

# **TESIS DOCTORAL**

## **Desarrollo de técnicas farmacológicas para la identificación y cribado de fármacos mediante microarrays de membranas celulares**

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**María Dolores García Fernández**

**2016**



Este trabajo ha sido realizado con una beca predoctoral para personal investigador en formación en cooperación con el entorno productivo y social Zabalduz de la UPV/EHU (Convocatoria 2012). Se ha contado con la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (Innpacto IPT-2011-1205) y del Gobierno Vasco (IT584-13).



Llegado este momento no queda más que recordar a toda la gente que ha hecho, de una manera u otra, que fuera posible llevar a cabo esta tesis. Hace algo más de tres años hice las maletas y vine a Bilbao, a 800 km de mi hogar, con la ilusión de comenzar una nueva etapa profesional la cual terminaría siendo personal también...

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis. Gracias al Dr. Iván Manuel por enseñarme gran parte, sino todo, de lo que sé, por tu apoyo y por tu implicación conmigo, sé que sin ti no habría sido posible llegar aquí hoy. Agradecer del mismo modo al Dr. Gabriel Barreda por abrirme las puertas de su empresa, apostar por mí para este proyecto y sumergirme en el mundo de la farmacología.

A la convocatoria Zabalduz por darme la oportunidad y el soporte para realizar este proyecto.

Una de las ventajas que ofrece hacer una tesis compartida en una empresa y un grupo de investigación de la universidad, entre otras muchas, es que tienes dos grupos de personas con los que trabajar, aprender y a los que conocer.

Gracias al Dr. Rafael Rodríguez Puertas por acogerme en el grupo de Neuroquímica y Neurodegeneración y brindarme los medios necesarios para la realización de este proyecto. A la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Giralt por tener siempre unas palabras de interés. Por otro lado, aquí no podría sino recordar a mis compañeros de laboratorio con los que he compartido tantas horas de trabajo, cafés, comidas,... por todos esos ratos que hemos pasado juntos y por su apoyo. Esti, gracias por tus consejos y ánimos constantes. Alberto, por tu forma de vivir la ciencia que es inspiradora y por intentar ayudarme en todo lo posible. Jonatan y Laura, a pesar de no haber coincidido mucho, el tiempo que hemos pasado juntos ha sido un placer teneros de compañeros. Por último, pero no por ello menos importante, a ti Marta, por todos los momentos pasados y los que nos quedan por pasar, por estar siempre dispuesta a charlar, quedar o lo que sea, por apuntarte a todas las aventuras que te he propuesto y así una larga lista, tu amistad es algo muy importante que me llevo de aquí.

En IMG Pharma, agradecer al Dr. Egoitz Astigarraga por acogerme desde el principio como un miembro más. A Tarson por ser la primera persona en enseñarme cuando llegué, por animarme tras días y días sin ver el sol, por ser un amigo. Ainara, el poco tiempo que hemos coincidido has sido una gran compañera.

Y, llegado a este punto, no puedo olvidar a la gente que he conocido a través de IMG. Bárbara, me abriste tu casa sin conocerme y desde entonces comenzó una amistad que sé que durará años, gracias por todo este tiempo y por tus consejos. Andrea, por todas las cosas que me enseñaste y todos los buenos ratos que pasamos. Si no llega a ser por vosotras dos probablemente habría vuelto a Murcia hace mucho pero vosotras me enseñasteis a luchar por conseguir mi sueño, por ello, gracias. Yoana, siempre tan risueña que alegras el día a quien tenemos la suerte de haber trabajado contigo. Silvia, eres una luchadora y conseguirás lo que te propongas, no cambies.

Por otro lado, agradecer a la gente que he tenido la suerte de conocer en Bilbao. Aitor, Imanol y Jorge por todos esos ratos que hemos pasado, por los “jueves de cañas” que hacían (y seguirán haciendo) más amena la semana y por contar conmigo para todo. A ti Ana, vivir contigo este último año ha sido genial, y aunque no entendieras mucho de qué te hablaba siempre escuchabas.

Y cómo no, tengo que recordar también a toda esa gente que desde la distancia me han apoyado. Ro, toda una vida de cosas junto a ti y las que quedan por venir, gracias por estar siempre para una llamada de teléfono en cualquier momento o lo que haga falta, sin olvidar aquella visita sorpresa que tanta ilusión me hizo. David, por esas conversaciones casi diarias siempre apoyándome. De la misma manera, a mi grupo de “Biólogas por el mundo” por todo el apoyo y por recordarme siempre por qué estoy aquí, fue con vosotras cuando empecé en todo este mundo y estoy segura de que os va a ir genial, os lo merecéis. Mención especial a Vero y Cori por los ánimos constantes, por hablar de cualquier cosa con tal de que sea un día mejor y a Mari Ángeles por tu visita en esta etapa final. Por último, a Raquel y Belén que siempre me habéis acompañado. Gracias a todos por hacer que la distancia no sea inconveniente, porque los amigos de verdad se sienten cerca aunque haya 800 km por medio.

Carlos, conocerte fue una casualidad que se ha convertido en lo mejor de mi aventura en Bilbao, gracias por darme tu apoyo y comprenderme en todo este período, sobre todo al final, animarme y no permitir que tirara la toalla, gracias por ser el motivo por el que tenía ganas de regresar cuando iba a mi casa, pero sobretodo, gracias por ser mi familia cuando no he tenido a la mía cerca.

Por último agradecer a mi familia. Mamá y papá porque a pesar de que no soy muy buena dejándome aconsejar y siempre he tomado todo tipo de decisiones sin apenas consultaros, me habéis dado vuestro apoyo, sé que seguramente os gustaría que fuera un poco menos independiente pero creedme si os digo que os tengo siempre presentes, valoro muchísimo todo lo que habéis hecho por mí, por nosotros 3 y os quiero. A María, más que un agradecimiento una disculpa por todas esas veces que no podido estar, pero ya sabes que sea aquí, en Murcia o en cualquier lugar tienes una hermana para lo que necesites y Juanan, porque a pesar de ser mi hermano pequeño has asumido el rol del mayor en mi ausencia y has cuidado de mí también, estoy muy orgullosa de vosotros. No puedo olvidarme tampoco de ti Merce porque eres la mejor tía del mundo.





# ÍNDICE

## Introducción

1. Receptores acoplados a proteínas G	
1.1 Estructura y proteínas G.....	1
1.2 Tipos de GPCR.....	2
1.3 Técnicas para el estudio de GPCR .....	9
2. Microarrays	
2.1 Microarrays de ADN.....	13
2.2 Microarrays de proteínas.....	14
2.3 Microarrays de células .....	16
2.3 Microarrays de proteínas de membrana – GPCR .....	17
3. Mitocondria: cadena de transporte de electrones	
3.1 Cadena de transporte de electrones mitocondrial.....	21
3.2 Inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	34
3.3 Mitocondria y Metabolismo.....	40
3.4 Mitocondria y formación de Especies Reactivas de Oxígeno .....	40
3.5 Cannabinoides en la mitocondria .....	42
<b>Objetivos</b> .....	49

## Animales y líneas celulares

1. Muestras de tejido de rata.....	53
2. Muestras de tejido cerebral de ratón <i>knockout</i> CB <sub>1</sub> .....	53
3. Muestras de tejido de mono .....	54
4. Líneas celulares .....	55

## Materiales y métodos

1. Radioligandos.....	61
2. Fármacos y reactivos .....	61
3. Inhibidores, aceptores y dadores de electrones utilizados en los ensayos mitocondriales.....	62
4. Extracción de membranas celulares .....	63
5. Fabricación de microarrays de membrana celulares.....	64
6. Marcaje autorradiográfico en microarrays de membranas celulares.....	65
7. Determinación de las actividades enzimáticas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en microarrays de membrana .....	69
8. Cuantificación microarrays de membrana celulares.....	70
9. Estudio de competición en homogeneizados de membrana.....	73
10. Estudio de viabilidad de mitocondrias .....	74
11. Determinación de las actividades enzimáticas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en homogeneizados de membrana .....	75

## Resultados

### 1. Optimización de protocolos de autorradiografía en microarrays de membranas celulares de rata

- 1.1 Optimización de protocolos de autorradiografía para receptores cannabinoides, muscarínicos, opioides y GABAérgicos ..... 83
- 1.2 Optimización de los protocolos de acople funcional para los receptores GABAérgicos, opioides, muscarínicos y cannabinoides ..... 85

### 2. Validación de los microarrays de membranas celulares de modelos animales y líneas celulares

- 2.1 Microarrays de membranas celulares de líneas celulares..... 95
- 2.2 Microarrays de membranas celulares de rata control ..... 100
- 2.3 Microarrays de membranas celulares de *Macaca fascicularis*..... 107
- 2.4 Estudio de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en microarrays de membranas celulares de *Macaca fascicularis*..... 113
- 2.5 Fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en microarrays de membranas de cerebelo de ratón *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub> ..... 115
- 2.6 Estudio de receptores cannabinoides en microarrays de membranas de hipocampos de ratón *wildtype*, *knockout* CB<sub>1</sub>, *knockout* transfectados con el receptor CB<sub>1</sub> o con el receptor CB<sub>1</sub> con la mutación DN22 ..... 115
- 2.7 Estudio de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en microarrays de membranas celulares de hipocampo de ratón *knockout* CB<sub>1</sub>. 117

### 3. Estudio del efecto de los ligandos cannabinoides sobre el complejo I mitocondrial mediante ensayos de fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR

- 3.1 Estudio de fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR en presencia de CP55940 en microarrays de membranas aisladas de hipocampos de ratón ..... 121
- 3.2 Estudio del efecto de ligandos cannabinoides sobre la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR al complejo I mitocondrial en homogeneizados de membranas ..... 122

### 4. Estudio de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Efecto de los inhibidores

- 4.1 Actividad malato deshidrogenasa..... 127
- 4.2 Actividad NADH deshidrogenasa..... 128
- 4.3 Actividad succinato deshidrogenasa ..... 129
- 4.3 Actividad citocromo c oxidasa..... 131

### 5. Efecto de ligandos cannabinoides sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial

- 5.1 Actividad NADH deshidrogenasa..... 141
- 5.2 Actividad succinato deshidrogenasa ..... 144
- 5.3 Citocromo c oxidasa..... 147

## **Discusión**

1. Optimización de protocolos de autorradiografía en microarrays de membranas celulares de rata.....	167
2. Validación de los microarrays de membranas celulares de modelos animales y líneas celulares	
2.1 Rata .....	173
2.2 Líneas celulares .....	177
2.3 <i>Macaca fascicularis</i> .....	183
2.4 Ratones <i>knockout</i> CB <sub>1</sub> .....	184
3. Estudio de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	
3.1 Estudio de la actividad mitocondrial en membranas celulares de corazón de rata .....	187
3.2 Efecto de los ligandos cannabinoides sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	193

<b>Conclusiones</b> .....	207
---------------------------	-----

<b>Bibliografía</b> .....	211
---------------------------	-----



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), son receptores de 7 dominios transmembrana que se caracterizan por tener como efector primario proteínas G heterotriméricas con actividad GTPasa. Son la mayor familia de receptores de membrana y representan aproximadamente el 4% de las proteínas codificadas por el genoma humano (Zhang y Shie, 2012). Actúan como receptores de diferentes ligandos, incluyendo hormonas, neurotransmisores, lípidos, alcaloides, péptidos y aminas biógenas, e incluso de moléculas sensoriales olorosas, feromonas y luz (Sóvágó et al., 2001; Heilker et al., 2009, Zhang et al., 2015). Por este motivo, los GPCR son dianas farmacológicas de entre el 40 y 50% de los fármacos comercializados (Zhang y Shie, 2012; Zhang et al., 2015), indicados para el tratamiento de patologías tales como dolor, asma, inflamación, obesidad y cáncer, así como de enfermedades gastrointestinales, metabólicas y del sistema nervioso (Klabunde y Hessler, 2002; Fang et al., 2003).

### 1.1 Estructura y proteínas G

Los GPCR presentan una estructura con una serie de características comunes. Concretamente, están integrados por una cadena polipeptídica que forma 7 hélices  $\alpha$  transmembrana conectada por 3 bucles intracelulares y 3 extracelulares (Sóvágó et al., 2001). La región N-terminal está localizada en la zona extracelular y la C-terminal en la intracelular. La N-terminal, junto con los bucles extracelulares, son los encargados de reconocer una amplia variedad de ligandos (Zhang et al., 2015). Mientras que la interacción con la proteína G sería realizada por los bucles intracelulares y la región C-terminal (Gether, 2000).

La señal del receptor es transducida y amplificada por las proteínas G. La proteína G es una proteína heterotrimérica formada por 3 subunidades, la subunidad  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  puede unirse a nucleótidos de guanina y tiene actividad GTPasa (Sóvágó et al., 2001). Las proteínas G se clasifican en 4 familias según el subtipo de subunidad  $G\alpha$ , éstas son las  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  y  $G\alpha_{12/13}$  (Heng et al., 2013; Kamato et al., 2015). El subtipo de proteína G determina la ruta de transducción de un receptor. Así, en rasgos generales, la

proteína  $G\alpha_s$  provoca la activación de la adenilato ciclasa, con el consecuente aumento del AMP cíclico (AMPC); la  $G\alpha_{i/o}$  realiza la acción contraria inhibiendo la adenilato ciclasa; la  $G\alpha_{q/11}$  activa la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ) y la  $G\alpha_{12/13}$  activa el factor de intercambio de nucleótidos de guanina RhoGEF, que a su vez activa la proteína RhoA. Por otro lado, las subunidades  $\beta\gamma$  modulan varios enzimas y canales iónicos (Harrison y Traynor, 2003; Zhang and Shie, 2012).

En el estado inactivo la subunidad  $G\alpha$  del heterotrímero tiene unido GDP. La unión de un agonista al GPCR induce un cambio conformacional del mismo que da origen a la disociación de la molécula de GDP de la subunidad  $G\alpha$  y la unión de GTP. Se produce entonces la separación de la subunidad  $G\alpha$  de las subunidades  $\beta\gamma$  las cuales están disponibles para interactuar con los diferentes sistemas efectores. La subunidad  $G\alpha$ , que tiene actividad GTPasa, transforma el GTP en GDP, lo que provoca un nuevo cambio conformacional que permite la unión de las 3 subunidades cerrándose el ciclo y volviendo al estado inactivo. Si bien este proceso se produce tras la ocupación por parte de un agonista de los GPCR, los receptores pueden asumir conformaciones activas en ausencia de agonista y activar constitutivamente la proteína G (Sóvágó et al., 2001; Harrison y Traynor, 2003).

## **1.2 Tipos de GPCR**

Se han identificado numerosos tipos de GPCR. En base a la estructura y a la homología de la secuencia se clasifican principalmente en 3 grupos: grupo A en el que están incluidos los receptores tipo rodopsina; grupo B para los receptores tipo secretina y grupo C en el que forman parte los metabotrópicos de glutamato. Los estudiados en la presente Tesis se encuadran dentro del grupo A (muscarínicos, cannabinoides, opioides y de esfingosina) excepto los receptores GABAérgicos que pertenecen al grupo C.

### **1.2.1 Receptores GABAérgicos tipo B**

Son los receptores metabotrópicos del neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Bowery, 2006). La estructura del receptor GABA<sub>B</sub> fue completamente identificada en 1998 cuando se mostró su existencia como un heterodímero con dos subunidades, GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub>, las cuales

proporcionan diferentes funciones pero son mutuamente dependientes (Bowery, 2006). La subunidad GABA<sub>B1</sub> es responsable de la unión del agonista, mientras que la subunidad GABA<sub>B2</sub> interviene en el acople a la proteína G (Charles et al., 2003).

La unión del ligando en la subunidad GABA<sub>B1</sub> provoca un cambio conformacional en la subunidad GABA<sub>B2</sub> que activa la proteína G $\alpha_{i/o}$  provocando la consiguiente inhibición de la adenilato ciclasa. Asimismo, produce una disminución de la conductancia de la membrana al Ca<sup>2+</sup> y un incremento al K<sup>+</sup>, hiperpolarizando de este modo la célula (Bowery et al., 2002; McCarson y Enna, 2014). A nivel de los terminales nerviosos, la activación del receptor GABA<sub>B</sub> inhibe la liberación de neurotransmisores (McCarson y Enna, 2014).

Los receptores GABA<sub>B</sub> están localizados pre y postsinápticamente en todo el Sistema Nervioso Central (SNC) (McCarson y Enna, 2014). En cerebro de mamíferos hay una gran densidad de lugares de unión para GABA<sub>B</sub> en núcleos talámicos, corteza cerebral, núcleo interpeduncular y asta dorsal de la médula espinal. En órganos periféricos modula la respuesta autónoma de las musculatura lisa del sistema digestivo (Bowery et al., 2002).

Son varios los agonistas sintéticos descritos hasta el momento como 3-APPA, 3-APMPA o baclofen siendo este último el más potente. Los agonistas del receptor GABA<sub>B</sub> manifiestan un elevado número de efectos farmacológicos actuando principalmente como relajantes musculares, en procesos de antinocicepción, disminuyendo la necesidad de consumo de drogas de abuso, en la reducción de la conducta cognitiva y como anticonvulsionantes (Bowery et al., 2002; McCarson y Enna, 2014).

Como antagonistas con elevada afinidad están descritos el CGP54626 y el CGP55845, entre otros (Bowery et al., 2002).

### **1.2.2 Receptores Muscarínicos**

El sistema colinérgico se caracteriza por el neurotransmisor acetilcolina, el cual media sus acciones a través de la activación de dos tipos de receptores: los receptores nicotínicos (ionotrópicos) y los receptores muscarínicos (metabotrópicos) (Caulfield y Birdsall, 1998).

Se han descrito 5 subtipos de receptores muscarínicos (M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub>), los subtipos M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> están acoplados principalmente a proteínas G<sub>q/11</sub>, pero

los receptores M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub> lo hacen a la proteínas G<sub>i/o</sub> (Caulfield y Birdsall, 1998; Brown et al., 2010).

Los receptores M<sub>1</sub> se expresan abundantemente en corteza cerebral, hipocampo y estriado (Abrams et al., 2006), regulando importantes procesos fisiológicos como la memoria y el aprendizaje. Concretamente, tienen una acción relevante en procesos de memoria que incluyen las interacciones entre corteza cerebral e hipocampo (Eglen, 2012).

El subtipo M<sub>2</sub> está ampliamente expresado en SNC. En hipocampo y corteza se localiza presinápticamente en neuronas colinérgicas. En la periferia se expresa principalmente en miocardio (Abrams et al., 2006; Eglen, 2012).

El receptor M<sub>3</sub> está ampliamente distribuido en el SNC aunque en menor cantidad que otros subtipos, presentando una elevada expresión en hipotálamo, por lo que se ha sugerido un papel central en la regulación de la ingesta de alimentos. Se cree que está implicado en promover el crecimiento longitudinal debido a que su activación modula la liberación de hormona del crecimiento así como en la masa ósea (Eglen, 2012). Por otro lado, están presentes en hipocampo donde se ha descrito que median en el aprendizaje y la memoria (Poulin et al., 2010). En la periferia, se ha descrito su presencia en el músculo liso de la vejiga urinaria donde juega un papel importante en la contracción refleja (Eglen, 2012).

El subtipo M<sub>4</sub> en SNC está distribuido principalmente en estriado colocándose con receptores de dopamina en las neuronas de proyección estriatal. Igualmente, se encuentra ampliamente distribuido en el núcleo accumbens, corteza e hipocampo (Dencker et al., 2012). En la periferia, está presente en varias terminaciones nerviosas donde actúa inhibiendo la transmisión parasimpática y simpática (Eglen, 2012).

Por último, el receptor M<sub>5</sub> es el único subtipo expresado por las neuronas dopaminérgicas de la región *pars compacta* de la sustancia *nigra*. También predomina en el área tegmental ventral y en hipocampo. En la periferia está expresado en bajos niveles en el iris, esófago y linfocitos (Abrams et al., 2006).

La mayoría de agonistas y antagonistas descritos para los receptores muscarínicos no presentan una elevada selectividad por un subtipo en particular (Hulme et al., 1990; Jakubík et al., 2008). Entre ellos se encuentran los agonistas carbacol y oxotremorina y los antagonistas escopolamina y atropina. Sin embargo, existen ciertas neurotoxinas, como por ejemplo la

MT74 que actúa como antagonista específico del subtipo M<sub>1</sub> (Caulfield y Birdsall, 1998).

En resumen, en el SNC los receptores muscarínicos están involucrados principalmente en el control motor, la regulación de la temperatura, la regulación cardiovascular y el aprendizaje y la memoria. En la periferia, los receptores muscarínicos median la contracción del músculo liso, la secreción glandular y la modulación de la tasa y fuerza cardíaca. Por tanto, el estudio de estos receptores suscita un elevado interés debido a su implicación en trastornos como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, asma, analgesia, trastornos de motilidad intestinal y función de la vejiga urinaria y cardíaca (Caulfield y Birdsall, 1998; Eglén, 2012).

### **1.2.3 Receptores Opioides $\mu$**

Los opioides son los analgésicos más efectivos y potentes, habiendo sido utilizados durante miles de años para el tratamiento del dolor y trastornos relacionados. Además, se utilizan frecuentemente para el tratamiento de otros numerosos desórdenes incluyendo diarrea, tos y cáncer (Al-Hasani y Bruchas, 2011).

Se han descrito 4 subtipos de receptores opiáceos ( $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$  y NOP), todos ellos pertenecen a la familia de los GPCR y transducen la información a través de proteínas G<sub>i/o</sub> (McDonald y Lambert, 2005). En los últimos años se ha descrito que pueden formar heterodímeros entre ellos o con otros tipos de GPCR (Al-Hasani y Bruchas, 2011; Fujita et al., 2014).

El receptor opioide  $\mu$  se encuentra principalmente en neuronas dopaminérgicas. Es el subtipo que más extensamente ha sido estudiado debido a su papel mediando acciones analgésicas (Feng et al., 2012). Se localizan presinápticamente en neuronas primarias aferentes en el asta dorsal de la médula espinal donde inhiben la liberación de glutamato y, por tanto, la transmisión de estímulo nociceptivo desde las fibras C y A $\delta$  (McDonald y Lambert, 2005). Por otro lado, está ampliamente distribuido en todas las áreas del cerebro que participan en sistemas de recompensa y adicción, lo que incluye desde el área ventral tegmental hasta el núcleo accumbens. Asimismo están involucradas las áreas de corteza prefrontal, hipocampo y amígdala. Es muy abundante también en caudado-putamen, *locus coeruleus* y núcleos talámicos (Contet et al., 2004; McDonald y Lambert, 2005). En la periferia se

encuentra en las neuronas mientéricas del intestino y en los conductos deferentes (Dhawan et al., 1996).

Son estimulados por una familia de péptidos endógenos opioides (Contet et al., 2004). Uno de los agonistas sintéticos más ampliamente utilizados es el péptido alcaloide morfina, extraído y purificado de la flor del opio (*Papaver somniferum*) (Thomasy et al., 2007). Además, existen otros agonistas sintéticos como el péptido [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-Enkephalin (DAMGO) o el alcaloide codeína. En el caso de los antagonistas el primero descrito fue la naloxona aunque también existen otros como la naltrexona (Dhawan et al., 1996).

El sistema opioide juega un papel central en la modulación del estado de ánimo y el bienestar así como en la regulación del dolor. Asimismo están implicados en el funcionamiento de la respiración, tránsito intestinal, alimentación, aprendizaje, memoria, actividad locomotora, termorregulación, secreción hormonal, funciones inmunes y cardiovasculares (Dhawan et al., 1996; McDonald y Lambert, 2005).

#### **1.2.4 Receptores Cannabinoides**

Hasta la fecha se han descrito dos tipos de receptores cannabinoides, el subtipo CB<sub>1</sub> y el CB<sub>2</sub>. Sus ligandos endógenos son el N-araquidonoiletanolamina (anandamida) y el 2-araquidoil glicerol (2-AG), que se producen a demanda en función de requerimientos celulares (Console-Bram et al., 2012).

En cuanto a los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, ambos se acoplan principalmente a proteínas del subtipo G<sub>i/o</sub> (Pertwee et al., 2010; Fonseca et al., 2013b). No obstante, el receptor CB<sub>1</sub> además tiene la capacidad de acoplarse a G<sub>s</sub> aunque solamente bajo condiciones específicas en las que ya están activadas las G<sub>i/o</sub> (Mackie y Stella, 2006).

El receptor CB<sub>1</sub> se encuentra principalmente en las terminales de las neuronas periféricas y centrales, donde normalmente median la inhibición de la liberación de un gran número de neurotransmisores excitatorios e inhibitorios (Pertwee et al., 2010). El CB<sub>1</sub> se encuentra altamente expresado en áreas relacionadas con funciones como la coordinación motora, el control del ánimo, funciones autónomas, memoria, funciones sensoriales y cognición. Se ha descrito una alta densidad de CB<sub>1</sub> en corteza, hipocampo, ganglios basales

y cerebelo (Pertwee et al., 2010). En la periferia, el receptor CB<sub>1</sub> está distribuido en diversos tejidos y órganos como el endotelio vascular, intestino, hígado o en tejidos del sistema reproductor, entre otros, aunque en niveles más bajos que en el SNC (Howlett et al., 2002; Pertwee et al., 2010; Fonseca et al., 2013b).

Además de esta distribución, recientemente se ha descrito la presencia del receptor CB<sub>1</sub> en la membrana externa mitocondrial, lo que parece indicar que este receptor también presenta un papel importante en la regulación del metabolismo energético (Bénard et al., 2012).

En cuanto al subtipo CB<sub>2</sub>, se encuentra localizado predominantemente en células del sistema inmune. Asimismo se ha detectado ARNm en células del cerebelo así como en el tronco cerebral (Mackie y Stella, 2006; Fonseca et al., 2013b).

En general, los agonistas para estos receptores son poco selectivos mientras que los antagonistas son muy selectivos (Console-Bram et al., 2012). Los agonistas cannabinoides se clasifican en varios grupos. Por un lado, los cannabinoides clásicos, alcaloides de la planta *Cannabis sativa* ( $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC),  $\Delta^8$ -THC, cannabinal y cannabidiol) y derivados sintéticos del  $\Delta^9$ -THC como el 11-hidroxi- $\Delta^8$ -THC-dimetilheptilo (HU210), el 11-hidroxihexahidrocannabinol-dimetilheptilo (HU243) y la nabilona. Por otro lado, los cannabinoides no-clásicos, en el que el principal ligado de este grupo es el CP55,940, y por último, los aminoalquilindoles, en el que se encuentra como principal ligando el WIN55,212-2 (Fig. 1-1).

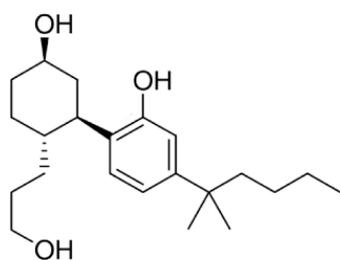
En cuanto a los agonistas selectivos de subtipo, el araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA) y la araquidonilciclopropilamida (ACPA) se consideran agonistas selectivos del CB<sub>1</sub> mientras que el JWH051 y el HU308 se definen como agonistas selectivos CB<sub>2</sub> (Howlett et al., 2002; Pertwee et al., 2010).

Con respecto a los antagonistas, los específicos para el receptor CB<sub>1</sub> son el SR141716A, AM251 y AM281 (Fig. 1-1), mientras que para el receptor CB<sub>2</sub> es el SR144528 (Howlett et al., 2002; Pertwee et al., 2010).

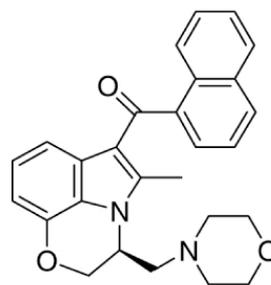
No obstante, se ha sugerido que el GPCR huérfano GPR55 media acciones cannabinoides a pesar de su escasa homología con los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Este receptor se expresa en cerebro e hígado humanos, aunque también se ha descrito su presencia en otros tejidos del sistema vascular de la rata, en bazo e intestino. Se ha demostrado además, su activación por parte de ciertos agonistas cannabinoides (Fonseca et al., 2013b). En este sentido,

ligandos endocannabinoides como la anandamida también pueden activar otras proteínas como el canal iónico receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) o algunos subtipos del receptor activador de la proliferación del peroxisoma (PPAR) también puede ser activado por endocannabinoides para la regulación del metabolismo de lípidos y de la glucosa, así como en respuestas inflamatorias (D'Addario et al., 2014).

### AGONISTAS

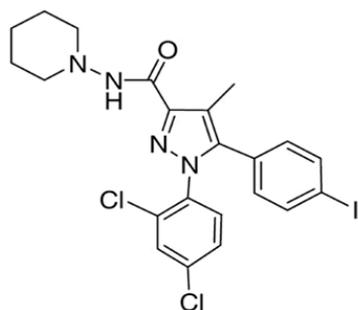


CP 55,940

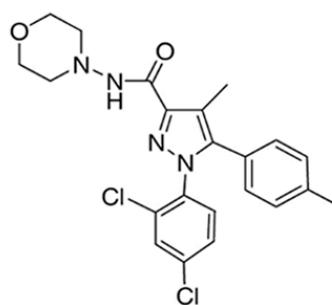


WIN55212-2

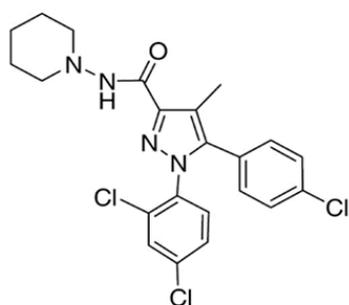
### ANTAGONISTAS



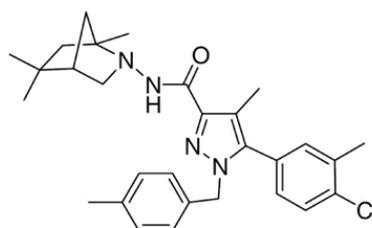
AM251



AM281



SR141716A



SR144528

Fig. 1-1. Estructura química de los agonistas cannabinoides CP55,940 y WIN55,212-2 y de los antagonistas AM251, AM281, SR141716A y SR144528.

### **1.2.5 Receptores Esfingosina 1-fosfato tipo 1**

Se han descrito 5 tipos de receptores para el ligando endógeno esfingosina 1-fosfato (S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>5</sub>). Anteriormente eran conocidos como proteínas del gen de diferenciación endotelial (Edg), subfamilia de proteínas de la que también forman parte los receptores del ácido lisofosfatídico (LPA) (O'Sullivan y Dev, 2013).

El receptor S1P<sub>1</sub> se acopla a proteínas G<sub>i/o</sub>. Este receptor está ampliamente distribuido en el SNC así como en algunos órganos y tejidos periféricos. Cabe destacar su implicación en la regulación de las funciones del sistema inmune y cardiovascular, así como en el mantenimiento de la integridad endotelial (González-Cabrera et al., 2008; Prager et al., 2015). Muestra de su importancia es el hecho de que la delección del gen que lo codifica en ratones implica letalidad en la forma embrionaria (Rosen et al., 2013).

Se han descrito varios agonistas y antagonistas para estos receptores. El agonista FTY720 tiene efecto inmunomodulador secuestrando los linfocitos en el timo y en los órganos linfoides secundarios, impidiendo de esta forma, su recirculación por los lugares periféricos de inflamación (González-Cabrera et al., 2008). Esto ha llevado a su aprobación como tratamiento para algunos casos de esclerosis múltiple tanto en Estados Unidos como en Europa (Prager et al., 2015). Además de este ligando, se dispone de otros agonistas como el CYM-5442 y el SEW2781 y antagonistas como el W146 (Kihara et al., 2014).

### **1.3 Técnicas para el estudio de GPCR**

Como se ha mencionado anteriormente, los GPCR son una familia de proteínas de membrana que destacan por su importancia terapéutica, lo que les otorga gran importancia como una de las dianas farmacológicas fundamentales en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Por este motivo, han sido desarrolladas diferentes técnicas para su estudio.

### **1.3.1 Ensayos de unión de ligandos al receptor**

Los ensayos de fijación de ligandos al receptor se basan en el estudio de la unión de una molécula marcada al receptor diana. Estas técnicas pueden ser utilizadas para caracterizar en gran detalle la interacción entre el receptor y su ligando. Los ligandos más utilizados son los que tienen unidas moléculas radiactivas como tritio ( $^3\text{H}$ ) o yodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ) (Zhang et al., 2012), siendo habitual su empleo junto con homogeneizados de membranas celulares para la caracterización farmacocinética y farmacodinámica del ligando. Es posible determinar las constantes de asociación y disociación ( $K_d$ ) así como la densidad máxima de receptores en una muestra ( $B_{\text{max}}$ ) mediante la realización de experimentos de saturación o competición (Manuel et al., 2015).

Una variante de esta técnica es la autorradiografía de receptor que se lleva a cabo en secciones de tejidos y que permite obtener los parámetros farmacológicos anteriormente mencionados con resolución anatómica. El uso más común en la autorradiografía ha sido producir mapas cuantitativos de la distribución de receptores. Asimismo, es muy útil para cuantificar áreas muy pequeñas que no pueden ser diseccionadas de una manera eficiente.

En ambos casos es posible la utilización tanto de agonistas como de antagonistas. Sin embargo, presenta varias limitaciones importantes como son la disponibilidad de ligandos selectivos y la contaminación asociada a la utilización de radioisótopos (Eglen et al., 2007).

### **1.3.2 Ensayos funcionales dependientes de la proteína G**

En este tipo de ensayos se determina la interacción ligando-receptor estudiando alguna de las proteínas o segundos mensajeros de la cascada de señalización.

Los estudios de acople funcional a la proteína G evalúan la interacción del ligando y el receptor en el primer eslabón de la cadena de señalización. Para ello, se utiliza el radioligando [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S que es un análogo no hidrolizable de GTP. La unión de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S refleja la activación de la proteína G por el receptor. Se han utilizado otros radioligandos como el [ $^3\text{H}$ ]-Gpp(NH)p o el [ $^3\text{H}$ ]-GTP, sin embargo, el más empleado es el [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S debido a que el isótopo  $^{35}\text{S}$  tiene una actividad específica alta lo que implica tiempos de exposición muy cortos (García-Jiménez et al., 1997).

Los parámetros farmacológicos que se pueden determinar en estos ensayos son la eficacia definida como efecto máximo ( $E_{max}$ ) y la potencia ( $EC_{50}$ ) que indica la concentración del fármaco que produce la mitad del  $E_{max}$  (Strange, 2010). Se pueden diferenciar los tipos de ligandos en agonista total, si produce una respuesta máxima y tienen eficacia máxima, lo cual es independiente de su potencia; parcial si producen menos del 100% de la respuesta biológica máxima incluso cuando existe una ocupación total de los receptores y antagonista que ocupan los receptores sin activarlos. Además, los agonistas inversos pueden inhibir la unión basal o constitutiva.

De la misma manera que los ensayos de unión del receptor, los ensayos de acople funcional se pueden realizar tanto en homogeneizados de membranas celulares como en secciones de tejido (Sim et al., 1995).

Con el objetivo de evitar la utilización de ligandos radiactivos se han desarrollado moléculas de  $GTP\gamma S$  con diferentes marcajes. Este es el caso del Eu- $GTP\gamma S$  que actúa de manera similar al  $[^{35}S]GTP\gamma S$  pero lleva unido el átomo fluorescente europio, el cual puede ser leído en un contador fluorescente (Koval et al., 2010).

El ensayo de acople funcional suele ser más factible para los receptores acoplados a las proteínas  $G_{i/o}$ , ya que son las proteínas G más abundantes en las células y la tasa de intercambio de GPD-GTP es más rápida. No obstante, pueden ser usados para GPCR que se acoplan a proteínas  $G_s$  y  $G_{q/11}$  en sistemas de expresión artificial, utilizando quimeras de receptor-proteína G, por inmunoprecipitación de  $[^{35}S]GTP\gamma S$  unido a la proteína G o asociado a la tecnología de “*Scintillation Proximity Assay*” (SPA) (Khawaja et al., 2008; Zhang et al., 2012).

Por otro lado, se han desarrollado otras técnicas indirectas para medir la activación de un receptor acoplado a subtipos  $G_s$  o  $G_{q/11}$  cuantificando algún tipo de molécula de la cascada de transducción como  $Ca^{2+}$ , inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) o AMPc, entre otros (Zhang et al., 2012).



## 2. Microarrays

La tecnología microarray permite el análisis de miles de muestras simultáneamente en un único experimento (Templin et al., 2002), lo que le convierte en una tecnología de cribado de alto rendimiento o “*high throughput screening*” (HTS) para el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Blohm y Giuseppi-Elie, 2001). Los primeros microarrays fueron desarrollados a finales de la década de los 90 y estaban formados por ADN, desde entonces, ha habido una evolución en cuanto al tipo de molécula que forma parte del microarray, la superficie sobre la cual se disponen o las técnicas de detección. En cuanto al analito inmovilizado, además de los microarrays de ADN y ARN, actualmente están disponibles en el mercado microarrays de proteínas, péptidos, carbohidratos, antígenos, anticuerpos, membranas celulares y células completas, entre otros (Zhu y Snyder, 2003; Wellhausen y Seitz, 2012; Manuel et al., 2015).

### 2.1 Microarrays de ADN

Los microarrays de ADN se desarrollaron como una herramienta para analizar la expresión de miles de genes simultáneamente en un único ensayo de hibridación. Entre las aplicaciones de estos arrays destacan el estudio de mutaciones, la identificación de organismos, la realización de perfiles genéticos, la detección de polimorfismos o copias de genes y la identificación de genes involucrados en enfermedades (Watson et al., 1998; Epstein y Butow, 2000; Blohm y Giuseppi-Elie, 2001). De hecho, una de las principales ventajas con respecto a las técnicas de secuenciación de la época, era que proporcionaban un aumento en la velocidad de trabajo experimental (Blohm y Giuseppi-Elie, 2001).

Cada microarray consiste en una matriz ordenada de miles de moléculas de ADN diferentes (productos de PCR u oligonucleótidos) dispuestos en un soporte sólido, normalmente de vidrio, recubierto con alguna sustancia que ayude a retener el ADN, como polilisina, silano o una superficie reactiva químicamente. A continuación, el ARN marcado con fluorescencia hibrida con su ADN complementario depositado en el soporte y, posteriormente, se detecta mediante un escáner de fluorescencia (Harrington et al., 2000).

Se han utilizado 3 protocolos de fabricación de microarrays de ADN:

- Impresión directa de la molécula de ADN sobre el soporte en forma de puntos.
- Síntesis *in situ* donde las moléculas son sintetizadas directamente sobre la superficie del soporte.
- Síntesis de ADN sobre perlas y posterior depositado de dichas perlas en el soporte.

No obstante, ha habido una transición gradual de los microarrays creados con hebras de ADN a los formados por oligonucleótidos ya que éstos últimos proporcionan una mayor especificidad debido a la posibilidad de crear oligonucleótidos específicos de la región objeto de estudio (Bumgarner, 2013).

Para la elaboración de microarrays de ADN se necesitan 5 componentes: la superficie donde se van a depositar las muestras de ADN, el dispositivo que fabrica el microarray, un sistema de hibridación de la muestra problema con el microarray, un escáner y un programa de software para cuantificar e interpretar los resultados (Blohm y Giuseppi-Elie, 2001).

Las limitaciones del uso de microarrays de nucleótidos (ADN o ARN) son que proporcionan una medida indirecta de la concentración relativa ya que la señal es sólo lineal dentro de un rango de concentraciones concreto, la dificultad de diseñar arrays de genomas complejos en los cuales hay genes con mucha homología de secuencia y, por último, el microarray puede detectar tan solo las secuencias para las que ha sido diseñado (Bumgarner, 2013).

## **2.2 Microarrays de proteínas**

Los microarrays de proteínas se desarrollaron de forma simultánea a los de ADN (Kodadek, 2001). Estos microarrays aportan información importante con respecto a la expresión de proteínas ya que como bien es conocido, los niveles de expresión de ARNm en el interior de la célula no siempre correlacionan con la concentración de la proteína, por lo que es preferible cuantificar directamente cada proteína (Mitchell, 2002; Templin et al., 2002).

Las principales ventajas de este tipo de arrays son las inherentes a la tecnología microarray, es decir, la gran cantidad de información obtenida en un periodo breve de tiempo así como la baja cantidad de muestra necesaria para el análisis. En este sentido, cabe resaltar que se requiere menos de un

picogramo de proteína, es decir, alrededor de un millón de veces menos que lo utilizado en una microplaca de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) (Schweitzer y Kingsmore, 2002).

La medida de los niveles de proteínas se ha realizado tradicionalmente mediante ELISA o *western blot*. Sin embargo, el uso de microarrays de proteínas permite tanto la obtención de perfiles de expresión de proteínas y la detección de anticuerpos como la realización de estudios funcionales mediante ensayos enzimáticos (Templin et al., 2002; Schweitzer y Kingsmore, 2002; Zhu y Snyder, 2003).

Para los ensayos de funcionalidad es necesario tener la proteína en su conformación nativa evitando su desnaturalización. Por este motivo son de vital importancia no sólo las superficies de inmovilización sino también el grado de unión de las proteínas a la superficie (Mitchell, 2002; Wilson y Nock, 2002) ya que las interacciones entre ambas pueden modificar la estructura y/o actividad de las proteínas. Entre las superficies de uso común destacan los plásticos hidrofóbicos como el poliestireno en el que las proteínas se adsorben mediante enlaces de van der Waals, puentes de hidrógeno o los enlaces hidrofóbicos. Otras superficies son las de nitrocelulosa o polilisina. En todas ellas la fijación suele ser heterogénea y, a pesar de que no se requiere modificar la proteína, ésta puede perder su funcionalidad (Wilson y Nock, 2002; Zhu y Snyder, 2003). Otras superficies utilizadas son portaobjetos de vidrio o silicona tratados con aldehídos u otros agentes que inmovilicen las proteínas. La principal ventaja de estos métodos consiste en crear enlaces covalentes de manera que con pocas uniones se consiga inmovilizar la proteína, contribuyendo de este modo a mantener la conformación nativa. Asimismo, otra aproximación encaminada a mantener la funcionalidad de las proteínas, consiste en inmovilizar estreptavidina en la superficie de forma que, posteriormente, puedan inmovilizarse a dicho soporte diferentes proteínas que previamente han sido biotiniladas (Mitchell, 2002; Wilson y Nock, 2002).

En cuanto a los métodos de detección, uno de los más empleados es el basado en la detección de fluorescencia, debido a que es un método simple, seguro y sensible (Zhu y Snyder, 2003). No obstante, también se han utilizado otros métodos como la quimioluminiscencia, espectrometría de masas, radiactividad o electroquímica (Templin et al., 2002).

En investigación biomédica los microarrays de proteínas aceleran el diagnóstico inmunológico. Así por ejemplo, los microarrays con anticuerpos

inmovilizados, tras ser expuestos a una muestra biológica, permiten analizar en paralelo cientos de analitos requiriendo únicamente una mínima cantidad de muestra (Wilson y Nock, 2002; Templin et al., 2002).

### 2.3 Microarrays de células

Los microarrays de células fueron desarrollados por vez primera por el grupo de Sabatini (Ziauddin y Sabatini, 2001), como una herramienta para el análisis de la función genética en células de mamíferos.

Para la fabricación de este tipo de microarrays (Fig. 2-1) se depositan plásmidos con moléculas de ADNc del mismo modo que en los microarrays de ADN. A continuación, se cultiva con células HEK293, estas células crecen sobre los plásmidos transfectados y el resultado es un microarray de células vivas que sobreexpresa una proteína particular (Ziauddin y Sabatini, 2001; Baley et al., 2002). Las limitaciones de este proceso suelen estar en el proceso de transfección.

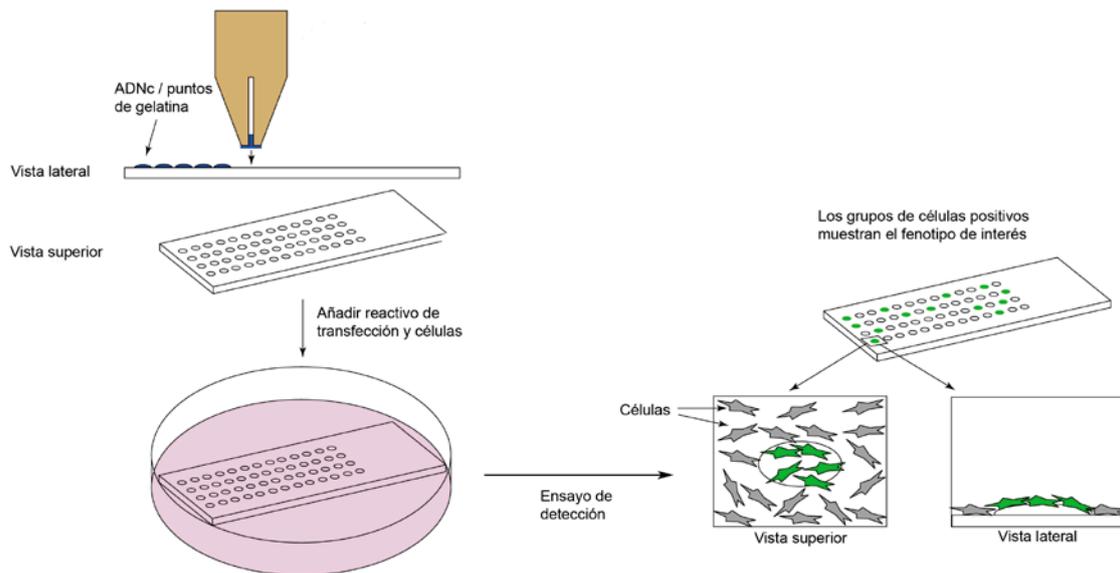


Fig. 2-1. Fabricación de microarrays de células. (Modificado de Bailey et al., 2002).

Utilizando este principio, se han desarrollado diferentes tipos de arrays de células utilizando otras moléculas en lugar de ADN como polímeros, glicanos, péptidos, anticuerpos, matriz extracelular, membranas y ARN (Castel et al., 2006).

Sobre dichos microarrays es posible realizar diferentes determinaciones. Así por ejemplo, se han realizado experimentos de autorradiografía sobre microarrays de células, por ejemplo, en microarrays de células que sobreexpresaban receptores serotoninérgicos (HT<sub>1A</sub>) y dopaminérgicos (D<sub>1</sub>) (Ziauddin y Sabatini, 2001; Bailey et al., 2002). Asimismo, es posible determinar la cuantificación del flujo de Ca<sup>2+</sup> cuando microarrays de células que sobreexpresan GPCR son incubadas con diferentes agonistas y antagonistas (Mishina et al., 2004).

La principal ventaja sobre el microarray de proteínas es que no es necesaria tener un gran número de proteínas purificadas para depositarlas en el soporte. Asimismo, resulta especialmente útil en el caso de proteínas de membrana ya que éstas necesitan un ambiente lipídico concreto para adquirir su conformación funcional. Por último, se puede expresar cualquier tipo de proteína transfectando el ADNc que la codifique (Ziauddin y Sabatini, 2001; Bailey et al., 2002). No obstante, es importante la determinación de proteínas mediante microscopía de fluorescencia para comprobar que la transfección se ha dado de manera correcta (Ziauddin y Sabatini, 2001).

## **2.4 Microarrays de proteínas de membrana – GPCR**

La fabricación de microarrays de proteínas de membrana funcionales requiere la inmovilización de las dianas de interés junto con los lípidos en las que están embebidas.

Las superficies a las que se pueden unir lípidos se clasifican en cuatro categorías: superficies altamente hidrofóbicas; superficies hidrofílicas; superficies híbridas con moléculas anfipáticas de anclaje y superficies en las que se deposita una bicapa lipídica sobre una matriz polimérica (Fig. 2-2) (Fang et al., 2002a). Un ejemplo, es el descubrimiento que desarrolló el grupo de Lahiri en 2002, una superficie de  $\gamma$ -aminopropilsilano que permite mantener la unión de las membranas manteniendo la estructura y función de sus proteínas (Fang et al., 2002b).

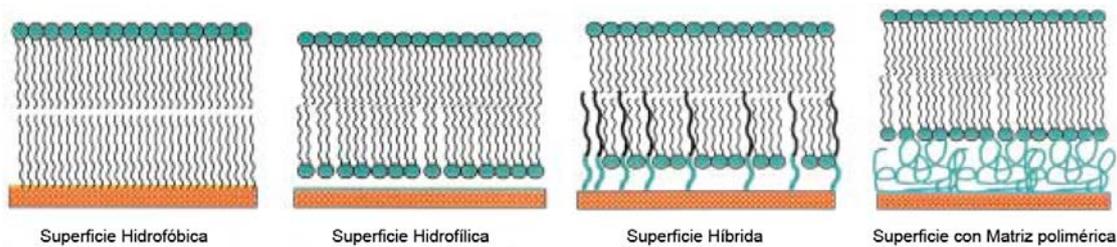


Fig. 2-2. Esquema de los principales tipos de soporte para la inmovilización de membranas. (Modificado de Fang et al., 2002a).

Los microarrays de membranas fueron desarrollados principalmente para el estudio de ligandos de proteínas de membrana, tales como los GPCR. Para ello es fundamental que el GPCR objeto de estudio mantenga una conformación adecuada y que ésta pueda modularse en función de diferentes ligandos. Esta asociación debe permanecer estable durante el experimento aunque no es deseable una inmovilización covalente de toda la membrana ya que la movilidad lateral es una propiedad intrínseca y fisiológica importante de las membranas nativas (Fang et al., 2003).

Se han realizado ensayos con microarrays en los que se han depositado diferentes GPCR con el objetivo de demostrar que este formato es válido para el estudio de las características farmacocinéticas y la especificidad de unión de un ligando. Sobre estos microarrays se han ensayado tanto radioligandos específicos para el estudio de receptores de clonidina y adrenérgicos ( $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2C}$ ) (Posner et al., 2007) como ligandos fluorescentes en los que se estudiaban receptores de neurotensina 1 (NT<sub>1</sub>), adrenérgicos ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\alpha_{2A}$ ) (Fang et al., 2002a); dopaminérgicos (D<sub>1</sub>) (Fang et al., 2002b); muscarínicos (M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>), opioide  $\delta$  y receptor de motilina (Fang et al., 2006) así como receptores de apelina, bradiquinina, urotensina, melanocortina,  $\beta_1$ , galanina, M<sub>1</sub> y opioide  $\mu$  (Hong et al., 2006).

Por otro lado, en este tipo de microarrays se ha demostrado que no sólo se mantiene la integridad de los GPCR, sino también el acople a sus proteínas efectoras mediante ensayos de acople funcional. En este sentido, Hong y colaboradores estudiaron el acople funcional de los receptores NT<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, opioide  $\mu$  y CB<sub>1</sub> a la proteína G mediante Eu-GTP $\gamma$ S en microarrays de membranas celulares aisladas de células que sobreexpresaban dichos GPCR. Concretamente, los microarrays fueron incubados con un cóctel de agonistas los cuales provocaron un aumento de la fijación de Eu-GTP $\gamma$ S en los 4 tipos de GPCR. Más aún, la incubación con el antagonista muscarínico atropina, como

era de esperar, sólo causó una disminución de la fijación de Eu-GTP $\gamma$ S en el receptor M<sub>2</sub> confirmando, de este modo, la robustez de esta metodología (Hong et al., 2005).

Una variante de este tipo de microarrays son los microarrays fabricados con depósitos de homogenizados de membranas celulares, con los que es posible estudiar las proteínas de membranas en diversos tejidos simultáneamente. Una de las principales ventajas es que las membranas celulares pueden provenir de muestras diversas, pudiendo ser aisladas de cualquier tejido animal o humano, o de células que sobreexpresan una proteína en concreto. Las membranas, una vez aisladas, son depositadas sobre un soporte sólido, normalmente de vidrio, tratado con un agente químico, el ácido ortofosfórico (Rodríguez-Puertas et al., 2008), el cual permite la inmovilización de las membranas celulares manteniendo la funcionalidad de las proteínas de membrana. Asimismo, en estos microarrays se ha desarrollado un método para la detección de GPCR mediante el estudio de acople funcional utilizando el radioligando [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (Rodríguez-Puertas et al., 2007). Concretamente, con este método se ha estudiado el efecto de diferentes ligandos para el receptor de galanina en microarrays de membranas celulares aisladas de tejido nervioso y periférico de rata (Rodríguez-Puertas et al., 2007). Asimismo, esta metodología ha sido aplicada con éxito en el estudio de la actividad de los receptores cannabinoides en diversos tejidos (Manuel et al., 2015).

Cabe destacar que los microarrays de membranas celulares proporcionan una poderosa herramienta en el campo del desarrollo y descubrimiento de fármacos debido a que posibilitan monitorizar simultáneamente numerosos GPCR, permitiendo así estudiar las características farmacológicas de diferentes ligandos en un solo experimento. Además de disminuir de este modo la variabilidad inter-experimental, reduce considerablemente la cantidad de muestra, lo que resulta especialmente útil para aquellas muestras de difícil extracción y/o de gran escasez. Asimismo, se consigue disminuir tanto la cantidad de reactivos necesarios para el experimento como los residuos generados en el mismo, contribuyendo de esta manera, no sólo a reducir costes sino también a respetar el medio ambiente.



### **3. Mitocondria: cadena de transporte de electrones**

La mitocondria es un orgánulo que se encuentra localizado en la mayoría de las células eucariotas. Existe un gran número de mitocondrias en todos los tipos celulares siendo más abundantes en los tejidos que necesitan más energía como en áreas del sistema nervioso o tejido muscular.

Este orgánulo tiene un diámetro de entre 0,5-1  $\mu\text{m}$  y una longitud de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$ . Está formada por una membrana externa y otra interna, entre las que hay un espacio denominado espacio intermembrana (EIM) (Krauss, 2001).

La membrana mitocondrial externa (MME) está en contacto con el citosol de la célula y es permeable a pequeñas moléculas e iones. A través de ella se produce la liberación de componentes al citoplasma que pueden inducir la apoptosis celular. Asimismo, tiene diferentes proteínas que facilitan el paso de las moléculas sintetizadas en el citoplasma.

La membrana mitocondrial interna (MMI) está altamente invaginada para aumentar su superficie, es mucho menos permeable que la externa y es el lugar donde se encuentran los diferentes complejos que forman la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Estos complejos, son los que están implicados en la síntesis de moléculas de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa (Saraste, 1999), descrito por primera vez por Peter Mitchell en 1961 (Mitchell, 1961). La oxidación de los cofactores provenientes de la glucólisis (NADH o FADH<sub>2</sub>) generan electrones que son transferidos de un centro redox a otro, este mecanismo está acoplado al bombeo de protones desde la matriz mitocondrial (sitio N) al EIM (sitio P), generándose un gradiente electroquímico y de pH que es utilizado para sintetizar ATP (Krauss, 2001).

#### **3.1 Cadena de transporte de electrones mitocondrial y fosforilación oxidativa**

La cadena de transporte de electrones mitocondrial está formada por un conjunto de complejos que son los encargados del proceso de fosforilación oxidativa (Fig. 3-1).

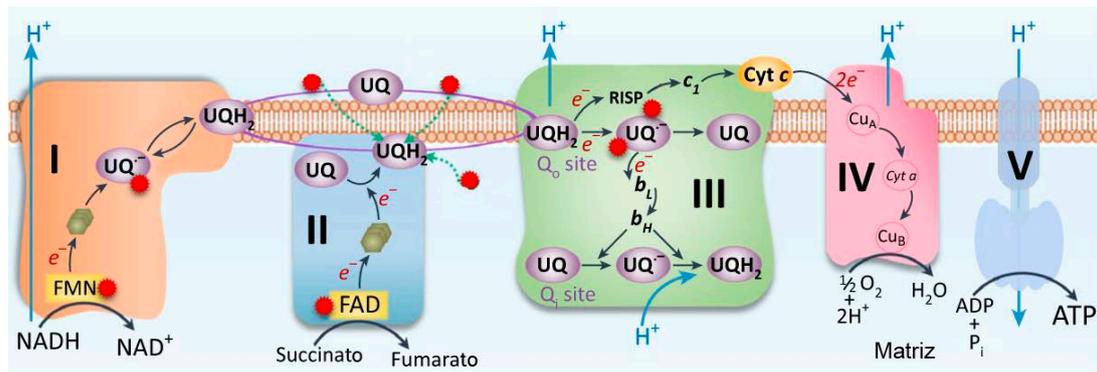


Fig. 3-1. Esquema del flujo de electrones a través de los diferentes complejos que integran la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En rojo, puntos de formación de especies reactivas de oxígeno. (Modificado de Wang y Hekimi, 2016).

### 3.1.1 Complejo I - NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona oxidorreductasa

En el complejo I, también denominado NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona oxidorreductasa, se produce la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>, proceso en el cual se transfieren 2 electrones a la molécula de ubiquinona (o coenzima Q) reduciéndola de este modo a ubiquinol lo que va acompañado del transporte de 4 protones al EIM (Rich y Maréchal, 2010). Este NADH puede provenir del generado en la matriz mitocondrial mediante el ciclo de Krebs o del citoplasma a través de las lanzaderas mitocondriales.

El complejo I está formado por 45 subunidades y tiene un tamaño de aproximadamente 1.000 kDa tomando como modelo el de las mitocondrias de corazón bovino. Mediante microscopía electrónica se ha observado que tiene estructura en forma de L, de manera que uno de los brazos es hidrofóbico y está embebido en la MMI mientras que el otro es hidrofílico y se proyecta hacia la matriz mitocondrial (Rich y Maréchal, 2010).

De las 45 subunidades, 7 son productos del genoma mitocondrial y corresponden a los componentes hidrofóbicos (ND1-ND6 y ND4L). En el dominio hidrofílico se encuentra el cofactor flavina mononucleótido (FMN) y una cadena de grupos hierro-azufre (Fe-S) (1 [2Fe-2S] y 6 [4Fe-4S]) que unen la FMN con el sitio de unión de la ubiquinona, además de un grupo 2Fe-2S en el lugar opuesto de la FMN. Este último grupo (N2) es el encargado de donar los electrones a la ubiquinona (Hirst, 2013), y por ello se cree que está próximo al lugar de unión de ésta (Rich y Maréchal, 2010) (Fig. 3-2).

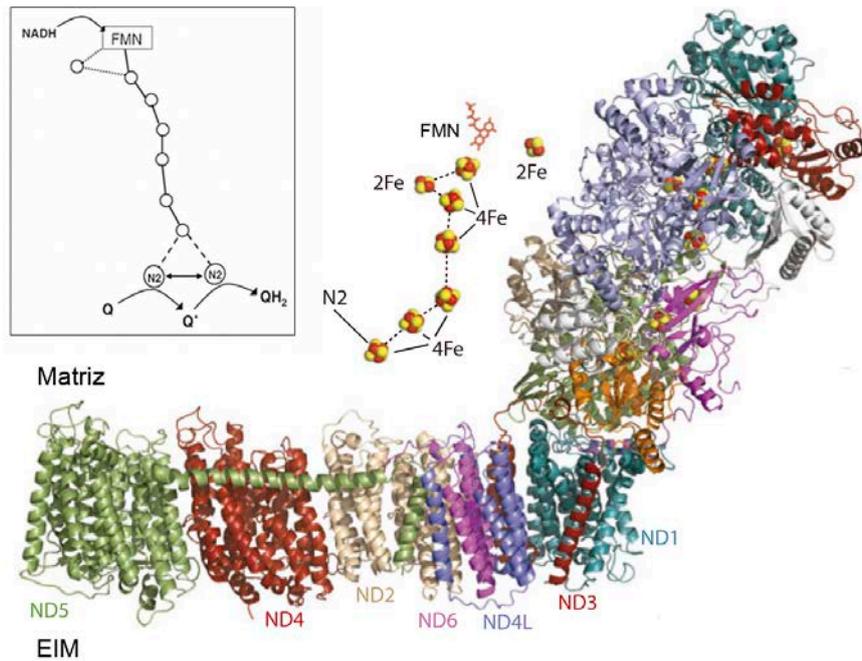


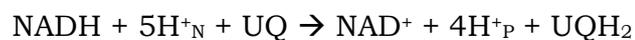
Fig. 3-2. Estructura del complejo I mitocondrial. Se muestra la disposición de la FMN y de los grupos Fe-S por donde pasan los electrones hasta el lugar N2, lugar donde se reduce la ubiquinona a ubiquinol. (Modificado de Fato et al., 2009 y Hirst, 2013).

La molécula de FMN es el punto de entrada de electrones, ya que el NADH es oxidado por la FMN y los dos electrones generados pasan secuencialmente a través de los grupos Fe-S hasta el lugar de unión de la ubiquinona donde es reducida a ubiquinol. Esta reducción tiene lugar en dos pasos, de manera que con la llegada del primer electrón pasa a semiquinona y con el segundo pasa a ubiquinol (Lenaz y Génova, 2010).

En el proceso de reducción de la molécula de ubiquinona se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como la reducción de  $O_2$  a superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) o a  $H_2O_2$ . Esta producción de ROS es mayor si la concentración de NADH es mucho más alta que la de  $NAD^+$ , por lo tanto disminuye cuando la enzima funciona correctamente y oxida el NADH (Hirst, 2013).

El mecanismo por el cual se translocan los protones no es del todo conocido ya que los centros redox se encuentran en la parte del brazo que proyecta hacia la matriz (Rich y Maréchal, 2010).

La ecuación final de esta reacción es:



### **3.1.2 Complejo II - Succinato deshidrogenasa o Succinato coenzima Q reductasa**

El complejo II, succinato deshidrogenasa o succinato coenzima Q reductasa es un monómero de 124 kDa compuesto por 4 subunidades: SDHA, SDHB, SDHC y SDHD (Fig. 3-3). Es el complejo más pequeño de la cadena de transporte de electrones mitocondrial así como el único codificado sólo por ADN nuclear y que no bombea protones al espacio intermembrana (Hwang et al., 2014). Forma parte del ciclo de Krebs ya que se encarga de la oxidación de la molécula de succinato a fumarato y los electrones generados reducen la molécula de ubiquinona (Grimm, 2013).

Las subunidades SDHC y SDHD se encuentran ancladas a la MMI, mientras que la subunidad SDHB y la SDHA forman el grupo hidrofílico responsable de la oxidación de succinato. En la subunidad SDHA se localiza el sitio de unión del succinato y contiene el cofactor flavina (FAD). La subunidad SDHB está integrada por una cadena de 3 centros Fe-S ([2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S]) (Maklashina y Cecchini, 2010). En la subunidad SDHC y SDHD se encuentran los 2 sitios de unión de la ubiquinona, el UQ<sub>P</sub> (próximo a los grupos Fe-S) y UQ<sub>D</sub> (distal a los grupos Fe-S). Así, los electrones producidos por la oxidación del succinato son transportados al cofactor FAD, pasan por los tres grupos Fe-S y finalmente llegan a la UQ que se encuentra en el sitio UQ<sub>P</sub>. Al igual que el complejo I, con el primer electrón que se transfiere se forma un radical semiquinona y con el segundo se forma el ubiquinol (Grimm, 2013; Hwang et al., 2014).

A pesar de que la mayor producción de ROS en la mitocondria es a través de los complejos I y III también se ha determinado la formación de ROS en el complejo II aunque el mecanismo no es aún del todo conocido (Quinlan et al., 2012; Grimm, 2013).

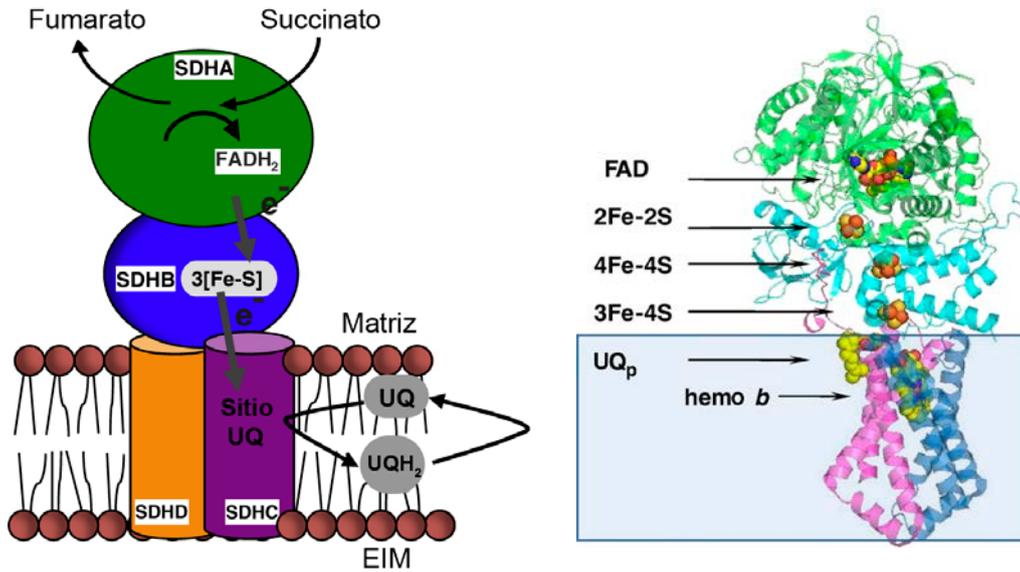
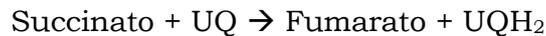


Fig. 3-3. Estructura del complejo II integrado por las subunidades hidrofílicas SDHA y SDHB, y las hidrofóbicas y la SDHC y SDHD que están ancladas a la MMI. Obsérvese el flujo de electrones procedente de la oxidación del succinato. (Modificado de Maklashina y Cecchini, 2010 y de Hwang et al., 2014).

La ecuación final de esta reacción es:



### 3.1.3 Complejo III – Complejo citocromo $bc_1$ o Ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa

El complejo III, complejo citocromo  $bc_1$  o ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa es un homodímero de unos 490 kDa formado por 2 monómeros de 11 subunidades cada uno que cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c, así como el bombeo de 4 protones a través de la membrana (Covian y Trumpower, 2006; Xia et al., 2013).

Se encuentran 4 grupos prostéticos redox activos (un centro Fe-S [2Fe-2S], un citocromo  $c_1$  que contiene un grupo hemo  $c$  y un citocromo  $b$  que contiene 2 grupos hemo  $b$ ) que catalizan la oxidación del ubiquinol y están asociados con la reducción del citocromo c. Las subunidades que conforman el citocromo  $b$  están codificadas por ADN mitocondrial. Tiene 7 hélices  $\alpha$ , 4 de ellas forman un haz que se une a los 2 hemos  $b$  por 2 histidinas. Estos grupos están localizados perpendicularmente al plano de la membrana y en los lados opuestos de ésta. El citocromo  $c_1$  tiene un dominio globular que alberga el grupo hemo  $c$  y proyecta hacia el EIM. La proteína Fe-S tiene proyecciones

hacia el EIM y contiene un centro Rieske cuyos átomos de Fe están ligados a 2 residuos de cisteína y a 2 residuos de histidina (Rich y Maréchal, 2010).

## Ciclo Q

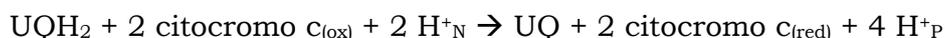
El ciclo Q comienza con la transferencia de 2 electrones a la ubiquinona desde el complejo I o el II, generándose ubiquinol. La subsecuente oxidación del ubiquinol en el complejo III requiere la donación de estos 2 electrones al citocromo c (Chandel, 2010).

El transporte de protones depende de una reacción que se bifurca en el sitio Q<sub>P</sub> (o sitio Q<sub>o</sub>) del complejo III, en el cual los 2 electrones del UQH<sub>2</sub> pasan por 2 cadenas diferentes. El primer electrón tras ser transferido a las proteínas de Fe-S de Rieske, pasa al citocromo c<sub>1</sub> y subsecuentemente al citocromo c (Fig. 3-4). Sin embargo, el segundo electrón es transferido desde el ubiquinol a los 2 grupos hemo del citocromo *b*, pasando primero al hemo *b<sub>L</sub>* (que está cerca del EIM y tiene baja afinidad por los electrones) y, posteriormente, al hemo *b<sub>H</sub>* (que se encuentra cerca de la matriz y tiene alta afinidad por los electrones) dando lugar a la formación de un radical semiquinona.

El ciclo Q en este paso está medio completado, sólo un electrón del ubiquinol ha sido transferido al citocromo c. Después de una segunda ronda del ciclo Q, 2 moléculas de ubiquinol han sido oxidadas en el sitio Q<sub>P</sub>, dos moléculas de citocromo c han sido reducidas y una molécula de ubiquinona ha sido reducida en el sitio Q<sub>N</sub> (o Q<sub>i</sub>) (Crofts, 2004; Chandel, 2010; Lenaz y Genova; 2010).

En resumen, este ciclo implica la oxidación secuencial de dos moléculas de ubiquinol en el sitio Q<sub>P</sub> con la liberación de 4 protones al EIM. Por un lado, 2 electrones, uno de cada ubiquinol, reducen 2 citocromos c. Los otros 2 electrones restantes pasan a través de los grupos hemo *b* y se reduce una ubiquinona a ubiquinol en el sitio Q<sub>N</sub> con el consumo de 2 protones de la matriz (Rich y Maréchal, 2010).

La ecuación final de esta reacción es:



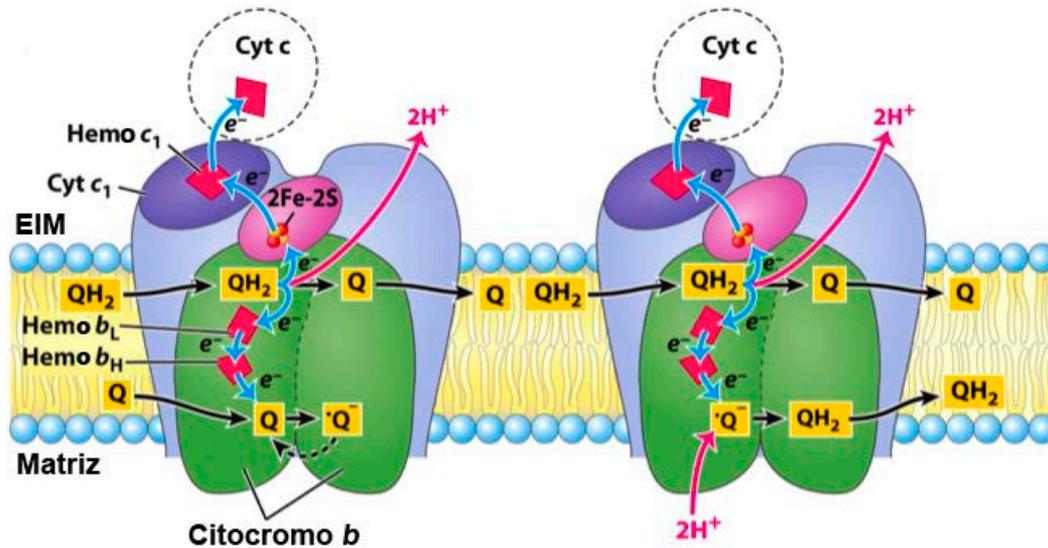


Fig. 3-4. Modelo esquemático del ciclo Q que muestra las ubicaciones aproximadas de los cofactores y los sitios de unión de la ubiquinona en el dímero del complejo III mitocondrial. Se indica además la transferencia de electrones (flechas azules) y la translocación de los protones (flechas rosas). Cyt: citocromo. (Modificado de Nelson et al., 2013).

En este proceso también se ha descrito la producción de ROS en el complejo III, principalmente en el sitio  $Q_P$ . La mayor producción de ROS se produce en presencia de inhibidores del sitio  $Q_N$  (antimicina), sin embargo, se generan también ROS mediante el uso de inhibidores del sitio  $Q_P$  (mixotiazol) (Starkov y Fiskum, 2001; Bleier y Dröse, 2013).

### 3.1.4 Complejo IV – Citocromo c oxidasa

El complejo IV o citocromo c oxidasa cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo c reducido al oxígeno molecular ( $O_2$ ), generando de este modo moléculas de  $H_2O$ . La reducción de 2 moléculas de  $H_2O$  requiere la transferencia de 4 electrones del citocromo c junto con 4 protones provenientes de la matriz. En este proceso se liberan 4 protones al EIM (Rich y Maréchal, 2010).

La citocromo c oxidasa es un homodímero formado por monómeros de 13 subunidades (Fig. 3-5). El núcleo funcional está formado por 3 subunidades, la I y II catalizan las reacciones de transferencia de electrones y protones mientras que la III proporciona el canal a través del cual difunde el  $O_2$  al sitio activo. Estas 3 subunidades están codificadas por ADN mitocondrial (Arnold, 2012).

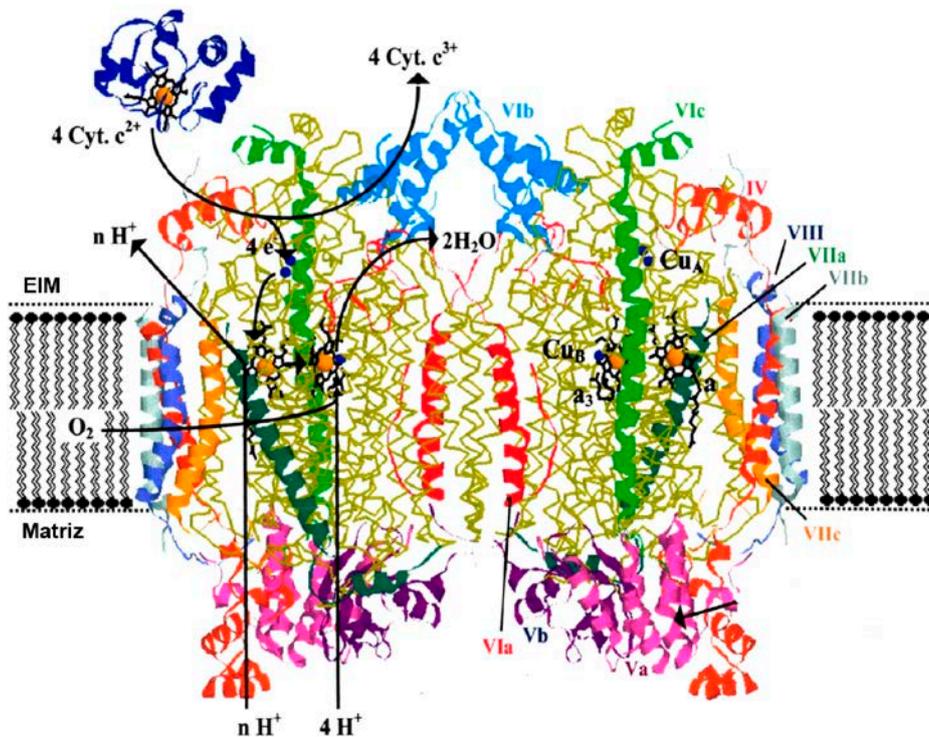
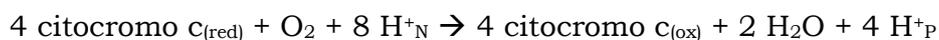


Fig. 3-5. Estructura del complejo IV mitocondrial. Los electrones difunden desde el citocromo c reducido al O<sub>2</sub>. (Modificado de Kadenbach y Huttemann, 2015).

La subunidad II tiene 2 hélices  $\alpha$  transmembranales y un dominio hidrofílico que proporciona un sitio de anclaje para el citocromo c. Además, cuenta con un centro de cobre, Cu<sub>A</sub>, que proporciona un punto de entrada para los electrones. La subunidad I es la más grande del núcleo de proteínas, está compuesta por 12 hélices  $\alpha$  formando 4 grupos que dejan 3 cavidades. En una cavidad se encuentra la molécula hemo  $a$  que está ligada por 2 residuos de histidina, en otra cavidad el hemo  $a_3$  junto con una histidina ligada a un átomo de cobre, Cu<sub>B</sub> (Rich y Maréchal, 2010).

Los electrones son transferidos del citocromo c al Cu<sub>A</sub>, de aquí pasan al hemo  $a$ , a continuación se transfieren al hemo  $a_3$  y de aquí al Cu<sub>B</sub>, para finalmente reducir el O<sub>2</sub>. La reducción de O<sub>2</sub> a 2 moléculas de agua requiere 4 electrones y 4 protones que llegan individualmente (Lenaz y Genova, 2010).

La ecuación final de esta reacción es:



### 3.1.5 Complejo V – ATP sintasa o $F_0F_1$ -ATP sintasa

La ATP sintasa o  $F_0F_1$ -ATP sintasa utiliza la energía del gradiente electroquímico transmembrana generado por el paso de protones a través de los complejos I, III y IV para la síntesis de ATP. Está formado por 2 dominios que se comportan como 2 motores rotatorios, el  $F_0$  es transmembranal y es el encargado del transporte de protones y el  $F_1$  es el encargado de la síntesis de ATP en la matriz mitocondrial. Su peso molecular es aproximadamente de 500 kDa (Okuno et al., 2011; Fillingame y Steed, 2014).

El dominio  $F_1$  está formado por las subunidades  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$  mientras que el dominio  $F_0$  está formado por las subunidades  $ab_2c_n$  que están embebidas en la MMI (Fig. 3-6). El número de subunidades  $c$  varía entre especies y parece depender de la fuerza protón-motriz disponible (Sielaff y Börsch, 2012).

La principal característica del dominio  $F_1$  es la disposición alterna de  $\alpha_3\beta_3$  subunidades, las cuales forman una estructura hexagonal con un pie o tallo central formado por la subunidad  $\gamma$ . Los lugares de unión del núcleo catalítico están localizados en la interfaz de las subunidades  $\beta$  con las  $\alpha$ . Las subunidades llamadas  $\beta_{TP}$  y  $\beta_{DP}$  contienen ATP y ADP, respectivamente, mientras que la tercera subunidad  $\beta_E$  está vacía (Jonckheere et al., 2012). Otra característica importante de la subunidad  $\beta$  es la secuencia de aminoácidos muy conservada DELSEED los cuales forman una palanca que puede actuar abriendo y cerrando el lugar de unión del nucleótido. Algunos aminoácidos de la subunidad  $\gamma$  pueden interactuar con esta palanca, lo que define el estado de cada lugar de unión catalítico, porque  $\gamma$  secuencialmente cambia su orientación con respecto a las 3 subunidades  $\beta$ . Por otro lado, la subunidad  $\gamma$  tiene un dominio globular que junto con  $\varepsilon$  está embebido en la membrana, además 2 hélices  $\alpha$  N y C terminal que forman una estructura *coiled-coil* se encuentran extendidas entre la cavidad del hexágono formado por  $\alpha_3\beta_3$ . La subunidad  $\delta$  actúa como conector entre las porciones  $F_1$  y  $F_0$ .

En la porción  $F_0$ , un anillo de subunidades  $c$  está embebido en la membrana. El anillo interacciona con las subunidades  $\gamma$  y  $\varepsilon$  de la porción  $F_1$  y con las subunidades  $b_2$  y  $a$  de la  $F_0$ . La subunidad  $a$  forma medio canal de conducción de 2 protones que termina al otro lado de la membrana. Las subunidades  $b_2$  forman una estructura *coiled-coil* con un pequeño residuo que engloba toda la proteína desde la parte de arriba de la membrana al hexágono

$\alpha_3\beta_3$ . Las subunidades  $b$  son el tallo que une de manera estrecha a  $F_1$ . Esta conexión periférica de  $ab_2$  con  $F_1$ , combinada con las 3 posibles orientaciones de  $\gamma$  en  $F_1$ , da lugar a una estructura asimétrica de la enzima con una orientación del eje central que es aleatorio con respecto a las subunidades  $b_2$  (Okuno et al., 2011; Sielaff y Börsch, 2012; Junge y Nelson, 2015).

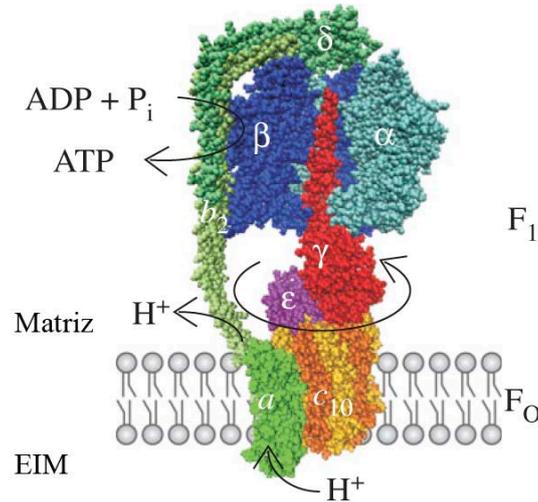


Fig. 3-6. Modelo estructural de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa de *Escherichia coli*. Nótese los movimientos rotatorios que permiten el paso de  $H^+$  así como la síntesis de ATP. (Modificado de Sielaff y Börsch, 2012).

Utilizando la diferencia de concentración de  $H^+$  ( $\Delta pH$ ) y el potencial eléctrico ( $\Delta\psi$ ) a través de la membrana, se produce la rotación de los dos motores rotatorios. El anillo de subunidades  $c$  en  $F_0$  rota a lo largo de las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  en  $F_1$  a la que está unido, entonces, los protones pasan por el anillo  $c$  y la rotación de la subunidad  $\gamma$  en el hexámero  $\alpha_3\beta_3$  proporciona la energía para la síntesis de ATP. Cada subunidad  $\beta$  cambia de conformación, en una se une el ADP y el  $P_i$ , en la siguiente se forma el ATP y en la última este ATP es liberado. La hidrólisis de ATP sigue la misma ruta pero en sentido contrario. Estas transiciones son causadas por la rotación de la subunidad  $\gamma$ . El hexámero  $\alpha_3\beta_3$  debe permanecer fijo con la subunidad  $a$  durante la catálisis, lo cual ocurre a través del tallo periférico (Jonckheere et al., 2012).

### 3.1.6 Supercomplejos

En la mitocondria de mamíferos casi todos los complejos I están asociados con complejos III, y estos a su vez también lo están a complejos IV

formando estructuras tipo I-III-IV, llamadas supercomplejos (Shagger y Pfeiffer, 2000), mientras que el complejo II permanece independiente (Vonck y Schäfer, 2009; Chaban et al., 2014). Se ha descrito la formación de supercomplejos en plantas, hongos, protozoos y animales, incluido el ser humano, con diferentes ratios entre los diferentes complejos (Chaban et al., 2014).

Mediante análisis de Blue Native PAGE (BN-PAGE) se ha determinado en mitocondria de corazón bovino que los supercomplejos pueden ser de dos tipos: asociación de un monómero del complejo I con un dímero del complejo III (I-III<sub>2</sub>) y asociación de este supercomplejo con un monómero del complejo IV (I-III<sub>2</sub>-IV) (Schäfer et al., 2006). Los datos bioquímicos muestran que el dímero de complejo III es esencial para el ensamblaje y estabilidad del complejo I. De hecho, sobre el 17% del total del complejo I de la mitocondria se encuentran formando el supercomplejo I<sub>1</sub>-III<sub>2</sub>, alrededor del 54% integrados en el supercomplejo I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>, y 9% formando parte del supercomplejo I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> (Genova et al., 2008). Por tanto, sólo entre 14-20% del complejo I se encontraría de manera libre (Lenaz et al., 2010).

No obstante, el complejo IV, a pesar de que tiene estructura dimérica, en la formación de los supercomplejos actúa como monómero (Schäfer et al., 2007; Vonck y Schäfer, 2009). La abundancia y elevada estabilidad del supercomplejo I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> indica que el contacto con el complejo IV es fuerte e importante en la estabilidad del supercomplejo (Schäfer et al., 2006).

La combinación I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> (Fig. 3-7) es denominada respirasoma ya que se considera la unidad mínima para realizar la respiración completa desde el NADH al oxígeno (Genova y Lenaz, 2014).

En el mapa 3D del supercomplejo I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> el sitio de unión de la proteína transportadora de electrones (ubiquinona o citocromo c) se enfrenta y está próxima al sitio de unión del transportador de electrones del siguiente complejo (Schäfer et al., 2007). Esta disposición es importante ya que da como resultado distancias de difusión muy cortas para la ubiquinona y el citocromo c lo que facilita la transferencia de electrones y, por tanto, incrementa la eficiencia de los complejos I, III y IV (Schäfer et al., 2007; Dudkina et al., 2010). Asimismo, los lípidos que hay entre los complejos I y III podrían servir como un microdominio de difusión para la ubiquinona (Chaban et al., 2014).

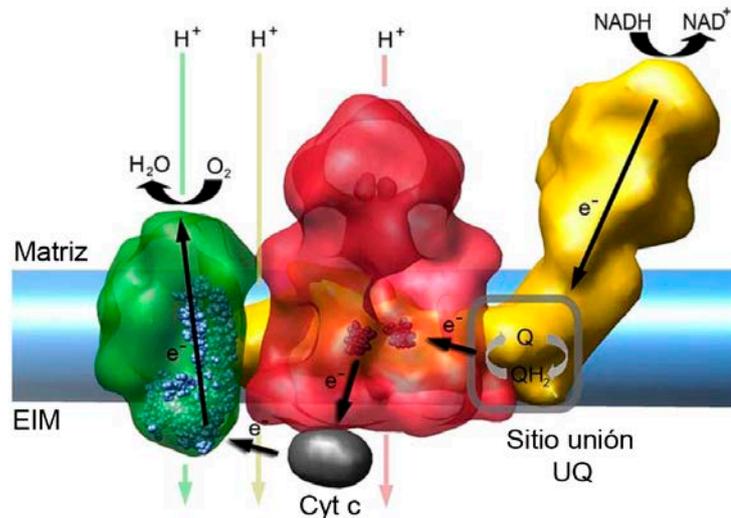


Fig. 3-7. Disposición de los complejos I, III y IV en la membrana mitocondrial interna formando un supercomplejo. Se muestra el posible transporte de electrones. En amarillo, complejo I; en rojo, dímero de complejo III; en verde, monómero de complejo IV. EIM: espacio intermembrana; Cyt c: citocromo c; UQ: ubiquinona. (Modificado de Vonck y Schäfer, 2009).

Por tanto, además del papel que juegan en la estabilización de los complejos individuales, los supercomplejos incrementan la eficiencia de la cadena de transporte de electrones, lo que conllevaría, a su vez, una reducción de la formación de ROS (Vartak et al., 2013; Genova y Lenaz, 2014).

### 3.1.7 Transportadores de electrones

En la cadena de transporte de electrones mitocondrial existen dos moléculas transportadoras de electrones. La molécula de ubiquinona, que transfiere los electrones de los complejos I y II al III y el citocromo c que los transporta del complejo III al IV.

#### Ubiquinona – Coenzima Q

La ubiquinona, también llamada coenzima Q, es una 2,3-dimetoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzoquinona. Consiste en un grupo benzoquinona conjugado con una cadena lateral poli-isoprenoide de longitud específica (6-10 subunidades). Se caracteriza por ser una molécula activa redox, lipofílica y está presente en todas las células eucariotas. Se encuentra en la MMI y transfiere electrones del complejo I y II al III (Lenaz et al., 2007; Lenaz y Genova, 2009).

La ubiquinona puede existir en 3 estados redox diferentes (Fig. 3-8): completamente oxidada (UQ), parcialmente reducida ( $UQ\cdot^-$ ) y completamente reducida ( $UQH_2$ ), aunque la existencia de diferentes niveles de protonación incrementa las posibles formas redox del anillo de quinona (Genova y Lenaz, 2011).

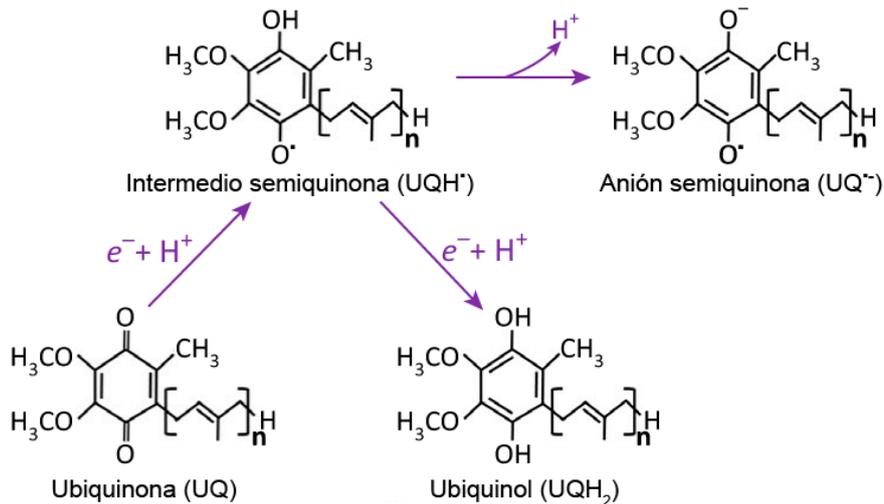


Fig. 3-8. Estados redox del anillo de quinona. Ubiquinona: totalmente oxidada. Ubiquinol: totalmente reducido. La reducción parcial de la forma oxidada por un electrón crea una semiquinona (si está protonada) o un radical inestable anión semiquinona (si está desprotonada). (Modificada de Wang y Hekimi, 2016).

La ubiquinona tiene un papel central en la generación de energía como demuestra el hecho de que su extracción de las membranas mitocondriales implica una pérdida de las actividades NADH oxidasa y succinato oxidasa. Estas actividades son restauradas al incorporarse de nuevo ubiquinona a las membranas. Más aún, su concentración influye directamente en la transferencia de electrones (Wang y Hekimi, 2016).

Pero también juega un papel importante en la producción de ROS, aunque su forma reducida, se considera un potente antioxidante (Wang y Hekimi, 2016).

### Citocromo c

El citocromo c es una hemoproteína que se encuentra principalmente en estado soluble en el EIM (Mavridou et al., 2013). Sin embargo, se puede ensamblar a la MMI a través del lípido cardiolipina el cual forma parte de la

MMI (Rytömaa y Kinnunen, 1994), la unión a cardiolipina es necesaria para la inserción, retención, estabilidad y función del citocromo c (Ostrander et al., 2001) así como en el bombeo de protones en el complejo IV (Musatov y Robinson, 2014; Capdevila et al., 2015).

El citocromo c participa en la transferencia de electrones del complejo III al IV (Mavridou et al., 2013). El hierro de su cofactor hemo puede ser reducido u oxidado. Este grupo hemo está covalentemente unido a la proteína por 2 enlaces tioéter entre 2 cadenas laterales de vinilo del grupo hemo y 2 cisteínas de un motivo conservado CXXCH (Giegé et al., 2008; Babbitt et al., 2015).

Entre las funciones del citocromo c, además de transportar electrones, está la de estabilizar el complejo IV ya que se ha descrito una degradación de las subunidades de la citocromo c oxidasa en ausencia de este citocromo (Pearce y Sherman, 1995). Asimismo, el citocromo c está involucrado en la apoptosis celular ya que su liberación al citosol desencadena este proceso (Jiang y Wang, 2004; Babbitt et al., 2015). Asimismo, se ha descrito que posee actividad peroxidasa (Wang et al., 2003; Bertini et al., 2006).

### **3.2 Inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

Existen diversos inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial que actúan a diferentes niveles. Se clasifican en inhibidores de la transferencia de electrones, desacopladores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial e inhibidores de la ATP sintasa.

Los inhibidores de la transferencia de electrones son moléculas que impiden el flujo de electrones entre los transportadores y, por lo tanto, la síntesis de ATP. En este grupo se encuentran los inhibidores del complejo I rotenona, amital y piericidina A que impiden la transferencia electrónica a la UQ, al igual que el inhibidor del complejo II 2-thenoyltrifluoroacetona. Los inhibidores del complejo III como la antimicina A, que impide el paso de electrones desde el citocromo  $b_H$  a la UQ, y el mixotiazol, el cual impide la transferencia de electrones desde el UQH<sub>2</sub> a la proteína de Rieske. Por último, los inhibidores del complejo IV como el cianuro, monóxido de carbono (CO) y azida, los cuales se unen al Fe en el hemo  $a_3$ ; el cianuro y la azida bloquean la forma férrica y el CO la forma ferrosa.

En cuanto a los desacopladores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, como su propio nombre indica actúan desacoplando el transporte de electrones de la formación de ATP. Son moléculas hidrofóbicas con un protón disociable que atraviesan la MMI transportando protones del EIM a la matriz, disipando de este modo el gradiente de protones. La energía se libera en forma de calor y, por tanto, no se produce ATP. En este grupo se encuentran el 2,4-dinitrofenol (DNP), el carbonyleanida-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) o el dicumarol.

Por último, los inhibidores de la ATP sintasa inhiben la síntesis de ATP actuando directamente sobre la enzima formadora de ATP. Entre ellos destacan la oligomicina que impide el paso de H<sup>+</sup> al unirse a la subunidad F<sub>0</sub>, el dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) que se une covalentemente a la subunidad c del dominio F<sub>0</sub> causando el cese de la rotación de la ATP sintasa y la aurovertina que actúa en la subunidad F<sub>1</sub>.

A continuación, se explican más en profundidad aquellos que han sido utilizados en la presente Tesis.

### **3.2.1 Rotenona**

La rotenona es el inhibidor del complejo I mitocondrial más comúnmente usado por su potencia y especificidad (Sharma et al., 2009). Pertenece al grupo de roteinoides, una familia de isoflavonoides extraídos de las plantas leguminosas (*Derris sp.*). La estructura es similar a la de la ubiquinona, con un anillo análogo a la ubiquinona y una cola hidrofóbica, formada por 5 anillos (A-E) y 3 centros quirales (6a-C, 12a-C y 5'-C) (Fig. 3-9) (Miyoshi, 1998).

Forma parte de numerosos insecticidas y pesticidas ya que actúa bloqueando el transporte de electrones entre el grupo Fe-S del sitio N2 y la ubiquinona. La subunidad ND1 del complejo I contribuye al lugar de unión de la rotenona (Degli Esposti, 1998; Lümmer, 1998).

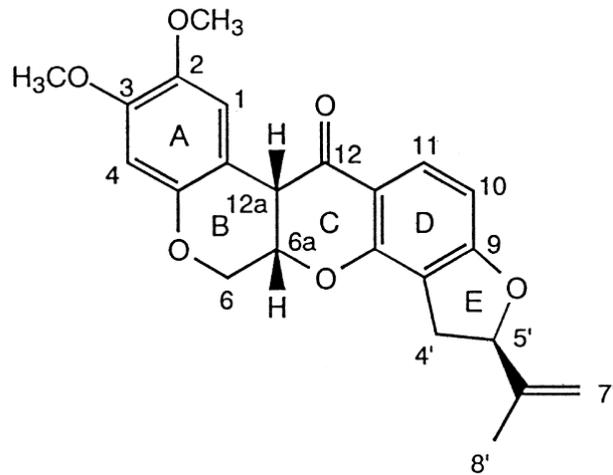


Fig. 3-9. Estructura química del inhibidor rotenona. (Miyoshi, 1998).

La rotenona induce producción de ROS en el complejo I al bloquear la transferencia de electrones e incrementar la formación de semiquinona, primer donante de electrones en la generación de superóxidos (Li et al., 2003; Fato et al., 2009).

Estudios con  $[^3\text{H}]$ -DHR muestran como el lugar de unión de la rotenona es compartido por otros inhibidores como el amital, piericidina A y el MPP<sup>+</sup> (Degli Esposti, 1998).

### 3.2.2 Antimicina A

El antibiótico antimicina A (Fig. 3-10) es producido por la bacteria *Streptomyces kitazawensis*. Se une específicamente al sitio de reducción de la ubiquinona, Q<sub>N</sub>, del complejo III, inhibiendo la correcta oxidación del ubiquinol al bloquear la transferencia de electrones entre el citocromo *b* y *c*<sub>1</sub> (Huang et al., 2005; Ma et al., 2011). La antimicina A se une de manera irreversible, aunque no están implicados enlaces covalentes en la unión (Rieske et al., 1967).

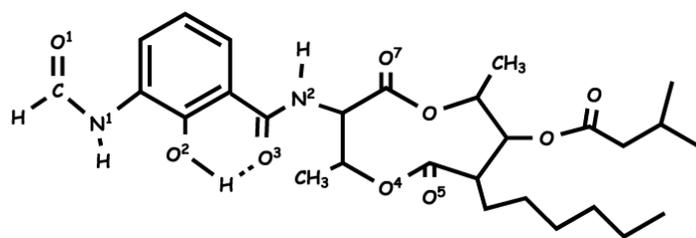


Fig. 3-10. Estructura química del antibiótico antimicina A. (Esser et al., 2004).

La ocupación del centro N por parte de la antimicina A ( $K_D$  de 30 pM), además de afectar a la movilidad de la proteína de Rieske, incrementa la susceptibilidad del dominio Fe-S de Rieske a la proteólisis (Huang et al., 2005; Covian y Trumpower, 2006).

De la misma manera que la inhibición del complejo I, las consecuencias de la inhibición del complejo III incluyen un incremento en la producción de ROS y una reducción en los niveles de ATP (Ma et al., 2011) debida al colapso en el gradiente de protones de la MMI, con la consiguiente pérdida del potencial de membrana.

### 3.2.3 Mixotiazol

El mixotiazol (Fig. 3-11) es un agente antifúngico producido por la mixobacteria *Myxococcus fulvus*. Consiste en un grupo metoxiacrilamida y fracción ditiazol. Este antibiótico tiene una elevada afinidad por el sitio  $Q_P$  del complejo III,  $IC_{50}$  de 6,3 nM, por lo que ha sido ampliamente utilizado como inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Esser et al., 2004).

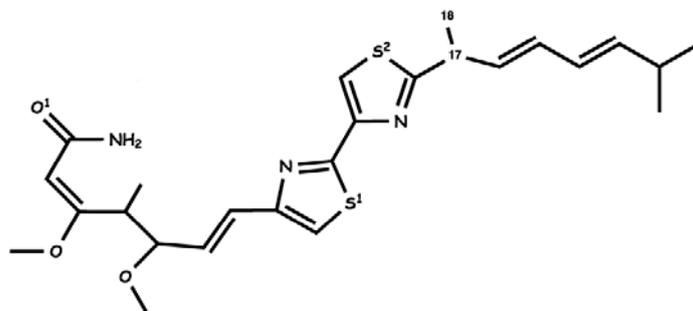


Fig. 3-11. Estructura química del antibiótico mixotiazol. (Esser et al., 2004).

El mixotiazol inhibe la formación de semiquinona en el centro  $Q_P$  por desplazamiento del ubiquinol de su lugar de unión induciendo la formación de  $H_2O_2$  (Starkov y Fiskum, 2001).

### 3.2.4 Azida

La azida ( $N_3^-$ ) inhibe el complejo IV mitocondrial al reconocer el lugar de unión del  $O_2$  (grupo hemo  $\alpha_3$  oxidado y  $Cu_B$ ) por el que presenta una elevada

afinidad ( $K_D = 64 \mu\text{M}$ ) (Lenaz y Genova, 2010). Además, se puede unir con baja afinidad ( $K_D = 20 \text{ mM}$ ) al grupo hemo  $\alpha$ . Una vez que se han reducido los centros de Cu de la citocromo c oxidasa, la afinidad de la azida por su lugar de unión se ve reducida (Smith y Wilcox, 1994). No obstante, la afinidad de esta molécula es baja en comparación con otros inhibidores de la citocromo c oxidasa, así por ejemplo, la azida es 100 veces menos potente que la cianida y la sulfida (Smith y Wilcox, 1994).

Se ha utilizado comercialmente como herbicida, fungicida, nematocida, insecticida y bactericida (Smith y Wilcox, 1994). Asociada a compuestos orgánicos ( $\text{R}-\text{N}_3$ ) forma parte de algunos antibióticos y antivirales (Debets et al., 2010). Formando compuesto con el  $\text{Na}^+$  se ha utilizado como conservante en reactivos acuosos de laboratorio y fluidos biológicos (Chang y Lamm, 2003).

### 3.2.5 MPP<sup>+</sup>

El *N*-Metil-4-fenilpiridinium (MPP<sup>+</sup>) es el metabolito activo de la toxina sintética 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) (Fig. 3-12) (Schapira, 2010) que actúa como inhibidor del complejo I mitocondrial a través de su unión en el lugar o cerca del lugar de unión de la rotenona. El MPP<sup>+</sup> tiene una elevada afinidad por el transportador de dopamina de la membrana plasmática, mediante el cual se introduce en las neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, una vez allí, además de inhibir al complejo I puede ser translocado a las vesículas sinaptosómicas o permanecer en el citosol e interactuar con diferentes enzimas citosólicas (Przedborski y Vila, 2001).

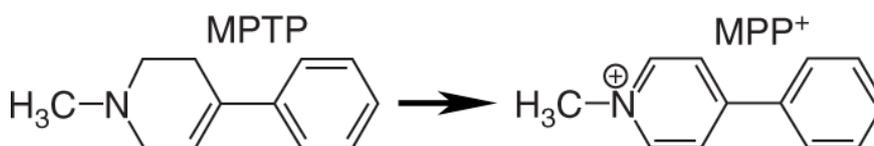


Fig. 3-12. Estructura química del MPTP y de su metabolito activo MPP<sup>+</sup>. (Modificado de Tieu, 2011).

El MPP<sup>+</sup>, una vez se une al complejo I, inhibe la cadena de transporte de electrones mitocondrial, reduciendo la formación de ATP y provocando el incremento de los niveles de ROS, induciendo de este modo la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Jackowec y Petzinger, 2004). No obstante, la potencia inhibitoria del MPP<sup>+</sup> es mucho menor que la de otros inhibidores de

este complejo como la piericidina A o la rotenona, siendo del orden de mM y estos últimos nM (Miyoshi, 1998).

### **Modelos experimentales con inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

A final de la década de los 70, se observó que la toxina sintética 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) desarrollaba síntomas motores de la enfermedad de Parkinson (EP) en humanos. Posteriormente, se comprobó que su metabolito activo, MPP<sup>+</sup>, era capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y entrar en las neuronas dopaminérgicas (Haelterman et al., 2014). La EP es un desorden neurodegenerativo que afecta al 1% de la población adulta. Las características motoras que definen la EP incluyen temblor, incremento del tono muscular, movimientos lentos y alteración de la marcha y el equilibrio. En estudios de autopsias se ha caracterizado una pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra*, asociada con la formación de agregados de proteínas  $\alpha$ -sinucleína (cuerpos de Lewy). Se incluyen además síntomas neuropsiquiátricos, disfunción del sistema nervioso autónomo, dolor, diarrea y perturbación del sueño (Haelterman et al., 2014). Además, se ha documentado una deficiencia de complejo I en sustancia *nigra* y en corteza frontal en pacientes de enfermedad de Parkinson (EP) (Henchcliffe y Beal, 2008).

Estos descubrimientos, llevaron a la utilización de inhibidores del complejo I, para el desarrollo de modelos animales de la EP. Estos inhibidores producen desregulación de varios genes mitocondriales (5 subunidades del complejo I entre otras) además de la degeneración de las neuronas de la sustancia *nigra* a través de rutas de activación apoptóticas (Sharma et al., 2009).

La toxina MPTP se utiliza en primates y en roedores para inducir la EP. Como se ha comentado anteriormente, el MPTP se transforma en MPP<sup>+</sup> el cual se introduce en las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina por el que tiene gran afinidad (Przedborski y Vila, 2001). Mediante la unión al complejo I inhibe la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que provoca muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* (Vila et al., 2008; Schapira, 2010; Haelterman et al., 2014). El inhibidor rotenona también se utiliza para inducir EP en ratas, aunque el

modelo más ampliamente aceptado es el del primate tratado con MPTP (Tieu, 2011).

### **3.3 Mitocondria y Metabolismo**

La mitocondria es responsable de la generación de aproximadamente el 90% de la energía celular en forma de ATP mediante los procesos de fosforilación oxidativa (Lipina et al., 2014).

Además de la formación de ATP tiene un papel central en el metabolismo, ya que es el orgánulo donde se lleva a cabo el ciclo de Krebs, oxidación de ácidos grasos y metabolismo de aminoácidos. Asimismo participa en diversos procesos de homeostasis de calcio, la formación ROS y la apoptosis celular (Smith et al., 2012).

El número de mitocondrias y su actividad cambia en respuesta a una variedad de condiciones fisiológicas, como el ejercicio, los nutrientes o la edad. Igualmente, se ha descrito una serie de funciones mitocondriales alteradas en patologías neurodegenerativas y oncológicas así como en diversas enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 (Tzamelis, 2012).

### **3.4 Mitocondria y Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)**

Las 3 especies que forman las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ). Se forman principalmente en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Rich y Maréchal, 2010).

La formación de  $O_2^{\cdot-}$  resulta de la reducción parcial del  $O_2$  por un solo electrón (Wang y Hekimi, 2016). Este  $O_2^{\cdot-}$  puede convertirse de manera espontánea en  $H_2O_2$  por la unión de dos  $O_2^{\cdot-}$  (Turrens, 2003), aunque la mayor parte se produce por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la formación de  $H_2O_2$  en la matriz mitocondrial o en el EIM a partir del  $O_2^{\cdot-}$  (Kowaltowski et al., 2009; Brand, 2010). El  $H_2O_2$  generado puede difundir al citosol y ser reducido por diferentes enzimas, como la catalasa, la glutatión peroxidasa y la tioredoxin peroxidasa (Kowaltowski et al., 2009). Las peroxidasas también pueden reducir el  $H_2O_2$  parcialmente y formar  $HO^{\cdot}$  (Turrens, 2003; Wang y Hekimi, 2016).

La formación de ROS se da principalmente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, aunque también pueden estar involucradas otras enzimas. En el complejo I, los electrones fluyen desde el NADH a la FMN y a continuación son transferidos a los grupos Fe-S. El grupo terminal Fe-S interactúa con la semiquinona siendo el donante de electrones a la quinona. Se ha sugerido que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en el complejo I se origina principalmente en la FMN. Sin embargo, la FMN reducida transfiere los electrones de uno en uno a la UQ, formando primero una semiquinona y finalmente el UQH<sub>2</sub>, esta semiquinona puede reaccionar con el O<sub>2</sub> formando, también de esta manera,  $O_2^{\cdot-}$  (Wang y Hekimi, 2016).

En el complejo III, los electrones son transferidos del UQH<sub>2</sub> al citocromo c mediante el ciclo Q. Como se ha descrito en el apartado 3.1.3 en este ciclo se produce la oxidación de 2 moléculas de UQH<sub>2</sub> en el sitio Q<sub>P</sub> y la formación de un UQH<sub>2</sub> en el sitio Q<sub>N</sub>, para ello se transfieren los electrones de uno en uno de un centro redox a otro en un proceso mediante el cual se generan semiquinonas. Se ha descrito el sitio Q<sub>P</sub> como el principal lugar de producción de  $O_2^{\cdot-}$  en el complejo III (Wang y Hekimi, 2016).

En el complejo II se puede dar la formación de ROS pero en menor cantidad que en los complejos I y III. Esto es debido a que la estructura de la enzima impide el fácil acceso de la molécula de O<sub>2</sub> al FAD. Asimismo, en determinadas condiciones se produce un fenómeno llamado transporte de electrones inverso, que consiste en la transferencia de electrones desde el succinato a través del complejo II a la UQ y entonces al complejo I y a su grupo FMN el cual finalmente reduce el NAD<sup>+</sup> y por el cual se producen ROS. Este mecanismo se ha observado *in vitro*, queda por confirmar que se produzca *in vivo* (Kowaltowski et al., 2009; Brand, 2010; Wang y Hekimi, 2016).

Por otro lado, en la mitocondria existen varias deshidrogenasas que también puede producir ROS como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la dihidroorotato deshidrogenasa y la flavoproteína electrón transferencia oxidorreductasa (Wang y Hekimi, 2016).

### **3.5 Cannabinoides en la mitocondria**

Como se ha mencionado en el apartado 1.2.4, los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> se encuentran habitualmente en las membranas

presinápticas de los axones neuronales modulando la liberación de neurotransmisores (Fišar, 2010; Alger y Tang, 2012). Los endocannabinoides son sintetizados a demanda en diferentes procesos fisiológicos que abarcan desde la realización de ejercicio hasta la inflamación o incluso el daño del SNC, entre otros, siendo especialmente relevante su papel en la modulación del estrés oxidativo y del metabolismo energético. De hecho, los endocannabinoides regulan varias vías involucradas en el control de la función mitocondrial, controlando la expresión y actividad de diferentes proteínas como los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , MAP quinasas (MAPK), eNOS/iNOS y la proteína quinasa A (PKA), así como la producción de ceramidas y la ruta Akt/mTOR (Nunn et al., 2012; Lipina et al., 2014). Más aún, se ha descrito que los cannabinoides pueden actuar directamente en la mitocondria por interacción con su membrana (Fig. 3.5-1) (Nunn et al., 2012).

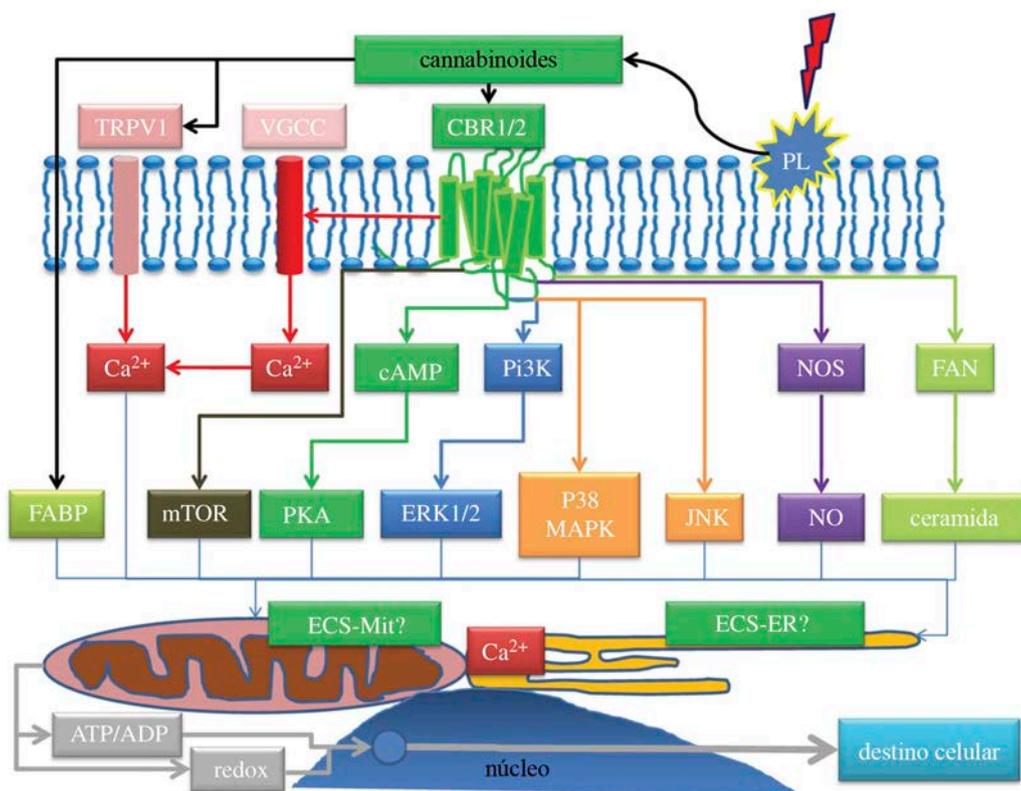


Fig. 3.5-1. Esquema de las vías reguladas por los cannabinoides que pueden influir en la viabilidad celular. CBR: receptor cannabinoide; ECS-ER: sistema endocannabinoide en el retículo endoplasmático; ECS-Mit: sistema endocannabinoide en mitocondria; ERK: receptor extracelular quinasa; FAPB: proteína de unión de ácidos grasos; FAN: factor asociado con esfingomielasa neutral; JNK: quinasa c-JUN N-terminal; NOS: NO sintasa; PKA: proteína quinasa A; PL: fosfolipasa; TRPV1: receptor vaniloide; VGCC: canal de calcio. (Modificado de Nunn et al., 2012).

Desde la década de los 70, diferentes evidencias experimentales apuntan a que la regulación del metabolismo ejercida por los cannabinoides tanto en SNC como en tejidos periféricos se debe a la inhibición de la respiración mitocondrial (Chiu et al., 1975; Bartova y Birmingham, 1976). En la actualidad, se ha confirmado que tanto los fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THC y cannabidiol (CBD) como el endocannabinoide AEA y los cannabinoides sintéticos WIN55,212-2 y AM251 producen una disminución dosis dependiente en el consumo de oxígeno así como en las actividades de los complejos mitocondriales I, II y III en mitocondrias aisladas de corazón de rata y de vaca así como en cerebro de cerdo (Athanasiou et al., 2007; Whyte et al., 2010; Fišar et al., 2014; Wolff et al., 2015). Asimismo, el  $\Delta^9$ -THC disminuye la producción de ATP (Sarafian et al., 2003).

Esta modulación de la respiración celular inducida por los cannabinoides afecta también a la viabilidad celular. Algunos de estos cannabinoides, como el  $\Delta^9$ -THC, la AEA o el HU210 inducen apoptosis celular y/o cambios en la morfología celular o en las propiedades de las membranas (Ruiz et al., 1999; Maccarrone et al., 2000; Athanasiou et al., 2007; Catanzaro et al., 2009; Zaccagnino et al., 2012). En este sentido, la AEA puede producir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, desacople de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y liberación de citocromo c, mediante la posible activación de los receptores vaniloides (Maccarrone et al., 2000). No obstante, el endocannabinoide 2-AG causa reducción de la liberación de citocromo c inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias aisladas de hígado, confiriendo resistencia a las señales proapoptóticas debidos a cambios en la fluidez de la membrana (Zaccagnino et al., 2012).

Por otro lado, en cuanto a la producción de ROS, la incubación con  $\Delta^9$ -THC o con HU210 produce un incremento en la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de radicales libres en el cerebro (Athanasiou et al., 2007; Wolff et al., 2015). De la misma manera, se ha determinado un aumento en la producción de ROS en presencia de CBD y de N-araquidonilglicina, un derivado del 2-AG (Shrivastava et al., 2011; Zaccagnino et al., 2009). No obstante, los ligandos CP55,940 y JWH015 bloquean la producción de radicales superóxidos debidos a paraquat, inhibidor del complejo I (Vélez-Pardo et al., 2010).

En cuanto a los mecanismos mediante los que actúan los cannabinoides en la mitocondria, a parte de las diversas vías de señalización intracelular moduladas por los receptores cannabinoides dispuestos en la

membrana plasmática (Lipina et al., 2014), se ha descrito la presencia de receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> en la membrana mitocondrial (mtCB<sub>1</sub>) de neuronas de ratón (Bénard et al., 2012). Concretamente, alrededor del 30% de las mitocondrias en neuronas de hipocampo contienen receptor CB<sub>1</sub> (Hebert-Chatelain et al., 2014). Asimismo, se ha descrito la presencia de proteínas G en mitocondria (G $\alpha_i$  y G $\alpha_{12/13}$ ) (Lyssand y Bajjalieh, 2007; Andreeva et al., 2008) así como la localización intramitocondrial de efectores de la cadena de señalización de proteínas G como el adenilato ciclasa, fosfodiesterasa y PKA (Bénard et al., 2012). En este sentido, ha sido propuesto que la activación de estos mtCB<sub>1</sub>, tanto por cannabinoides exógenos como por endocannabinoides disminuirían la concentración de AMPc, inhibiendo la actividad PKA que media la fosforilación de varios componentes de la cadena de transporte de electrones, reduciendo su actividad y la respiración (Hebert-Chatelain et al., 2014).

Es más, se ha propuesto que el efecto inhibitorio producido por los cannabinoides en la tasa respiratoria mitocondrial es causado no sólo por la activación de los mtCB<sub>1</sub> sino también por los cambios en las propiedades dinámicas de los lípidos de la MMI y el ensamblaje a los respirasomas (Fišar et al., 2014). Este modelo implica que el proceso se inicie por la estimulación de mtCB<sub>1</sub>, lo que implica una inhibición de la ruta AMPc/PKA, actividad del complejo I y respiración mitocondrial. Los mtCB<sub>1</sub> estarían involucrados además en la regulación de la energía del metabolismo y contribuirían en la plasticidad a corto plazo dependiente de cannabinoides en la neurotransmisión inhibitoria GABAérgica (Fišar et al., 2014).

No obstante, existen discrepancias en cuanto al perfil farmacológico de estos cannabinoides y su función en la mitocondria debido, por ejemplo, a la similitud de efectos que provocan el WIN55,212-2 y el AM251 en la respiración celular. Por otro lado, se ha descartado que dichos efectos sean debidos a la lipofiliidad de las moléculas (Fišar et al., 2014; Singh et al., 2015).





## **OBJETIVOS**



La aparición de nuevas enfermedades así como la pronta detección de las mismas hacen que sea indispensable idear continuamente nuevas herramientas para el cribado y desarrollo de nuevos fármacos de una manera rápida y eficiente. En este sentido, los microarrays de membranas celulares proporcionan una ventaja frente a otras técnicas ya que las proteínas de membrana inmovilizadas en el soporte mantienen la funcionalidad permitiendo así determinar diferentes parámetros farmacológicos fundamentales en la caracterización de nuevos fármacos. Asimismo, una reducción en la cantidad bien de muestra necesaria para el análisis como en los reactivos utilizados y los residuos generados aporta una ventaja tanto económica como medioambiental haciendo de los microarrays de membranas una potente herramienta farmacológica.

Por otro lado, los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son dianas farmacológicas de entre el 40 y el 50% de los fármacos comercializados actualmente, debido a que las rutas de señalización que activan o bloquean están involucradas en numerosas enfermedades, por ello la importancia de su estudio. Uno de los GPCR que actualmente está siendo más estudiado debido a su potencial terapéutico como neuromodulador y su importancia en el metabolismo energético es el receptor cannabinoide. No obstante, y a pesar de la presencia de receptores cannabinoideos en la membrana mitocondrial y de que los ligandos cannabinoideos modifican el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones existen aún ciertas incógnitas sobre su mecanismo de acción. Por todo ello, los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

- Optimizar los protocolos para el estudio de receptores acoplados a proteínas G por autorradiografía de receptor o del acople funcional mediante microarrays de membranas celulares.
- Validar las técnicas de autorradiografía del receptor y autorradiografía de acople funcional en microarrays de membranas aisladas de líneas celulares que sobreexpresan diferentes proteínas y receptores, hipocampo y cerebelo de ratones control y *knockout*, así como de diferentes órganos y tejidos de rata, primates control y primates modelo de la enfermedad de Parkinson.

## OBJETIVOS

---

- Determinar las actividades mitocondriales succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa en microarrays de membranas celulares.
- Evaluar el efecto que producen ligandos cannabinoides sobre la fijación del inhibidor específico del complejo I mitocondrial DHR en microarrays de membranas celulares y homogeneizados de membrana.
- Caracterizar las actividades NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa en homogeneizados de membrana de corazón de rata y evaluar el efecto que produce en estas actividades mitocondriales la presencia de los inhibidores rotenona, antimicina A, mixotiazol y/o azida sódica.
- Determinar el mecanismo de acción no mediado por receptor de los ligandos cannabinoides CP55940, WIN55,212-2, AM251 y AM281 y el compuesto de origen cannabinoide HU331 en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

# **ANIMALES Y LÍNEAS CELULARES**



## 1. Muestras de tejido de rata

Se emplearon ratas macho Sprague-Dawley de un peso que osciló entre los 225 y 275 g, procedentes del animalario de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Los animales se mantuvieron en unas condiciones de luz, temperatura y humedad controladas (ciclo luz y oscuridad de 12 horas, 22°C y 65-70% de humedad relativa); y recibieron agua y comida *ad libitum*. Los protocolos de estabulación e investigación con animales se llevaron a cabo según las recomendaciones aprobadas por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) que sigue las directrices internacionales de uso de animales de experimentación (2003/665/CE) y la legalidad vigente española (RD 1201/2005), así como la normativa del Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA 388/2014).

## 2. Muestras de tejido cerebral de ratón *knockout* CB<sub>1</sub>

Los ratones *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub> fueron proporcionados de una cepa mantenida en la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) gracias a la colaboración con el grupo de investigación del Profesor C. Matute del Departamento de Neurociencias de la Facultad de Medicina y Odontología. La generación de ratones que carecen del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> fue descrita previamente en la literatura (Ledent et al., 1999). Se utilizaron individuos *knockout* y *wildtype* de nueve semanas de edad que habían sido mantenidos en unas condiciones de temperatura (22°C) y humedad controladas (65%), con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y con comida y bebida *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a la normativa europea para el uso de animales de investigación (Directiva del Consejo Europeo 86/609/EEC, 98/81/CEE y 2003/65/CE; Recomendación de la Comisión 2007/526/EC) y la legalidad vigente española para el uso de animales de experimentación y el uso de organismos modificados genéticamente (RD 1205/2005, 178/2004; Ley 32/2007 y 9/2003). Se cuenta con la aprobación de los protocolos para la utilización de roedores en la investigación por parte del Comité de Ética en Experimentación Animal de la UPV/EHU y por parte de la Diputación Foral de Bizkaia (CEIAB/21/2010/Rodríguez Puertas; CEEA 388/2014 y EXPTE. 366-1 y 2).

Las muestras de hipocampos de ratones *wildtype*, *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub> y los *knockout* CB<sub>1</sub> infectados con el virus AAV para que expresen el receptor CB<sub>1</sub> normal (KO-CB<sub>1</sub>) o con la mutación DN22, que evita la expresión de dicho receptor en mitocondrias (KO-DN22), fueron obtenidos de la Universidad de Burdeos, Francia, gracias a la colaboración con el grupo de investigación de Endocannabinoides y Neuroadaptación del Dr. Giovanni Marsicano. Se utilizaron un total de 48 hipocampos divididos en hemisferio derecho e izquierdo procedente de 12 animales WT, 13 KO para el receptor CB<sub>1</sub>, 11 KO-CB<sub>1</sub> y 12 KO-DN22.

### **Obtención y almacenamiento de las muestras en fresco de rata y ratón**

Los animales una vez anestesiados con ketamina/xilacina (80 mg/kg y 50 mg/kg, respectivamente) por vía intraperitoneal, fueron decapitados y diseccionados para extraer los diferentes órganos y tejidos a 4°C. Todos los tejidos se almacenaron inmediatamente de manera hermética a una temperatura de -80°C.

Posteriormente, parte de las muestras de cerebros se cortaron en secciones de 20 µm en un microtomo (Microm HM550, Thermo) a -25°C, se montaron sobre portaobjetos previamente gelatinizados y se conservaron a -20°C hasta el momento de la realización de los ensayos de marcaje autorradiográfico de receptores acoplados a proteína G. El resto de los tejidos y órganos extraídos se mantuvieron a -80°C hasta el momento de la extracción de membranas celulares.

### **3. Muestras de tejido de mono**

En los experimentos realizados con monos se incluyeron 6 monos macho de aproximadamente 4 años de edad de la especie *Macaca fascicularis* procedentes del CIMA - Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra. Los 6 animales fueron distribuidos en 2 grupos. El primer grupo, constituido por 3 animales intactos, se utilizó como control y a los 3 restantes animales se les administró una dosis semanal de la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) por vía intravenosa (0,25

mg/kg) durante 9 semanas y una dosis de 0,30 mg/kg la semana número 10 con la finalidad de producir una degeneración nigroestriada, hallazgo neuropatológico típico de los pacientes con enfermedad de Parkinson (EP). Estas pautas de administración de MPTP producen una pérdida de aproximadamente el 80% de las neuronas dopaminérgicas siendo equiparable a un estadio avanzado de la EP. Los animales se mantuvieron en unas condiciones de humedad (50%), temperatura (21°C) y aire controladas (16 l/h) y con un ciclo luz y oscuridad de 12 horas, hasta el momento de su sacrificio.

Los animales fueron sedados con una dosis de ketamina (10 mg/kg) y midazolam (1 mg/kg). Una vez anestesiados se les realizó una perfusión transcardíaca con suero salino y a continuación, los cerebros y el resto de órganos fueron diseccionados a 4°C. Todos los tejidos se almacenaron inmediatamente de manera hermética a una temperatura de -80°C hasta el momento de la extracción de las membranas celulares.

#### **4. Líneas celulares**

Las líneas celulares utilizadas en los diferentes experimentos fueron suministradas por diferentes proveedores. Concretamente, las líneas celulares que sobreexpresan receptores acoplados a proteínas G (GPCR) del tipo CHEM, así como su control, fueron suministradas por Merck Millipore (Darmstadt, Alemania) (Tabla 1).

Las líneas celulares del tipo CHO (*Chinese Hamster Ovary*) que sobreexpresan el receptor muscarínico M<sub>3</sub> y las líneas celulares del tipo COS7 que fueron transfectadas con diferentes subtipos de receptores muscarínicos (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub>), diferentes subtipos de subunidad  $\alpha$  de la proteína G (G $\alpha$ i2, G $\alpha$ 01, G $\alpha$ s y G $\alpha$ 11), así como la combinación de los subtipos de proteína G $\alpha$  y el receptor M<sub>3</sub>, fueron suministradas por Delphi Genetics (Charleroi, Bélgica) (Tabla 2).

<b>Líneas Celulares que sobreexpresan Receptores Acoplados a proteínas G (GPCR)</b>		
Nombre	Tipo de GPCR	Subtipo
CB <sub>1</sub>	Cannabinoide	1
M <sub>2</sub>	Muscarínico	2
mGlu <sub>2</sub>	Metabotrópico glutamatérgico	2
Opioid $\mu$	Opioide	$\mu$
$\alpha_2$	Adrenérgico	$\alpha_2$
$\beta_1$	Adrenérgico	$\beta_1$
GABA $\beta_1$ b/GABA $\beta_2$	GABAérgico	$\beta_1$ b/ $\beta_2$
Gal <sub>1</sub>	Galanina	1
H <sub>1</sub>	Histamina	1
5-HT <sub>1B</sub>	Serotonina	1B
A <sub>1</sub>	Adenosina	1
LPA <sub>1</sub>	Lisofosfatídico	1
P <sub>2</sub> Y <sub>2</sub>	Purinérgico	2
$\alpha_{1A}$	Adrenérgico	$\alpha_{1A}$
MC1	Melanocortina	1
$\beta_2$	Adrenérgico	$\beta_2$
GALR <sub>2</sub>	Galanina	2
D <sub>1</sub>	Dopamina	1
Y <sub>2</sub>	Neuropéptido Y	2
S <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	Esfingosina 1-fosfato	1
CCK <sub>1</sub>	Colecistoquinina	1
D <sub>2</sub>	Dopamina	2
Control	Control	Control

Tabla 1. Líneas celulares que sobreexpresan receptores acoplados a proteínas G utilizadas para la fabricación de microarrays.

<b>Líneas Celulares que sobreexpresan proteínas G/GPCR</b>		
Nombre	Tipo de proteína G	Tipo de célula
M <sub>1</sub>	Muscarínico tipo 1	COS7
M <sub>2</sub>	Muscarínico tipo 2	COS7
M <sub>3</sub>	Muscarínico tipo 3	COS7/CHO
M <sub>4</sub>	Muscarínico tipo 4	COS7
M <sub>5</sub>	Muscarínico tipo 5	COS7
GNAI2	G $\alpha$ i2	COS7
GNA01	G $\alpha$ 01	COS7
GNAS	G $\alpha$ s	COS7
GNA11	G $\alpha$ 11	COS7
M3Rh GNAI2	Muscarínico tipo 3 + GNAI2	COS7
M3Rh GNA01	Muscarínico tipo 3 + GNA01	COS7
M3Rh GNAS	Muscarínico tipo 3 + GNAS	COS7
M3Rh GNA11	Muscarínico tipo 3 + GNA11	COS7
Control	Control	COS7/CHO

Tabla 2. Líneas celulares que sobreexpresan proteínas G y/o receptores acoplados a proteínas G utilizadas para la fabricación de microarrays.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Radioligandos

Para la cuantificación mediante autorradiografía de la densidad de los receptores acoplados a proteínas G, se utilizaron radioligandos marcados con tritio específicos de los subtipos de receptores seleccionados, del mismo modo que para la determinación del complejo I mitocondrial.

En el estudio de autorradiografía del acople funcional se empleó el radioligando [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, este ligando fue alicuotado en tampón DTT-tricina (10 mM; pH 7,4) y almacenado a -80°C (Tabla 4).

Radioligandos			
Nombre	Actividad Específica (Ci/mmol)	Proteína diana	Casa comercial
[ <sup>3</sup> H]-CGP54626	60,0	GABAérgico tipo B	Perkin Elmer*
[ <sup>3</sup> H]-N-metilescopolamina	81,0	Muscarínico	Perkin Elmer
[ <sup>3</sup> H]-DAMGO	51,5	Opioide $\mu$	Perkin Elmer
[ <sup>3</sup> H]-CP55,940	131,8	Cannabinoide	Perkin Elmer
[ <sup>3</sup> H]-dihidrorotenona	50,0	Complejo I mitocondrial	ARC**
[ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S	1.250,0	Proteína G $\alpha$	Perkin Elmer

Tabla 4. Radioligandos empleados en los experimentos de autorradiografía y competición.

\* Perkin Elmer; New England Nuclear (Boston, EE.UU.) \*\* American Radiolabeled Chemicals (ARC) (St. Louis, EE.UU.)

Las microescalas de [<sup>3</sup>H] y de [<sup>14</sup>C] utilizadas como estándares en los experimentos autorradiográficos fueron suministradas por American Radiolabeled Chemicals (ARC) (St. Louis, EE.UU.).

## 2. Fármacos y reactivos

Los fármacos utilizados fueron baclofen (0796, Tocris), saclofen (0246, Tocris), CGP55485 (1248, Tocris), carbacol (C4382, Sigma-Aldrich), atropina (A0257, Sigma-Aldrich), [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-Enkephalin (DAMGO) (E7384, Sigma-Aldrich), naloxona (0591, Tocris), WIN55,212-2 (W102, Sigma-Aldrich), AM251 (1117, Tocris), CYM-5442 (3601, Tocris), W146 (3602, Tocris) (Tabla 5), rotenona (R8875, Sigma-Aldrich), CP55,940 (C1112, Sigma-Aldrich) y AM281 (1115, Tocris) y HU331 (ab120922, Abcam).

Asimismo, se usó guanosina-5'-difosfato (GDP), guanosina-5'-O-3 tiotriofosfato (GTP $\gamma$ S), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). Estos reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.).

<b>Fármacos</b>			
Nombre	GPCR diana	Agonista/ Antagonista	Concentración ( $\mu$ M)
Baclofen	GABAérgico tipo B	Agonista Total	10
Saclofen	GABAérgico tipo B	Antagonista	100
CGP55845	GABAérgico tipo B	Antagonista	1
Carbacol	Muscarínico	Agonista Total	10 ó 100
Atropina	Muscarínico	Antagonista	10
DAMGO	Opioide tipo $\mu$	Agonista Total	1 ó 10
Naloxona	Opioide tipo $\mu$	Antagonista	1
WIN55,212-2	Cannabioide	Agonista Total	1 ó 10
AM251	Cannabioide tipo 1	Antagonista	10
CYM-5442	Esfingosina 1-fosfato tipo 1	Agonista	1
W146	Esfingosina 1-fosfato tipo 1	Antagonista	10

Tabla 5. Fármacos utilizados en los experimentos de autorradiografía funcional o autorradiografía de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S.

Las películas  $\beta$ -sensibles Kodak Biomax MR provienen también de Sigma-Aldrich. El líquido de centelleo empleado para la cuantificación (OptiPhase “HiSafe II”) fue suministrado por Perkin Elmer New England Nuclear (Boston, EE.UU.).

El resto de reactivos empleados para la preparación de los diferentes tampones y el revelado de las películas fotográficas se obtuvieron de diferentes casas comerciales con un grado de pureza y calidad adecuado a las necesidades para los estudios neuroquímicos.

### **3. Inhibidores, aceptores y dadores de electrones y reactivos utilizados en los ensayos mitocondriales**

Como inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se utilizaron rotenona (inhibidor del complejo I); antimicina A de *Streptomyces* sp. (A8674) y mixotiazol de *Myxococcus fulvus* (T5580) ambos inhibidores del complejo III y azida sódica (S2002) como inhibidor del complejo IV (Fig. 3-1), todos ellos fueron suministrados por Sigma-Aldrich y disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) para su utilización.

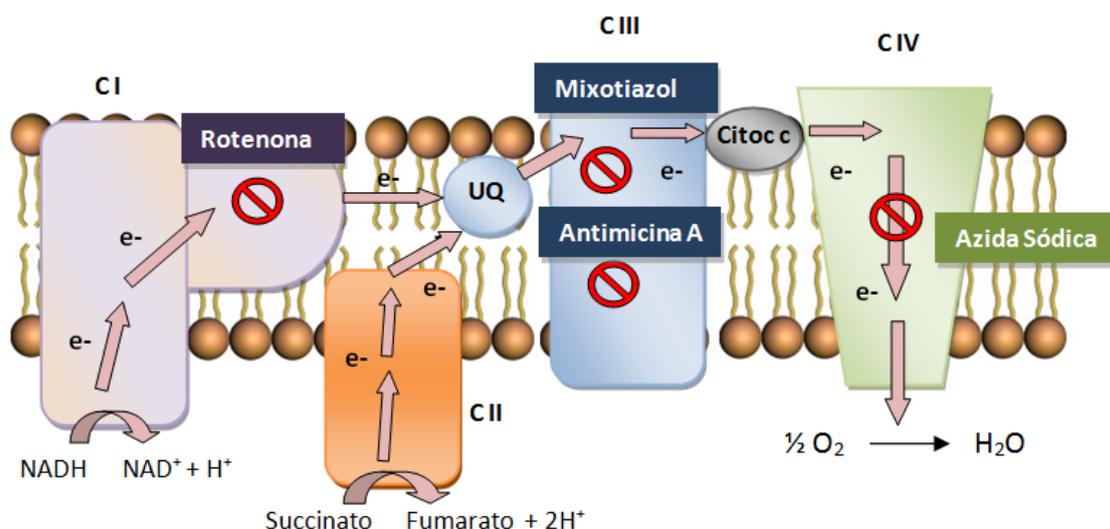


Fig. 3-1'. Esquema de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en el que se representa en qué complejo actúan los inhibidores empleados en los experimentos de determinación de actividades enzimáticas de la mitocondria.

Para el estudio de las actividades enzimáticas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se emplearon como aceptores de electrones el 2,6-dicloroindofenol (DCIP) (D1878) y el nitroazul de tetrazolio (NBT) (N6876), y como dador de electrones se utilizó la diaminobencidina (DAB) (D5637), suministrados por Sigma-Aldrich. Otros reactivos empleados fueron decilubiquinona, NADH y succinato, también fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

#### 4. Extracción de membranas celulares

Las muestras de diferentes tejidos, tras ser descongeladas, se homogeneizaron en 25 volúmenes de tampón de homogeneización (Tris-HCl 50 mM,  $MgCl_2$  3 mM, EGTA 1 mM; pH 7,4) suplementado con 250 mM de sacarosa, primero mediante el homogeneizador Ultra-Turrax® T10 basic, IKA, 30 seg a 20.000 rpm y a continuación con el homogeneizador Heidolph RZR 2020 a 1.500 rpm. El homogeneizado se centrifugó 5 min a 233 g (Allegra™ X 22R centrifuge, Beckman Coulter), posteriormente el sobrenadante se centrifugó 15 min a 18.000 g (Microfuge® 22R centrifuge, Beckman Coulter). El sobrenadante fue eliminado y el sedimento resultante fue resuspendido en tampón de homogeneización y de nuevo centrifugado 15 min a 18.000 g. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el sedimento obtenido se congeló a

-80°C hasta el momento del ensayo.

Para la extracción de las membranas de las diferentes líneas celulares se utilizó el mismo protocolo con algunas modificaciones. Las células se homogeneizaron en 2,5 ml de tampón de homogeneización suplementado con sacarosa por cada 40 millones de células mediante el homogeneizador Heidolph RZR 2020 a 1.500 rpm. El homogeneizado se centrifugó 15 min a 18.000 g (Microfuge® 22R centrifuge, Beckman Coulter). A continuación, el sobrenadante fue eliminado y el sedimento resultante fue resuspendido en tampón de homogeneización y nuevamente centrifugado 15 min a 18.000 g. Por último, se descartó el sobrenadante y el sedimento obtenido se congeló a -80°C hasta el momento del ensayo.

Durante todo este proceso las membranas, tanto las de tejido animal como las de las líneas celulares, se mantuvieron a una temperatura constante de 4°C para evitar su degradación. La concentración de proteínas de las mismas fue calculada siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

## **5. Fabricación de microarrays de membrana celulares**

Las membranas celulares que integrarían los microarrays fueron previamente descongeladas y resuspendidas en una solución de impresión. A continuación, dichas membranas fueron depositadas mediante un robot de *no-contacto* Nano-plotter NP2.1 (GeSiM, Alemania), con puntas piezoeléctricas que dispensan volúmenes de picolitros sobre un portaobjetos de vidrio (Fig. 5-1). Estos portaobjetos fueron previamente tratados utilizando una tecnología que permite la inmovilización de las membranas celulares preservando la estructura y funcionalidad de sus proteínas (Rodríguez-Puertas et al., 2008). Junto con las membranas celulares se depositaron cantidades crecientes de BSA así como de membranas de corteza cerebral de rata. Ambas se utilizaron como patrones de calibración del resto de las muestras depositadas.

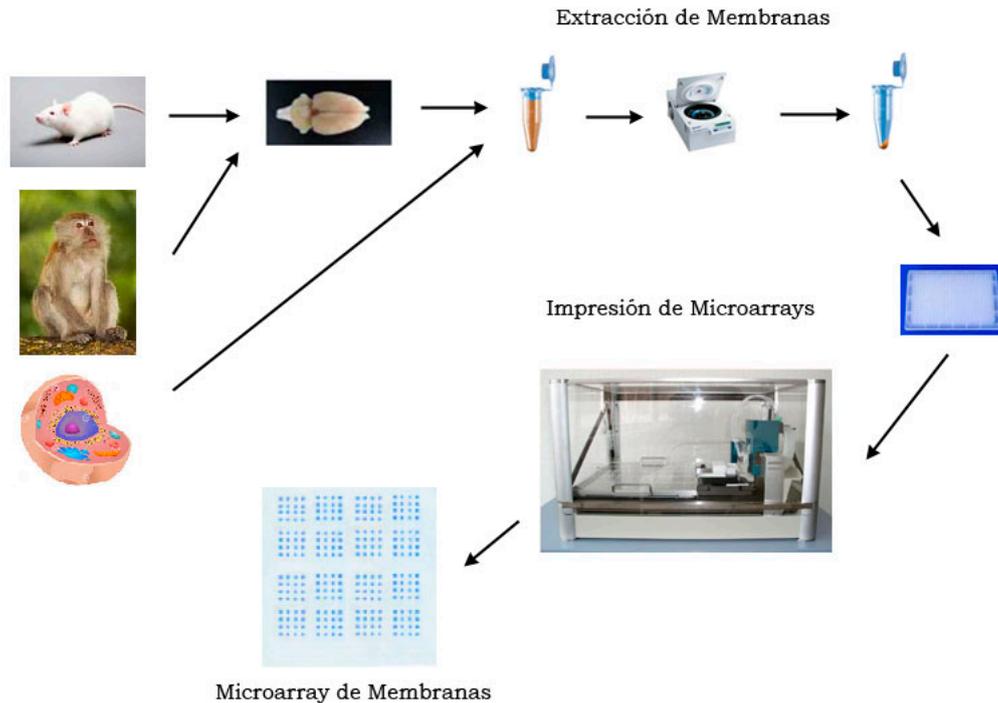


Fig. 5-1. Esquema representativo de la fabricación de microarrays de membranas celulares.

## 6. Marcaje autorradiográfico en microarrays de membranas celulares

### 6.1 Marcaje autorradiográfico con [ $^3\text{H}$ ]-CGP54626

Los microarrays de membranas y las secciones de cerebro de rata se dejaron secar 60 min a temperatura ambiente (t.a.) antes de preincubarlos en el tampón de ensayo (Tris-HCl 20 mM, NaCl 120 mM, glucosa 6 mM, KCl 4,7mM,  $\text{CaCl}_2$  1,8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM; pH 7,4) 45 min a t.a. Seguidamente, se incubaron durante 120 min a 37°C en tampón de ensayo que contenía el ligando [ $^3\text{H}$ ]-CGP54626 (2 nM). Para determinar la fijación no específica se añadió baclofen (10  $\mu\text{M}$ ). Transcurrido ese tiempo se lavaron 2 veces en tampón de ensayo a 4°C durante 10 min cada vez y se sumergieron dos veces rápidamente en agua destilada a 4°C. Finalmente, los microarrays y las secciones de cerebro de rata se secaron con una corriente de aire frío (4°C) y se expusieron a un film radiosensible durante 3 meses en presencia de [ $^3\text{H}$ ]-microescalas.

## **6.2 Marcaje autorradiográfico con [<sup>3</sup>H]-NMS**

Se dejaron atemperar los microarrays de membranas y las secciones de cerebro de rata durante 15 min a t.a. antes de preincubarlos en el tampón fosfato 50 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,3) durante 20 min a t.a. Posteriormente, se incubaron durante 60 min a t.a. con tampón de ensayo y el ligando [<sup>3</sup>H]-NMS (1,5 nM). La fijación no específica fue definida en presencia de atropina (1 μM). Transcurrido ese tiempo se realizó una inmersión rápida en tampón fosfato, se lavaron dos veces en el mismo tampón durante 5 min cada vez y se sumergieron rápidamente en agua destilada, todos estos últimos pasos se realizaron a 4°C. Para finalizar, los microarrays y las secciones de cerebro de rata se secaron con una corriente de aire frío (4°C) y se expusieron a un film radiosensible durante 41 días en presencia de [<sup>3</sup>H]-microescalas.

## **6.3 Marcaje autorradiográfico con [<sup>3</sup>H]-DAMGO**

Los microarrays de membrana y las secciones de cerebro de rata se dejaron secar 15 min a t.a. antes de incubarlos en tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4) 30 min a t.a. A continuación, se realizó una inmersión rápida en el tampón de ensayo y se incubaron durante 45 min a t.a. en el mismo tampón en presencia de [<sup>3</sup>H]-DAMGO (5 nM). La fijación no específica se determinó en presencia de naloxona (10 μM). Transcurrido este tiempo los portaobjetos se sumergieron rápidamente en el tampón de ensayo y seguidamente se lavaron 2 veces en el mismo tampón durante 5 min cada vez. Posteriormente se realizó una inmersión rápida en agua destilada, todos estos últimos pasos se realizaron a 4°C. Por último, los microarrays y las secciones se secaron con una corriente de aire frío (4°C) y se expusieron a un film radiosensible durante 6 meses en presencia de [<sup>3</sup>H]-microescalas.

## **6.4 Marcaje autorradiográfico con [<sup>3</sup>H]-CP55,940**

Los microarrays de membranas y las secciones de cerebro de rata se dejaron atemperar 30 min a t.a., a continuación se incubaron en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, BSA 1%; pH 7,4) 30 min a t.a. Posteriormente, se incubaron 120 min a 37°C con el tampón de incubación en presencia del

ligando [ $^3\text{H}$ ]-CP55,940 (3 nM). La fijación no específica fue definida en presencia de AM251 (10  $\mu\text{M}$ ). Transcurrido este tiempo se lavaron 2 veces en tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, BSA 0,5%; pH 7,4) a 4°C durante 15 min cada vez y se sumergieron rápidamente en agua destilada a 4°C. Finalmente, se secaron con una corriente de aire frío (4°C) y se expusieron a un film radiosensible durante 50 días en presencia de [ $^3\text{H}$ ]-microescalas.

### **6.5 Marcaje autorradiográfico con [ $^3\text{H}$ ]-DHR**

Los microarrays de membranas celulares se dejaron secar 15 min a t.a. antes de ser preincubados 30 min a t.a. en tampón (Tris-HCl 25 mM; pH 7,6). Una vez transcurrido este tiempo, se incubaron durante 120 min a t.a. en tampón (Tris-HCl 50 mM; BSA 1%; NADH 200 $\mu\text{M}$ ; pH 7,6) en presencia del ligando [ $^3\text{H}$ ]-DHR (5 nM). Para el estudio de competición se incubaron además en presencia de CP55,940 en concentraciones comprendidas entre 0,1 y 100  $\mu\text{M}$ . La fijación no específica se determinó en presencia de rotenona (100  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, los microarrays se lavaron dos veces en tampón de lavado (Tris-HCl 25 mM; pH 7,4) a 4°C durante 5 min cada vez y a continuación se realizó una doble inmersión rápida en agua destilada fría. Los microarrays se secaron con una corriente de aire frío (4°C), una vez secos se expusieron a una película radiosensible durante 3 meses en presencia de [ $^3\text{H}$ ]-microescalas.

### **6.6 Marcaje autorradiográfico del acople funcional con [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma\text{S}$**

Los estudios de fijación de [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma\text{S}$  permiten estudiar la distribución y función de los receptores acoplados a proteína G, ya que este radioligando, análogo no hidrolizable del GTP, se une a la subunidad  $G\alpha$  activa. De esta manera, se puede evaluar la acción farmacológica de un fármaco midiendo el incremento de [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma\text{S}$  unido, proporcional al número de proteínas G activadas, con respecto a la situación basal (en ausencia de ligando). Por tanto, la principal ventaja de este tipo de ensayo es que proporciona información de la actividad inducida por un agonista en la primera etapa de señalización permitiendo la localización del efecto (Harrison y Traynor, 2003) (Fig. 6-1).

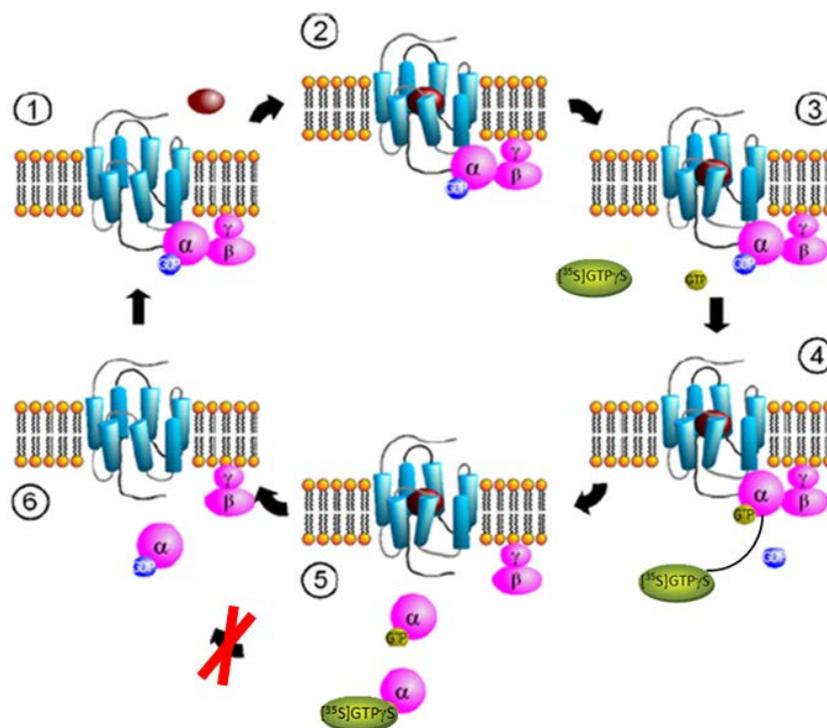


Fig. 6-1. Ciclo de activación de de la GPCR. La sustitución del GTP por el análogo no hidrolizable  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  permite obtener el ciclo G y cuantificar.

El experimento de cuantificación del acople de los receptores a la proteína G se realizó incubando las secciones de tejido con el radioligando  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  en presencia de los ligandos para estos receptores (Rodríguez-Puertas et al., 2000; Barreda-Gómez et al., 2005).

En el caso de los estudios con microarrays de membranas celulares, se empleó la metodología patentada para el cribado de moléculas que actúan a través de GPCR (Rodríguez-Puertas et al., 2007). Brevemente, los microarrays de membrana se dejaron secar a t.a. durante 20 min, a continuación, se preincubaron en tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM;  $\text{MgCl}_2$  3 mM; EGTA 1 mM; NaCl 100 mM; pH 7,4) durante 15 min a t.a. para eliminar, en lo posible, la presencia de neurotransmisores endógenos. Posteriormente, los microarrays se incubaron durante 120 min a  $30^\circ\text{C}$ , en el mismo tampón de ensayo suplementado con  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  (0,04 nM) y GPD (2 mM), en presencia y ausencia de los diferentes ligandos (Ver Tabla 5). El tampón de incubación para los fármacos cannabinoides y esfingosina 1-fosfato contenía BSA 0,5%, asimismo estos fármacos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta obtener la concentración requerida, dado que ambos reactivos aumentan la solubilidad de los fármacos con carácter lipofílico. El antagonista de los

receptores esfingosina 1-fosfato fue disuelto en una disolución de NaOH (100 mM). La fijación no específica se determinó añadiendo GTP $\gamma$ S (10  $\mu$ M).

Una vez transcurrido este tiempo se procedió a realizar 2 lavados de 15 min en tampón (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4) a 4°C. Tras el segundo lavado los microarrays se sumergieron en agua destilada a 4°C para eliminar las sales y se procedió al secado rápido de los portaobjetos mediante la aplicación de una corriente de aire frío. Posteriormente, los microarrays de membranas fueron expuestos, juntos con [<sup>14</sup>C]-microescalas, a una película radiosensible que se reveló de forma similar a una película fotográfica.

Este protocolo fue empleado en los estudios iniciales aunque, como se detallará en el apartado de resultados, se realizaron diferentes modificaciones con el objetivo de determinar cuáles eran las condiciones óptimas para el estudio del acople funcional a la proteína G en los microarrays de membranas para cada uno de los receptores objetivo de estudio y para cada tipo de muestra. Concretamente se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de radioligando [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (0,04, 0,1 ó 0,5 nM) y GDP (10, 50  $\mu$ M o 2 mM) cambiando tanto el tiempo de incubación con el ligando (15, 30, 60 ó 120 min) como el tiempo de exposición de los microarrays de membranas celulares a la película radiosensible (16, 24, 48 ó 96 h).

## **7. Determinación de las actividades enzimáticas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en microarrays de membrana**

### **7.1 Actividad succinato deshidrogenasa (complejo II)**

Para la cuantificación de la actividad succinato deshidrogenasa se siguió un protocolo de Seligman y colaboradores (Nachlas et al., 1957) con algunas modificaciones. Los microarrays de membranas celulares se incubaron en presencia de succinato (1 mM) y de NBT (1,2 mM) en tampón fosfato (0,05 M; pH 7,4) durante 16 h. Posteriormente, se lavaron 10 min en tampón fosfato y se sumergieron rápidamente en agua destilada. Una vez secos, los microarrays de membranas celulares, fueron escaneados y cuantificados utilizando el software ScanAlyze.

## **7.2 Actividad citocromo c oxidasa (complejo IV)**

La actividad citocromo c oxidasa fue determinada siguiendo un protocolo de Wong-Riley (Wong-Riley et al., 1979). Los microarrays de membranas celulares fueron incubados en una solución de DAB (1,3 mM) en tampón fosfato (0,1 M; pH 7,4) durante 16 h. A continuación, se lavaron 10 min en tampón fosfato y se sumergieron rápidamente en agua destilada. Una vez secos, los microarrays de membranas celulares fueron escaneados y cuantificados utilizando el software ScanAlyze.

## **8. Cuantificación microarrays de membrana celulares**

La cuantificación de la densidad óptica de los microarrays de membranas se efectuó mediante el programa informático ScanAlyze (Eisen y Brown, 1999). Para ello, los autorradiogramas o los portaobjetos, una vez digitalizados con un escáner de alta resolución, se importaron junto con una imagen similar en negro, ya que este software estaba diseñado para el análisis de microarrays de ADN, y se analizaron mediante unas gradillas virtuales que permiten seleccionar el área de interés. Cualquier píxel que esté dentro del círculo que rodea el punto es reconocido como propio. El fondo para ese punto se define como la intensidad de los píxeles que no están dentro del círculo pero que están alrededor del mismo con un área hacia los lados de 2 veces el de nuestro círculo, excluyendo los píxeles que forman parte del punto consecutivo (Fig. 8-1). Estos datos son posteriormente procesados con el programa informático Microsoft Office Excel.

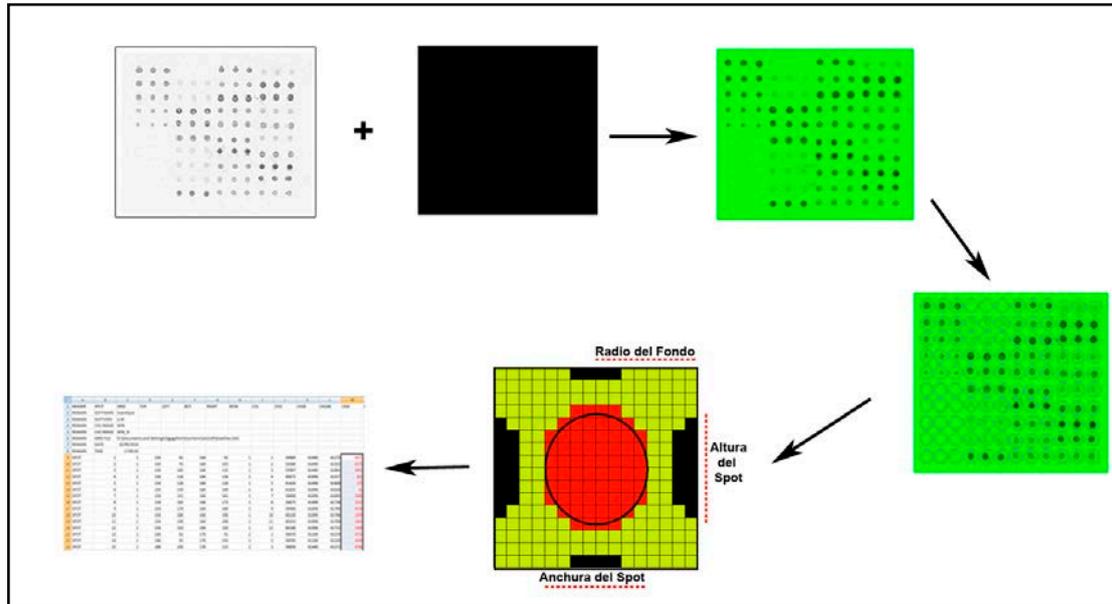


Fig. 8-1. Captura y cuantificación de los datos de los microarrays de membranas mediante el programa ScanAlyze.

### 8.1 Tratamiento de datos

Con el fin de normalizar los datos de autorradiografía, los microarrays se expusieron junto con patrones comerciales previamente calibrados tanto para los ligandos marcados con  $[^3\text{H}]$  como con  $[^{35}\text{S}]$ . Estos estándares están compuestos por un polímero sintético y constan de bandas que contienen concentraciones conocidas y crecientes del isótopo radiactivo. La impresión en las películas radiosensibles generada por los estándares de  $[^3\text{H}]$  y de  $[^{14}\text{C}]$  se cuantificó de la misma manera que los microarrays utilizando, en este caso, una gradilla de las mismas características. Estos patrones nos permitieron obtener en cada experimento una curva de calibración, con la que se calcularon los nCi/g a partir de las densidades de grises determinadas en cada depósito del microarray. Posteriormente, los valores expresados en nCi/g se convierten en unidades molares por unidad de tejido (Unnerstall et al., 1982).

Asimismo, en cada microarray se incluyó también una curva control consistente en cantidades crecientes de membranas de corteza cerebral de rata que permitiese comprobar la fiabilidad del método de normalización empleado.

En cuanto a los estudios de acople funcional, se calculó la estimulación neta restando la fijación basal de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  a los valores de actividad

inducida por agonista. Además, también se determinaron los porcentajes de estimulación sobre la actividad basal, de acuerdo con la fórmula  $[(\text{agonista} \times 100)/\text{basal}]-100$ .

Dado que los microarrays están constituidos por muestras de diferente origen y que la eficiencia de fijación al soporte no es igual para cada tipo de muestra, fue necesaria la normalización de los resultados en función de la cantidad de membranas reales inmovilizadas en cada punto. Para ello, después de cada impresión se realizó una tinción de tres microarrays elegidos aleatoriamente (del principio, mitad y final) de cada uno de los lotes creados adaptando el método Bradford (Bradford, 1976). Además de las muestras, en cada microarray se depositaron cantidades crecientes de BSA, con el fin de crear una curva de calibración interna que permitiese la transformación de las intensidades a nanogramos de proteína.

El tratamiento de los datos se realizó con los programas informáticos Microsoft Office Excel y GraphPad Prism 5.

## **8.2 Análisis estadístico**

Los datos se expresan como valores medios  $\pm$  error estándar de todas las muestras utilizadas. Posteriormente, las comparaciones entre grupos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Bonferroni en los experimentos en microarrays de membranas celulares.

La asociación existente entre el marcaje autorradiográfico de los receptores y el acople funcional de éstos a la proteína G se determinó mediante la correlación de Pearson.

Para la realización de estos análisis estadísticos se utilizaron los programas Microsoft Office Excel y GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, EE.UU.).

## 9. Estudio de competición en homogeneizados de membrana

### 9.1 Estudio del complejo I mitocondrial mediante [<sup>3</sup>H]-DHR

Para el estudio del complejo I mitocondrial en membranas aisladas de rata (corteza cerebral e hígado), ratón (cerebelo de ratón *wildtype* y *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub>), se utilizó el ligando selectivo [<sup>3</sup>H]-DHR.

Las membranas celulares una vez descongeladas se diluyeron a una concentración de proteínas final de 0,05 mg/ml con tampón de ensayo (Tris 50 mM; BSA 1%; pH 7,6). A continuación, se incubaron durante 120 min a t.a. con NADH 0,2 mM, [<sup>3</sup>H]-DHR (2 nM) y con los diferentes fármacos cannabinoides. Concretamente, las muestras de corteza de rata se incubaron con los agonistas cannabinoides CP55,940 y WIN55,212-2 y con los antagonistas AM251 y AM281 a 100 μM. Para el estudio en homogeneizados de membranas de hígado de rata y cerebelo de ratón *wildtype* y *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub> se utilizó el fármaco CP55,940 a concentraciones comprendidas entre 0,01 μM y 1 mM. La fijación no específica fue definida en presencia de rotenona (10 μM). Transcurrido este tiempo, se paró la reacción por dilución y por frío y se separó el radioligando unido del libre por filtración rápida sobre vacío utilizando un sistema de filtrado simultáneo “Cell Harvester” CH-5605 (Inotech, Suiza), a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C pretratados durante 15 min en el tampón de ensayo. Los filtros fueron lavados tres veces consecutivas con 5 ml de tampón a 4°C. Finalmente, los filtros se colocaron en viales de plástico conteniendo 5 ml de líquido de centelleo (OptiPhase “HiSafe II”) y se cuantificó la radiactividad retenida en los mismos por medio de un espectrofotómetro de centelleo líquido (QuantaSmart™ TriCarb® Packar 2200, CA, EE.UU.) durante 5 min cada vial.

Los cálculos de los datos obtenidos de las mediciones se realizaron con el programa informático Microsoft Office Excel, el análisis estadístico se realizó de la misma manera que el descrito para microarrays de membranas celulares.

## **10. Estudio de viabilidad de mitocondrias**

### **10.1 Extracción de mitocondrias**

Para la extracción de mitocondrias se siguió el protocolo descrito por Kristal y colaboradores (Gross et al., 2011) con algunas modificaciones. Para ello se empleó una fracción de corazón de rata macho Sprague-Dawley de tres individuos diferentes, tras ser descongelados se homogeneizaron en 20 volúmenes de tampón de homogeneización (Tris-HCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM; EGTA 1 mM; pH 7,4) suplementado con 250 mM de sacarosa con el homogeneizador Heidolph RZR 2020 a 1.500 rpm. A continuación, el homogeneizado se centrifugó a 1.000 g durante 8 min, se decantó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo esta vez a 14.000 g durante 8 min. Posteriormente, el sedimento se resuspendió suavemente con tampón de homogeneización y se centrifugó de nuevo 8 min a 14.000 g. Para finalizar, se retiró el sobrenadante quedando la fracción de mitocondrias aisladas en el sedimento obtenido. Todos estos pasos se realizaron a 4°C para mantener a la viabilidad de las mitocondrias.

### **10.2 Estudios de viabilidad mitocondrial mediante la determinación de la actividad malato deshidrogenasa**

La actividad malato deshidrogenasa fue estudiada tanto en homogeneizados de membranas celulares como en mitocondrias aisladas de corazón de rata macho. Esta enzima soluble, que se encuentra en la matriz mitocondrial, cataliza el paso de malato a oxalacetato con reducción de NAD<sup>+</sup>, sin embargo, esta reacción está fuertemente desplazada hacia la oxidación del NADH utilizando como sustrato el oxalacetato (Mullinax et al., 1982; Minárik et al., 2002), por este motivo es útil para determinar la viabilidad de las mitocondrias. Así, las membranas celulares y las mitocondrias aisladas de corazón de rata macho fueron homogeneizadas en tampón MOPS (20 mM; pH 7,5), a continuación, se incubaron en presencia de oxalacetato (0,3 mM; pH 6,5) y NADH (0,1 mM) ambos suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). La oxidación del NADH se cuantificó a 340 nm de absorbancia cada 10 seg durante 5 min a t.a. con el espectrofotómetro Scan it for Multiscan

(Thermo Scientific).

## **11. Determinación de las actividades enzimáticas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en homogeneizados de membrana**

### **11.1 Determinación de la actividad NADH deshidrogenasa (complejo I) en membranas de corazón de rata**

Para la determinación de la actividad NADH deshidrogenasa (complejo I) se utilizó el protocolo de Rodenburg y colaboradores (Janssen et al., 2007) con algunas modificaciones. Como aceptor final de electrones se empleó DCIP, así, el complejo I oxida el NADH, los electrones que genera son cedidos a la decilubiquinona (dUQ) que los pasa al DCIP reduciéndolo y volviéndose incoloro. La reducción del DCIP se cuantificó a 595 nm de absorbancia (Fig. 11-1). Para ello se homogeneizaron las membranas de corazón de rata hasta una concentración de proteínas final de 0,1 mg/ml en tampón fosfato 25 mM ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ; BSA 0,3 mg/ml; pH 7,4). Las membranas se incubaron con DCIP (160  $\mu$ M), NADH (0,7 mM) y dUQ (50  $\mu$ M), además se incubó con el inhibidor del complejo I rotenona (10  $\mu$ M), con el inhibidor del complejo III antimicina A (5, 10, 50 y 100  $\mu$ M) con los diferentes ligandos cannabinoides CP55,940 (50  $\mu$ M), WIN55,212-2 (100  $\mu$ M), AM251 (100  $\mu$ M), AM281 (100  $\mu$ M) o con el compuesto derivado cannabinoide HU331 (50  $\mu$ M). Se realizaron medidas a t.a. cada 30 segundos durante 50 min con un filtro de absorbancia a 595 nm con el espectrofotómetro Scan it for Multiscan (Thermo Scientific).

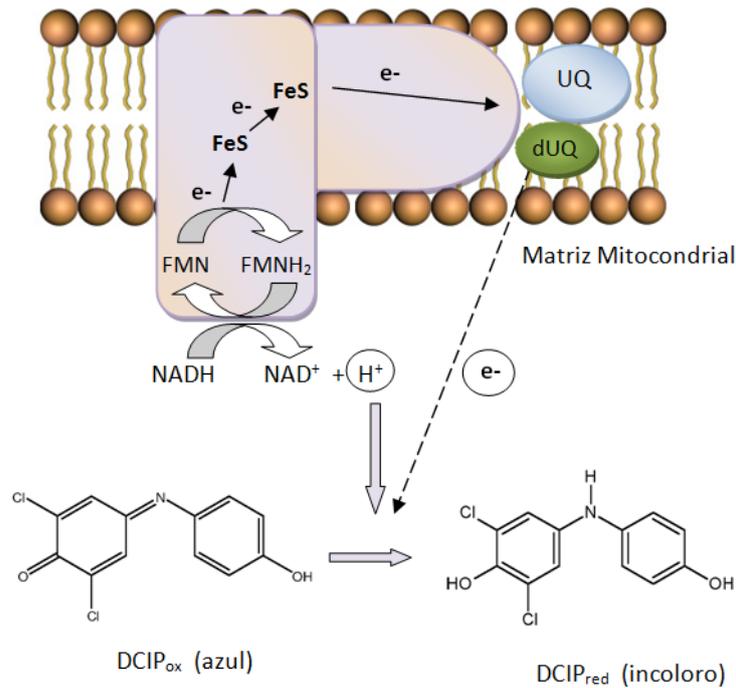


Fig. 11-1. Esquema representativo de la reacción de reducción de la molécula de DCIP producida por el complejo I mitocondrial, o NADH deshidrogenasa.

## 11.2 Determinación de la actividad succinato deshidrogenasa (complejo II) en membranas de corazón de rata

Para la cuantificación de la actividad succinato deshidrogenasa se siguió un protocolo de Seligman y colaboradores (Nachlas et al., 1957) con algunas modificaciones. Las membranas fueron homogeneizadas en tampón fosfato 50 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) a una concentración final de 0,1 mg/ml de proteínas y se utilizó NBT como aceptor de electrones (Nachlas et al., 1957). En esta reacción el succinato es transformado a fumarato por el complejo II mitocondrial, en este proceso se generan dos electrones que van a la UQ y ésta los cede y se forma anión superóxido. El NBT capta los electrones a través de los iones superóxidos que se forman *in vitro* en esta reacción, reduciéndose y formando un compuesto insoluble azul, el formazán (Esfandiari et al., 2003; Berridge et al., 2005). El NBT necesita de 2 protones y 4 electrones para reducir sus dos anillos de tetrazolio (Achilli et al., 2014) (Fig. 11-2). Las membranas celulares de corazón de rata se incubaron en presencia de succinato (1 mM) y de NBT (0,5 mg/ml) y en presencia o ausencia de dUQ (10 µM), antimicina A (5, 10, 50 y 100 µM), rotenona (10, 50 y 100 µM), azida

sódica (2,5 mM) y los ligandos cannabinoides CP55,940 (50  $\mu\text{M}$ ), WIN55,212-2 (100  $\mu\text{M}$ ), AM251 (100  $\mu\text{M}$ ) o AM281 (100  $\mu\text{M}$ ) o el compuesto de origen cannabinoide HU331 (50  $\mu\text{M}$ ).

La reducción del NBT se cuantificó con un filtro de absorbancia a 595 nm, se realizaron medidas cada 10 min durante 16 horas a t.a. con el espectrofotómetro Scan it for Multiscan (Thermo Scientific).

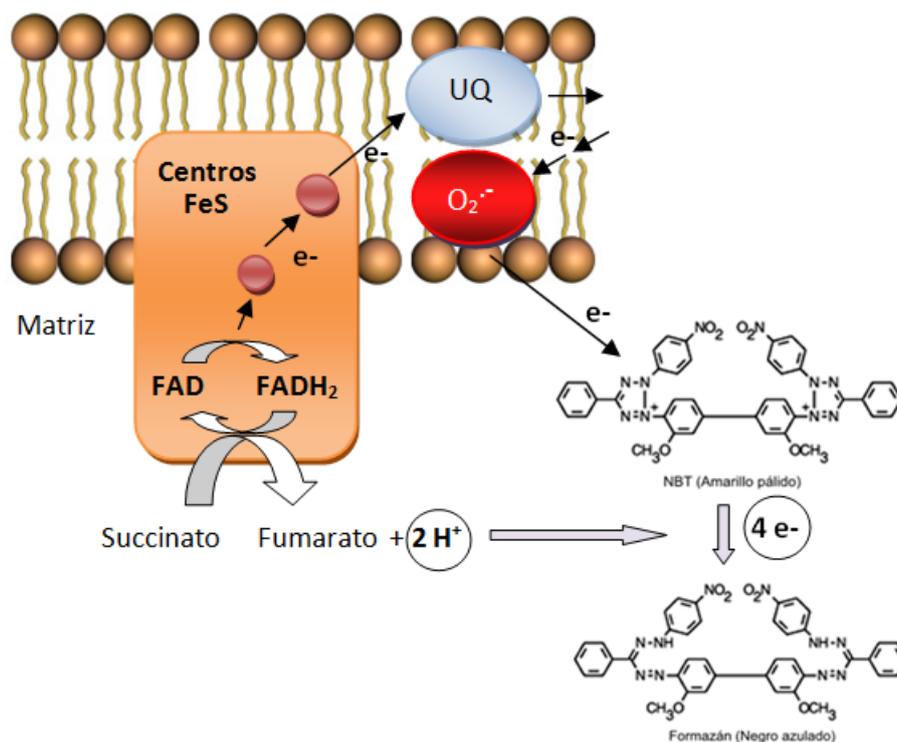


Fig. 11-2. Esquema representativo de la reacción de reducción de la molécula de NBT producida por el complejo II mitocondrial, o succinato deshidrogenasa.

### 11.3 Determinación de la actividad citocromo c oxidasa (complejo IV) en membranas de corazón de rata

En el estudio de determinación de la actividad citocromo c oxidasa se utilizó como dador de electrones el DAB, sustancia que reduce el citocromo c. La oxidación de la DAB genera un precipitado de color marrón que permite determinar la actividad de este complejo enzimático ya que es necesaria la reoxidación del citocromo c para que se regenere el sustrato de la DAB (Seligman et al., 1968; Roels, 1974) (Fig. 11-3).

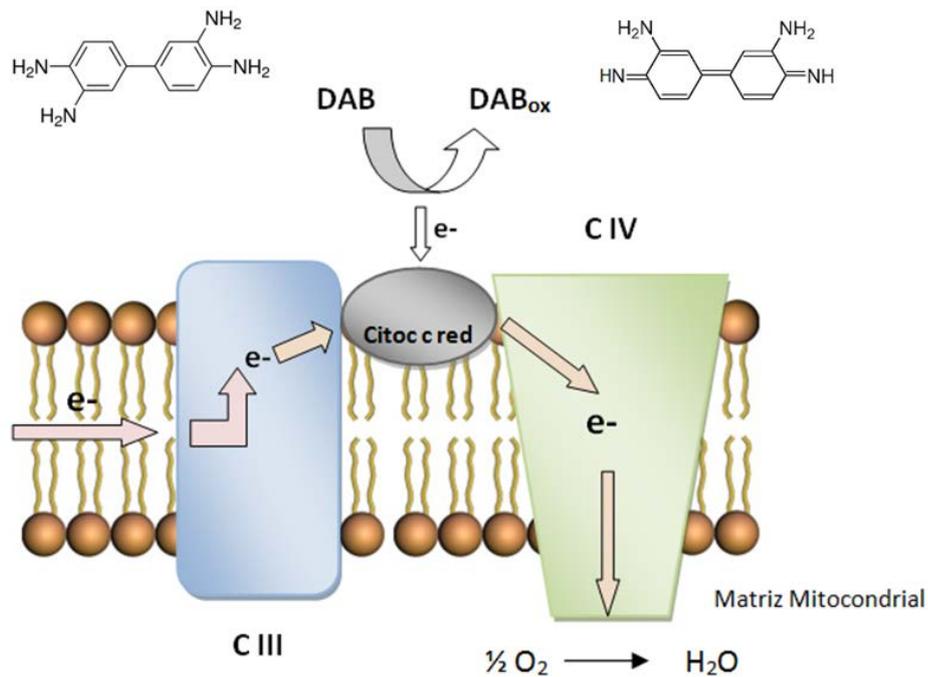


Fig. 11-3. Esquema representativo de la reacción de oxidación de la molécula de DAB utilizado en el ensayo de la detección de la actividad citocromo c oxidasa (complejo IV mitocondrial). Los electrones mostrados en el complejo III provienen de la activación del complejo I o II.

Las membranas celulares de corazón de rata una vez descongeladas se homogeneizaron a una concentración de proteínas final de 0,1 mg/ml en tampón fosfato 100 mM ( $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ ; pH 7,4). Las membranas se incubaron en presencia o ausencia de NADH (0,7 ó 1,4 mM), rotenona (10 ó 50  $\mu M$ ), antimicina A (5, 10, 50 ó 100  $\mu M$ ), mixotiazol (10 ó 50  $\mu M$ ), decilubiquinona (10, 50 ó 100  $\mu M$ ) y los ligandos cannabinoides CP55,940, WIN55,212-2, AM251 o AM281 o el compuesto de origen cannabinoide HU331 (1, 10, 50 ó 100  $\mu M$ ). Se realizaron medidas cada 10 min durante 16 horas a t.a. con un filtro de absorbancia a 595 nm con el espectrofotómetro Scan it for Multiscan (Thermo Scientific).

Al incubar las membranas celulares de corazón de rata con la DAB se obtiene una curva en la que se observa el funcionamiento de la enzima citocromo c oxidasa a lo largo del tiempo. Si además incubamos las membranas con NADH (el sustrato del complejo I) se observa una inhibición en la reacción hasta que el NADH se agota (Fig. 11-4), esto puede ser debido a que mientras el NADH se oxida y cede electrones al complejo I la cadena está funcionando de manera normal (los electrones del complejo I pasan al complejo III y luego al complejo IV) y el citocromo c no recibe los electrones de

la DAB. Sin embargo, una vez agotado el NADH la DAB puede oxidarse y ceder sus electrones al citocromo c. Esto indica que al estudiar la reacción de la citocromo c oxidasa es posible observar el funcionamiento de toda la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

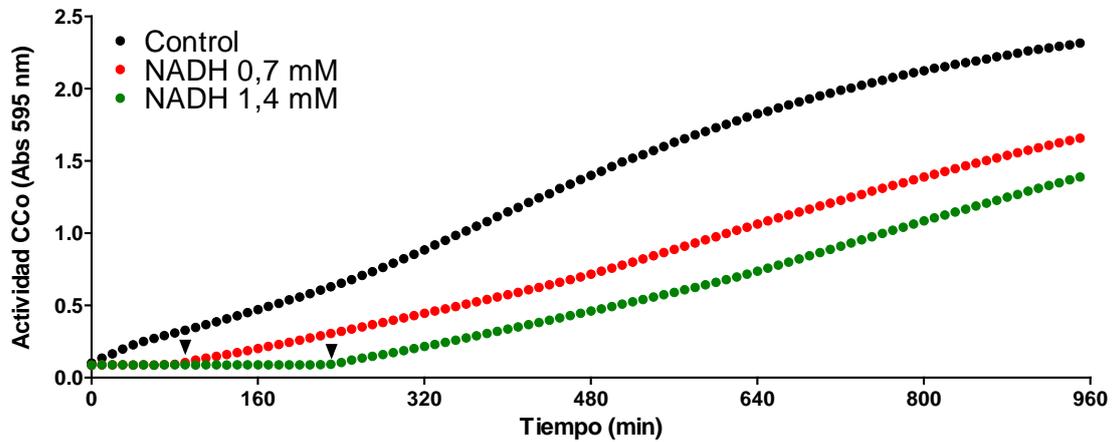


Fig. 11-4. Actividad citocromo c oxidasa o complejo IV mitocondrial en ausencia o presencia de NADH. Nótese la inhibición de la oxidación de la DAB que se produce cuando se añade NADH en el medio.



# **RESULTADOS**



## 1. Optimización de protocolos de autorradiografía en microarrays de membranas celulares de rata

El objetivo de los siguientes ensayos fue determinar las condiciones óptimas para el estudio de receptores acoplados a proteínas G por autorradiografía del receptor o del acople funcional mediante microarrays de membranas celulares.

Para ello, se fabricaron microarrays en los cuales se depositaron membranas celulares de corteza cerebral, estriado y cerebelo de rata a diferentes concentraciones.

### 1.1 Optimización de protocolos de autorradiografía para receptores cannabinoides, muscarínicos, opioides y GABAérgicos

La presencia de receptores GABAérgicos tipo B, muscarínicos y cannabinoides tipo 1 fue estudiada mediante la fijación del antagonista [ $^3\text{H}$ ]-CGP54626, el antagonista [ $^3\text{H}$ ]-NMS y el agonista [ $^3\text{H}$ ]-CP55,940, respectivamente, en los diferentes tejidos incluidos en los microarrays de membranas celulares. Se utilizaron las mismas condiciones que las empleadas en secciones de tejido cerebral de rata, sin embargo, fue necesario un periodo más largo de exposición al film (aproximadamente el doble) debido a la baja cantidad de proteína depositada en los microarrays. Como controles internos, se incluyeron secciones de tejido cerebral de rata en cada experimento.

#### Fijación de [ $^3\text{H}$ ]-CP55,940

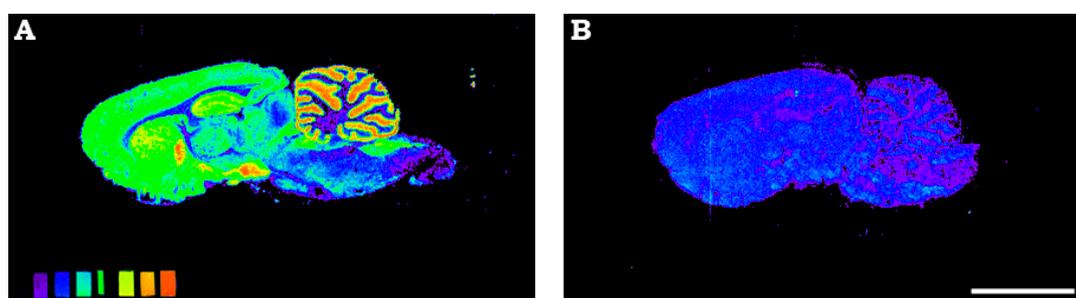


Fig. 1.1-1. Imagen representativa de la técnica de autorradiografía en secciones de encéfalo de rata. A. Fijación específica de [ $^3\text{H}$ ]-CP55,940. B. Fijación no específica obtenida en presencia de AM251. Barra: 7 mm.

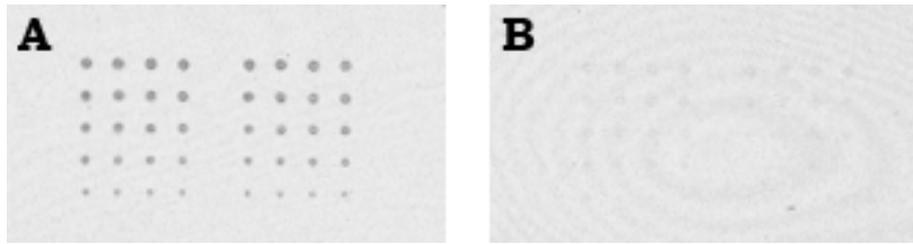


Fig. 1.1-2. Imagen representativa de la técnica de autorradiografía en microarrays de membranas celulares de corteza y estriado de rata. A. Fijación específica de  $[^3\text{H}]$ -CP55,940. B. Fijación no obtenida en presencia de AM251.

### Fijación de $[^3\text{H}]$ -NMS

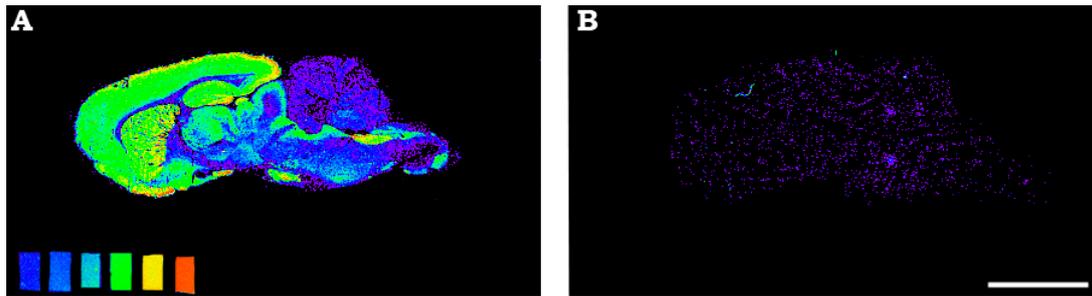


Fig. 1.1-3. Imagen representativa de la técnica de autorradiografía en secciones de encéfalo de rata. A. Fijación específica de  $[^3\text{H}]$ -NMS. B. Fijación no específica obtenida en presencia de atropina. Barra: 7 mm.

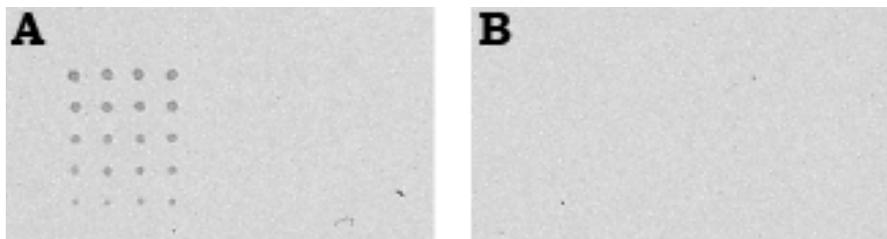


Fig. 1.1-4. Imagen representativa de la técnica de autorradiografía en microarrays de membranas celulares de estriado y cerebelo de rata. A. Fijación específica de  $[^3\text{H}]$ -NMS. B. Fijación no específica obtenida en presencia de atropina.

### Fijación de $[^3\text{H}]$ -DAMGO

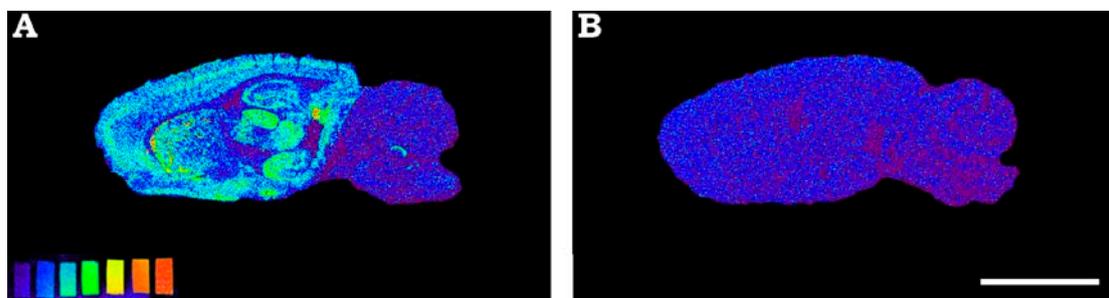


Fig. 1.1-5. Imagen representativa de la técnica de autorradiografía en secciones de encéfalo de rata. A. Fijación específica de  $[^3\text{H}]$ -DAMGO. B. Fijación no específica obtenida en presencia de naloxona. Barra: 7 mm.

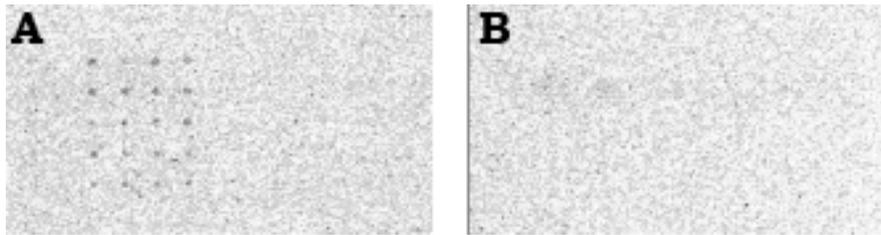


Fig. 1.1-6. Imagen representativa de la técnica de autorradiografía en microarrays de membranas celulares de estriado y cerebelo de rata. A. Fijación específica de [<sup>3</sup>H]-DAMGO. B. Fijación no específica obtenida en presencia de naloxona.

### Fijación de [<sup>3</sup>H]-CGP54626

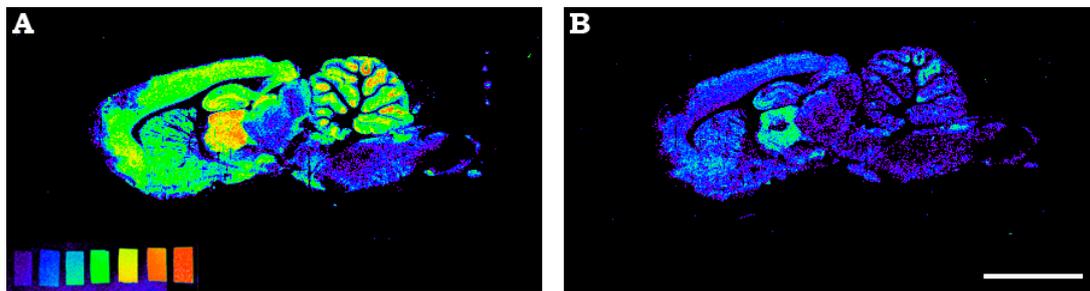


Fig. 1.1-7. Imagen representativa de la técnica de autorradiografía en secciones de encéfalo de rata. A. Fijación específica de [<sup>3</sup>H]-CGP54626. B. Fijación no específica obtenida en presencia de baclofen. Barra: 7 mm.

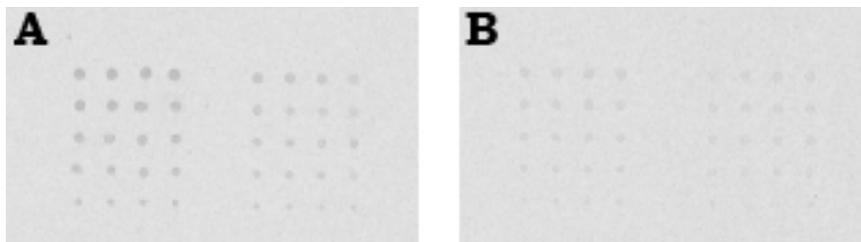


Fig. 1.1-8. Imagen representativa de la técnica de autorradiografía en microarrays de membranas celulares de corteza y estriado de rata. A. Fijación específica de [<sup>3</sup>H]-CGP54626. B. Fijación no específica obtenida en presencia de baclofen.

## 1.2 Optimización de los protocolos de acople funcional para los receptores GABAérgicos, opioides, muscarínicos y cannabinoides.

A continuación, se realizaron algunas modificaciones en el protocolo convencional de fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S con el objetivo de buscar las condiciones óptimas para el estudio de diferentes receptores mediante microarrays de membranas celulares.

Se realizaron ensayos con microarrays que contenían membranas celulares de corteza cerebral, estriado y cerebelo de rata a 5 concentraciones diferentes y se utilizaron agonistas de diferente naturaleza estructural como son los opiáceos (DAMGO), muscarínicos (carbacol), GABAérgicos (baclofen) y esfingosina 1-fosfato (CYM-5442) y sus respectivos antagonistas, naloxona, atropina, CGP55845 y W146 (Fig. 1.2-1).



Fig. 1.2-1. Imagen representativa de la técnica de autorradiografía de acople funcional en microarrays de membranas celulares de corteza, estriado y cerebelo de rata. A. En ausencia de agonista. B. En presencia del agonista WIN55,212-2 (10  $\mu$ M). C. En presencia del agonista carbacol (100  $\mu$ M). D. En presencia del agonista DAMGO (10  $\mu$ M). E. En presencia del agonista baclofen (10  $\mu$ M).

### **Determinación del tiempo de incubación**

Se estudiaron 4 tiempos de incubación (15, 30, 60 y 120 min) con el radioligando [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S y con el agonista muscarínico carbacol (100  $\mu$ M) y el opioide  $\mu$  DAMGO (10  $\mu$ M), así como con sus correspondientes antagonistas atropina (10  $\mu$ M) y naloxona (1  $\mu$ M). El objetivo de este experimento fue determinar el tiempo de incubación óptimo para obtener una estimulación de la fijación de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S inducida por el agonista adecuada, a la vez que un bloqueo por parte del antagonista en los microarrays de membranas celulares.

Tanto para los receptores muscarínicos como para los opiáceos, la incubación con sus respectivos antagonistas no bloqueó la fijación de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S en ninguno de los tiempos ni en ninguno de los tejidos estudiados (Fig. 1.2-2 y 1.2-3). Sin embargo, la fijación de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S inducida por carbacol y DAMGO proporciona un mejor resultado en el min 120, por este motivo, se mantuvo como tiempo para la incubación.

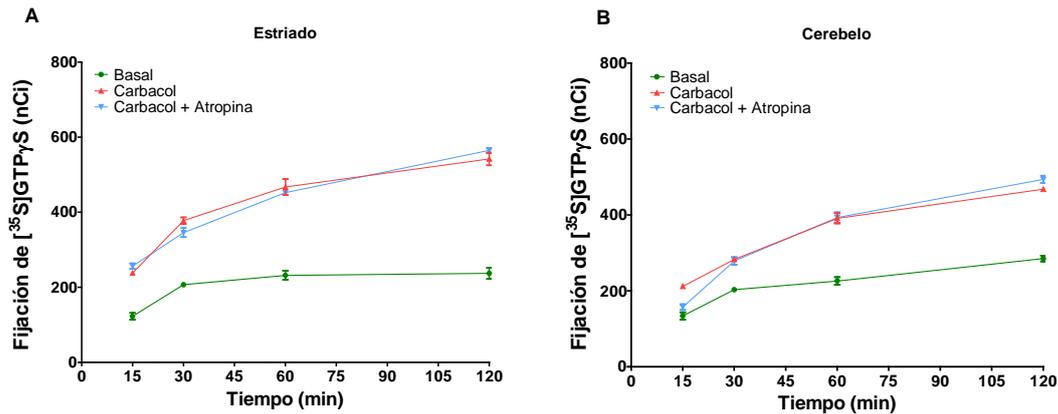


Fig. 1.2-2. Fijación de [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S a microarrays de membrana de rata en ausencia (basal) y en presencia de carbacol (100 μM) o de carbacol (100 μM) y atropina (10 μM) en el tiempo en microarrays de membranas de estriado de rata (A) en microarrays de cerebelo de rata (B).

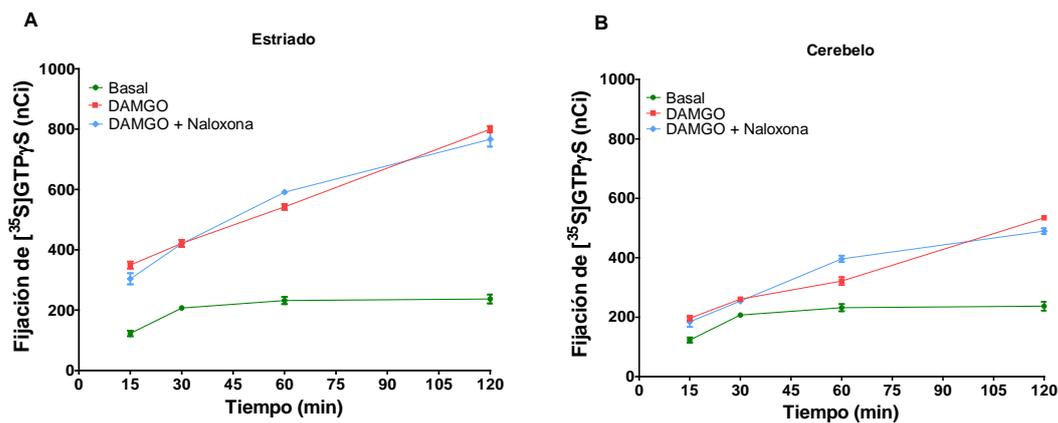


Fig. 1.2-3. Fijación de [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S a microarrays de membrana de rata en ausencia (basal) y en presencia de DAMGO (10 μM) o de DAMGO (10 μM) y naloxona (1 μM) en el tiempo en microarrays de membranas de estriado de rata (A) o en microarrays de membranas de cerebelo de rata (B).

### Optimización de la concentración de GDP y [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S

Se realizaron varios ensayos combinando concentraciones de GDP y [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S diferentes a las condiciones estándar de la técnica (2 mM GDP y 0,1 nM [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S) en presencia del agonista de los receptores opiáceos DAMGO (10 μM) y el antagonista naloxona (1 μM). Se decidió estudiar este tipo de GPCR ya que tiene una expresión elevada en estriado pero baja en cerebelo (Fig. 1.2-4).

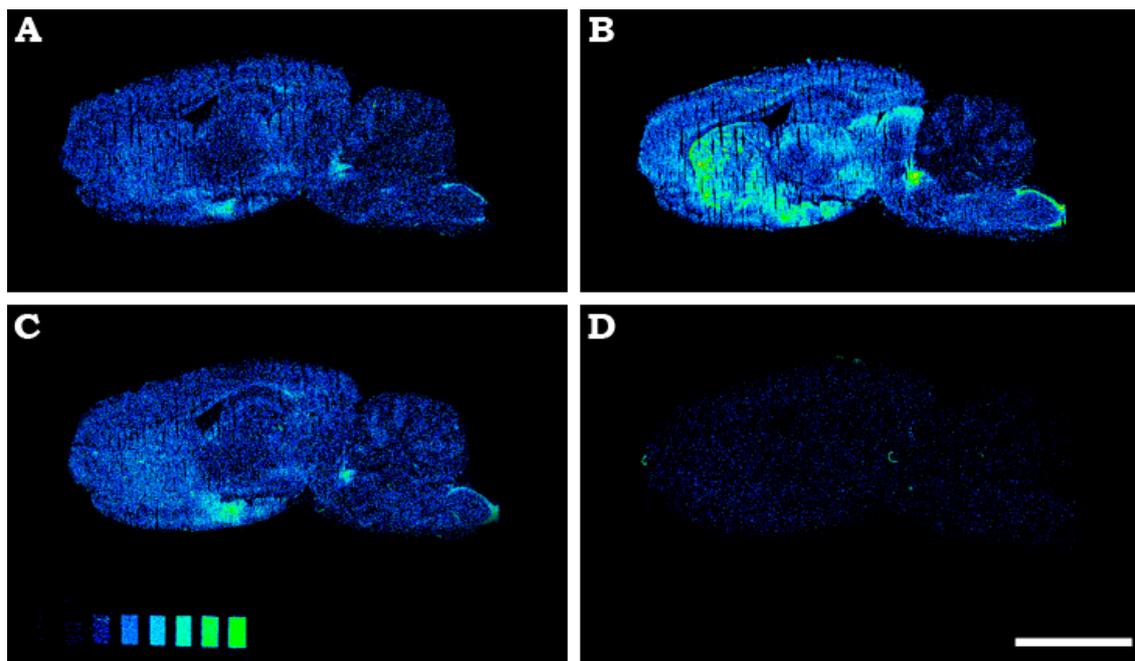


Fig. 1.2-4. Fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  a tejido cerebral de rata. A. En ausencia de agonista o fijación basal. B. En presencia del agonista de receptores opiáceos tipo  $\mu$  sintético, DAMGO ( $10\ \mu\text{M}$ ). C. En presencia de DAMGO ( $10\ \mu\text{M}$ ) y el antagonista específico de receptores opiáceos tipo  $\mu$ , naloxona ( $1\ \mu\text{M}$ ). D. Fijación no específica determinada en presencia de  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  ( $10\ \mu\text{M}$ ) no radiactivo.

Los resultados obtenidos de los ensayos realizados en presencia de  $10\ \mu\text{M}$  de GDP y de  $0,1\ \text{nM}$  de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  (Fig. 1.2-5 A) mostraron porcentajes de estimulación de en torno al 90% en corteza y estriado y alrededor del 70% en cerebelo. Por otro lado, el efecto del antagonista sólo logró bloquear el efecto del DAMGO en las membranas de estriado, observándose una fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  de un 40% y 45% en corteza y cerebelo, respectivamente.

En el ensayo en presencia de GDP  $50\ \mu\text{M}$  y de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$   $0,1\ \text{nM}$  en estriado se cuantificaron estimulaciones de 145% y en cerebelo de 40%, además, en presencia del antagonista selectivo naloxona se obtuvo una fijación de aproximadamente un 50% en estriado y un 40% en cerebelo de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  (Fig. 1.2-5 B).

Mediante el ensayo en presencia de  $250\ \mu\text{M}$  de GDP y de  $0,25\ \text{nM}$  de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  las estimulaciones obtenidas en corteza y en estriado fueron menores que con las dos condiciones testadas anteriormente (Fig. 1.2-5 C).

Los datos obtenidos de la incubación en presencia de GDP  $500\ \mu\text{M}$  y  $0,50\ \text{nM}$  de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  desvelaron unas estimulaciones inducidas por DAMGO en corteza de un 70%, de un 130% en estriado y de un 35% en cerebelo. Por

otro lado, en presencia del antagonista, se obtuvo una fijación muy elevada del radioligando  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  incluso por encima de la fijación en presencia del agonista en corteza y en cerebelo (Fig. 1.2-5 D).

Con todo esto, la condición que pareció ser más apropiada para los ensayos de autorradiografía es 50  $\mu\text{M}$  de GDP y 0,1 nM de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  debido a que en estriado se obtuvo la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por DAMGO más elevada, así como una fijación baja en cerebelo (tejido en el que no hay receptores opioides  $\mu$ ) y que al no bloquearse con la naloxona esta fijación podría ser inespecífica.

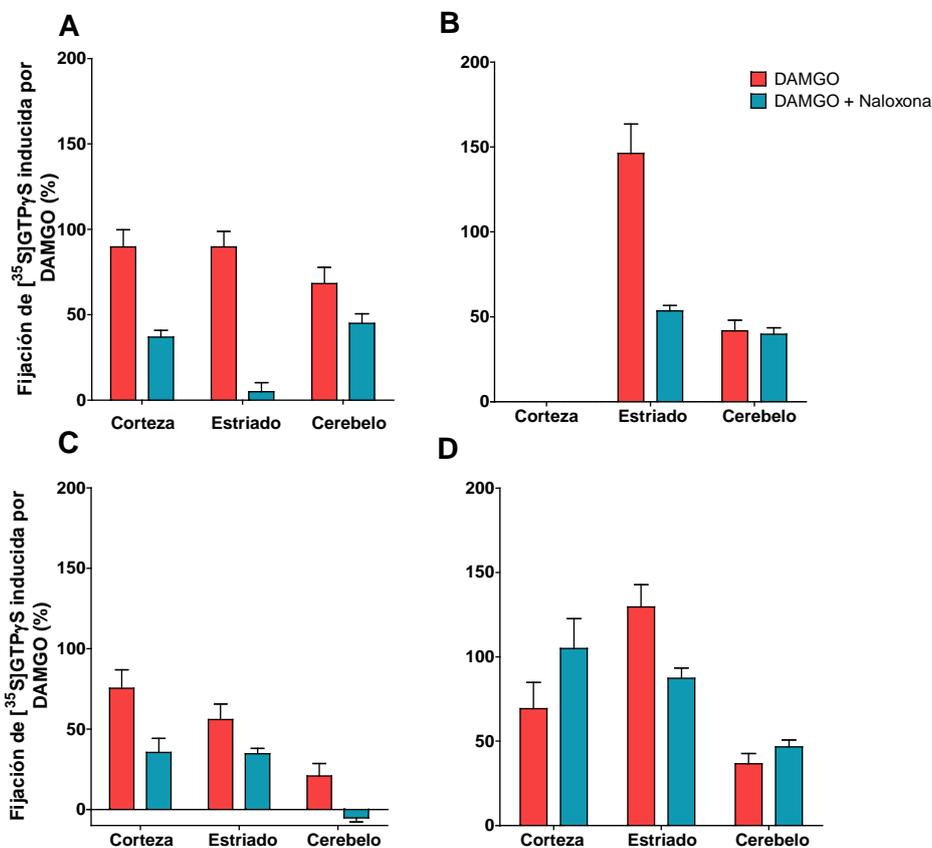


Fig. 1.2-5. Fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  en presencia de DAMGO (■) o de DAMGO y naloxona (■) en microarrays de membranas celulares de corteza, estriado y cerebelo de rata. A. Incubación con GDP 10  $\mu\text{M}$  y  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  0,1 nM. B. Incubación con GDP 50  $\mu\text{M}$  y  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  0,1 nM. C. Incubación con GDP 250  $\mu\text{M}$  y  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  0,25 nM. D. Incubación con GDP 500  $\mu\text{M}$  y  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  0,50 nM.

## Validación de las condiciones de preincubación: en presencia y ausencia de GDP

Una vez establecida la condición más adecuada en cuanto a la concentración de GDP y [<sup>35</sup>S]GTPγS se evaluó el efecto de la preincubación con GDP para tratar de tener una mayor proporción de receptores desacoplados y por tanto, susceptibles de ser activados por el agonista. Con este fin se utilizó el agonista de receptores muscarínicos carbacol (100 μM) y su antagonista atropina (10 μM) y el agonista de receptores GABAérgicos baclofen (10 μM) y su antagonista CGP55845 (1 μM).

La condición de preincubación con GDP 2 mM, disminuyó los porcentajes de estimulación inducida por el carbacol, no llegando a un 50% en corteza ni a un 100% en estriado. Sin embargo, el antagonista bloqueó totalmente, incluso llevando las inhibiciones por debajo del basal (Fig. 1.2-6 B).

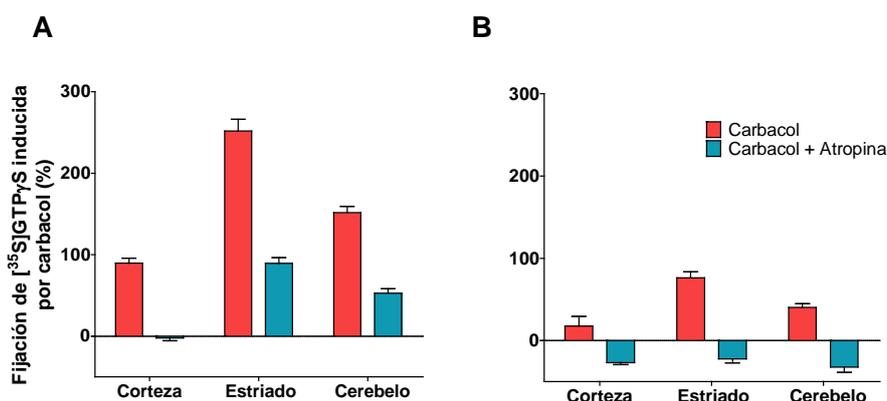


Fig. 1.2-6. Fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS en presencia de carbacol (■) o de carbacol y atropina (■). A. Preincubación en ausencia de GDP. B. Preincubación con GDP 2 mM.

Siguiendo con las pruebas con diferentes agonistas se ensayó con el agonista de receptores GABA<sub>B</sub>, baclofen. Utilizando como antagonista el fármaco CGP55845.

Como se observa en las imágenes (Fig. 1.2-7 A, B y C) los resultados en ausencia de GDP en la preincubación dieron unos porcentajes de estimulación de un 36% en cerebelo, 21% en estriado y 27% en corteza. Asimismo, se logra antagonizar en una gran parte la estimulación del agonista.

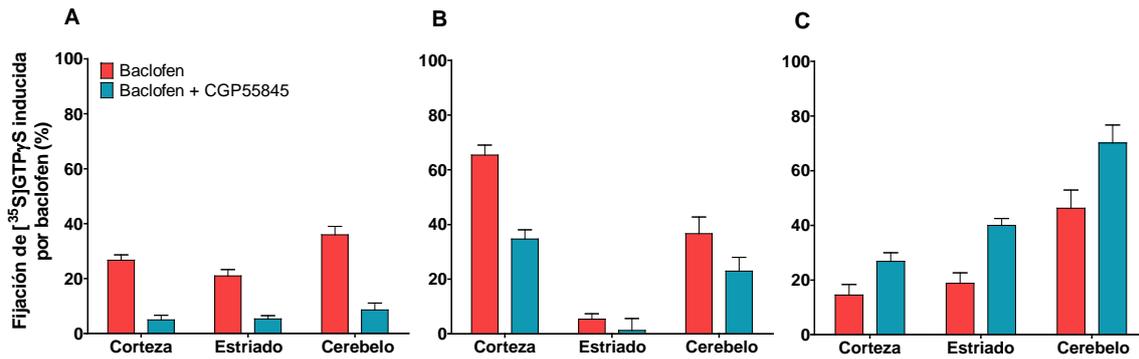


Fig. 1.2-7. Fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  en presencia de baclofen (■) o de baclofen y CGP55845 (■). A. Preincubación en ausencia de GDP. B. Preincubación con GDP 50  $\mu\text{M}$ . C. Preincubación con GDP 2 mM.

Teniendo en cuenta lo obtenido para estos dos tipos de receptores parece ser que con la condición de preincubación en ausencia de GDP se obtienen resultados más próximos a lo esperado.

#### Variación en la concentración de agonista utilizado

Por último, se realizó el experimento de autorradiografía con dos concentraciones diferentes de agonista con el objetivo de evitar las fijaciones inespecíficas de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  que se obtenían en algunos tejidos. Con este fin se utilizaron los agonistas carbacol (10 y 100  $\mu\text{M}$ ), DAMGO (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y WIN55,212-2 (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y los antagonistas atropina (10  $\mu\text{M}$ ), naloxona (1  $\mu\text{M}$ ) y AM251 (10  $\mu\text{M}$ ).

En el caso de los receptores muscarínicos (Fig. 1.2-8 A y B) la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de carbacol no fue suficiente para producir los porcentajes de estimulación sobre el basal deseados ya que en el caso de las membranas de corteza cerebral de rata no se produjo apenas estimulación y en estriado y cerebelo fueron menores que cuando se incubó con 100  $\mu\text{M}$  de carbacol.

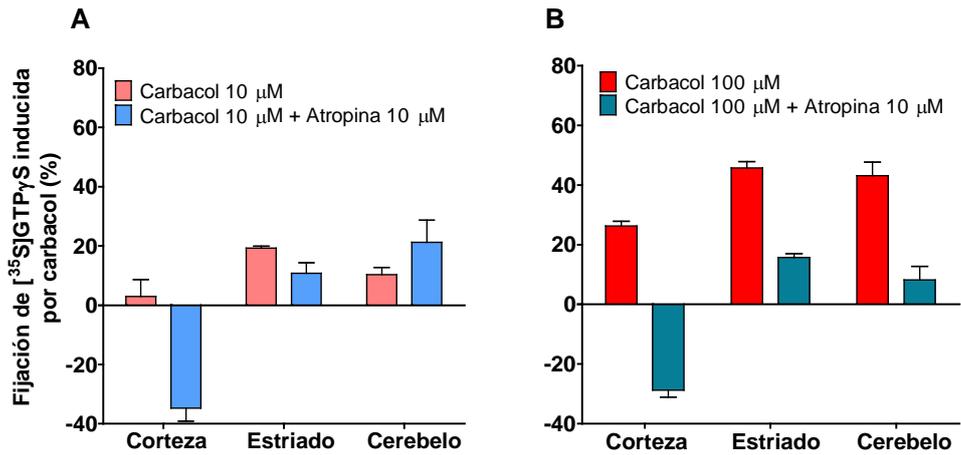


Fig. 1.2-8. Fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  a microarrays de membrana de rata. A. Incubación en presencia de carbacol ( $10\ \mu\text{M}$ ) (■) o de carbacol ( $10\ \mu\text{M}$ ) y atropina ( $10\ \mu\text{M}$ ) (■). B. Incubación en presencia de carbacol ( $100\ \mu\text{M}$ ) (■) o de carbacol ( $100\ \mu\text{M}$ ) y atropina ( $10\ \mu\text{M}$ ) (■).

En el estudio con los receptores opiáceos (Fig. 1.2-9 A y B) se obtuvo una estimulación mayor en estriado cuando fue incubado con  $10\ \mu\text{M}$  del agonista DAMGO, además, en ambos casos no apareció estimulación en las membranas de cerebelo tal y como se describe en la literatura.

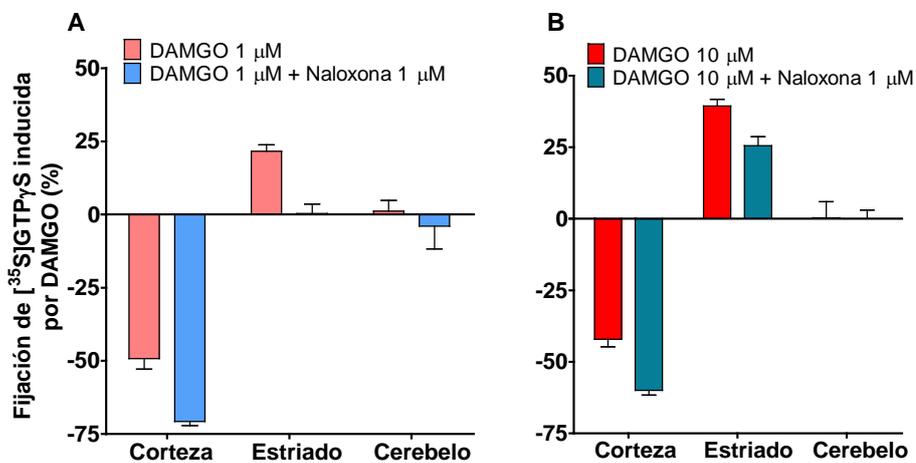


Fig. 1.2-9. Fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  a microarrays de membrana de rata. A. Incubación en presencia de DAMGO ( $1\ \mu\text{M}$ ) (■) o de DAMGO ( $1\ \mu\text{M}$ ) y naloxona ( $1\ \mu\text{M}$ ) (■). B. Incubación en presencia de DAMGO ( $10\ \mu\text{M}$ ) (■) o de DAMGO ( $10\ \mu\text{M}$ ) y naloxona ( $1\ \mu\text{M}$ ) (■).

No se observaron diferencias significativas en la incubación de los microarrays celulares con el agonista cannabinoide WIN55,212-2 a  $1\ \mu\text{M}$  o a  $10\ \mu\text{M}$ .

$\mu\text{M}$ , lo que indica que ya a estas concentraciones se ha llegado al efecto máximo en los tres tejidos estudiados (Fig. 1.2-10 A y B).

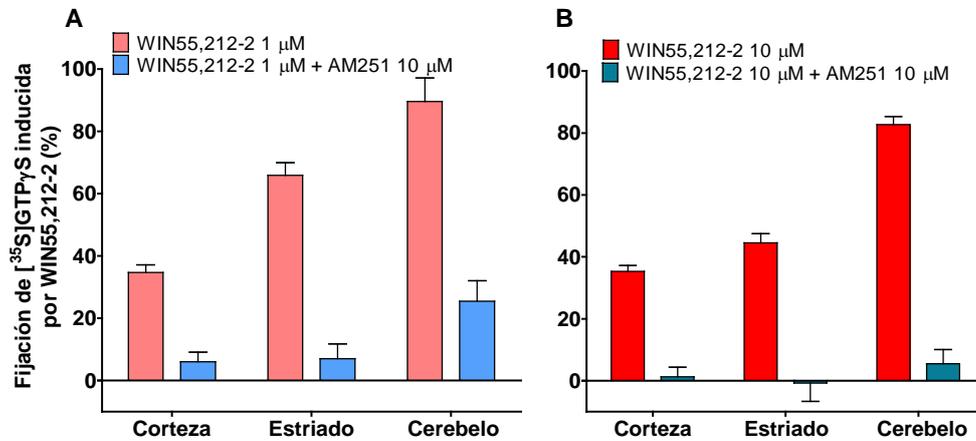


Fig. 1.2-10. Fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  a microarrays de membrana de rata. A. Incubación en presencia de WIN55,212-2 ( $1\ \mu\text{M}$ ) o de WIN55,212-2 ( $1\ \mu\text{M}$ ) y AM251 ( $10\ \mu\text{M}$ ). B. Incubación en presencia de WIN55,212-2 ( $10\ \mu\text{M}$ ) o de WIN55,212-2 ( $10\ \mu\text{M}$ ) y AM251 ( $10\ \mu\text{M}$ ).

Por último se estudió el acople funcional de los receptores de esfingosina 1-fosfato tipo 1 ( $\text{S1P}_1$ ) en microarrays de membranas celulares utilizando el agonista CYM-5442 ( $1\ \mu\text{M}$ ) y de CYM-5442 ( $1\ \mu\text{M}$ ) y el antagonista W146 ( $10\ \mu\text{M}$ ), con el objetivo de verificar si los cambios realizados en el protocolo de autorradiografía funcional servían para otros receptores.

Los porcentajes de estimulación que se obtuvieron cuando se incubó con el agonista CYM-5442 mostraron un 80% en las membranas de cerebelo incluidas en el microarray. En estriado se observó un 21% y en corteza fue prácticamente inapreciable. El antagonista bloqueó casi por completo en cerebelo y un 50% aproximadamente en estriado (Fig. 1.2-11).

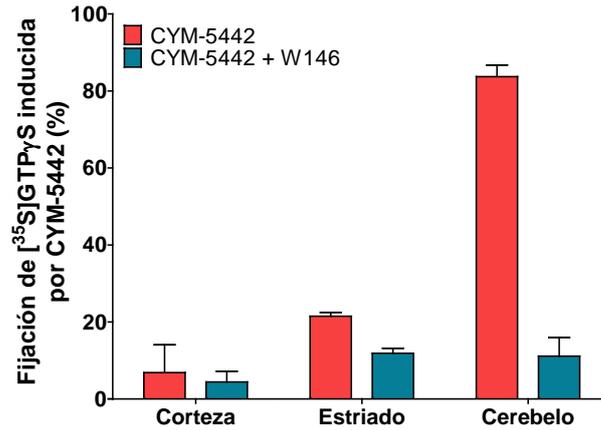


Fig. 1.2-11. Fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  a microarrays de membrana de rata en presencia de CYM5442 (1  $\mu\text{M}$ ) (■) o en presencia de CYM-5442 (1  $\mu\text{M}$ ) y W146 (10  $\mu\text{M}$ ) (■).

## Sumario

1. Se comprobó que el protocolo empleado en los estudios de autorradiografía en secciones de tejido es también adecuado para los microarrays de membranas celulares modificando el tiempo de exposición de los microarrays requerido.

2. Las condiciones que mejores resultados dieron para los experimentos de autorradiografía de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  en microarrays de membranas celulares fueron 2 horas de incubación con GDP 50  $\mu\text{M}$  y  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  0,1 nM, preincubación sin GDP. Se decidió mantener las concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  para carbacol y de 10  $\mu\text{M}$  para DAMGO y WIN55,212-2 para los futuros ensayos.

## **2. Validación de los microarrays de membranas celulares de modelos animales y líneas celulares.**

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el ensayo de fijación de radioligandos y acople funcional, se fabricaron microarrays compuestos por membranas celulares que incluían líneas celulares que sobreexpresaban GPCR, microarrays de membranas de tejido de rata control, tejidos de un modelo de la enfermedad de Parkinson y de animales *knockout* para el receptor cannabinoide tipo 1.

Se estudiaron los receptores GABAérgicos tipo B, muscarínicos, opioides tipo  $\mu$  y cannabinoides en dichos modelos con el objetivo de, por un lado, comprobar si los cambios descritos en la literatura concuerdan con los obtenidos en nuestros microarrays y por otro, identificar alteraciones específicas de estos receptores en las patologías estudiadas.

### **2.1 Estudio de GPCR en microarrays de membranas celulares de líneas celulares**

Se determinó la densidad de receptores GABAérgicos tipo B, muscarínicos y cannabinoides mediante fijación de [ $^3$ H]-CGP54626, [ $^3$ H]-NMS y [ $^3$ H]-CP55,940, respectivamente.

#### **Estudio de la densidad de receptores en líneas celulares que sobreexpresan GPCR**

En los microarrays de membranas aisladas de líneas celulares que sobreexpresan GPCR se obtuvo una fijación de [ $^3$ H]-CGP54626 de  $8,434 \pm 1,889$  pmol/ng de proteína en la línea celular que sobreexpresaba el receptor GABA<sub>B</sub> no observándose fijación alguna del radioligando en el resto de las líneas celulares que estaban presentes en el microarray (Fig. 2.1-1 A)

Asimismo, se obtuvo una fijación de [ $^3$ H]-NMS de  $2,518 \pm 0,105$  pmol/ng de proteína en la línea celular que sobreexpresa el receptor M<sub>2</sub>, muy por encima del resto de las líneas celulares donde la fijación fue nula o apenas existente (por debajo de 0,2 pmol/ng proteína) (Fig. 2.1-1 B).

Por último, la línea celular que más fijación de  $[^3\text{H}]$ -CP55,940 presentó fue la que sobreexpresaba el receptor  $\text{CB}_1$  con una fijación de  $0,794 \pm 0,019$  pmol/ng de proteína (Fig. 2.1-1 C).

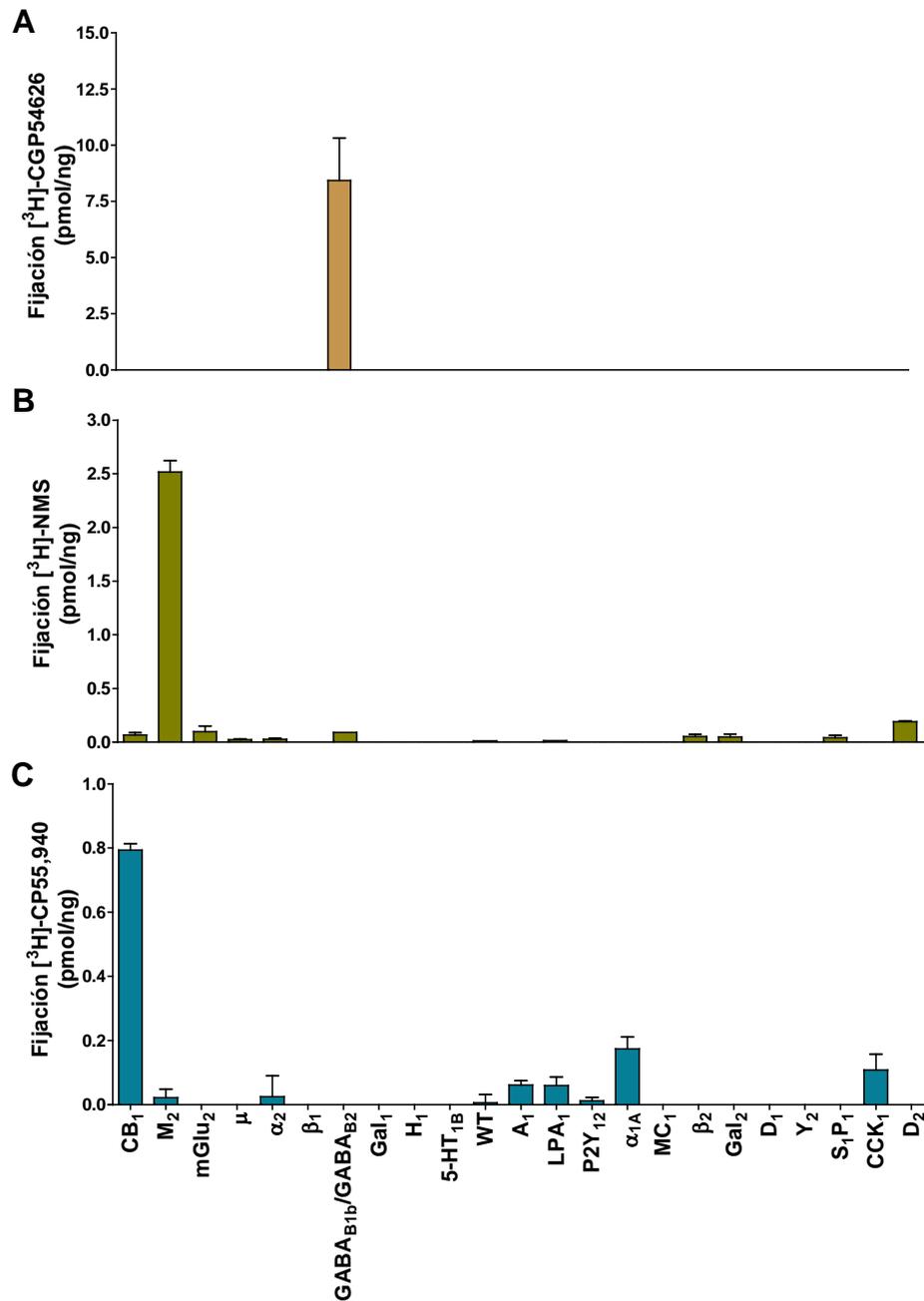


Fig. 2.1-1. Estudio autorradiográfico en microarrays de membranas de líneas celulares que sobreexpresan GPCR. A. Fijación específica de  $[^3\text{H}]$ -CGP54626 (■). B. Fijación específica de  $[^3\text{H}]$ -NMS (■). C. Fijación específica de  $[^3\text{H}]$ -CP55,940 (■).

### Fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S inducida por WIN55,212-2 en microarrays de membranas de líneas celulares que sobreexpresan el receptor CB<sub>1</sub>

En las membranas celulares de las células CHEM que sobreexpresan el receptor CB<sub>1</sub> se obtuvo una fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S del 400% sobre el basal cuando se incubó con WIN55,212-2 (10  $\mu$ M), no observándose fijación relevante en las células CHEM sin transfectar (Fig. 2.1-2).

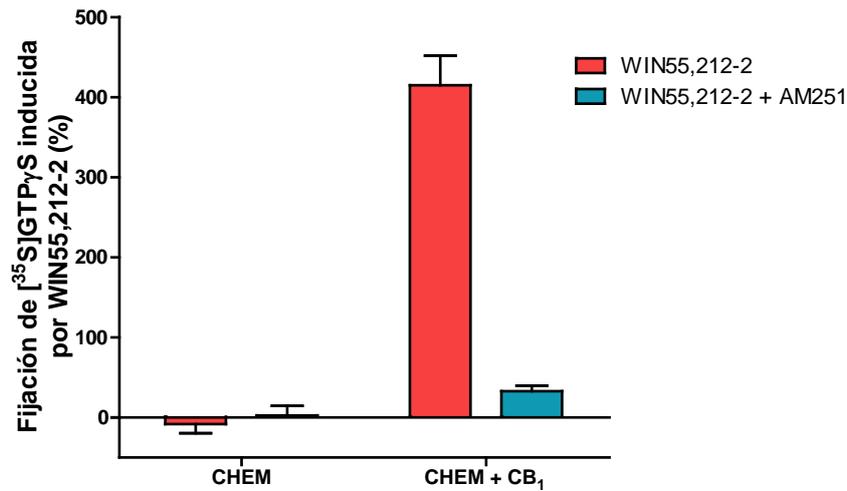


Fig. 2.1-2. Estimulación del acople funcional de los receptores cannabinoides en microarrays de membranas celulares de células CHEM y de células CHEM que sobreexpresan el receptor CB<sub>1</sub> (CHEM + CB<sub>1</sub>) inducida por WIN55,212-2 (10  $\mu$ M) en ausencia (■) o en presencia de AM251 (10  $\mu$ M) (■).

### Fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S inducida por carbacol en microarrays de membranas de líneas celulares que sobreexpresan los receptores muscarínicos solos o junto a determinadas proteínas G

Se estudió la fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en microarrays de membranas aisladas de líneas celulares COS7 que sobreexpresaban los receptores muscarínicos M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> y líneas celulares CHO que sobreexpresaban el receptor muscarínico M<sub>3</sub> (Fig. 2.1-3). Se determinó que la línea celular que sobreexpresaba el receptor muscarínico M<sub>4</sub> era la que más fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en porcentajes de estimulación sobre el basal presentaba cuando se incubaba con carbacol (100  $\mu$ M) (94,00  $\pm$  5,55 %) seguido del receptor M<sub>5</sub> (69,13  $\pm$  5,94 %), M<sub>2</sub> (51,57  $\pm$  7,82 %), M<sub>1</sub> (43,57  $\pm$  3,05 %) y, por último el receptor M<sub>3</sub> (38,38  $\pm$  7,13 %). Sin embargo, sólo las líneas celulares que

sobreexpresaban los receptores  $M_4$  y  $M_5$  tuvieron un aumento del porcentaje de estimulación significativo con respecto a su línea control ( $p < 0,001$ ), por lo que parte de las estimulaciones obtenidas parecen deberse a los receptores muscarínicos endógenos. Por otro lado, el antagonista atropina ( $10 \mu\text{M}$ ) bloqueó por completo el efecto del carbacol incluso por niveles debajo del basal.

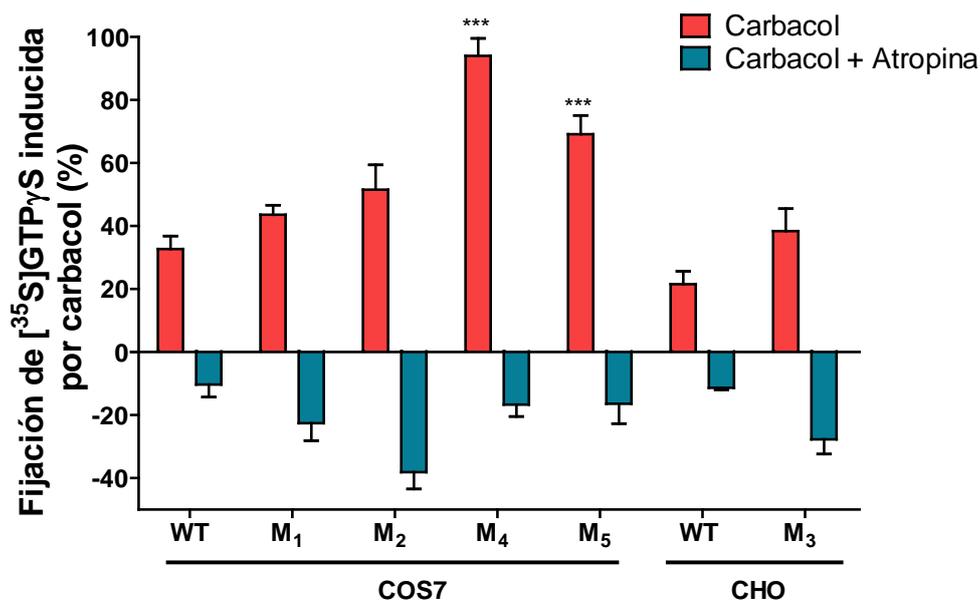


Fig. 2.1-3. Estudio del acople funcional de receptores muscarínicos en microarrays de membrana inducido por carbacol ( $100 \mu\text{M}$ ) en ausencia (■) o en presencia de atropina ( $10 \mu\text{M}$ ) (■).  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_5$  hacen referencia a los receptores muscarínicos tipo 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente; WT: *wildtype*. \*\*\* $p < 0,001$

Asimismo, se estudió la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por carbacol ( $31,6 \mu\text{M}$ ) en las líneas celulares COS7 transfectadas con diferentes subtipos de proteínas G y con el receptor muscarínico  $M_3$ .

Se determinó un aumento en la fijación basal de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  en las líneas transfectadas con el subtipo de proteína  $G_{01}$  (GNA01). Este incremento se observó también en las células cotransfectadas con el receptor  $M_3$  (Fig. 2.1-4).

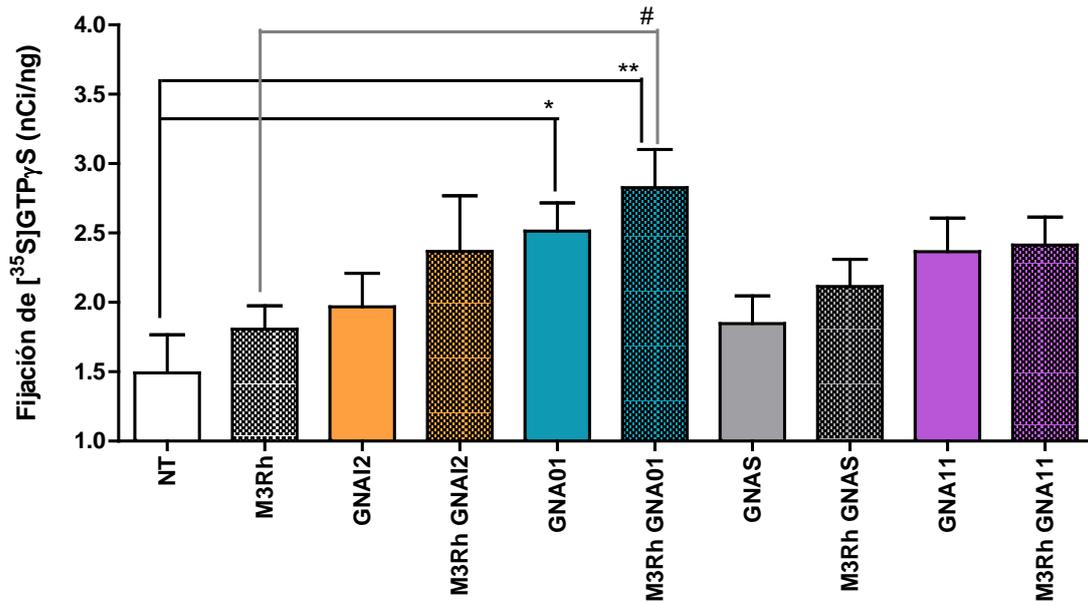


Fig. 2.1-4. Fijación basal de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  a microarrays de membranas celulares procedentes de líneas celulares COS7 control, transfectadas con diferentes proteínas G o cotransfectadas con el receptor muscarínico  $\text{M}_3$  y las proteínas G correspondientes.  $*/\#p<0,05$ ;  $**p<0,01$ . NT: no transfectada; M3Rh: receptor muscarínico  $\text{M}_3$ ; GNA: subunidad alfa de la proteína G; GNAS:  $\text{G}_s$ ; GNA11:  $\text{G}_{11}$ ; GNA01:  $\text{G}_{01}$ ; GNAI2:  $\text{G}_{i2}$ .

En cuanto a la fijación inducida por carbacol se observó una disminución en las células transfectadas con el subtipo de proteína  $\text{G}_{01}$  (GNA01) ( $p<0,05$ ), el subtipo  $\text{G}_s$  (GNAS) y el  $\text{G}_{11}$  (GNA11) ( $p<0,001$ ) con respecto a las células no transfectadas. De igual manera, se determinó un aumento en la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por carbacol en las líneas celulares cotransfectadas con el receptor  $\text{M}_3$  y la proteína  $\text{G}_{01}$  ( $p<0,05$ ) y las cotransfectadas con el receptor  $\text{M}_3$  y  $\text{G}_{11}$  ( $p<0,001$ ) con respecto a las transfectadas solamente con la proteína  $\text{G}_{01}$  y  $\text{G}_{11}$ , respectivamente (Fig. 2.1-5).

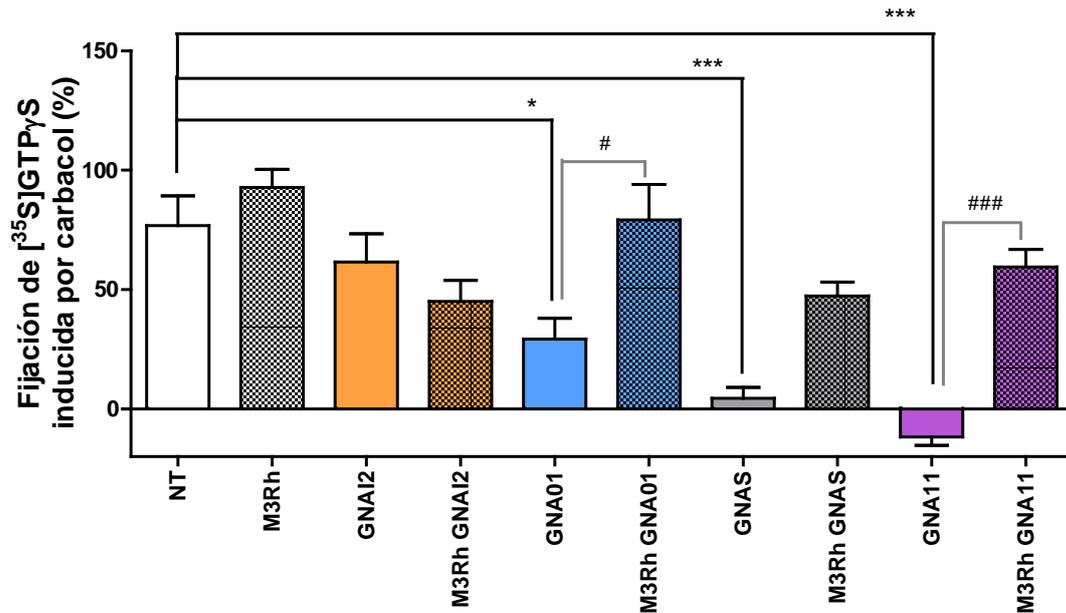


Fig. 2.1-5. Estudio del acople funcional de receptores muscarínicos inducido por carbacol (31,6  $\mu$ M) en microarrays de membranas celulares procedentes de líneas celulares COS7 control, transfectadas con diferentes proteínas G o cotransfectadas con el receptor muscarínico M<sub>3</sub> y las proteínas G correspondientes. \*/#p<0,05; \*\*\*/###p<0,001. NT: No transfectada; M3Rh: receptor muscarínico M<sub>3</sub>; GNA: subunidad alfa de la proteína G; GNAS: G<sub>s</sub>; GNA11: G<sub>11</sub>; GNA01: G<sub>01</sub>; GNAI2: G<sub>i2</sub>.

## 2.2 Microarrays de membranas celulares de rata control

Se fabricaron microarrays de membranas celulares de diferentes tejidos nerviosos y periféricos de rata control que se utilizaron para el estudio de la densidad y la actividad de receptores GABAérgicos, muscarínicos y cannabinoides (Fig. 2.2-1, tabla 6).

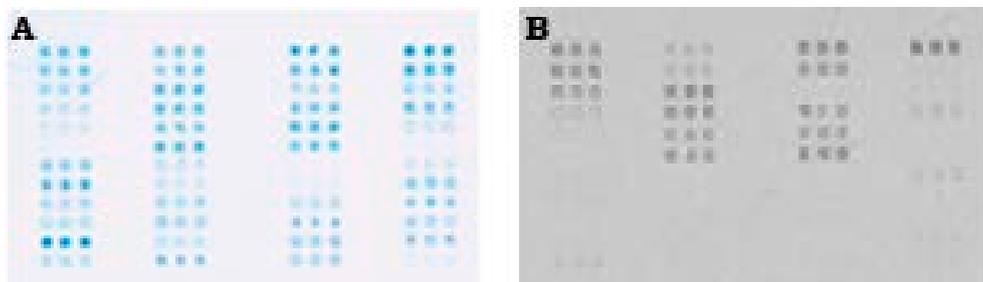


Fig. 2.2-1. Imagen representativa del microarray de membranas celulares de rata control. A. Tinción de proteínas mediante el método de Bradford. B. Fijación de [35S]GTP $\gamma$ S inducida por WIN55,212-2 (10  $\mu$ M).

Cx 12,5 µg/µl	Médula Lumbar	Amígdala	Hipocampo
Cx 10,0 µg/µl	Médula Cervical	Bulbo Olfatorio	Pituitaria
Cx 7,5 µg/µl	Tálamo	Ganglios Raquídeos	Ojos
Cx 5,0 µg/µl	Hipotálamo	Cerebelo	Arteria
Cx 2,5 µg/µl	Nervio Óptico	Tronco Cerebral	Glóbulos Rojos
No Mb	Colículo	Estriado	No Mb
Riñón	Lengua	Páncreas	Intestino Delgado
Corazón	Conducto Deferente	Grasa	Testículos
Pulmón	Glándulas Salivares	Estómago	Esófago
Timo	Glándulas Suprarrenales	Piel	Epidídimo
Próstata	Bazo	Intestino Grueso	Hígado
Vejiga	Tejido Muscular	Ciego	No Mb

Tabla 6. Disposición de los tejidos en el microarray de membranas celulares de rata. Cx = Corteza cerebral.

**Densidad de receptores GABAérgicos, muscarínicos y cannabinoides determinada en diferentes tejidos de rata mediante microarrays de membranas celulares de rata.**

La fijación de [<sup>3</sup>H]-CGP54626 fue más elevada en los tejidos nerviosos como el cerebelo (2,548 ± 0,285 pmol/ng proteína), amígdala (2,439 ± 0,182 pmol/ng proteína) y corteza cerebral (2,281 ± 0,018 pmol/ng proteína).

En el caso de la incubación con el radioligando [<sup>3</sup>H]-NMS los tejidos que presentaron una mayor fijación fueron amígdala (2,447 ± 0,027 pmol/ng proteína), estriado (2,396 ± 0,089 pmol/ng proteína) y corteza cerebral (1,515 ± 0,037 pmol/ng proteína).

Por último, la fijación de [<sup>3</sup>H]-CP55,940 en los microarrays de membranas celulares de rata aportó valores más elevados en cerebelo (0,715 ± 0,063 pmol/ng proteína), estriado (0,597 ± 0,038 pmol/ng proteína) e hipocampo (0,592 ± 0,009 pmol/ng proteína).

En el caso de los tejidos periféricos se obtuvieron valores en algunos casos por encima de los tejidos nerviosos en los tres tipos de receptores acoplados a proteínas G. Así por ejemplo, se determinó una fijación muy elevada por parte de los tres radioligandos en grasa así como en pulmón debido al [<sup>3</sup>H]-CP55,940.

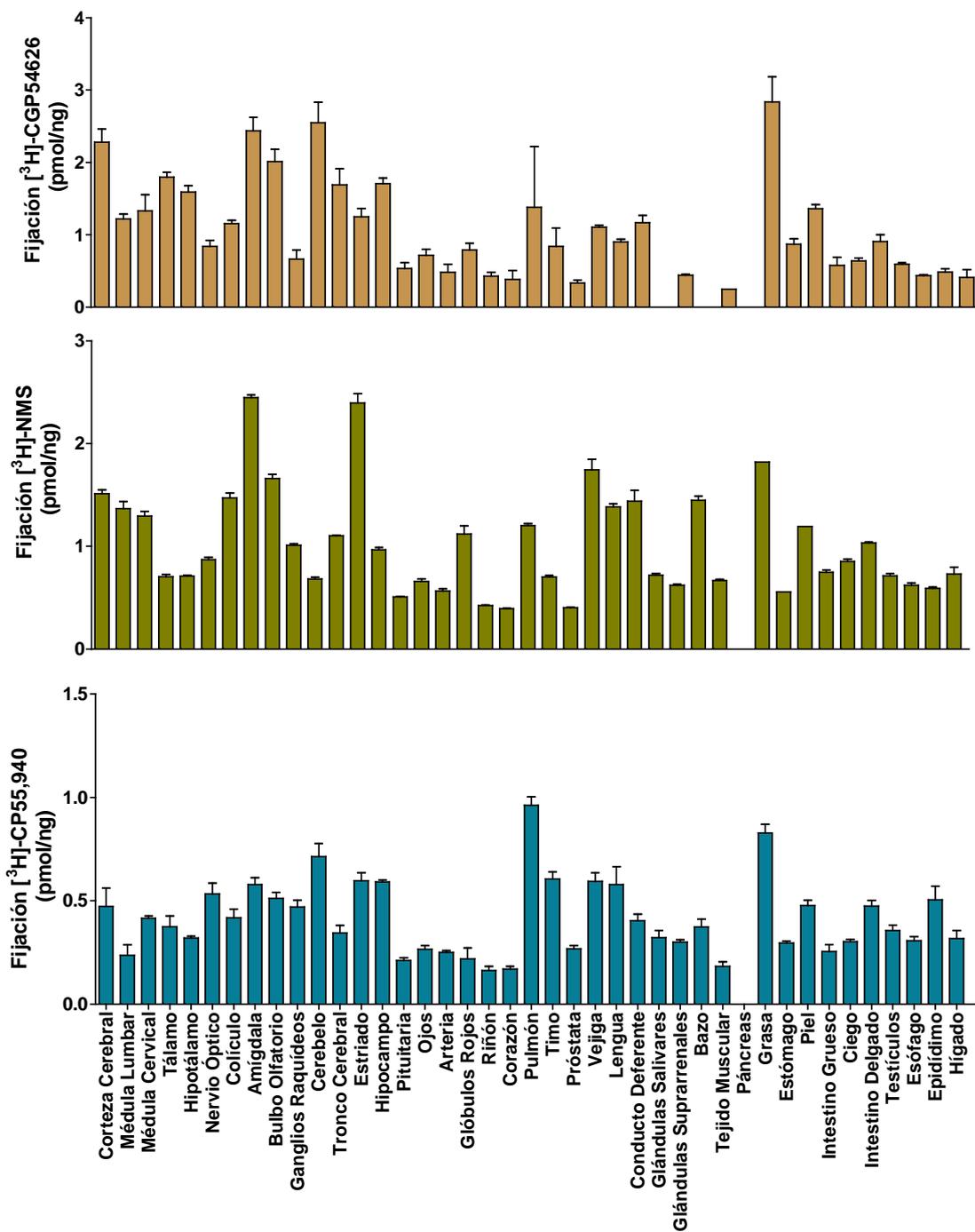


Fig. 2.2-2. Estudio autorradiográfico en microarrays de membranas celulares aisladas de tejidos de rata. Fijación específica de [<sup>3</sup>H]-CGP54626 (■), [<sup>3</sup>H]-NMS (■) y [<sup>3</sup>H]-CP55,940 (■).

**Autorradiografía funcional inducida por baclofen, carbacol y WIN55,212-2 en microarrays de membranas celulares de rata**

La fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en presencia del agonista específico para receptores GABA<sub>B</sub> baclofen (10  $\mu$ M) fue más elevada en áreas de tejido nervioso como corteza cerebral (63  $\pm$  8 %), ganglios raquídeos (58  $\pm$  1 %) y colículo (58  $\pm$  2 %), siendo también muy importantes en áreas de tejidos periféricos como esófago y pulmón.

Los tejidos nerviosos que presentaron una mayor fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S cuando se incubaron con el agonista muscarínico carbacol (100  $\mu$ M) fueron colículo (78  $\pm$  7 %), amígdala (52  $\pm$  3 %) y tronco cerebral (51  $\pm$  3 %). En tejidos periféricos se obtuvieron unos porcentajes de estimulación más elevados en riñón y conducto deferente.

La fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S inducida por el agonista cannabinoide WIN55,212-2 (10  $\mu$ M) fue muy elevada en casi todas las áreas del sistema nervioso, siendo especialmente significativa en cerebelo (128  $\pm$  7 %), ganglios raquídeos (127  $\pm$  1 %) y corteza cerebral (109  $\pm$  1 %) (Tabla 7).

**Tabla 7. Fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S a microarrays de membranas celulares de rata. Los datos son la media  $\pm$  E.S.M. expresados en porcentajes de estimulación sobre el basal (%).**

<b>Tejido</b>	<b>Baclofen (10 <math>\mu</math>M)</b>	<b>Carbacol (100 <math>\mu</math>M)</b>	<b>WIN55,212-2 (10 <math>\mu</math>M)</b>
Corteza Cerebral	63 $\pm$ 8	43 $\pm$ 2	109 $\pm$ 1
Médula Lumbar	36 $\pm$ 1	38 $\pm$ 4	69 $\pm$ 1
Médula Cervical	56 $\pm$ 3	37 $\pm$ 7	101 $\pm$ 3
Tálamo	55 $\pm$ 5	49 $\pm$ 10	71 $\pm$ 3
Hipotálamo	54 $\pm$ 3	46 $\pm$ 8	80 $\pm$ 3
Nervio Óptico	39 $\pm$ 2	34 $\pm$ 4	55 $\pm$ 2
Colículo	58 $\pm$ 2	78 $\pm$ 7	84 $\pm$ 4
Amígdala	41 $\pm$ 4	52 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2
Bulbo Olfatorio	38 $\pm$ 1	46 $\pm$ 4	84 $\pm$ 3
Ganglios Raquídeos	58 $\pm$ 1	38 $\pm$ 2	127 $\pm$ 1
Cerebelo	36 $\pm$ 5	13 $\pm$ 0,6	128 $\pm$ 7
Tronco Cerebral	46 $\pm$ 3	51 $\pm$ 2	60 $\pm$ 7
Estriado	21 $\pm$ 6	50 $\pm$ 5	106 $\pm$ 3
Hipocampo	58 $\pm$ 3	45 $\pm$ 3	106 $\pm$ 2
Pituitaria	40 $\pm$ 2	22 $\pm$ 2	99 $\pm$ 5
Ojos	49 $\pm$ 2	30 $\pm$ 1	123 $\pm$ 4
Arteria	36 $\pm$ 4	33 $\pm$ 3	89 $\pm$ 1
Glóbulos Rojos	74 $\pm$ 2	50 $\pm$ 1	130 $\pm$ 0
Riñón	59 $\pm$ 6	51 $\pm$ 7	81 $\pm$ 1
Corazón	31 $\pm$ 15	29 $\pm$ 13	106 $\pm$ 2
Pulmón	84 $\pm$ 0	50 $\pm$ 0,1	135 $\pm$ 3
Timo	59 $\pm$ 0	44 $\pm$ 2	102 $\pm$ 1
Próstata	53 $\pm$ 2	34 $\pm$ 2	84 $\pm$ 1
Vejiga	-	42 $\pm$ 2	128 $\pm$ 1
Lengua	62 $\pm$ 0	41 $\pm$ 1	-
Conducto Deferente	-	51 $\pm$ 0,7	-
Glándulas Salivares	65 $\pm$ 2	44 $\pm$ 1	127 $\pm$ 1
Glándulas Suprarrenales	64 $\pm$ 1	47 $\pm$ 1	128 $\pm$ 3
Bazo	-	40 $\pm$ 0,6	119 $\pm$ 1
Tejido Muscular	-	-	130 $\pm$ 2
Páncreas	-	-	-
Grasa	-	42 $\pm$ 0	-
Estómago	-	-	121 $\pm$ 1
Piel	54 $\pm$ 0	38 $\pm$ 0,7	-
Intestino Grueso	52 $\pm$ 0,4	33 $\pm$ 0,8	113 $\pm$ 2
Ciego	70 $\pm$ 1	50 $\pm$ 3	108 $\pm$ 1
Intestino Delgado	65 $\pm$ 1	-	98 $\pm$ 2
Testículos	67 $\pm$ 0,5	44 $\pm$ 1	116 $\pm$ 2
Esófago	98 $\pm$ 0	-	-
Epidídimo	61 $\pm$ 0	-	111 $\pm$ 1
Hígado	76 $\pm$ 2	44 $\pm$ 0	135 $\pm$ 1

### Correlación entre la distribución y el acople funcional de los receptores GABAérgicos, muscarínicos y cannabinoides

Con el objetivo de evaluar la relación existente entre la distribución de los receptores estudiados y la fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en presencia de sus agonistas específicos, que previamente habían sido determinados mediante estudios de unión de radioligandos, se realizó un estudio de correlación (Fig. 2.2-3, 4 y 5).

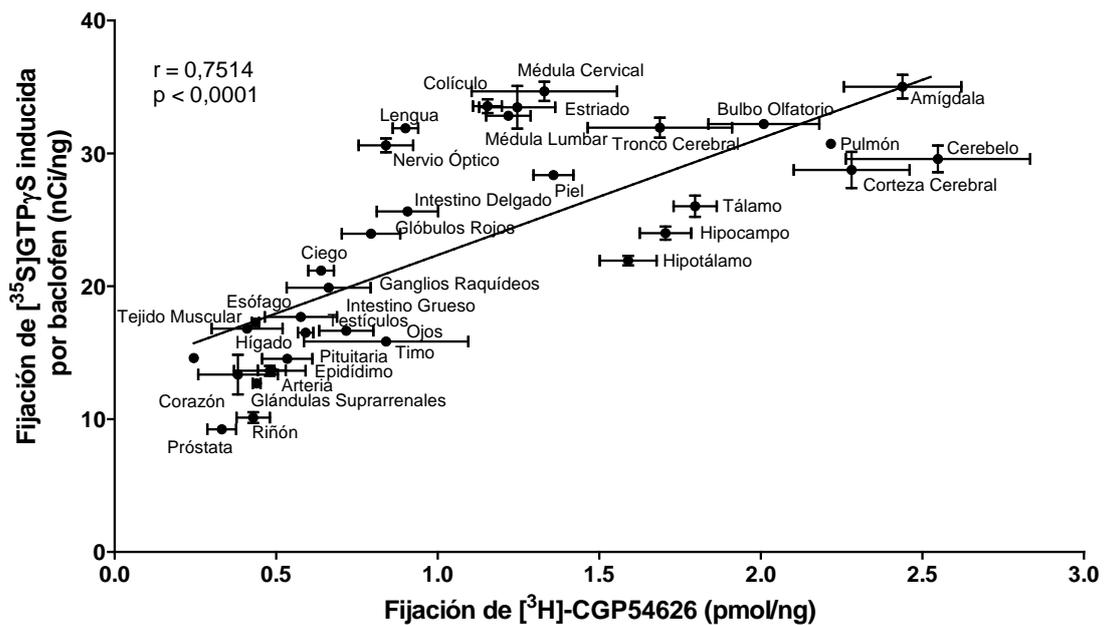


Fig. 2.2-3. Relación entre la fijación de [<sup>3</sup>H]-CGP54626 y la estimulación neta de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S inducida por baclofen obtenida en los diferentes tejidos incluidos en los microarrays de tejidos de ratón. r: coeficiente de variación de Pearson.

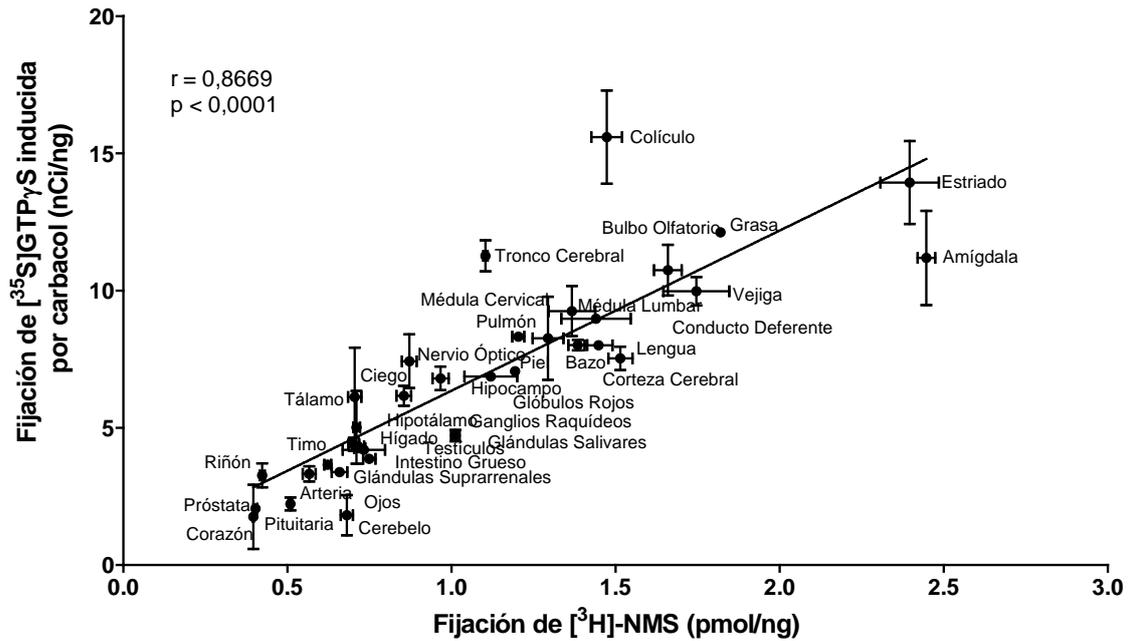


Fig. 2.2-4. Relación entre la fijación de  $[^3\text{H}]\text{-NMS}$  y la estimulación neta de la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por carbacol en microarrays de tejidos de rata.  $r$ : coeficiente de variación de Pearson.

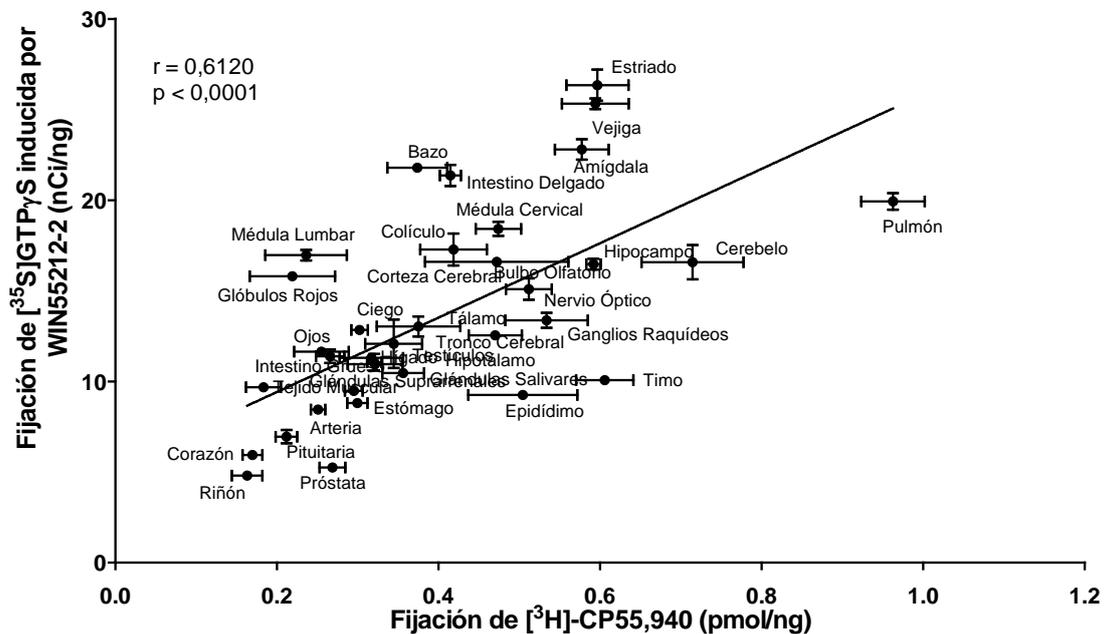


Fig. 2.2-5. Relación entre la fijación de  $[^3\text{H}]\text{-CP55,940}$  y la estimulación neta de la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por WIN55,212-2 en microarrays de tejidos de rata.  $r$ : coeficiente de variación de Pearson.

Las correlaciones positivas entre la densidad de receptores y el acople funcional a la proteína G son una muestra de la fiabilidad de los resultados

obtenidos en microarrays, además de proporcionar una idea de la eficiencia del acople de la proteína G a cada receptor.

### 2.3 Microarrays de membranas celulares de *Macaca fascicularis*

Se fabricaron microarrays de membranas celulares de tejidos de mono control y mono tratado con la neurotoxina MPTP (Fig. 2.3-1; tabla 8). Se utilizaron para estudios autorradiográficos y de actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

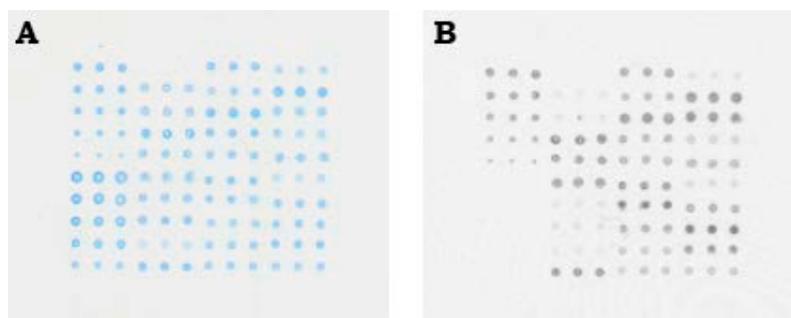


Fig. 2.3-1. Imagen representativa del microarray de membranas celulares de *M. fascicularis* control y tratado con MPTP. A. Tinción de proteínas mediante el método de Bradford. B. Fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por WIN55,212-2 (10  $\mu\text{M}$ ).

CxF 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Blanco	Caudado	C. Calloso	} Mono Control
CxF 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Hígado	S. <i>Nigra</i>	Amígdala	
CxF 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Corazón	Hipocampo	Gl. Pálido	
CxF 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Cerebelo	Tálamo	B. Olfatorio	
CxF 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Putamen	Hipotálamo	Mesencéfalo	
BSA 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	CxF	Caudado	C. Calloso	} Mono MPTP
BSA 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Hígado	S. <i>Nigra</i>	Amígdala	
BSA 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Corazón	Hipocampo	Gl. Pálido	
BSA 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Cerebelo	Tálamo	B. Olfatorio	
BSA 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Putamen	Hipotálamo	Mesencéfalo	

Tabla 8. Disposición de los tejidos en el microarray de membranas celulares de *M. fascicularis*. CxF: Corteza frontal.

### Estudio de receptores GABAérgicos, muscarínicos, opioides y cannabinoides mediante autorradiografía

Los resultados en los microarrays de membrana de *Macaca fascicularis* revelaron cambios en cuanto a la densidad de los receptores estudiados en diversos tejidos de mono tratado con MPTP con respecto al control (Tabla 9).

**Tabla 9. Cambios en la fijación de radioligandos inducida por el tratamiento con MPTP determinados mediante microarrays de membranas celulares aisladas de *Macaca fascicularis* control o tratado con MPTP**

Tejidos	Radioligandos			
	[ <sup>3</sup> H]-CGP54626	[ <sup>3</sup> H]-NMS	[ <sup>3</sup> H]-DAMGO	[ <sup>3</sup> H]-CP55,940
Corteza frontal	ns	↓***	ns	ns
Hígado	ns	ns	ns	ns
Corazón	ns	ns	ns	ns
Cerebelo	↓**	↑***	↑***	↑***
Putamen	ns	ns	ns	↓*
Caudado	ns	ns	ns	ns
Sustancia <i>nigra</i>	ns	ns	↓*	↑***
Hipocampo	ns	↑***	↑*	ns
Tálamo	ns	↑***	ns	↑***
Hipotálamo	↓*	ns	ns	ns
Cuerpo calloso	ns	ns	ns	ns
Amígdala	↓**	↑**	↑***	ns
Globo pálido	ns	ns	ns	↑***
Bulbo olfatorio	↓*	↓***	ns	↑***
Mesencéfalo	ns	ns	↑***	ns

Los valores de p fueron calculados mediante el análisis de varianzas (ANOVA), \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. ns: no cambio

Se determinó una disminución de la fijación de [<sup>3</sup>H]-CGP54626 en el mono tratado con MPTP con respecto al control en cerebelo (p<0,01), amígdala (p<0,01), hipotálamo (p<0,05) y bulbo olfatorio (p<0,05) (Fig. 2.3-2 A). En cuanto a la fijación de [<sup>3</sup>H]-NMS, en el mono tratado con MPTP se observó una disminución en corteza cerebral y bulbo olfatorio (p<0,001) y un aumento en amígdala (p<0,01), cerebelo (p<0,001), hipocampo (p<0,001) y tálamo (p<0,001) (Fig. 2.3-2 B).

Por otro lado, el grupo tratado con MPTP presentó una menor fijación de [<sup>3</sup>H]-DAMGO en sustancia *nigra* (p<0,05) mientras que se aumentó en cerebelo (p<0,001), amígdala (p<0,001), mesencéfalo (p<0,001) e hipocampo (p<0,05) (Fig. 2.3-2 C).

Por último, en el grupo tratado con MPTP se observó un aumento en la fijación de [<sup>3</sup>H]-CP55,940 en las áreas de sustancia *nigra*, tálamo, globo pálido y bulbo olfatorio (p<0,001) y una disminución de dicha fijación en cerebelo (p<0,001) y putamen (p<0,05) (Fig. 2.3-2 D).

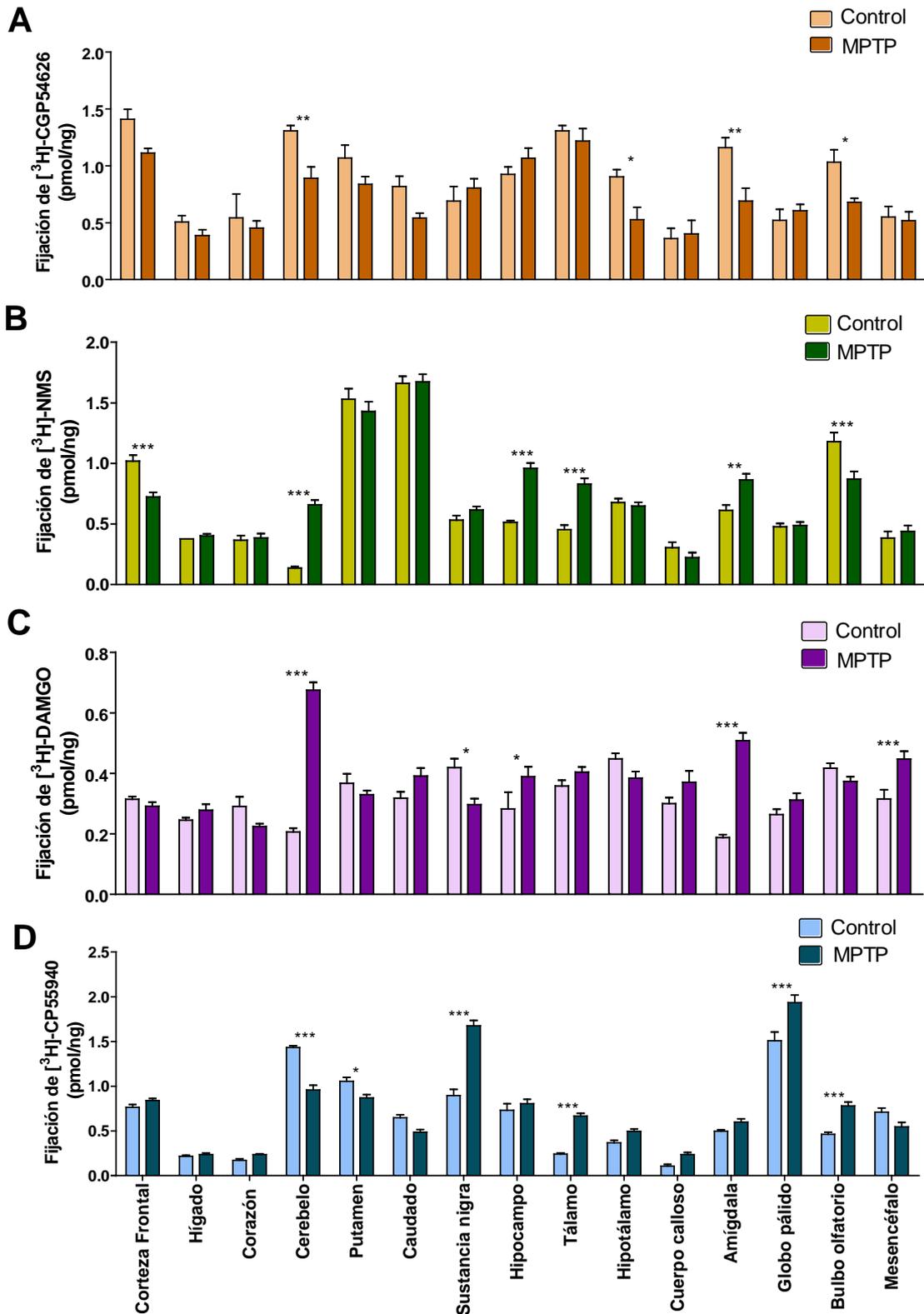


Fig. 2.3-2. Estudio autorradiográfico en microarrays de membranas celulares aisladas de mono control y tratado con MPTP. A. Fijación específica de [<sup>3</sup>H]-CGP54626. B. Fijación específica de [<sup>3</sup>H]-NMS. C. Fijación específica de [<sup>3</sup>H]-DAMGO. D. Fijación específica de [<sup>3</sup>H]-CP55,940. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

### Fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS en microarrays de membranas celulares de *Macaca fascicularis*. Receptores cannabinoides.

Tras analizar los datos de la fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS se encontraron cambios significativos en varios tejidos de mono tratado con MPTP (Fig. 2.3-3), por este motivo, se analizaron las estimulaciones netas inducidas por el agonista cannabinoide WIN55,212-2 (10 μM) (Fig. 2.3-4).

La fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS inducida por WIN55,212-2 más elevada en microarrays de tejido de monos control se observó en las áreas de globo pálido (35,22 ± 3,70 nCi/ng de proteína); sustancia *nigra* (21,60 ± 1,34 nCi/ng de proteína) y putamen (20,56 ± 2,03 nCi/ng de proteína).

En los microarrays de tejido de monos tratados con MPTP se detectó una fijación más elevada en las áreas globo pálido (26,24 ± 2,71 nCi/ng de proteína); sustancia *nigra* (24,80 ± 1,97 nCi/ng de proteína) y corteza (24,58 ± 1,34 nCi/ng de proteína).

Además, en el grupo tratado con MPTP se observó un aumento en la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS inducida por WIN55,212-2 en corteza cerebral (p<0,001) y una disminución de la fijación en globo pálido (p<0,001) (Fig. 2.3-4).

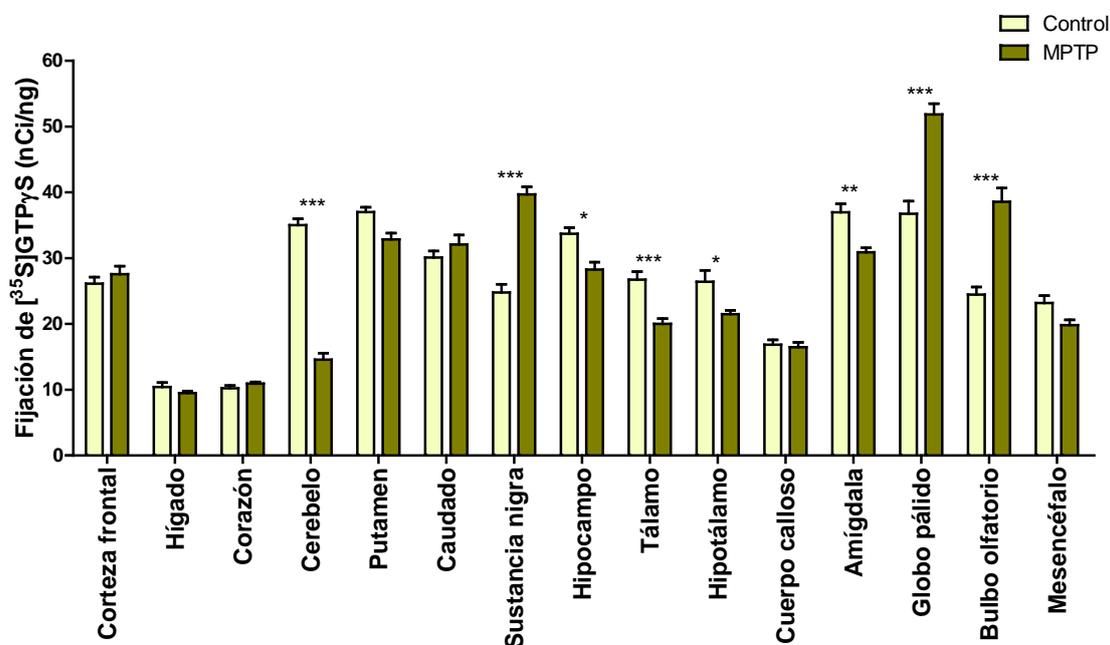


Fig. 2.3-3. Fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS a microarrays de membranas celulares aisladas de tejidos de mono control (■) y mono tratado con MPTP (■). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

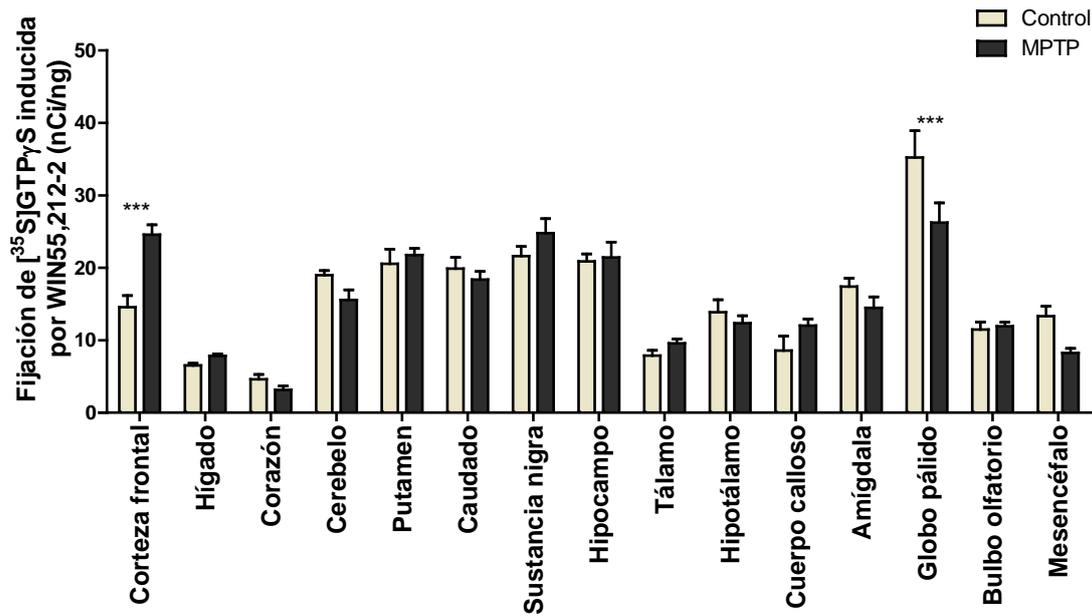


Fig. 2.3-4. Estudio del acople funcional de receptores cannabinoides en presencia de WIN55,212-2 (10  $\mu$ M) en microarrays de membranas celulares aisladas de tejidos de monos control (■) y tratados con MPTP (■). \*\*\* $p < 0,001$

### **Correlación entre la distribución y el acople funcional de los receptores cannabinoides en microarrays de membranas de *Macaca fascicularis***

Los resultados obtenidos de las correlaciones realizadas entre la fijación de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S inducida por WIN55,212-2 y la fijación específica de [ $^3$ H]-CP55,940 en los microarrays de tejido de monos control (Fig. 2.3-5) muestran la existencia de una relación directa entre ambas técnicas de estudio ( $r = 0,8569$ ;  $p < 0,001$ ). Del mismo modo, se obtuvo una correlación positiva con los datos de monos tratados con MPTP ( $r = 0,7743$ ;  $p < 0,001$ ) (Fig. 2.3-6).

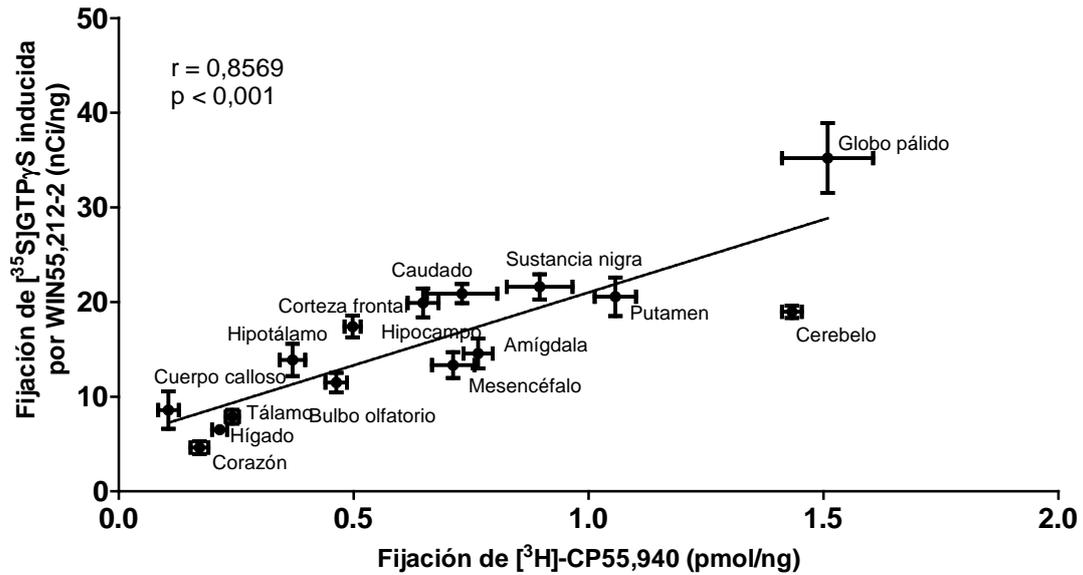


Fig. 2.3-5. Relación entre la fijación de  $[^3\text{H}]\text{-CP55,940}$  y la estimulación neta de la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por WIN55,212-2 en microarrays de membranas celulares aisladas de *Macaca fascicularis* control.  $r$ : coeficiente de variación de Pearson.

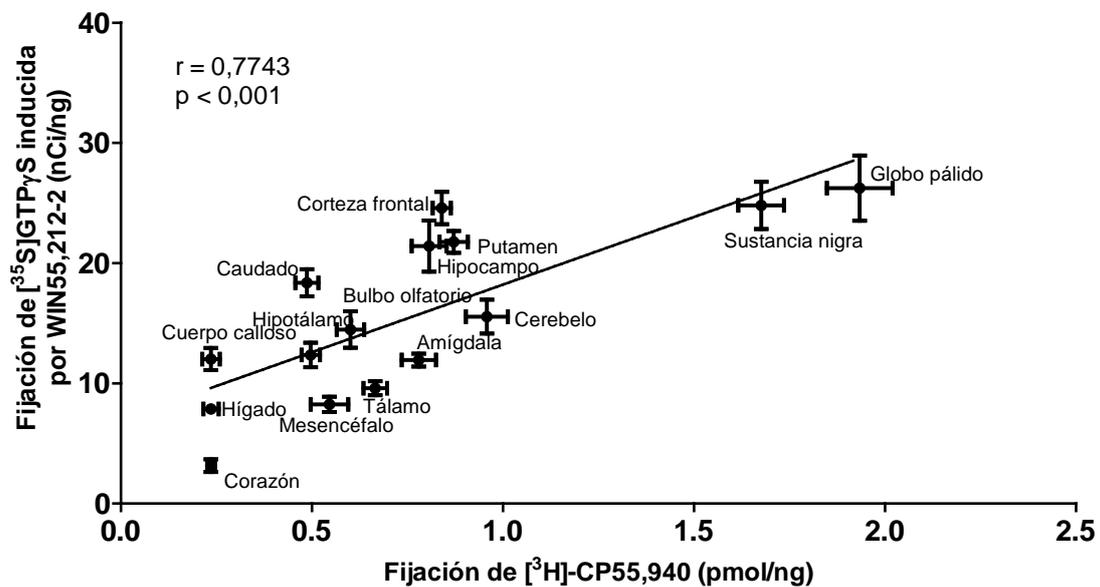


Fig. 2.3-6. Relación entre la fijación de  $[^3\text{H}]\text{-CP55,940}$  y la estimulación neta de la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  inducida por WIN55,212-2 en microarrays de membranas celulares aisladas de *Macaca fascicularis* tratados con MPTP.  $r$ : coeficiente de variación de Pearson.

## 2.4 Estudio de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en microarrays de membranas celulares de *Macaca fascicularis*

Con el fin de evaluar los diferentes complejos mitocondriales se procedió al análisis de la unión de la rotenona, molécula inhibidora del complejo I mitocondrial, se determinó la fijación del radioligando [<sup>3</sup>H]-DHR en microarrays de membranas celulares de monos tratados con la neurotoxina MPTP la cual modifica la actividad del complejo I mitocondrial. Asimismo, los complejos II y IV se estudiaron mediante actividad enzimática.

### Fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR en microarrays de membranas de *Macaca fascicularis*

El tratamiento con MPTP indujo un aumento significativo de los lugares de unión de la [<sup>3</sup>H]-DHR en el putamen, hipotálamo, globo pálido y bulbo olfatorio (Fig. 2.5-1).

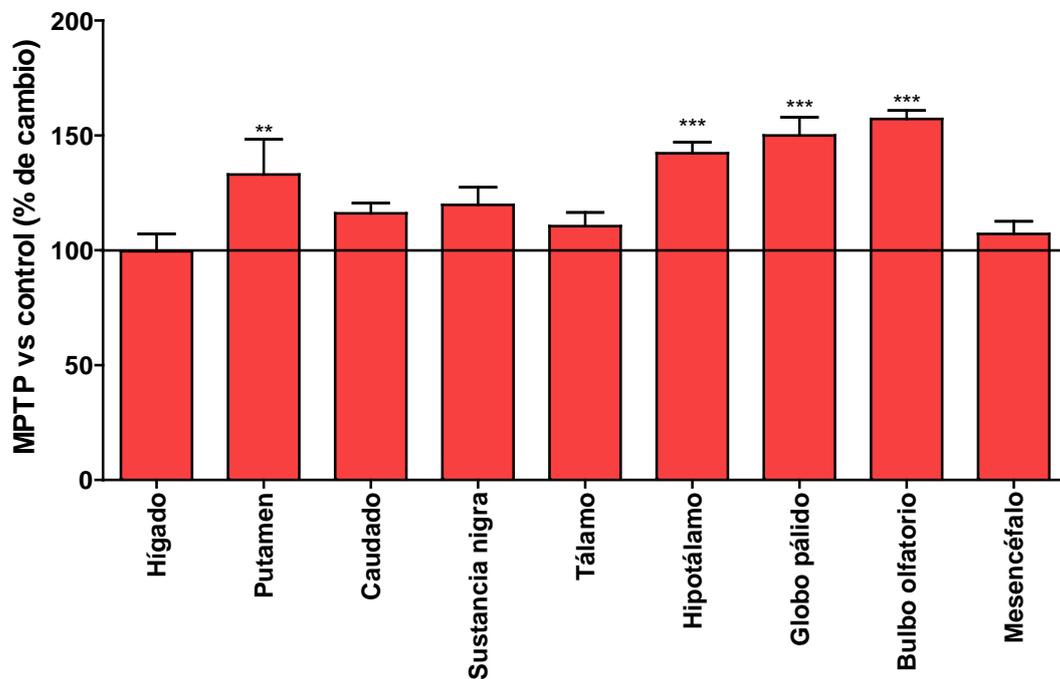


Fig. 2.4-1. Efecto del tratamiento con MPTP sobre la densidad de lugares de unión para la [<sup>3</sup>H]-DHR determinado en microarrays de membranas celulares de tejidos de monos control y tratados con MPTP. Los resultados del gráfico están expresados en porcentaje de cambio respecto al grupo control. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

## Actividad succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa en microarrays de membranas de *Macaca fascicularis*

Una vez estudiado el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial mediante autorradiografía de la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR se procedió a estudiar los complejos II y IV esta vez por determinación de la actividad succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa, respectivamente (Fig. 2.4-2).

En cuanto a la actividad del complejo II se observó una disminución de la actividad succinato deshidrogenasa en hígado, corazón, cerebelo y cuerpo calloso ( $p < 0,001$ ) de los monos tratados con MPTP. Por el contrario, esta actividad se vio incrementada en caudado ( $p < 0,05$ ), hipocampo ( $p < 0,05$ ), sustancia nigra ( $p < 0,001$ ), hipotálamo ( $p < 0,001$ ) y bulbo olfatorio ( $p < 0,001$ ). En el caso de la actividad citocromo c oxidasa, el grupo tratado con MPTP presentó un aumento de dicha actividad en hipotálamo ( $p < 0,05$ ), hipocampo ( $p < 0,01$ ) y cuerpo calloso ( $p < 0,001$ ) y una disminución en sustancia nigra ( $p < 0,05$ ), cerebelo ( $p < 0,01$ ), amígdala ( $p < 0,01$ ), corteza frontal ( $p < 0,001$ ) e hígado ( $p < 0,001$ ).

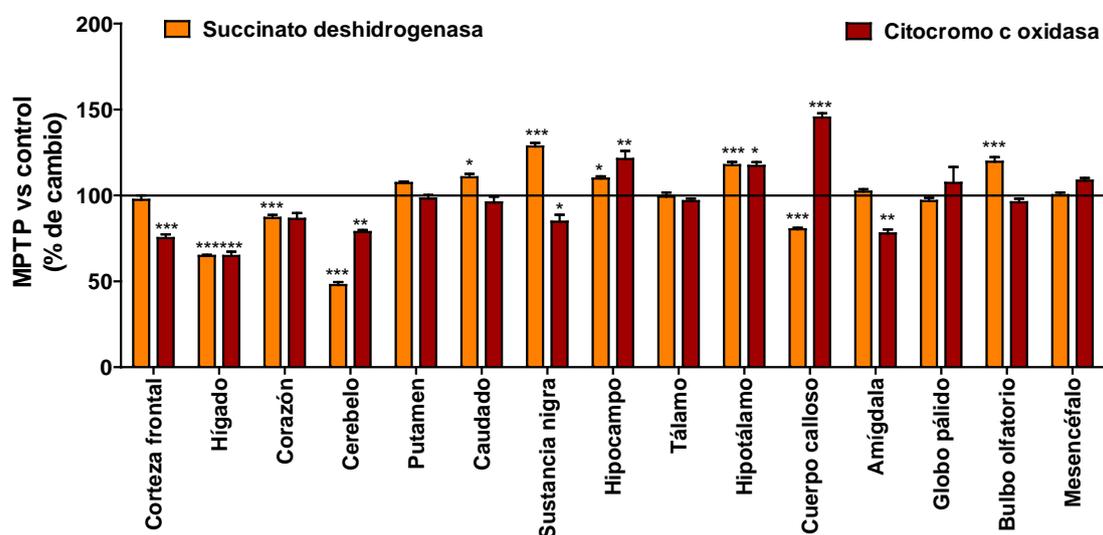


Fig. 2.4-2. Actividad succinato deshidrogenasa (■) y citocromo c oxidasa (■) determinada en distintas áreas cerebrales y tejidos de *Macaca fascicularis* control y tratados con MPTP, mediante microarrays de membranas celulares. Los resultados del gráfico están expresados en porcentaje de cambio del grupo tratado con MPTP con respecto al control. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 2.5 Fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en microarrays de membranas de cerebelo de ratón *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub>

El ligando cannabinoide WIN55,212-2 (10  $\mu$ M) estimuló la fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S en torno al 70% sobre el basal en las membranas de cerebelo de ratón. Sin embargo, en las membranas de cerebelo de ratón *knockout* para CB<sub>1</sub> este agonista cannabinoide no indujo estimulación significativa (Fig. 2.5-1).

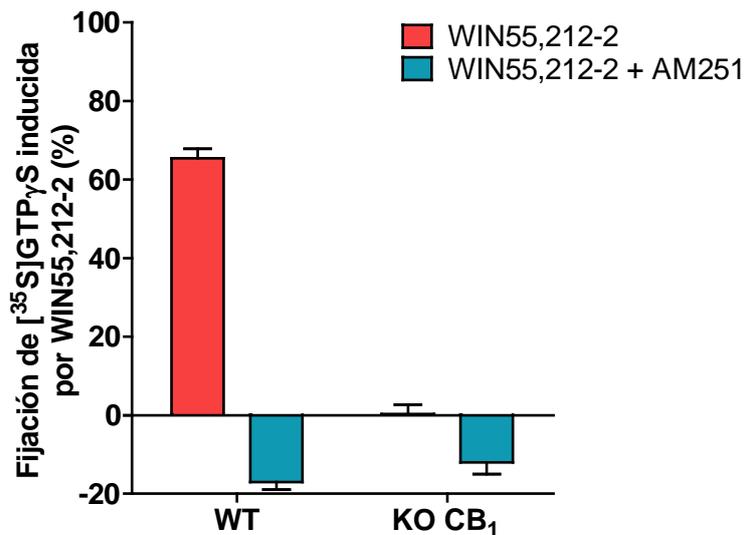


Fig. 2.5-1. Estudio del acople funcional de receptores cannabinoideos en microarrays de membranas celulares de cerebelo de ratón *wildtype* (WT) y *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub> (KO CB<sub>1</sub>) mediante el agonista WIN55,212-2 (10  $\mu$ M) en ausencia (■) o en presencia de AM251 (10  $\mu$ M) (■).

## 2.6 Estudio de receptores cannabinoideos en microarrays de membranas de hipocampos de ratón *wildtype*, *knockout* CB<sub>1</sub>, *knockout* transfectados con el receptor CB<sub>1</sub> o con el receptor CB<sub>1</sub> con la mutación DN22

Se determinó la presencia y la actividad de los receptores CB<sub>1</sub> en microarrays de membranas fabricados con hipocampos de ratón *wildtype*, *knockout* CB<sub>1</sub>, *knockout* transfectados con el virus AAV para que expresen el receptor CB<sub>1</sub> normal (KO (CB<sub>1</sub>)) y con la mutación DN22 (KO (DN22- CB<sub>1</sub>)) (Fig. 2.6-1) mediante fijación de [<sup>3</sup>H]-CP55,940 y fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S inducida con WIN55,212-2 (10  $\mu$ M) (Fig. 2.6-2). La mutación DN22 consiste en la delección

de 22 aminoácidos N-terminal del gen que codifica el receptor CB<sub>1</sub>. Esta modificación genética no afecta a la localización de los receptores CB<sub>1</sub> en la membrana plasmática pero sí evita la aparición de los mismos en las mitocondrias.

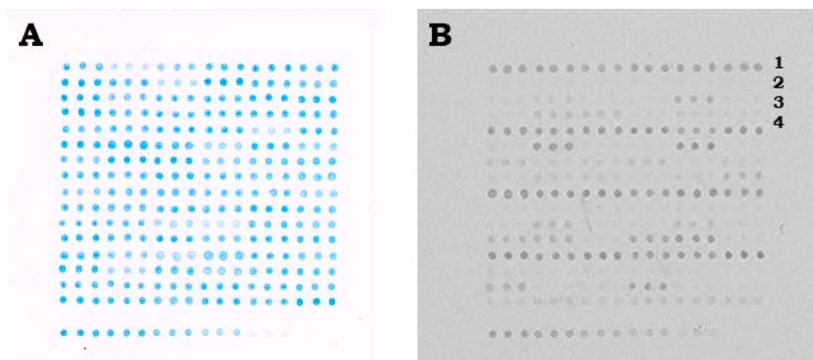


Fig. 2.6-1. Imagen representativa del microarray de membranas de hipocampus de ratón. A. Tinción de proteínas mediante el método de Bradford. B. Fijación de [<sup>3</sup>H]-CP55,940. 1: Fila WT; 2: Fila KO; 3: Fila KO (CB<sub>1</sub>); 4: Fila KO (DN22-CB<sub>1</sub>).

Se observó una recuperación tanto de la cantidad de receptores cannabinoides como de la actividad de los mismos cuando se expresó de nuevo el receptor CB<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ) o el receptor CB<sub>1</sub> con la mutación DN22 ( $p < 0,01$ ) en los ratones KO para dicho receptor, tras la infección del virus (Fig. 2.6-2).

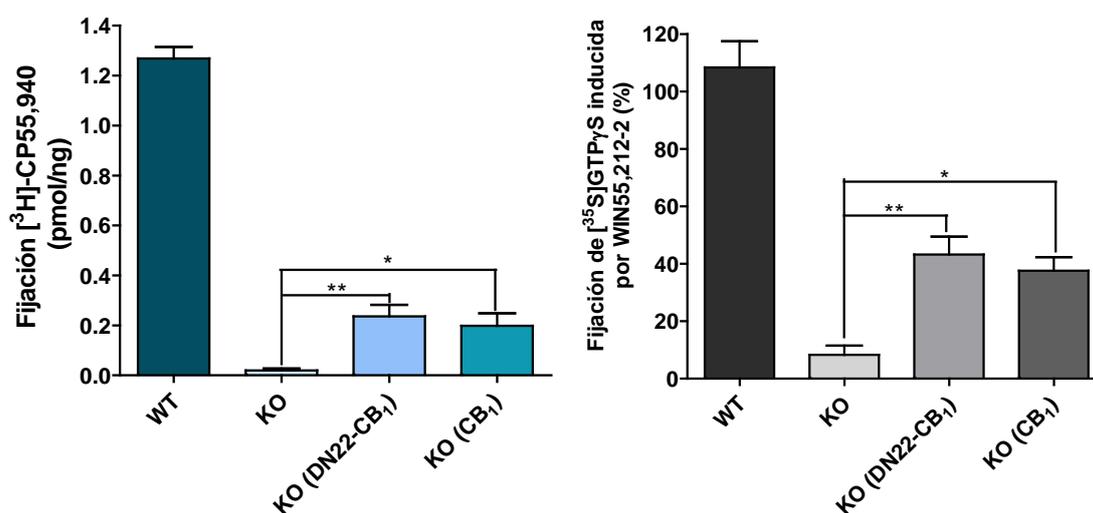


Fig. 2.6-2. Estudio de la densidad y del acople funcional de receptores cannabinoides mediante fijación de [<sup>3</sup>H]-CP55,940 y de [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S inducida por WIN55,212-2 (10 μM) en microarrays de membrana de hipocampus de ratón. WT: *wildtype*; KO: *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub>; KO (DN22-CB<sub>1</sub>): *knockout* transfectado con CB<sub>1</sub> con la mutación DN22; KO (CB<sub>1</sub>): *knockout* transfectado con CB<sub>1</sub>. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

## 2.7 Estudio de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en microarrays de membranas celulares hipocampo de ratón *knockout* CB<sub>1</sub>

Se estudiaron además las actividades succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa en los microarrays fabricados con membranas de hipocampos. Se observó una disminución en la actividad del complejo II mitocondrial en los individuos *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub>, sin verse alterada la actividad citocromo c oxidasa (Fig. 2.7-1).

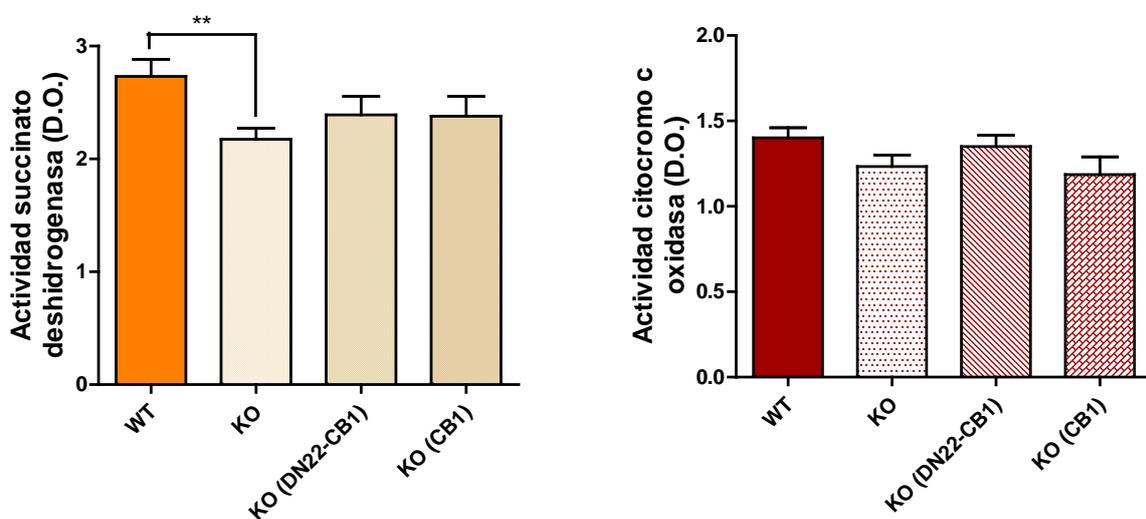


Fig. 2.7-1. Actividad succinato deshidrogenasa (■) y citocromo c oxidasa (■) determinada en microarrays de membrana de hipocampos de ratón. WT: *wildtype*; KO: *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub>; KO (DN22-CB<sub>1</sub>): *knockout* transfectado con CB<sub>1</sub> con la mutación DN22; KO (CB<sub>1</sub>): *knockout* transfectado con CB<sub>1</sub>. \*\* $p < 0,01$ .

### Sumario

#### Líneas celulares

1. En los microarrays de líneas celulares que sobreexpresan diferentes GPCR se obtuvo un marcaje elevado en la línea celular que sobreexpresaba el receptor GABA<sub>B</sub> con el radioligando [<sup>3</sup>H]-CGP54626; la que sobreexpresaba el receptor M<sub>2</sub> con el radioligando [<sup>3</sup>H]-NMS y la que sobreexpresaba el receptor CB<sub>1</sub> con [<sup>3</sup>H]-CP55,940. Asimismo se observó un incremento del acople funcional en estas líneas celulares con el agonista WIN55,212-2.

2. En cuanto a las líneas celulares que sobreexpresan los diferentes subtipos de receptores muscarínicos se obtuvo un aumento del porcentaje de estimulación inducido por carbacol significativo con respecto a su línea control en las M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub>.

3. Por último, se determinó un aumento en la fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS en las líneas transfectadas con el subtipo Gα<sub>01</sub>, así como en las células cotransfectadas con el receptor M<sub>3</sub>. Asimismo, se produjo una disminución de la fijación inducida por carbacol en las células transfectadas con el subtipo Gα<sub>01</sub>, el subtipo Gα<sub>s</sub> y el Gα<sub>11</sub> con respecto a las no transfectadas y un aumento en las líneas celulares cotransfectadas con el receptor M<sub>3</sub> y la proteína Gα<sub>01</sub> y las cotransfectadas con el receptor M<sub>3</sub> y Gα<sub>11</sub> con respecto a las transfectadas solamente con la proteína Gα<sub>01</sub> y Gα<sub>11</sub>, respectivamente.

### **Tejido de rata control**

1. Los tejidos que presentaron una fijación más elevada de [<sup>3</sup>H]-CGP54626 fueron cerebelo, amígdala y corteza cerebral; de [<sup>3</sup>H]-NMS fueron amígdala, estriado y colículo y de [<sup>3</sup>H]-CP55,940 fueron cerebelo, estriado e hipocampo.

2. El agonista GABAérgico baclofen indujo una estimulación de la fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS en corteza cerebral, colículo y ganglios raquídeos, mientras que el agonista de los receptores muscarínicos carbacol lo hizo en colículo, amígdala y tronco cerebral. Por último, el agonista cannabinoide WIN55,212-2 incrementó el acople funcional en cerebelo, ganglios raquídeos y corteza cerebral.

3. Existe una correlación positiva entre la densidad de receptores acoplados a proteínas G y el acople funcional a la proteína G en los 3 sistemas estudiados: GABAérgico, colinérgico muscarínico y cannabinoide.

### ***Macaca fascicularis***

1. Los microarrays de *M. fascicularis* permitieron identificar diferencias debidas al tratamiento con MPTP en la densidad de receptores GABA<sub>B</sub> en cerebelo, hipotálamo, amígdala, bulbo olfatorio.

2. El tratamiento con MPTP indujo alteraciones en la densidad de receptores muscarínicos en corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, tálamo, amígdala y bulbo olfatorio.

3. Los microarrays de membranas celulares procedentes de diferentes áreas cerebrales y tejidos de primates control y tratados con MPTP posibilitaron la identificación de cambios en la densidad del ligando del receptor opioide  $\mu$ , [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO, en cerebelo, sustancia *nigra*, hipocampo, amígdala y mesencéfalo en cuanto a la densidad.

4. También se estudió el efecto del tratamiento con MPTP sobre la densidad de receptores cannabinoides en microarrays de *M. fascicularis*, observándose diferencias en cerebelo, putamen, sustancia *nigra*, hipocampo, globo pálido y bulbo olfatorio.

5. Asimismo fue estudiada la actividad de los receptores cannabinoides en diferentes tejidos y áreas cerebrales mediante microarrays de mono, observándose, diferencias significativas en los tejidos de corteza y globo pálido.

6. La correlación obtenida entre la densidad y el acople funcional de los receptores cannabinoides valida la metodología empleada.

7. El tratamiento con MPTP indujo cambios significativos en la fijación de [ $^3\text{H}$ ]-DHR en las siguientes áreas cerebrales de los monos incluidos en el microarray: putamen, hipotálamo, globo pálido y bulbo olfatorio.

8. En mono tratado con MPTP se produjo un aumento de la actividad succinato deshidrogenasa en áreas de corazón, caudado, sustancia *nigra*, hipocampo, hipotálamo y bulbo olfatorio, y una disminución en hígado, cerebelo y cuerpo calloso. Por otra parte, la actividad citocromo c oxidasa se encontró disminuida en corteza frontal, hígado, cerebelo, sustancia *nigra* y amígdala y aumentada en hipocampo, hipotálamo y cuerpo calloso.

### **Ratones *knockout* CB<sub>1</sub>**

1. No se observó fijación de [ $^3\text{H}$ ]-CP55,940 ni de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S inducida por WIN55,212-2 en las membranas de ratón KO para el receptor CB<sub>1</sub> de cerebelo y de hipocampo. Sin embargo, en los ratones infectados con los virus que contenían el receptor CB<sub>1</sub> y el receptor CB<sub>1</sub> con la mutación DN22, y que expresan dicho receptor, se recuperó parcialmente el acople funcional con respecto al grupo control.

2. Se observó una disminución en la actividad succinato deshidrogenasa en los individuos KO para el receptor CB<sub>1</sub>. Sin embargo, no se obtuvieron cambios significativos en la actividad citocromo c oxidasa.

### 3. Estudio del efecto de los ligandos cannabinoides sobre el complejo I mitocondrial mediante ensayos de fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR

En este apartado se evaluó el efecto de diferentes ligandos cannabinoides sobre la fijación del ligando selectivo del complejo I mitocondrial [<sup>3</sup>H]-DHR a diferentes tejidos mediante microarrays de membranas celulares y estudios en homogeneizados de membranas celulares.

#### 3.1 Estudio de fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR en presencia de CP55,940 en microarrays de membranas aisladas de hipocampos de ratón

Sobre microarrays de membranas de hipocampo de ratón se determinó la fijación del radioligando [<sup>3</sup>H]-DHR en presencia de concentraciones crecientes del ligando cannabinoide CP55,940 (Fig. 3.1-1). Para todos los grupos de ratones estudiados la incubación con CP55,940 causó un desplazamiento de la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR dosis dependiente de una manera muy similar, reportando valores de IC<sub>50</sub> en el grupo *wildtype* de 55 μM, en el grupo *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub> de 63 μM y en los *knockout* infectados con los virus para el receptor CB<sub>1</sub> o CB<sub>1</sub> con la mutación DN22 de 68 y 59 μM, respectivamente.

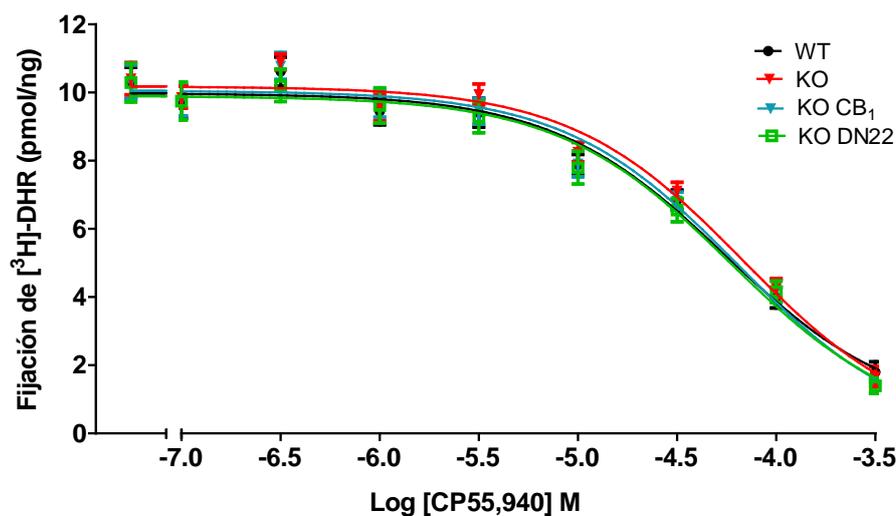


Fig. 3.1-1. Efecto del CP55,940 sobre la fijación de la [<sup>3</sup>H]-DHR en membranas de hipocampos de ratón. WT: *wildtype*; KO: *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub>; KO (DN22-CB<sub>1</sub>): *knockout* transfectado con CB<sub>1</sub> con la mutación DN22; KO (CB<sub>1</sub>): *knockout* transfectado con CB<sub>1</sub>.

### 3.2 Estudio del efecto de ligandos cannabinoides sobre la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR al complejo I mitocondrial en homogeneizados de membranas

Tras los resultados obtenidos en microarrays de membranas y con el objetivo no sólo de validar sino también para estudiar en profundidad en qué medida afectan los ligandos cannabinoides a la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR, se realizó el estudio de la fijación del inhibidor del complejo I en presencia de diferentes ligandos cannabinoides en homogeneizados de membranas celulares de corteza cerebral de rata (0,05 mg/ml).

Concretamente, se testaron dos agonistas (CP55,940 y WIN55,212-2) y dos antagonistas cannabinoides (AM251 y AM281) a una única concentración (100 µM) (Fig. 3.2-1).

La presencia tanto de los agonistas CP55,940 y WIN55,212-2, como del antagonista AM251 produjo una disminución de la fijación del radioligando [<sup>3</sup>H]-DHR. Sin embargo, el antagonista AM281 no sólo no redujo la fijación del radioligando sino que incluso llegó a aumentarla. Por otro lado, se obtuvieron porcentajes de inhibición similares tanto en ausencia como en presencia de NADH (0,2 mM), sustrato del complejo I mitocondrial que incrementa el número de complejos I en estado de alta afinidad para la [<sup>3</sup>H]-DHR.

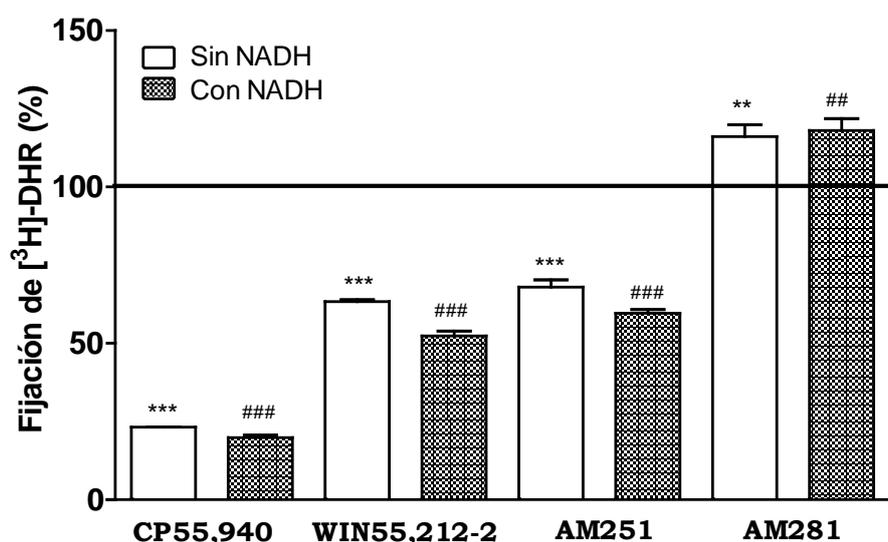


Fig. 3.2-1. Efecto de los ligandos cannabinoides WIN55212-2, CP55,940, AM251 y AM281 (100 µM) sobre la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR a membranas de corteza cerebral de rata. Los estudios se realizaron en ausencia y en presencia de NADH (0,2 mM) en el medio de reacción. Los resultados del gráfico están expresados en porcentajes de fijación siendo el 100% la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR sin cannabinoides. \*\*/##p<0,01; \*\*\*/###p<0,001.

**Fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR en presencia de CP55,940**

Utilizando membranas de corteza de rata (0,05 mg/ml) se determinó la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR y su desplazamiento con concentraciones crecientes del agonista CP55,940 ya que fue el ligando que a 100  $\mu$ M aportó un desplazamiento mayor, con el objetivo de determinar si la inhibición de la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR, que se observó, era específica y no debida a la elevada concentración utilizada de fármaco, se utilizaron concentraciones comprendidas entre 0,1  $\mu$ M y 1 mM. A partir de 1  $\mu$ M de CP55,940 se produjo un descenso de la fijación del radioligando [<sup>3</sup>H]-DHR de una manera dosis dependiente, obteniéndose una  $IC_{50} = 51 \mu$ M y una  $I_{max} = 0,84 \pm 0,19 \%$  (Fig. 3.2-2).

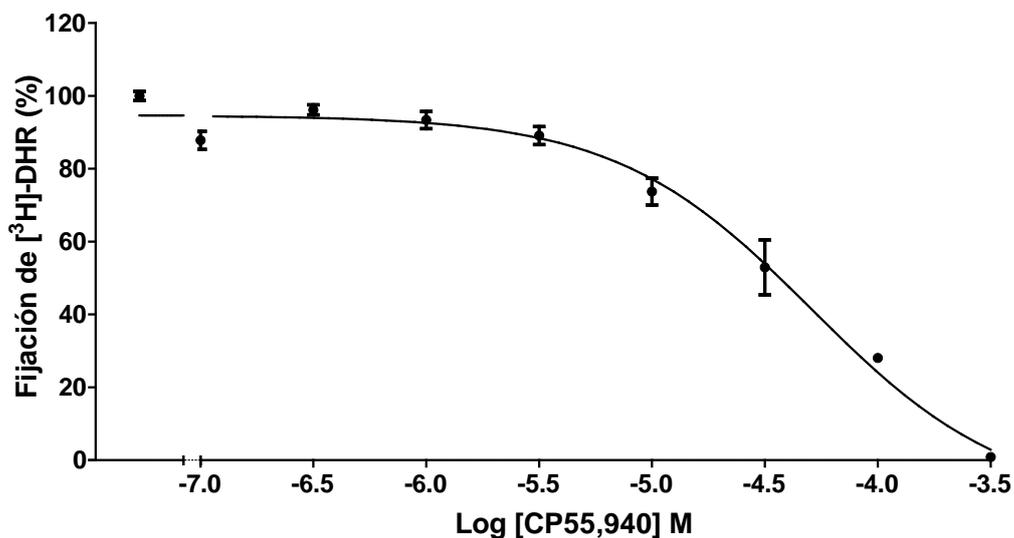


Fig. 3.2-2. Efecto del CP55,940 sobre la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR en membranas de corteza de rata. Los resultados del gráfico están expresados en porcentajes de fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR (%).

A continuación, se decidió realizar el experimento utilizando homogeneizado de membranas de hígado de rata (0,05 mg/ml); un tejido en el cual está descrito la práctica total ausencia de receptores cannabinoides tipo 1 (Lynn and Herkenham, 1994). Se observó de nuevo un desplazamiento dosis dependiente de la fijación del radioligando [<sup>3</sup>H]-DHR,  $IC_{50} = 70 \mu$ M e  $I_{max} = 1,78 \pm 1,08 \%$  (Fig. 3.2-3).

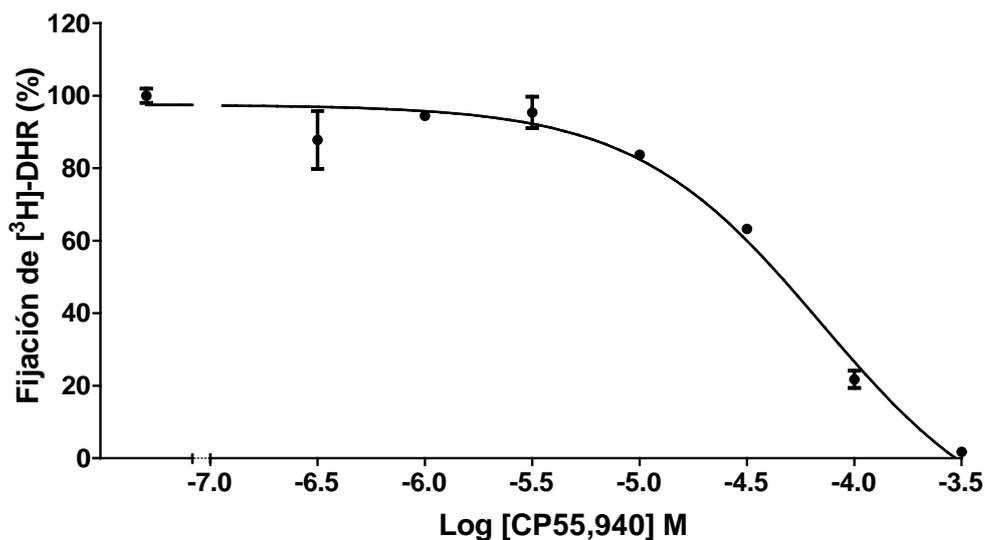


Fig. 3.2-3. Efecto del CP55,940 sobre la fijación de  $[^3\text{H}]\text{-DHR}$  en membranas de hígado de rata. Los resultados del gráfico están expresados en porcentajes de fijación de  $[^3\text{H}]\text{-DHR}$  (%).

Asimismo, se realizó el ensayo en homogeneizados de membranas de cerebelo de ratón *wildtype* y *knockout* para el receptor  $\text{CB}_1$ , en ambos tipos de membranas se obtuvo una disminución de la fijación de  $[^3\text{H}]\text{-DHR}$  mayor conforme aumentaba la concentración de CP55,940. La  $\text{IC}_{50}$  para el cerebelo de ratón *wildtype* fue de  $137 \mu\text{M}$  y para el *knockout* de  $151 \mu\text{M}$  y las  $\text{I}_{\text{max}}$  fueron  $12,21 \pm 1,08 \%$  y  $7,81 \pm 1,29 \%$ , respectivamente (Fig. 3.2-4).

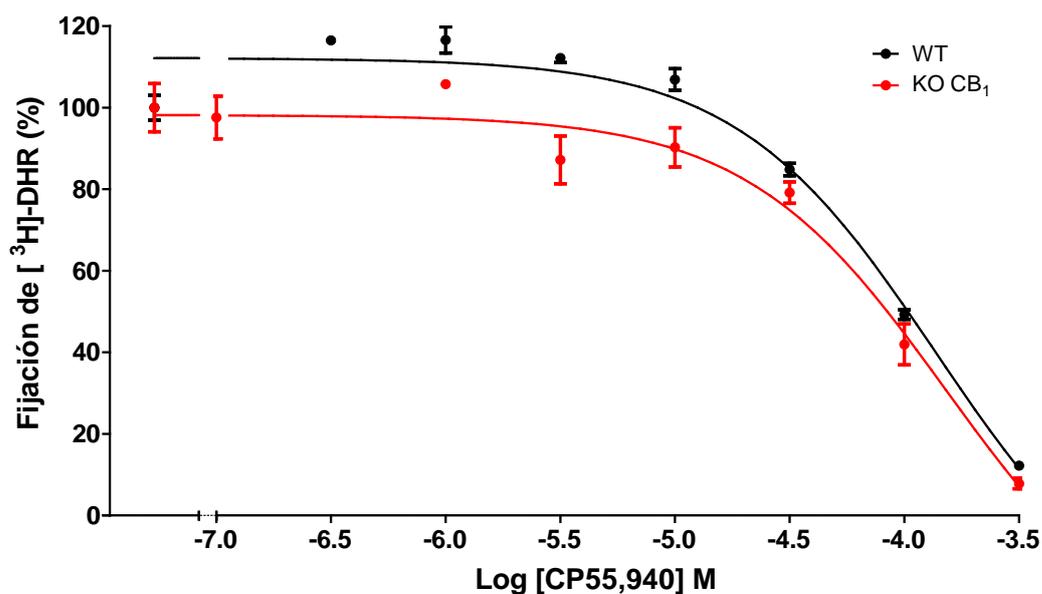


Fig. 3.2-4. Efecto del CP55,940 sobre la fijación de  $[^3\text{H}]\text{-DHR}$  en membranas de cerebelo de ratón *knockout* para  $\text{CB}_1$  ( $\text{KO CB}_1$ ) y *wildtype* ( $\text{WT}$ ). Los resultados del gráfico están expresados en porcentajes de fijación de  $[^3\text{H}]\text{-DHR}$  (%).

## Sumario

1. El agonista CP55,940 causa una inhibición dosis dependiente de la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR en hipocampo de ratón similar en los grupos: *wildtype*, *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub>, infectado con el virus que expresa el receptor CB<sub>1</sub> y con el receptor CB<sub>1</sub> con la mutación DN22.

2. Los agonistas cannabinoides CP55,940 y WIN55,212-2 y el antagonista AM251 a una concentración de 100 μM provocan una inhibición de la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR en homogeneizados de membranas de corteza de rata, esta inhibición fue mayor con el CP55,940 que con el WIN55,212-2 o el AM251. No obstante, el antagonista AM281 produjo un leve aumento.

3. El agonista CP55,940 causa una inhibición dosis dependiente de la fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR en homogeneizados de membrana de corteza cerebral e hígado de rata y de cerebelo de ratón *wildtype* y *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub>, obteniéndose unas IC<sub>50</sub> de 51 μM, 70 μM, 137 μM y 151 μM, respectivamente.



## **4. Efecto de los inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en membranas celulares de corazón de rata**

Con el fin de caracterizar el efecto de los diferentes inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en las metodologías puestas a punto y detalladas en el apartado material y métodos, se utilizaron membranas aisladas de corazón, ya que este órgano contiene una elevada concentración de mitocondrias. Concretamente, se determinó el efecto de los inhibidores rotenona, antimicina A, mixotiazol y azida sódica sobre la cadena de transporte de electrones estudiando para ello, la actividad NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa en homogeneizados de membranas celulares de corazón de rata.

### **4.1 Actividad malato deshidrogenasa en mitocondrias y en homogeneizados de membranas**

Antes de determinar las diferentes actividades enzimáticas se evaluó la actividad malato deshidrogenasa tanto en homogeneizados de membranas como en extracto de mitocondrias con el objetivo de descartar una posible existencia de mitocondrias enteras en el homogeneizado de membranas celulares.

En el extracto de mitocondrias enteras se determinó un consumo de NADH del 40%, indicativo de que la lanzadera malato-oxalacetato era funcional. Sin embargo, en los homogeneizados de membranas celulares no se observó un consumo significativo, lo que permite descartar la presencia de mitocondrias completas en los homogeneizados de membranas (Fig. 4.1-1).

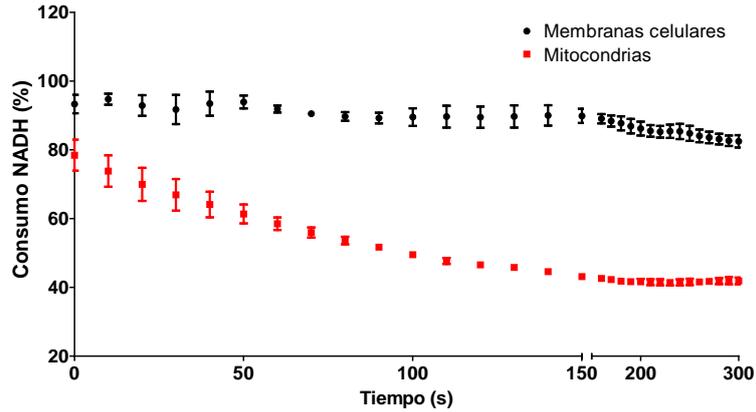


Fig. 4.1-1. Actividad malato deshidrogenasa en homogeneizados de membranas celulares y en extractos de mitocondrias enteras. Los datos están representados en porcentajes de consumo de NADH (%).

## 4.2 Actividad NADH deshidrogenasa

La incubación del homogeneizado de membranas con rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) produjo una inhibición de la actividad NADH deshidrogenasa. La presencia del transportador de electrones dUQ (50  $\mu\text{M}$ ) aceleró la reacción ya que éste facilita el paso de los electrones al aceptor DCIP. No obstante, la inhibición provocada por la rotenona es independiente de la presencia de dUQ (Fig. 4.2-1). Por otro lado, la presencia del inhibidor del complejo III antimicina A produce una inhibición de la actividad NADH deshidrogenasa, no obstante, este efecto es bifásico ya que concentraciones crecientes de antimicina A disminuyen este efecto.

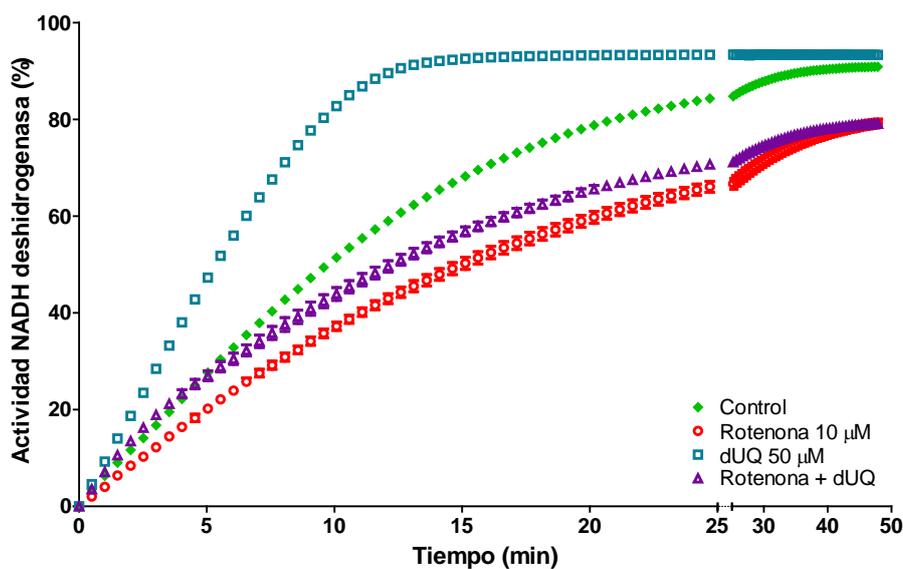


Fig. 4.2-1. Efecto del inhibidor del complejo I rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad NADH deshidrogenasa.

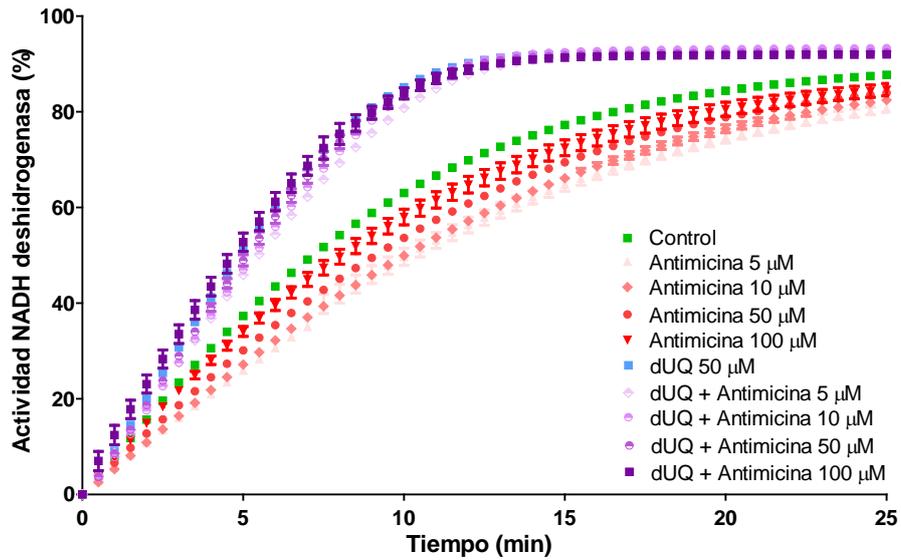


Fig. 4.2-2. Efecto del inhibidor del complejo III antimicina (5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad NADH deshidrogenasa.

### 4.3 Actividad succinato deshidrogenasa

En el caso de la actividad succinato deshidrogenasa, la rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) no ejerció ningún efecto, sin embargo, al igual que en la actividad del complejo I, la incubación con dUQ (10  $\mu\text{M}$ ) causó un aumento en la actividad de esta enzima (Fig. 4.3-1). Por otro lado, concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  inhibieron la reducción del NBT tanto en presencia como en ausencia de dUQ (Fig. 4.3-2).

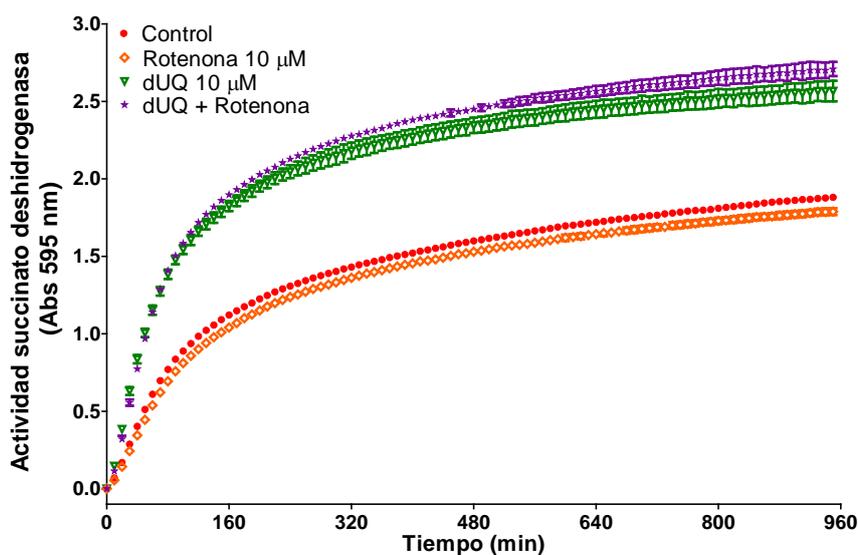


Fig. 4.3-1. Efecto del inhibidor del complejo I rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

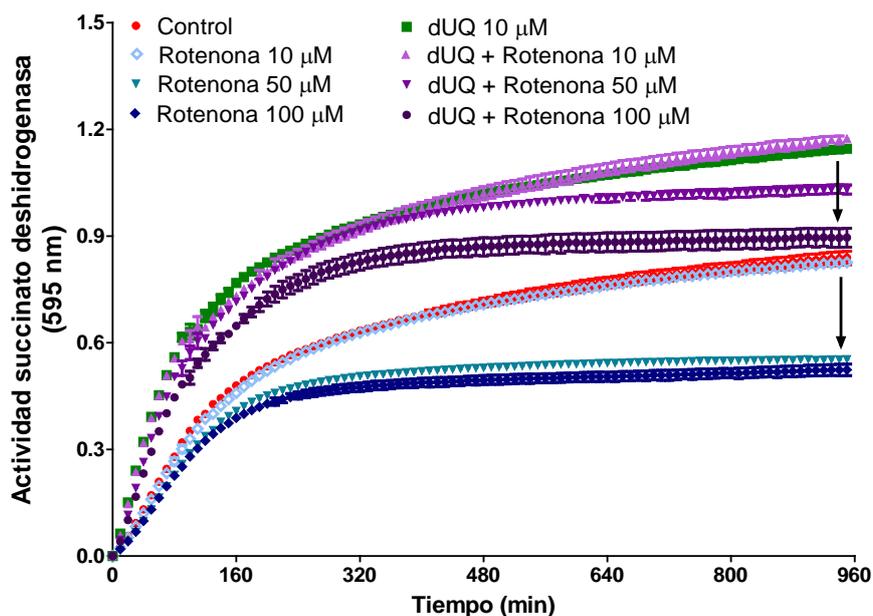


Fig. 4.3-2. Efecto del inhibidor del complejo I rotenona (10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

Al incubar las membranas con el inhibidor del complejo III antimicina A (5  $\mu\text{M}$ ) éste no produjo ningún efecto, sin embargo, al incubarlas con antimicina (5  $\mu\text{M}$ ) y dUQ (10  $\mu\text{M}$ ) se obtuvo un aumento de casi el doble de actividad (Fig. 4.3-3). No obstante, conforme se aumenta las concentraciones de antimicina A este efecto va disminuyendo al igual que se observaba con la actividad NADH deshidrogenasa (Fig. 4.3-4).

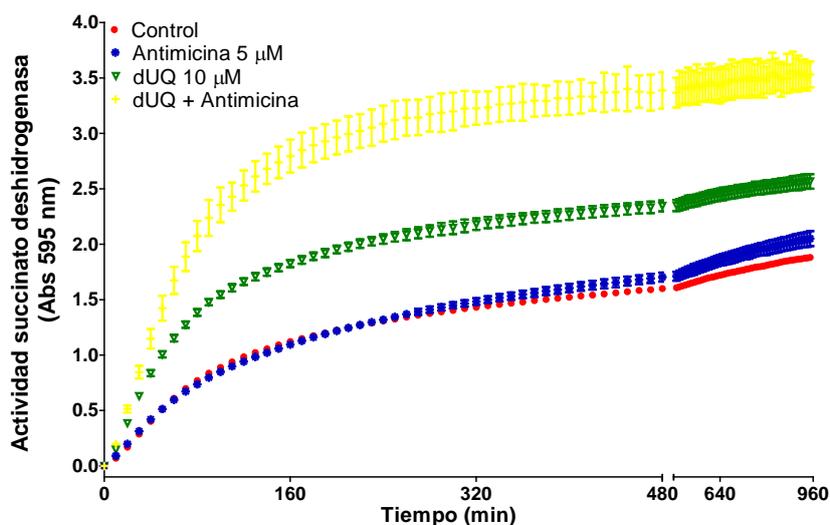


Fig. 4.3-3. Efecto del inhibidor del complejo III antimicina A sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

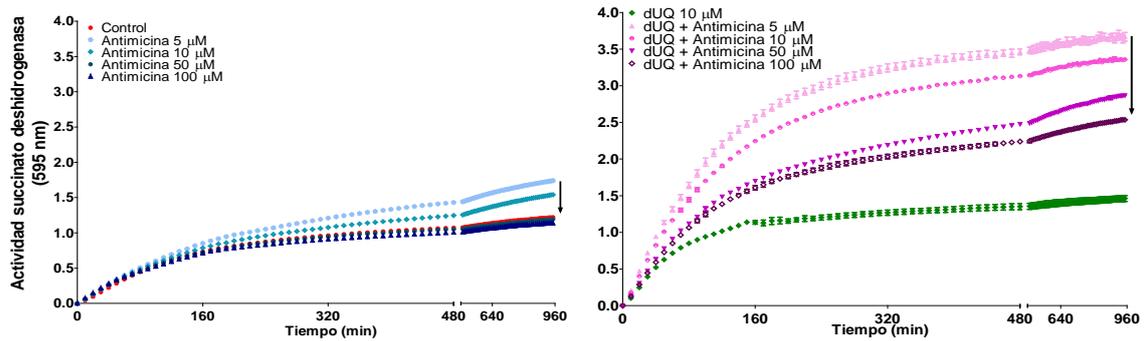


Fig. 4.3-4. Efecto del inhibidor del complejo III antimicina A sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

Por último, la incubación con azida sódica 2,5 mM, inhibidor del complejo IV, produce un efecto similar al de la antimicina A (Fig. 4.3-5).

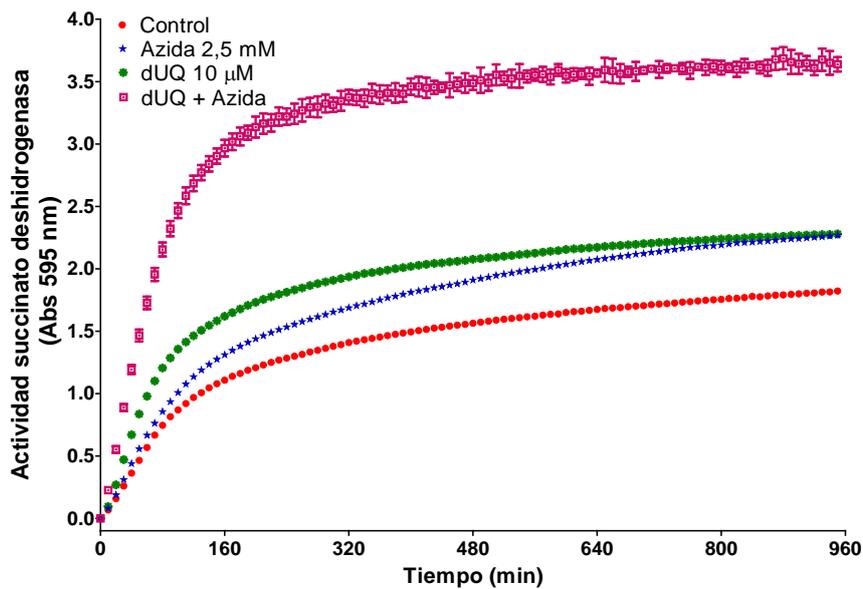


Fig. 4.3-5. Efecto del inhibidor del complejo IV azida sódica (2,5 mM) sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

#### 4.4 Actividad citocromo c oxidasa

En la actividad citocromo c oxidasa la azida sódica produjo una inhibición de la actividad prácticamente completa a concentraciones superiores a 2,5 mM en las membranas celulares anteriormente mencionadas (Fig. 4.4-1).

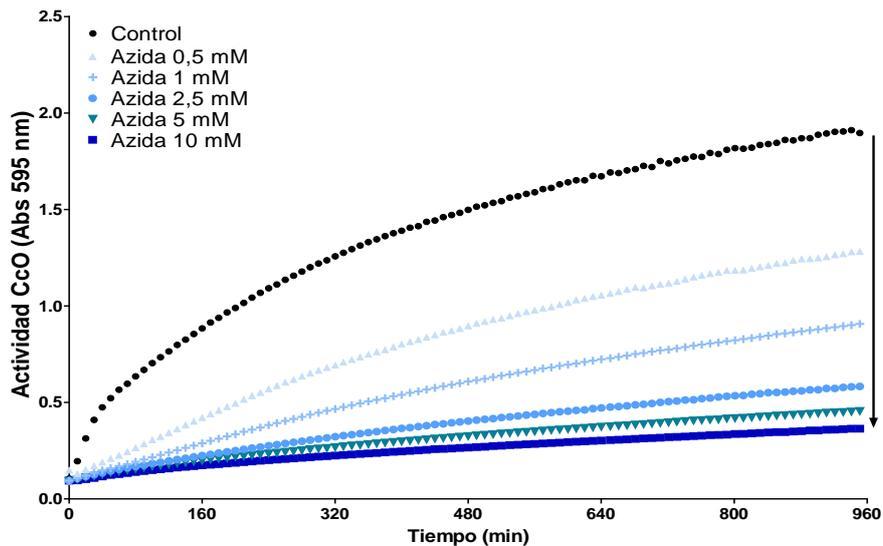
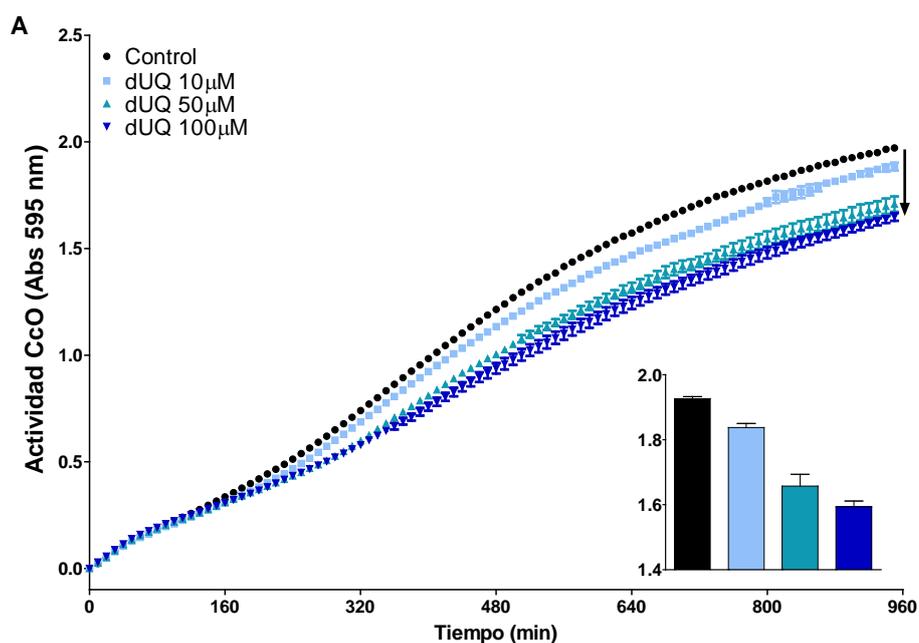


Fig. 4.4-1. Efecto del inhibidor del complejo IV azida sódica sobre la actividad citocromo c oxidasa en presencia del sustrato citocromo c (0,005%).

Por otro lado, se incubaron las membranas de corazón de ratón con dUQ. A 10  $\mu\text{M}$  no produjo ningún efecto en la actividad citocromo c oxidasa, a 50 y 100  $\mu\text{M}$  disminuyó de manera leve el efecto máximo (Fig. 4.4-2 A), por otro lado, cuando se incubó en presencia de NADH apenas se observaron cambios (Fig. 4.4-2 B). También se determinó la actividad del complejo IV en presencia del sustrato del complejo II mitocondrial succinato (1 mM). En este caso, la dUQ tanto a 10 como a 50  $\mu\text{M}$  provocó el desplazamiento del efecto producido por el succinato (Fig. 4.4-2 C).



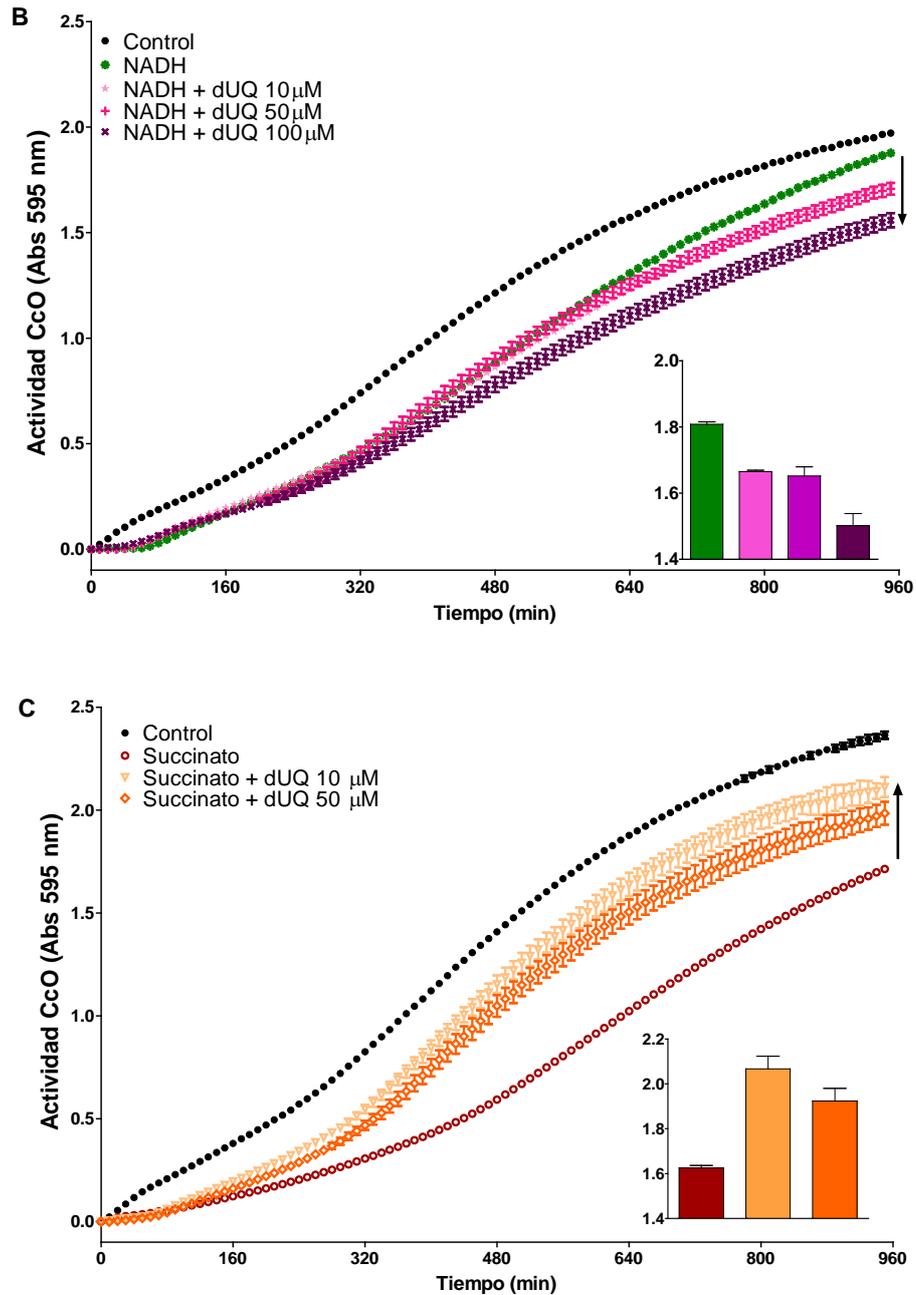


Fig. 4.4-2. Efecto de la dUQ sobre la actividad citocromo c oxidasa. A. En ausencia de sustrato. B. En presencia de NADH. C. En presencia de succinato. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

La rotenona (10  $\mu$ M) no inhibió la actividad citocromo c oxidasa por sí sola, aunque sí lo hizo cuando se incubó con el sustrato NADH. La rotenona al inhibir el complejo I, bloquea toda la cadena incrementando, de este modo, la inhibición de la oxidación del DAB que produce el NADH (Fig. 4.4-3).

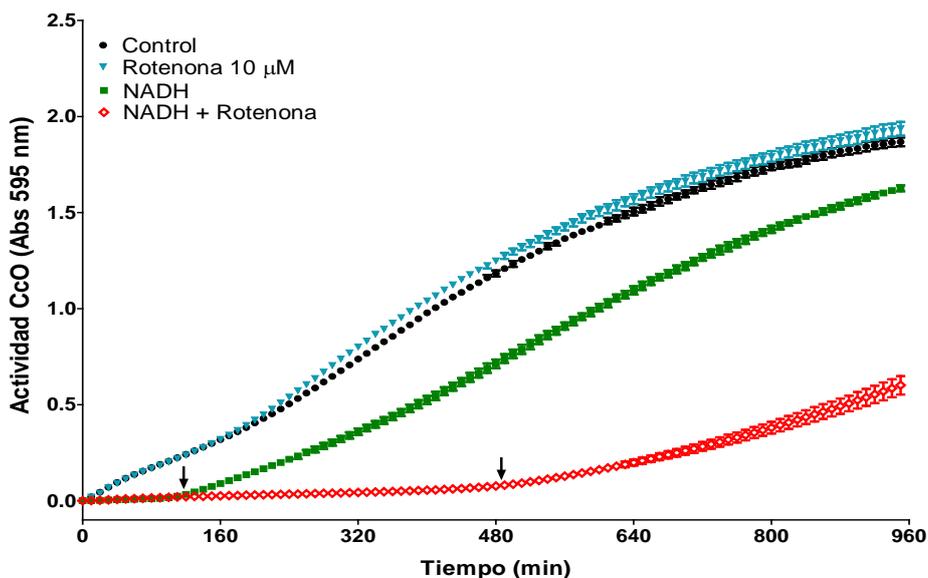


Fig. 4.4-3. Efecto del inhibidor rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia del sustrato del complejo I NADH sobre la oxidación del DAB.

Al incubar las membranas con dUQ y con rotenona (10  $\mu\text{M}$ ), se observó una inhibición de la oxidación de la DAB causada por la quinona a 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 4.4-4). Asimismo, en presencia de NADH se obtuvo un efecto bifásico en el que a bajas concentraciones de dUQ (10  $\mu\text{M}$ ) se evitaba parcialmente el efecto inhibitorio de la rotenona mientras que a concentraciones superiores (50  $\mu\text{M}$ ) se potenciaba dicho efecto (Fig. 4.4-5).

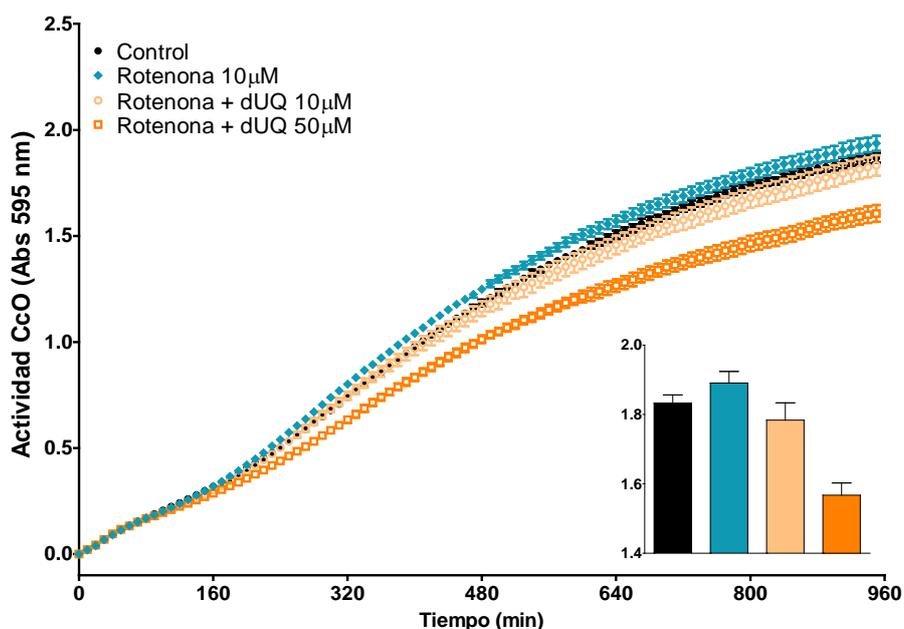


Fig. 4.4-4. Efecto del inhibidor rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia de dUQ (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad citocromo c oxidasa. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

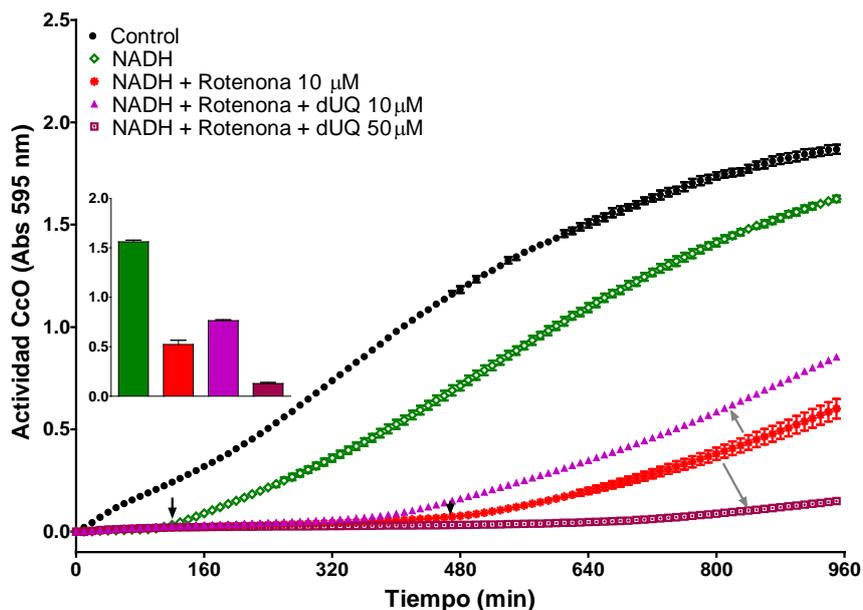


Fig. 4.4-5. Efecto del inhibidor rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia de dUQ (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) y del sustrato NADH sobre la oxidación de DAB. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

La antimicina A provocó una inhibición dosis dependiente de la actividad citocromo c oxidasa, siendo perceptible a partir de 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 4.4-6). En presencia además de NADH (1,4 mM) la antimicina A provocó una inhibición de la oxidación de la DAB (Fig. 4.4-7) similar al producido por la rotenona.

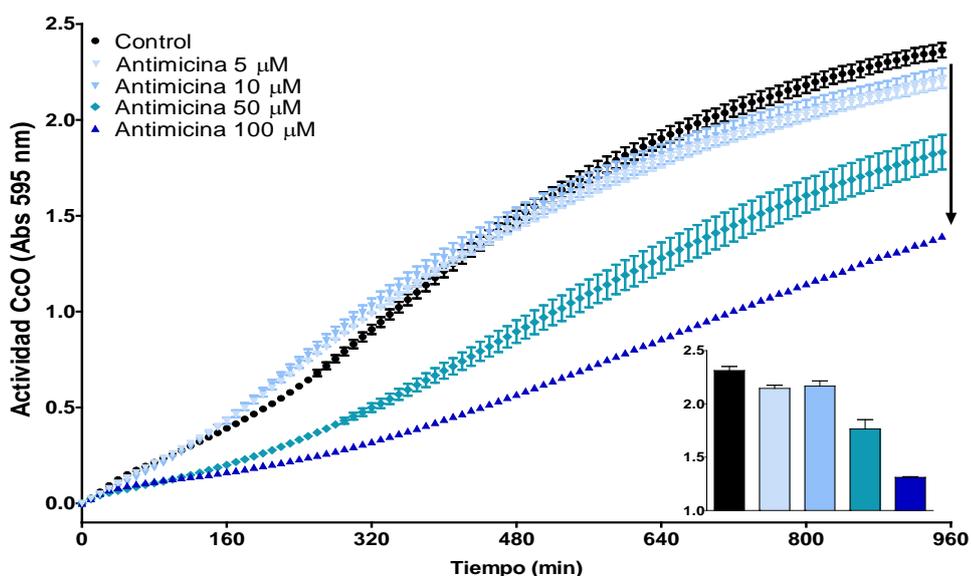


Fig. 4.4-6. Efecto de la antimicina A sobre la oxidación de la DAB. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

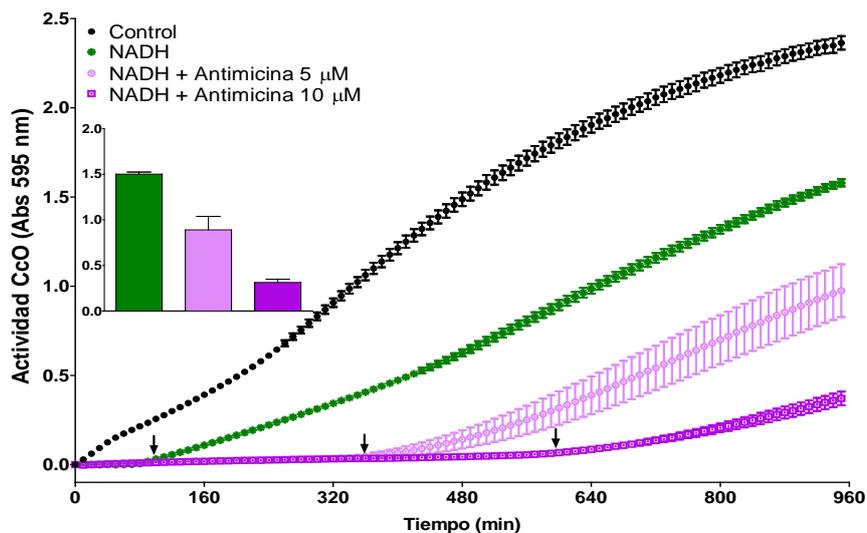
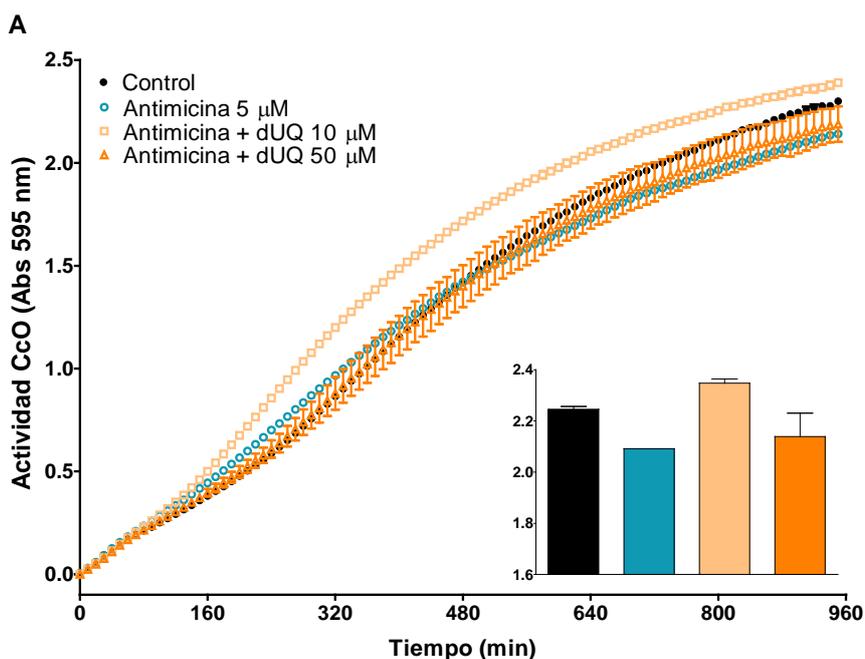


Fig. 4.4-7. Efecto del inhibidor antimicina A (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) en presencia del sustrato NADH sobre la oxidación de DAB. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

Posteriormente, se estudió el efecto de la dUQ sobre la inhibición inducida por la antimicina A (5  $\mu\text{M}$ ), observándose un aumento de la velocidad de reacción en presencia de dUQ 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 4.4-8 A). Por otro lado, en presencia de NADH la concentración de dUQ 10  $\mu\text{M}$  desplazó el efecto inhibitorio de la antimicina A sobre la oxidación de la DAB y la concentración de 50  $\mu\text{M}$  potenció el efecto inhibitorio de la antimicina A (Fig. 4.4-8 B).



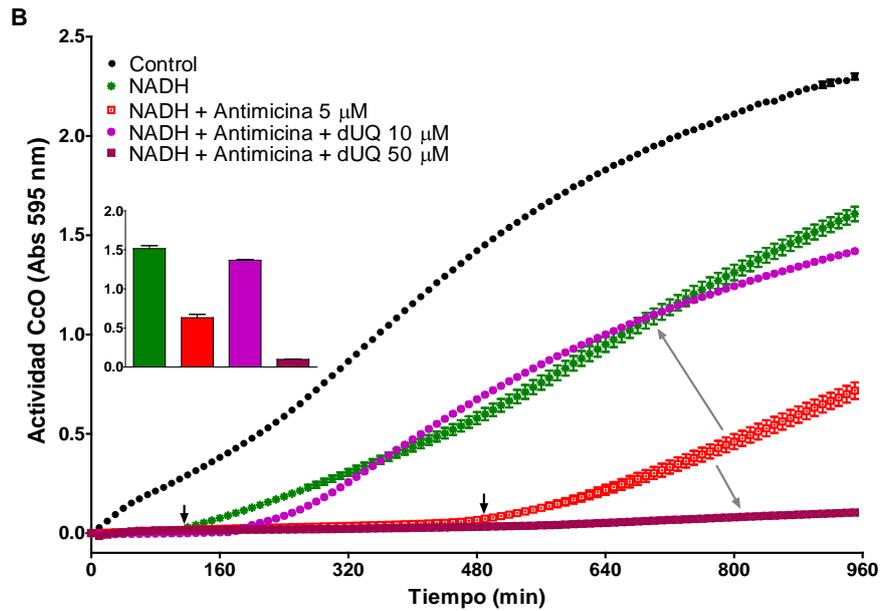


Fig. 4.4-8. Efecto de la dUQ (10 y 50  $\mu$ M) sobre la oxidación de la DAB inducida por la antimicina A (5  $\mu$ M). A. En ausencia de sustrato. B. En presencia de NADH. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

La incubación con el inhibidor del complejo III mixotiazol causó una inhibición de la actividad citocromo c oxidasa a las concentraciones de 10 y 50  $\mu$ M (Fig. 4.4-9). En presencia de NADH (1,4 mM) la concentración de 5  $\mu$ M ya indujo una inhibición casi completa de la oxidación de la DAB (Fig. 4.4-10).

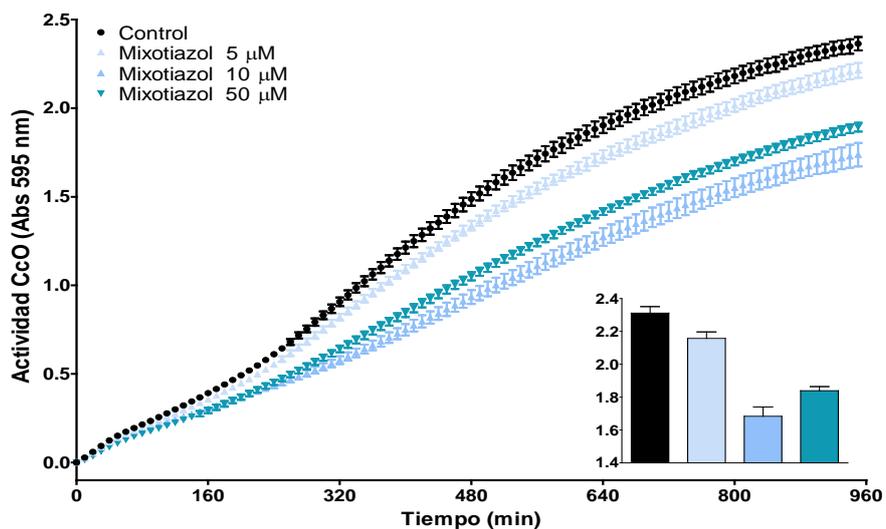


Fig. 4.4-9. Efecto del inhibidor mixotiazol sobre la oxidación de la DAB. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

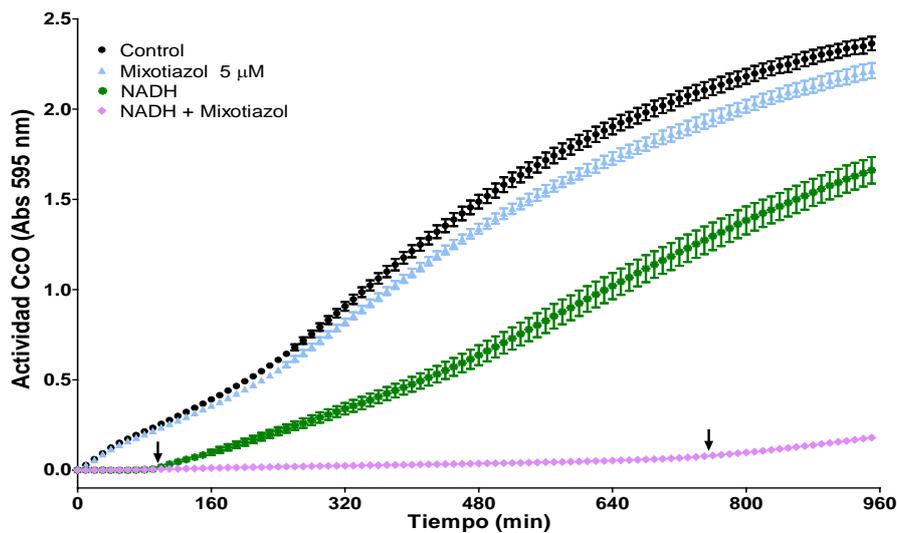
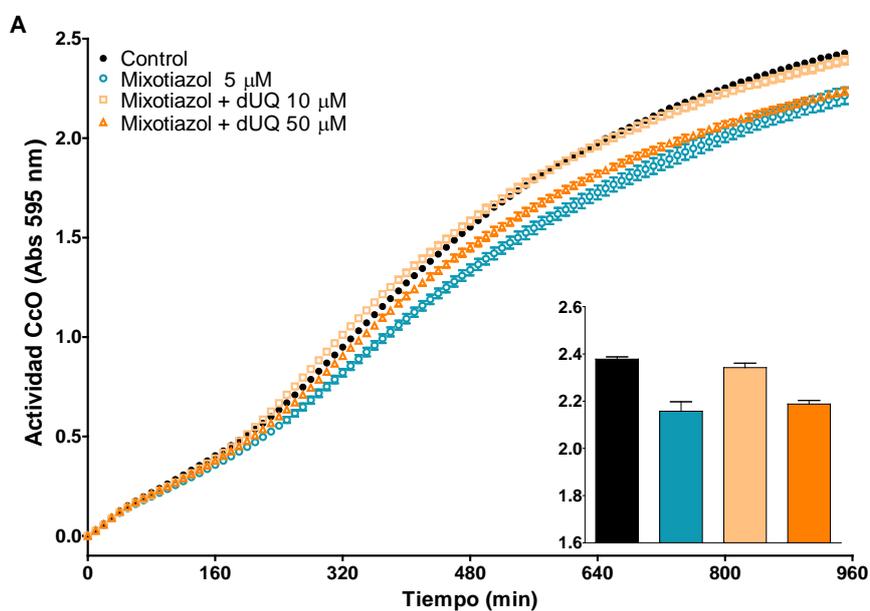


Fig. 4.4-10. Efecto del inhibidor mixotiazol en presencia de NADH sobre la oxidación de la DAB. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

La presencia de dUQ en el medio de reacción apenas afectó a la fuerte inhibición de la oxidación de la DAB inducida por el mixotiazol, no obstante, al igual que ocurría con la antimicina A, se observó un efecto bifásico, de manera que la concentración de dUQ 10 μM desplazó ligeramente la inhibición mientras que la de 50 μM la potenció (Fig. 4.4-11).



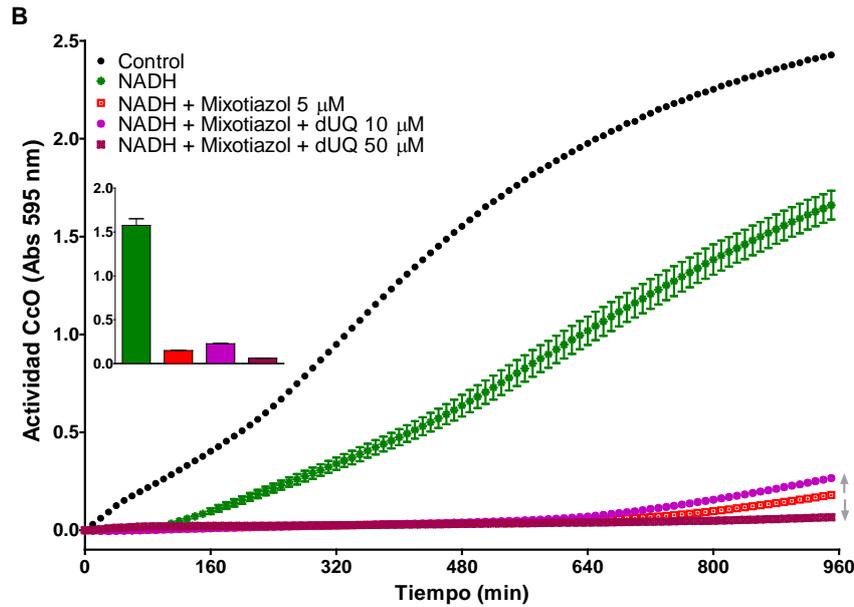


Fig. 4.4-11. Efecto del inhibidor mixotiazol en presencia de dUQ sobre la oxidación de la DAB. A. En ausencia de sustrato. B. En presencia de NADH. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

## Sumario

### Rotenona

1. El inhibidor específico del complejo I rotenona (10 μM) causa una inhibición de la actividad NADH deshidrogenasa en presencia y en ausencia de dUQ.

2. Sin embargo, a esa misma concentración la rotenona no ejerce ningún efecto en la actividad succinato deshidrogenasa. A concentraciones de 50 y 100 μM se observa una disminución de la reducción del NBT en presencia y en ausencia de dUQ.

3. La rotenona a 10 μM no produce efecto sobre la actividad citocromo c oxidasa. No obstante, en presencia de NADH, sustrato del complejo I, aumenta el tiempo de inhibición de la oxidación de la DAB, no recuperándose dicha actividad hasta que el sustrato es consumido. Este efecto es bloqueado parcialmente por concentraciones bajas de dUQ (10 μM) mientras que a concentraciones superiores (50 μM) lo potencia.

### **Antimicina A**

1. La antimicina A causa una inhibición en la actividad NADH deshidrogenasa a 5  $\mu\text{M}$ , no obstante, esta inhibición va siendo cada vez menor conforme se aumenta la concentración del inhibidor. En presencia de dUQ (10  $\mu\text{M}$ ) no se observa efecto alguno.

2. En cuanto a la actividad succinato deshidrogenasa, una concentración de 5  $\mu\text{M}$  en presencia de dUQ (10  $\mu\text{M}$ ) aumenta la reducción del NBT, este aumento, al igual que ocurre en la actividad NADH deshidrogenasa, va reduciéndose conforme se aumenta la concentración del inhibidor. Este efecto también se observa, aunque en menor medida, en ausencia de dUQ.

3. Para finalizar, la antimicina A realiza una inhibición dosis dependiente de la actividad citocromo c oxidasa. En presencia de NADH se alarga el tiempo de inhibición hasta que se consume el sustrato. La dUQ produce un efecto bifásico tal y como ocurre en el caso de la rotenona.

### **Mixotiazol**

1. El mixotiazol produce un efecto similar al que reporta la antimicina A en la actividad citocromo c oxidasa, aunque en presencia de NADH el efecto es más potente (5  $\mu\text{M}$ ).

### **Azida sódica**

1. La azida sódica produce un aumento en la actividad de la enzima succinato tanto en presencia como en ausencia de dUQ.

2. La azida sódica produce una inhibición dosis dependiente de la actividad citocromo c oxidasa.

## **5. Efecto de ligandos cannabinoides sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

En el presente capítulo se ha evaluado el efecto que producen diferentes ligandos cannabinoides sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial en homogeneizados de membranas. Con este fin, se determinaron las siguientes actividades enzimáticas: NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa.

### **5.1 Actividad NADH deshidrogenasa**

Se estudió la actividad NADH deshidrogenasa en presencia de los ligandos cannabinoides testados en los estudios con [<sup>3</sup>H]-DHR, CP55,940, WIN55,212-2, AM251 y AM281, junto al HU331, quinona derivada de la oxidación del cannabidiol que no actúa a través de receptores cannabinoides (Kogan et al., 2007).

La molécula de CP55,940 (50  $\mu$ M) produjo una inhibición de la actividad del complejo I cuando se incubó en presencia del transportador de electrones dUQ (10  $\mu$ M) (Fig. 5.1-1). El WIN55,212-2 (100  $\mu$ M) (Fig. 5.1-2) y el AM251 (100  $\mu$ M) (Fig. 5.1-3) indujeron una leve inhibición de la actividad NADH deshidrogenasa, sin embargo, tanto el AM281 (100  $\mu$ M) (Fig. 5.1-4) como el HU331 (50  $\mu$ M) (Fig. 5.1-5) no causaron ningún efecto.

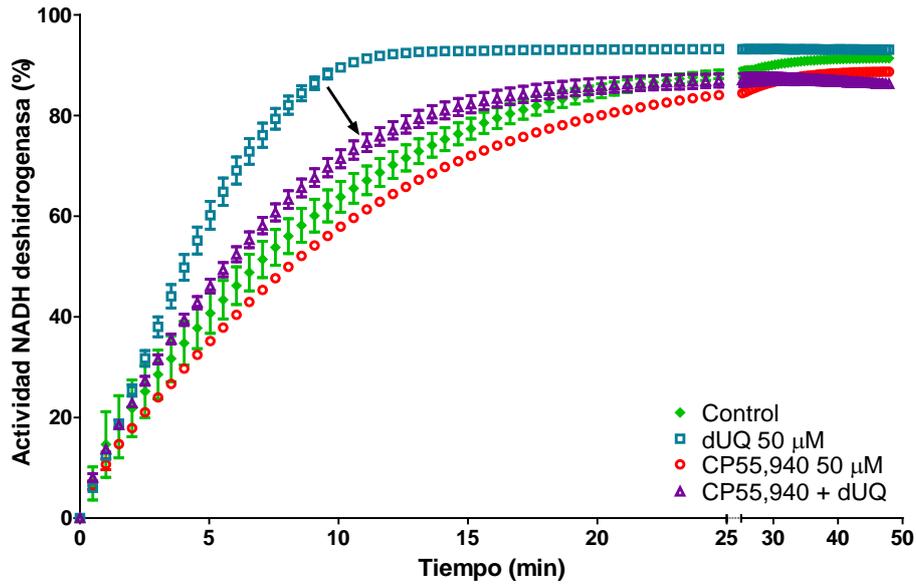


Fig. 5.1-1. Efecto del ligando CP55,940 (50  $\mu$ M) sobre la actividad NADH deshidrogenasa.

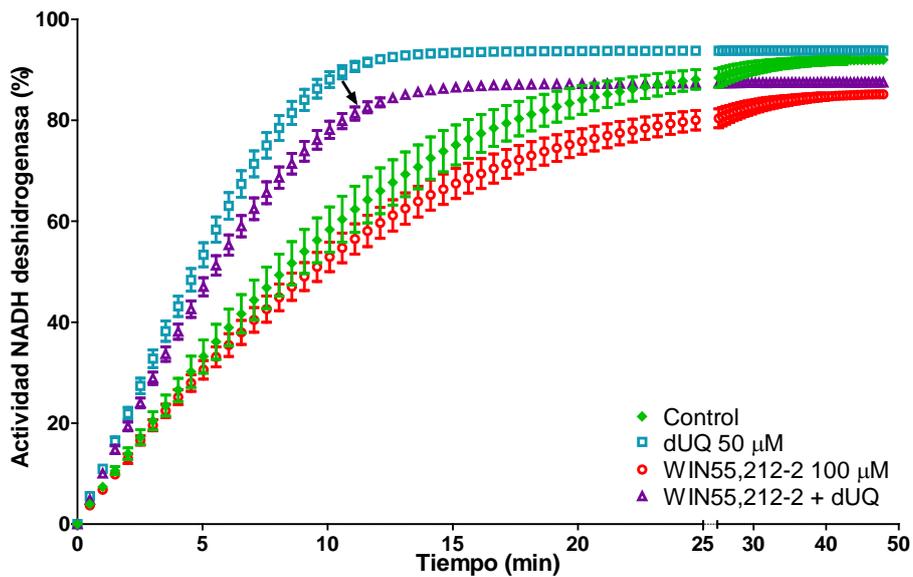


Fig. 5.1-2. Efecto del ligando WIN55,212-2 (100  $\mu$ M) sobre la actividad NADH deshidrogenasa.

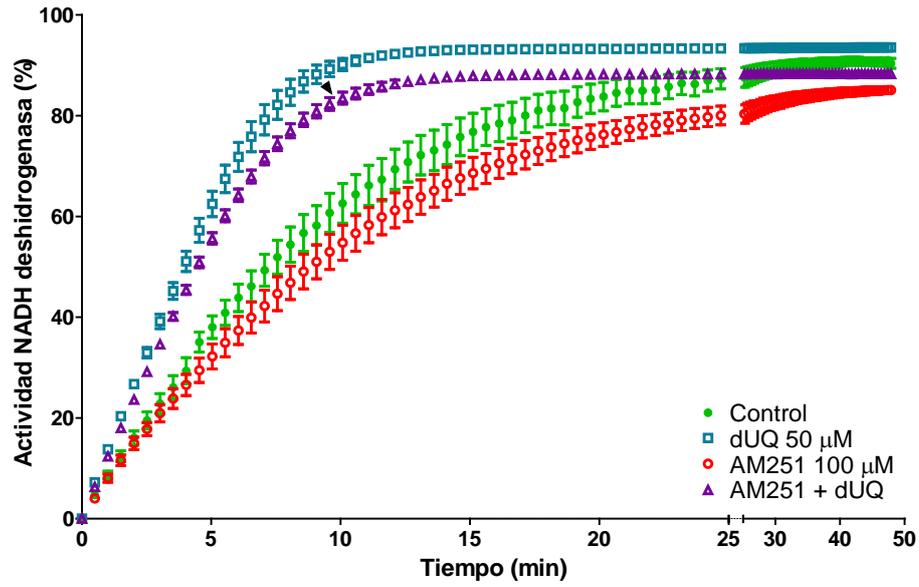


Fig. 5.1-3. Efecto del ligando AM251 (100  $\mu$ M) sobre la actividad NADH deshidrogenasa.

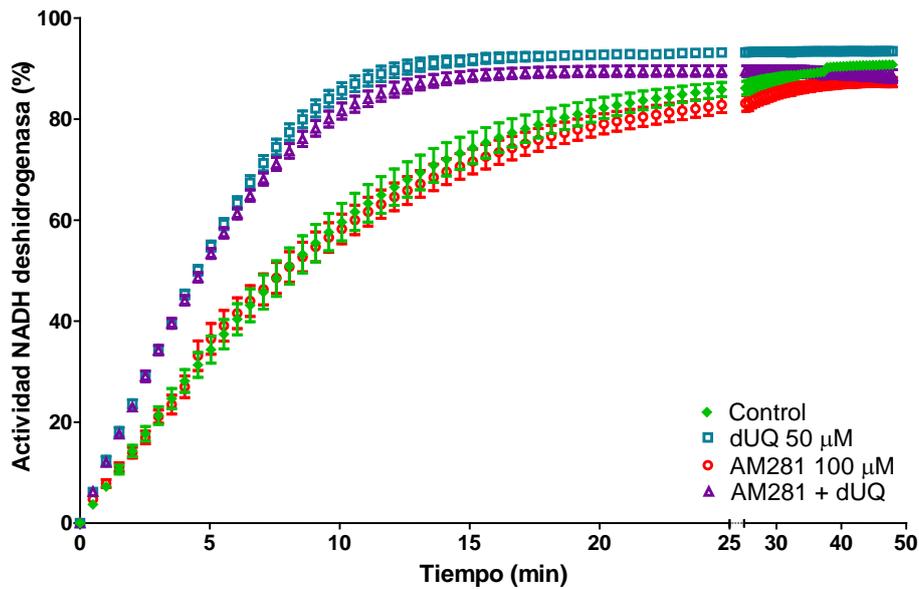


Fig. 5.1-4. Efecto del ligando AM281 (100  $\mu$ M) sobre la actividad NADH deshidrogenasa.

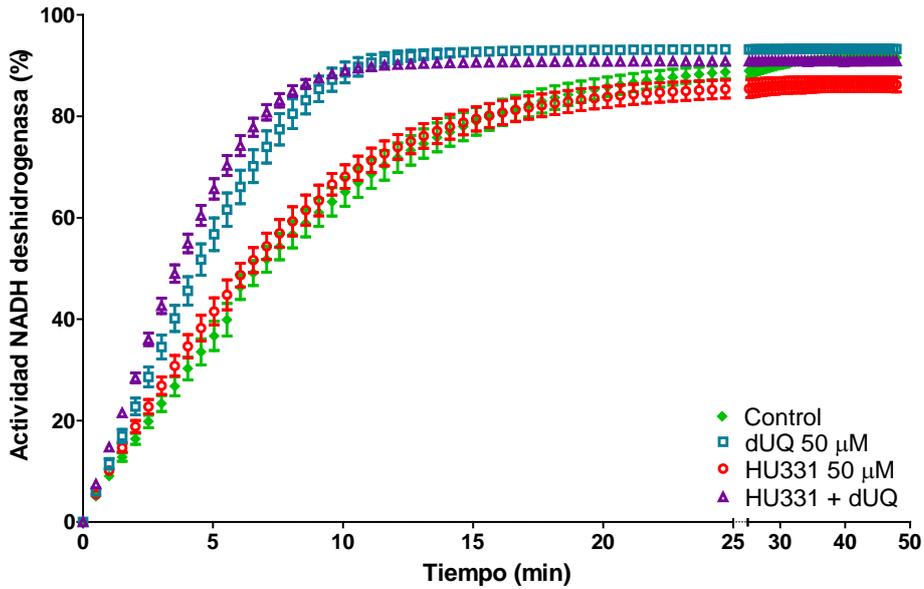


Fig. 5.1-5. Efecto del HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad NADH deshidrogenasa.

## 5.2 Actividad succinato deshidrogenasa

Se testaron los diferentes cannabinoides en presencia y en ausencia tanto de dUQ (10  $\mu\text{M}$ ) como del inhibidor del complejo III antimicina A (5  $\mu\text{M}$ ).

El ligando CP55,940 (50  $\mu\text{M}$ ) actuó de manera similar a la antimicina A sobre la actividad succinato deshidrogenasa, ya que ambos por sí solos, no ejercieron ningún efecto pero en presencia de dUQ aumentaron la actividad de la enzima (Fig. 5.2-1). Más aún, la combinación de ambas moléculas no modificó el efecto alcanzado por cada uno de ellas por separado.

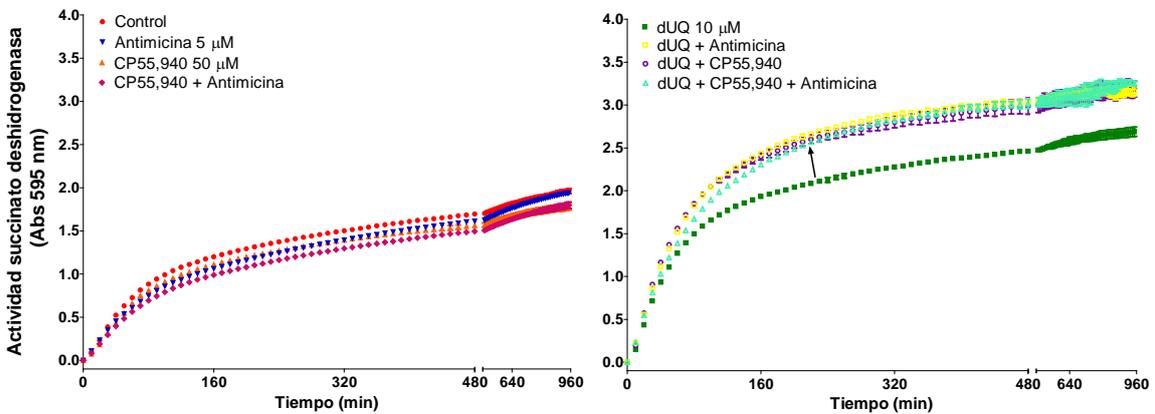


Fig. 5.2-1. Efecto del ligando CP55,940 (50  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

La presencia del ligando WIN55,212-2 (100  $\mu\text{M}$ ) provocó una disminución en la actividad succinato deshidrogenasa, además, tanto en presencia de dUQ como de dUQ y antimicina se observó una disminución en la velocidad de la reacción, a pesar de obtenerse un efecto final similar (Fig. 5.2-2).

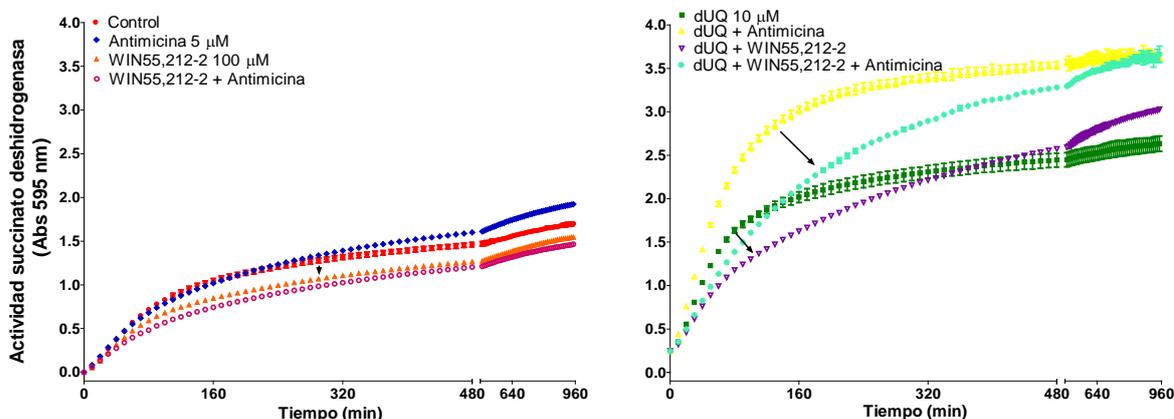


Fig. 5.2-2. Efecto del ligando WIN55,212-2 (100  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

No se observaron diferencias en la actividad succinato deshidrogenasa en presencia de AM251 (100  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, en presencia de antimicina A y de dUQ, el AM251 provocó una disminución de la velocidad de reacción, no afectando esto en el efecto final, ya que en ambos casos se mantiene igual o por encima de su control (Fig. 5.2-3).

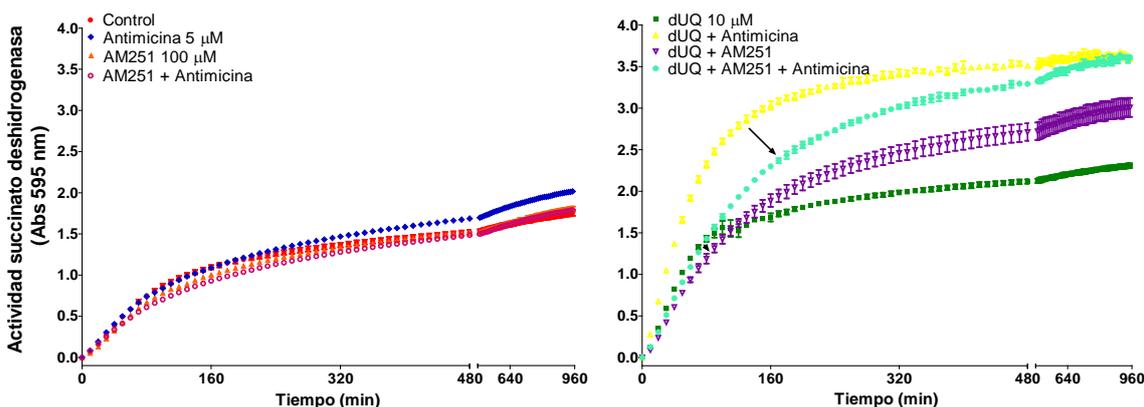


Fig. 5.2-3. Efecto del ligando AM251 (100  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

La presencia del ligando AM281 (100  $\mu\text{M}$ ) no indujo cambios significativos en la actividad succinato deshidrogenasa, tampoco realizó ningún efecto en presencia de dUQ y/o de antimicina A (Fig. 5.2-4).

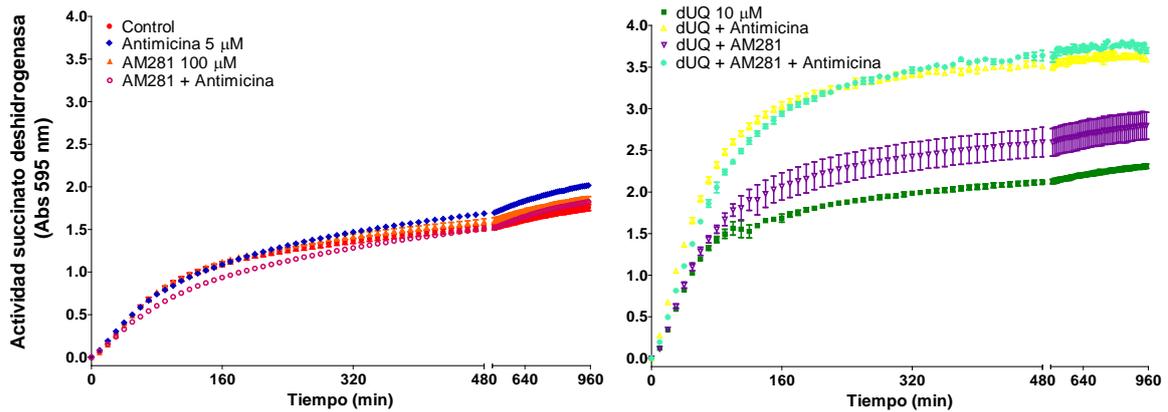


Fig. 5.2-4. Efecto del ligando AM281 (100  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

Por último, el ligando HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) tanto en presencia como en ausencia de antimicina A indujo una disminución de la actividad succinato deshidrogenasa. Por otro lado, incubando con dUQ o con antimicina A y HU331 se observó una leve disminución de la velocidad de la actividad de la enzima, sin embargo, no afectó al efecto final (Fig. 5.2-5).

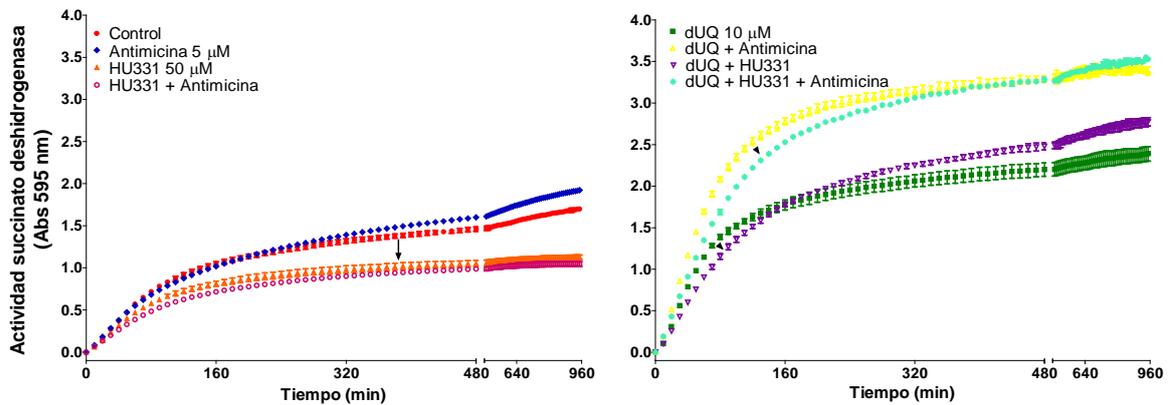


Fig. 5.2-5. Efecto del ligando HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad succinato deshidrogenasa.

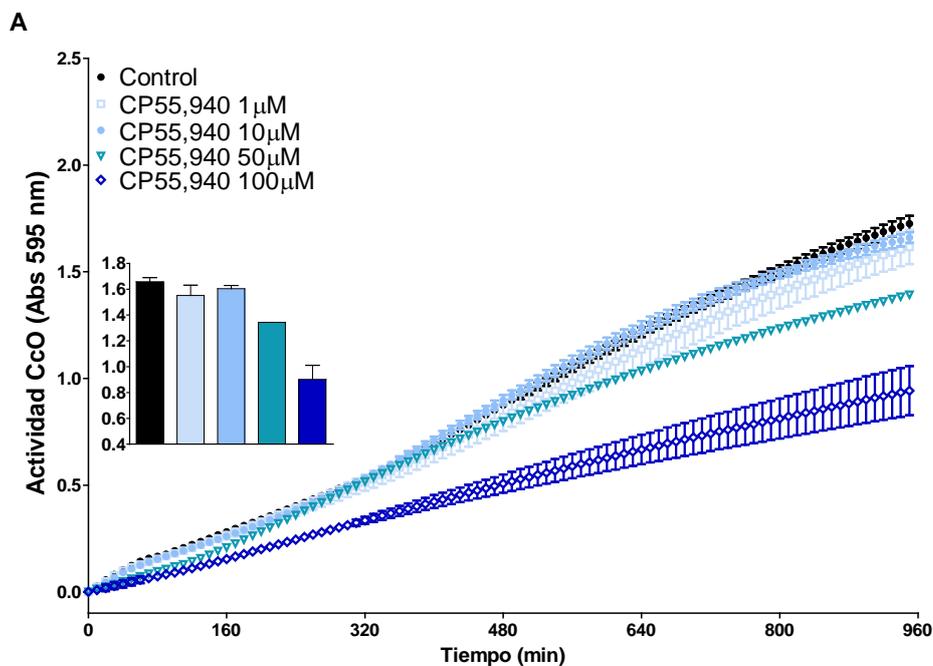
### 5.3 Citocromo c oxidasa

Como se explicó en el apartado de Materiales y métodos el estudio de la actividad citocromo c oxidasa se realiza cuantificando el cambio de color que produce la oxidación de la molécula de DAB cuando reduce el citocromo c, ya que es necesario que el complejo IV oxide de nuevo el citocromo c, para que pueda captar los electrones de otra molécula de DAB.

Se estudió el efecto de los cannabinoides CP55,940, WIN55,212-2, AM251, AM281 y HU331 sobre la actividad citocromo c oxidasa, en ausencia y en presencia de NADH, con el fin de evaluar el efecto en el complejo respiratorio en reposo o tras ser activado.

El CP55,940 indujo una inhibición de la actividad citocromo c oxidasa dosis dependiente a concentraciones superiores a 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 5.3-1 A). No obstante, la concentración de 10  $\mu\text{M}$  en presencia de NADH (0,7 mM) indujo la inhibición de la oxidación de la DAB, incrementando el tiempo hasta 300 minutos, con las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  esta inhibición fue total (Fig. 5.3-1 B).

Cuando se empleó el sustrato del complejo II, succinato (1 mM) únicamente la concentración de CP55,940 superior (50  $\mu\text{M}$ ) disminuyó el efecto máximo (Fig. 5.3-1 C).



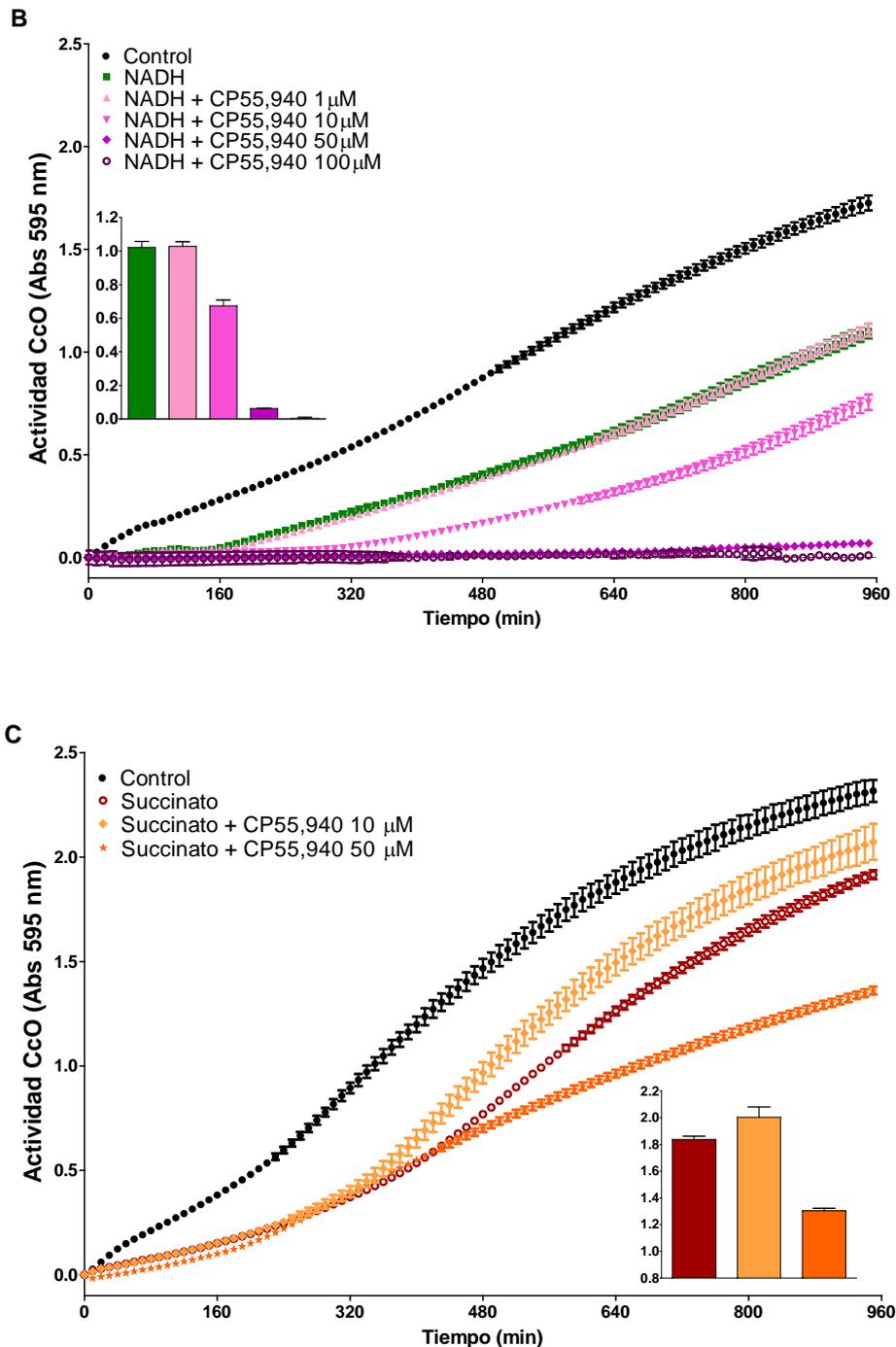


Fig. 5.3-1. Efecto del ligando CP55,940 sobre la actividad citocromo c oxidasa. A. En ausencia de sustrato. B. En presencia de NADH. C. En presencia de succinato. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

Para comprobar si estos cannabinoides actuaban en los lugares de unión de la ubiquinona, se estudió el efecto que producía la dUQ sobre la inhibición de la oxidación de la DAB producida por el ligando CP55,940 a la concentración de 10  $\mu$ M y de 50  $\mu$ M con dUQ. La incubación de las membranas con CP55,940 (10  $\mu$ M) en presencia de NADH y dUQ dio lugar a

un efecto bifásico similar al observado anteriormente con los inhibidores específicos de diferentes complejos mitocondriales (rotenona, antimicina A y mixotiazol). De esta manera, una concentración baja de dUQ (10  $\mu\text{M}$ ) reducía el efecto del CP55,940 mientras que una concentración más alta (50  $\mu\text{M}$ ) prolongaba dicho efecto (Fig. 5.3-2). La incubación con 50  $\mu\text{M}$  CP55,940 llevó a una inhibición total que no fue modificada por la dUQ.

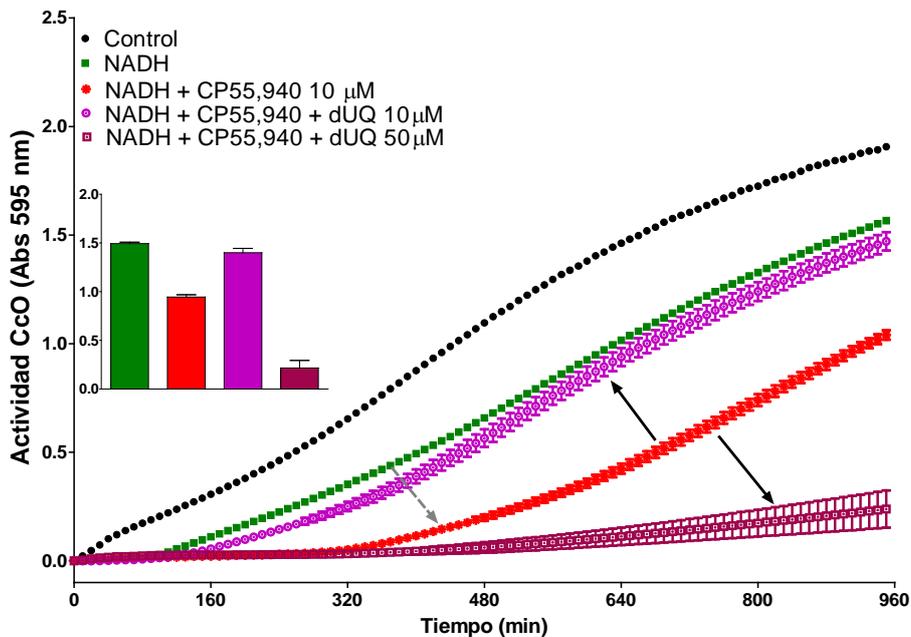


Fig. 5.3-2. Efecto de la dUQ (10 ó 50  $\mu\text{M}$ ) sobre la inhibición de la oxidación de la DAB inducida por CP55,940 (10  $\mu\text{M}$ ) actividad citocromo c oxidasa en presencia del sustrato NADH. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

En el estudio de la actividad citocromo c oxidasa con el ligando cannabinoide WIN55,212-2 se observó que no se producía inhibición de la reacción a ninguna de las concentraciones (Fig. 5.3-3 A). No obstante, en presencia del sustrato del complejo I la concentración de 10  $\mu\text{M}$  produjo una inhibición de la oxidación de la DAB hasta el min 180 y con 50 y 100  $\mu\text{M}$  la inhibición se prolongó ligeramente (hasta el min 210), observándose una leve disminución del efecto máximo a estas 2 concentraciones (Fig. 5.3-3 B).

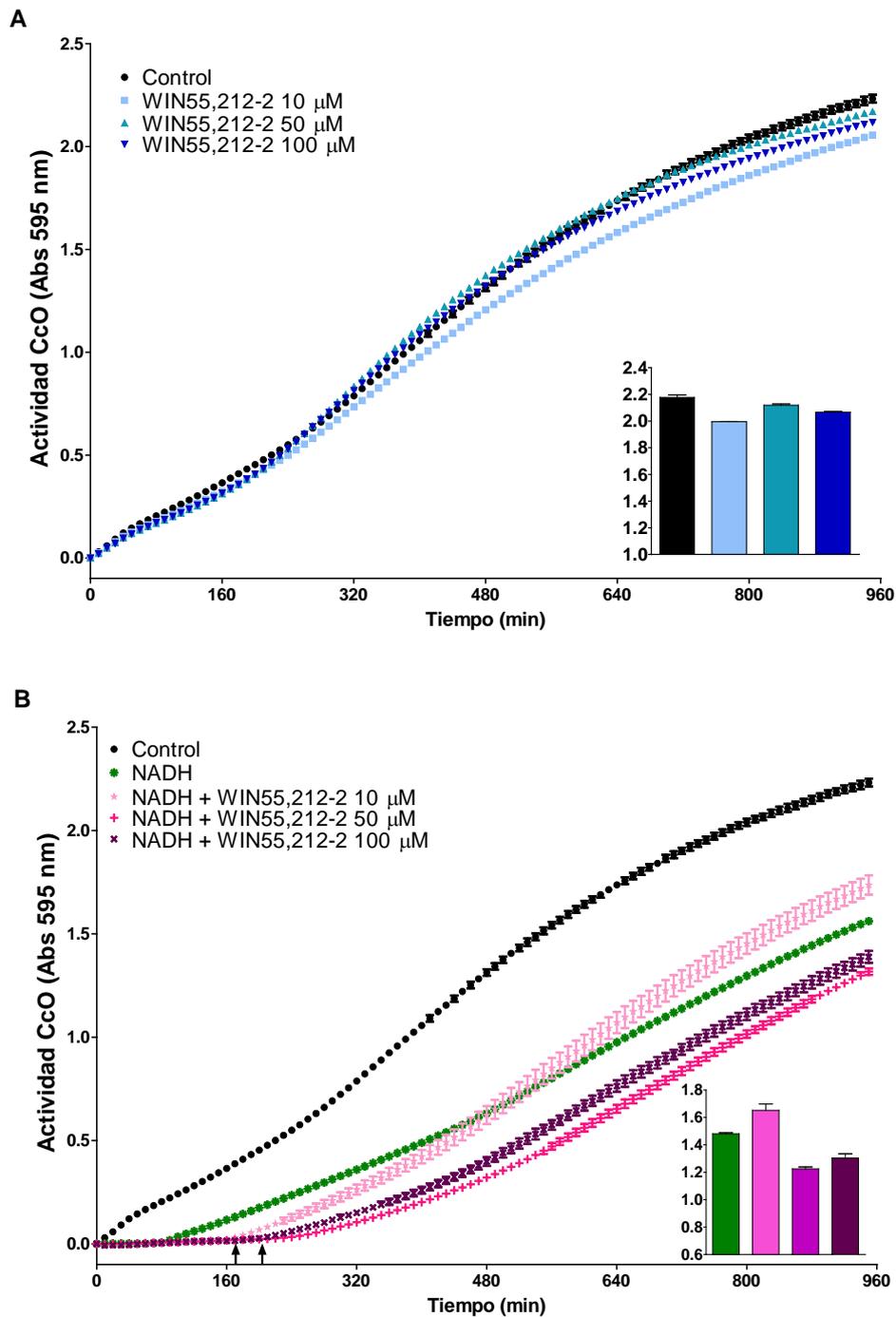


Fig. 5.3-3. Efecto del ligando WIN55,212-2 sobre la actividad citocromo c oxidasa. A. En ausencia de NADH. B. En presencia de NADH. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

El ligando cannabinoide AM251 produjo una inhibición de la actividad citocromo c oxidasa a 50 y 100  $\mu$ M (Fig. 5.3-4 A). Cuando se incubó en presencia de NADH, se observó una disminución de la oxidación de la DAB a medida que se incrementaba la concentración (Fig. 5.3-4 B).

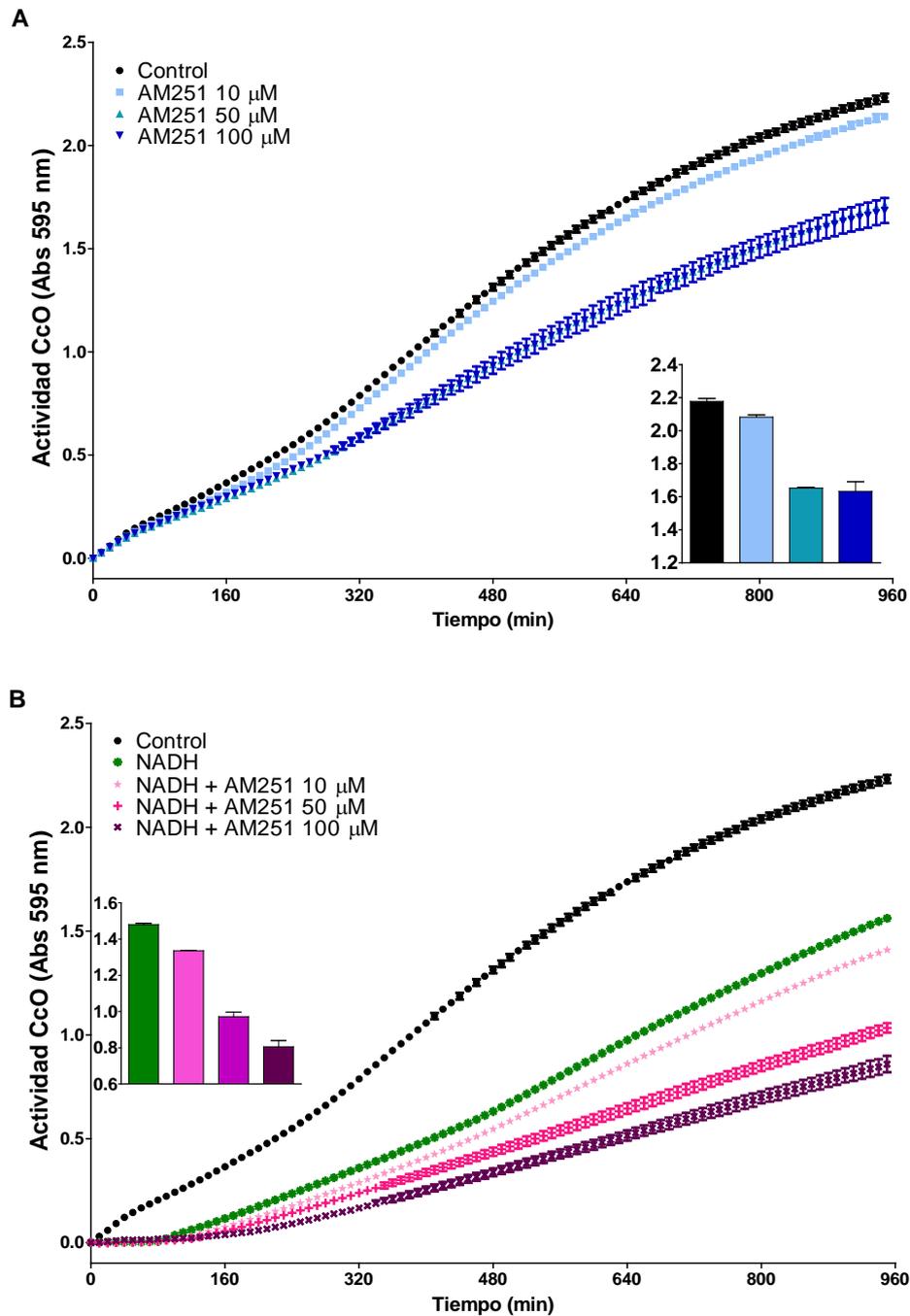


Fig. 5.3-4. Efecto del ligando AM251 sobre la actividad citocromo c oxidasa. A. En ausencia de NADH. B. En presencia de NADH. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

La incubación con el ligando AM281 no produjo inhibición de la oxidación de la DAB, si bien se observó una leve disminución del efecto total (Fig. 5.3-5 A). Al ser incubado en presencia de NADH las concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{M}$  no reportaron ningún efecto (Fig. 5.3-5 B).

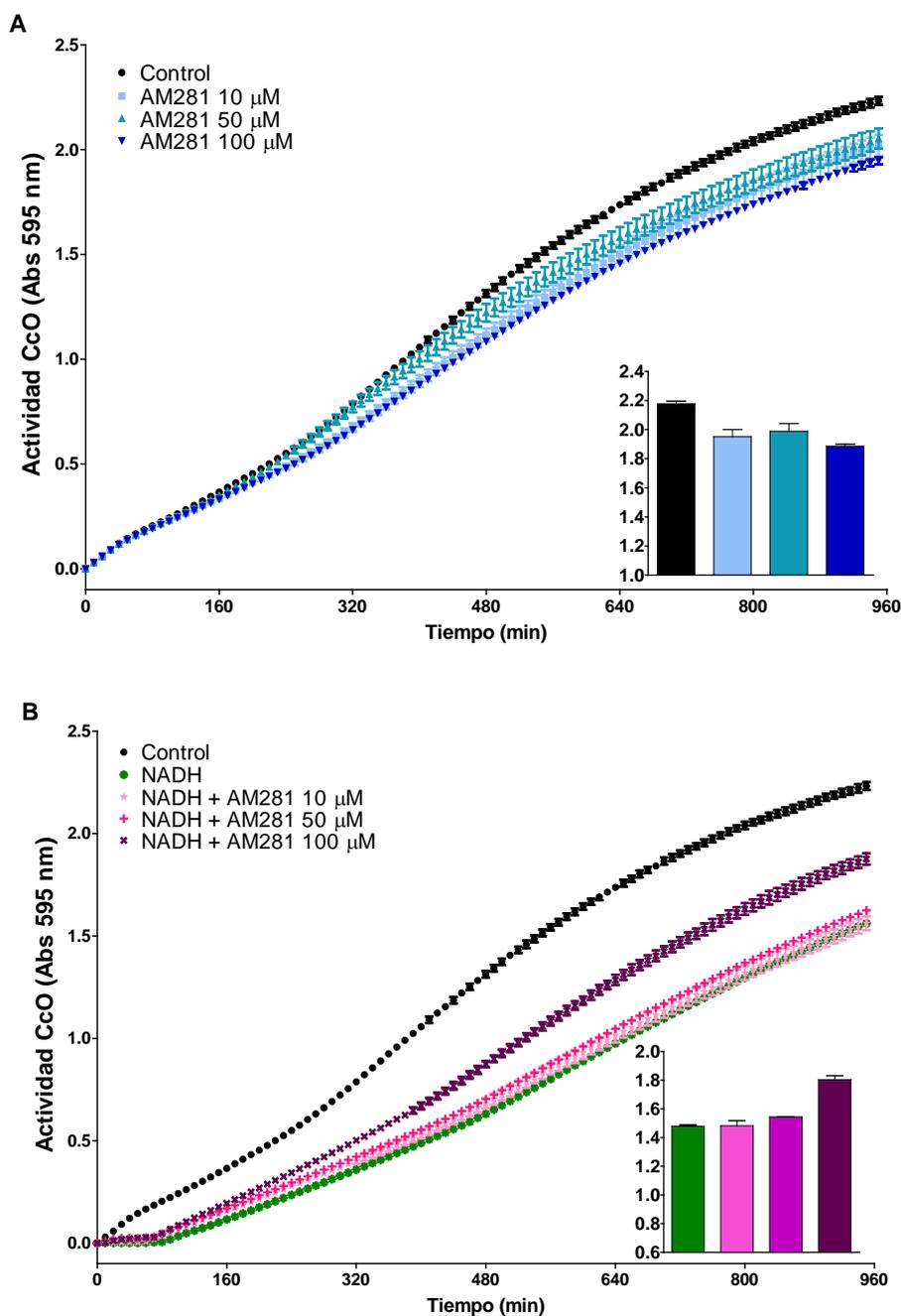
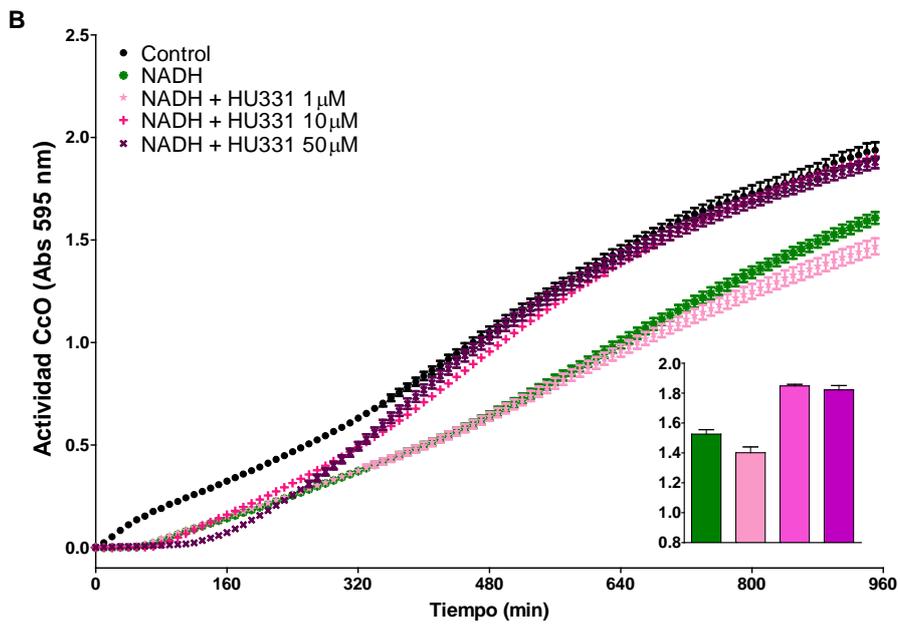
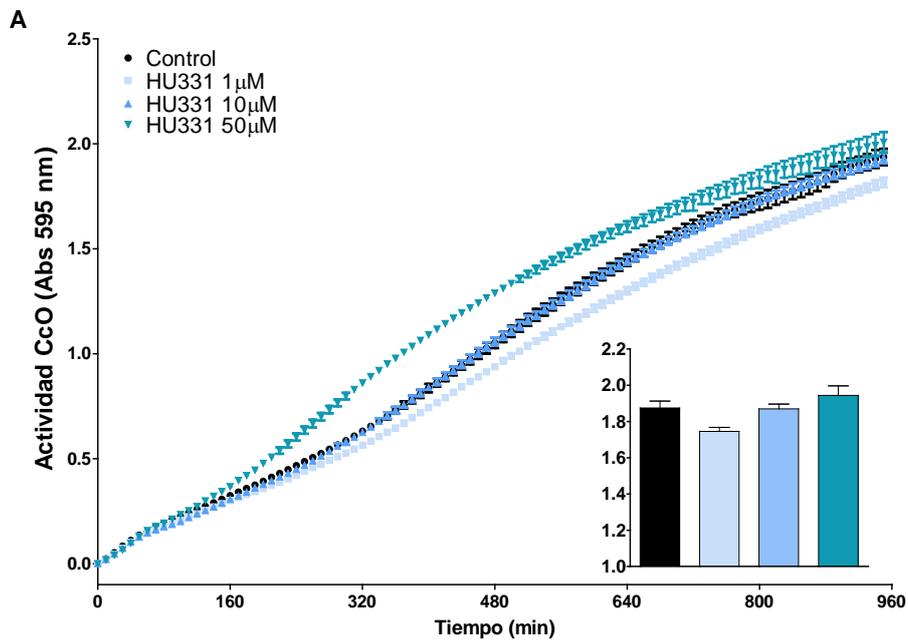


Fig. 5.3-5. Efecto del ligando AM281 sobre la actividad citocromo c oxidasa. A. En ausencia de NADH. B. En presencia de NADH. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

Para finalizar, la incubación con el ligando HU331 a 1 y 10  $\mu\text{M}$  no causó efecto, sin embargo, la concentración de 50  $\mu\text{M}$  actuó aumentando levemente la velocidad de la reacción a partir del min 160 igualándose al control a partir del min 750 (Fig. 5.3-6 A). Respecto a los resultados en presencia de NADH la concentración de HU331 1  $\mu\text{M}$  no produjo efecto, sin embargo, las de 10 y 50  $\mu\text{M}$  se comportaron de manera contraria al resto de cannabinoides (Fig. 5.3-6

B). Este mismo efecto se observó cuando se utilizó el sustrato del complejo II succinato (Fig. 5.3-6 C).



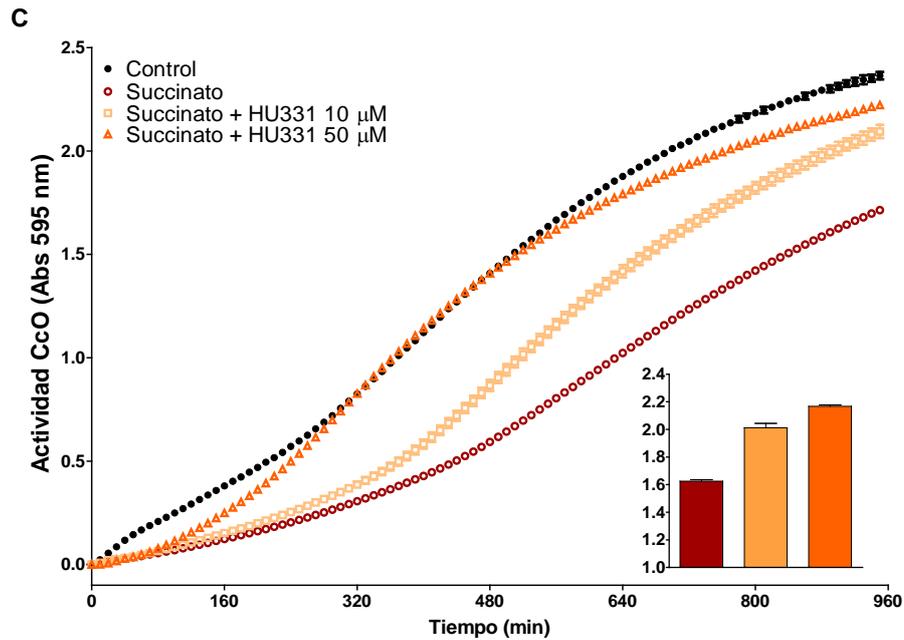


Fig. 5.3-6. Efecto del ligando HU331 sobre la actividad citocromo c oxidasa. A. En ausencia de sustrato. B. En presencia de NADH. C. En presencia de succinato. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

### **Efecto del CP55,940 sobre la oxidación de la DAB en presencia de inhibidores del complejo III mitocondrial: antimicina A y mixotiazol**

Al incubar las membranas de corazón de rata con CP55,940 y antimicina A se observó una inhibición de la actividad citocromo c oxidasa (Fig. 5.3-7).

Por otro lado, en presencia del inhibidor mixotiazol también se produjo una inhibición de la actividad citocromo c oxidasa aunque menor que la observada con antimicina A. (Fig. 5.3-8).

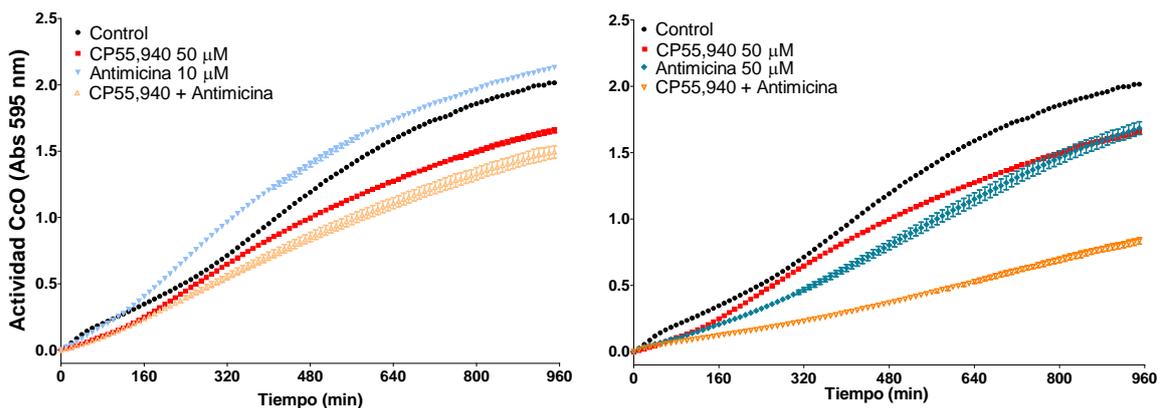


Fig. 5.3-7. Efecto sobre la actividad citocromo c oxidasa del ligando CP55,940 (50 μM) en presencia del inhibidor antimicina A a 10 μM (izda) o 50 μM (dcha).

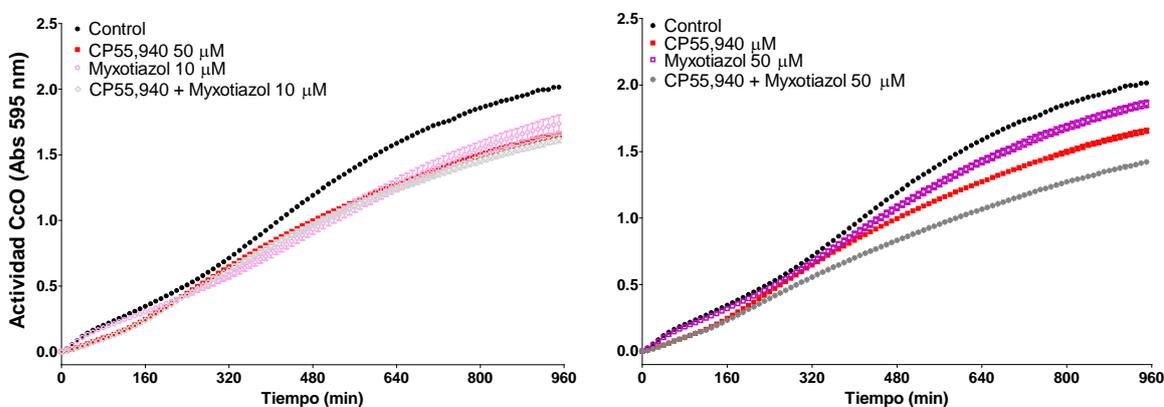


Fig. 5.3-8. Efecto sobre la actividad citocromo c oxidasa del ligando CP55,940 (50 μM) en presencia del inhibidor mixotiazol a 10 μM (izda) o 50 μM (dcha).

### Efecto del HU331 sobre la oxidación de DAB en presencia del inhibidor del complejo III antimicina A

Se determinó la actividad citocromo c oxidasa en presencia del cannabinoide HU331 y del inhibidor antimicina A. A las concentraciones mayores (50 μM), el efecto inhibitorio de la antimicina A se vio incrementado por la presencia del ligando HU331 (50 μM) (Fig. 5.3-9). Asimismo se estudió su efecto en presencia de NADH y de una concentración menor de antimicina A (5 μM), tanto la concentración de 10 μM como la de 50 μM de HU331 revirtieron la inhibición producida por la antimicina A (Fig. 5.3-10 y 11).

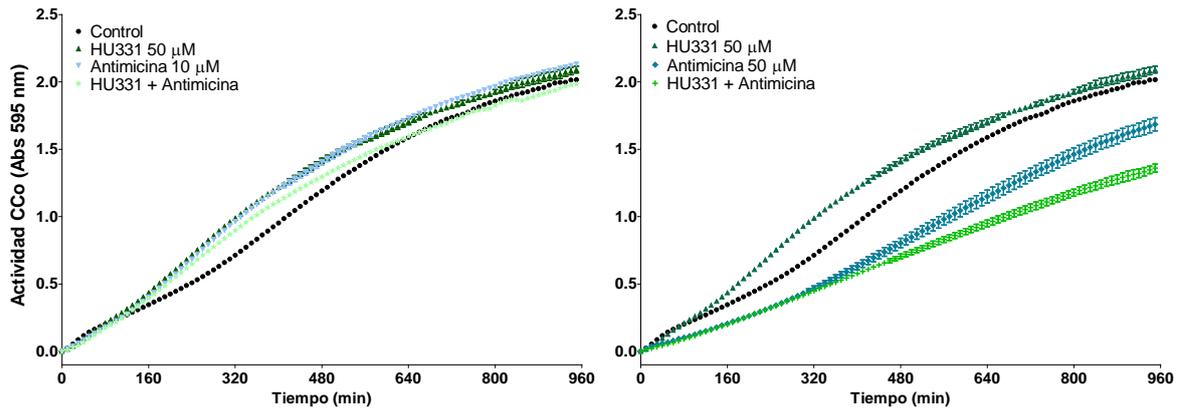


Fig. 5.3-9. Efecto del ligando HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) en presencia del inhibidor antimicina A (10 ó 50  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad citocromo c oxidasa.

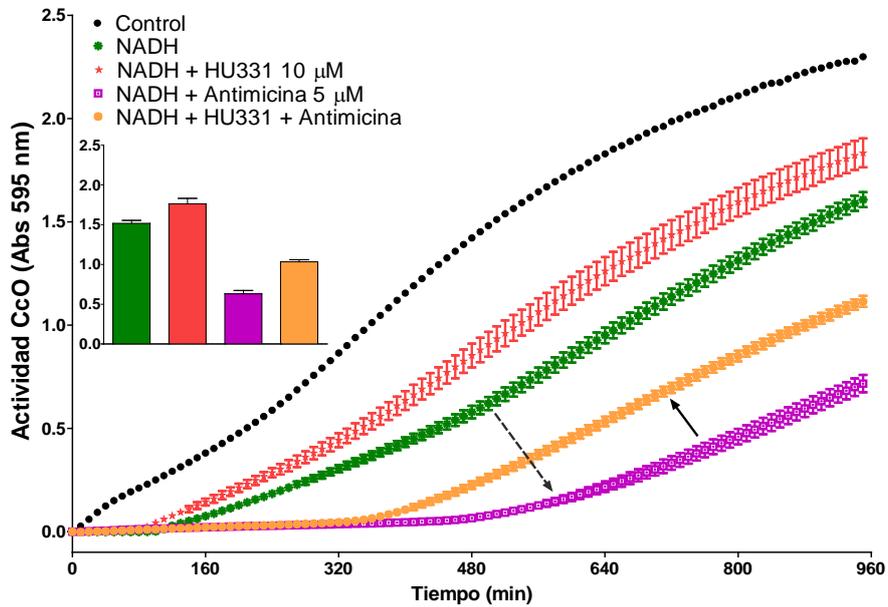


Fig. 5.3-10. Efecto del ligando HU331 (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia del sustrato del complejo I NADH y del inhibidor antimicina A (5  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad citocromo c oxidasa. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

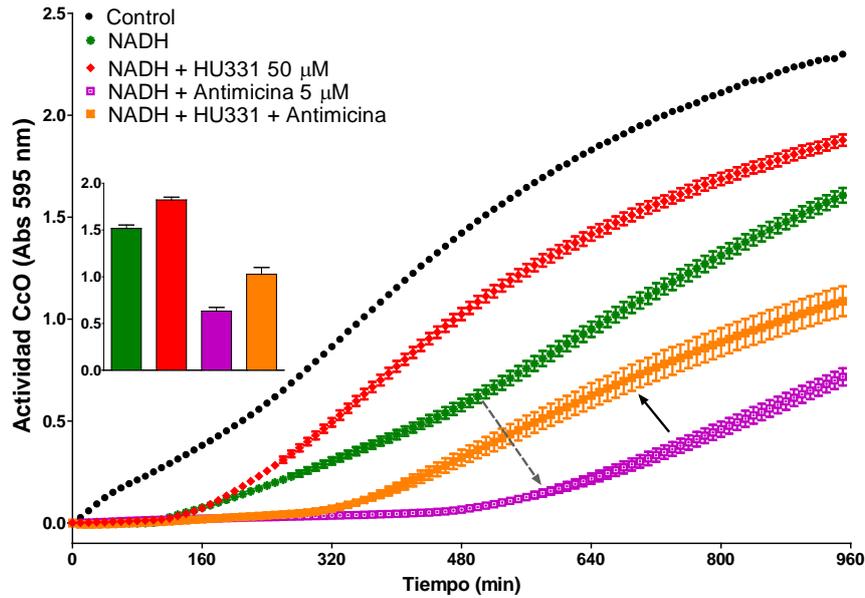


Fig. 5.3-11. Efecto del ligando HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) en presencia del sustrato del complejo I NADH y del inhibidor antimicina A (5  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad citocromo c oxidasa. Los datos del histograma estan tomados en el min 900.

**Efecto del HU331 sobre la oxidaci3n de la DAB en presencia del inhibidor del complejo III mixotiazol**

El mixotiazol desplaz3 el efecto que ejerce el HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad citocromo c oxidasa de manera dosis dependiente, bloqueando totalmente este efecto a la concentraci3n de 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 5.3-12).

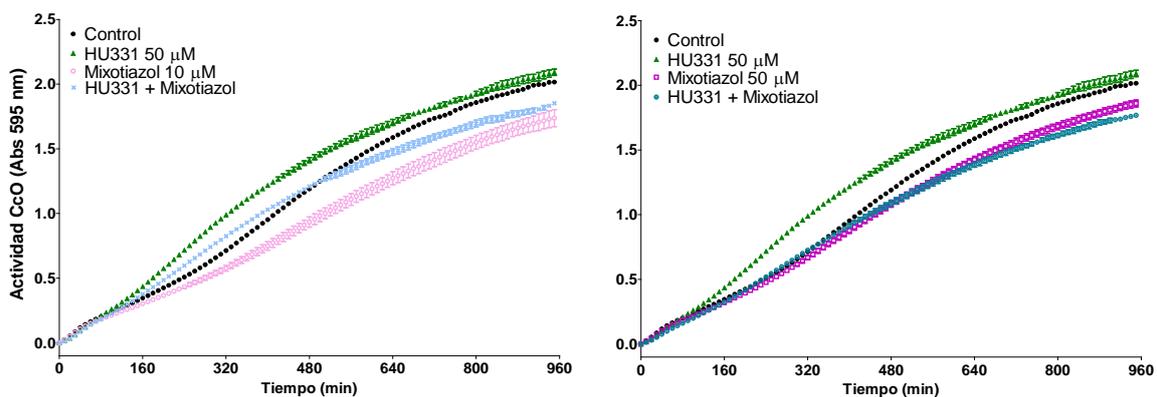


Fig. 5.3-12. Efecto del ligando HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) en presencia del inhibidor mixotiazol (10 3 50  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad citocromo c oxidasa.

En presencia de NADH y con una concentraci3n baja de mixotiazol (5  $\mu\text{M}$ ), la cual provoca una inhibici3n parcial, el ligando HU331 a 10  $\mu\text{M}$

desplazó parte de la inhibición producida por el mixotiazol (Fig. 5.3-13), este desplazamiento también fue observado con la concentración más elevada de HU331 (50  $\mu$ M), pero no se obtuvieron diferencias en el efecto entre las dos concentraciones del cannabinoide (Fig. 5.3-14).

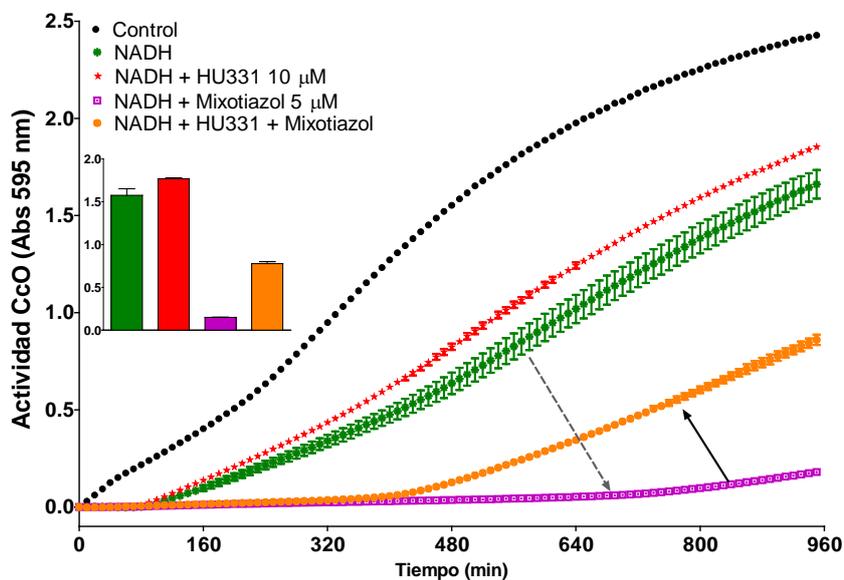


Fig. 5.3-13. Efecto del ligando HU331 (10  $\mu$ M) en presencia del sustrato NADH y del ligando mixotiazol (5  $\mu$ M) sobre la actividad citocromo c oxidasa. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

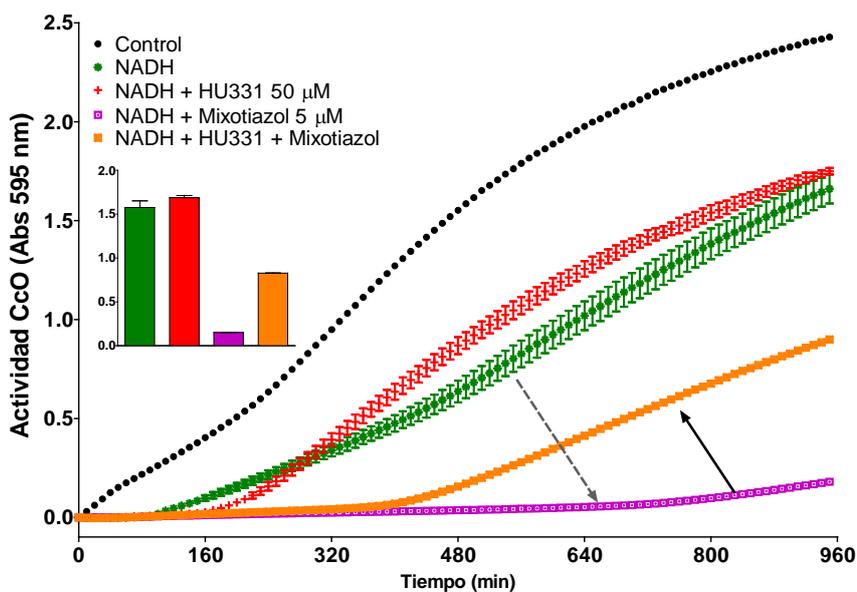


Fig. 5.3-14. Efecto del ligando HU331 (50  $\mu$ M) en presencia del sustrato NADH y del ligando mixotiazol (5  $\mu$ M) sobre la actividad citocromo c oxidasa. Los datos del histograma están tomados en el min 900.

### Efecto del HU331 sobre la oxidación de DAB en presencia del inhibidor del complejo I rotenona

Se determinó además el efecto conjunto del ligando cannabinoide HU331 (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) y el inhibidor del complejo I rotenona (10  $\mu\text{M}$ ). La rotenona produjo un efecto inhibitorio leve debido a su baja concentración, sin embargo, las dos concentraciones estudiadas de HU331 revirtieron esta inhibición (Fig. 5.3-15). En presencia de NADH este efecto fue más evidente, ya que el HU331 tanto a 10  $\mu\text{M}$  como a 50  $\mu\text{M}$  desplazó la inhibición inducida por rotenona, además, el desplazamiento fue mayor con la concentración más alta de HU331 (Fig. 5.3-16).

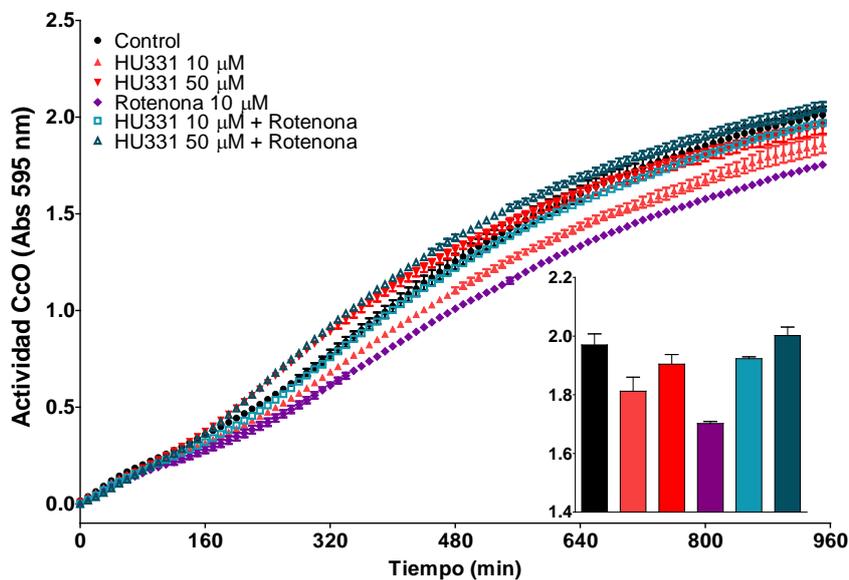


Fig. 5.3-15. Efecto del ligando HU331 (10 ó 50  $\mu\text{M}$ ) en presencia del inhibidor rotenona (10  $\mu\text{M}$ ). Los datos del histograma están tomados en el min 900.

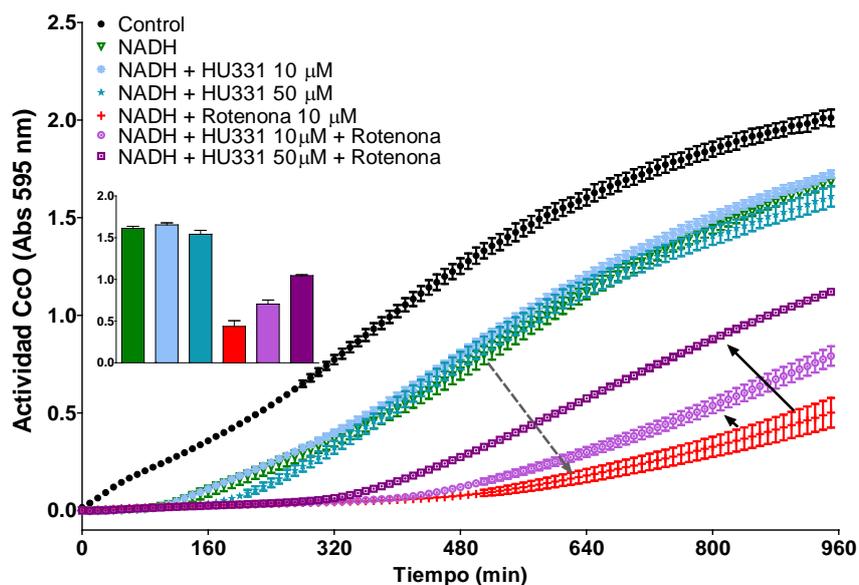


Fig. 5.3-16. Efecto del ligando HU331 (10 ó 50  $\mu\text{M}$ ) en presencia del sustrato NADH y del inhibidor rotenona (10  $\mu\text{M}$ ). Los datos del histograma están tomados en el min 900.

### Efecto del CP55,940 y HU331 sobre la oxidación de la DAB

Por último, se determinó el efecto producido por la presencia de dos cannabinoides sobre la oxidación de la DAB con el complejo respiratorio activo, para comprobar si esta quinona era capaz de revertir los efectos del CP55,940. El HU331, a 10 y 50  $\mu\text{M}$ , evitó parcialmente el bloqueo de la oxidación de la DAB producido por el CP55,940 (10  $\mu\text{M}$ ) de manera similar a como lo había hecho para la rotenona, mixotiazol y antimicina A (Fig. 5.3-17 y 18).

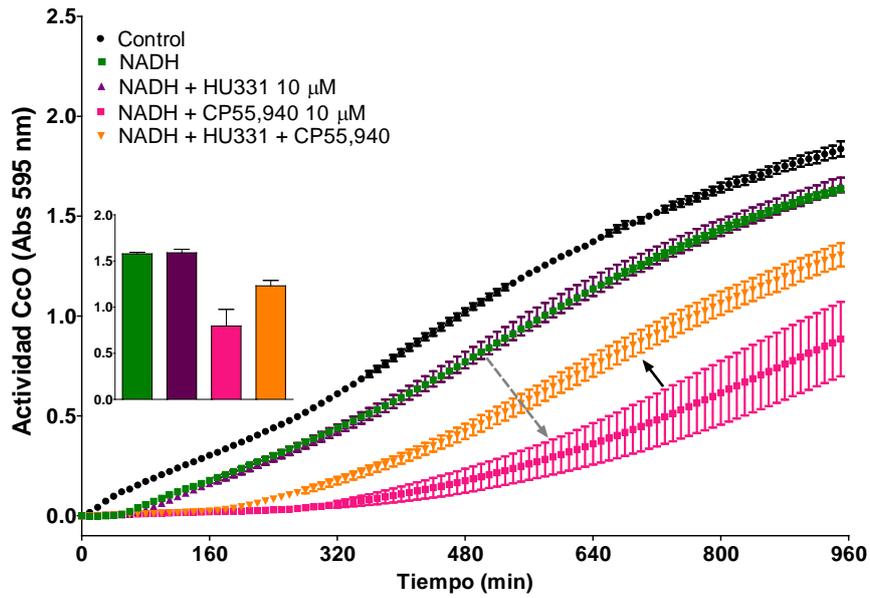


Fig. 5.3-17. Efecto conjunto de los ligandos cannabinoides CP55,940 (10  $\mu$ M) y HU331 (10  $\mu$ M) sobre la actividad citocromo c oxidasa en presencia del sustrato NADH. Los datos del histograma estan tomados en el min 900.

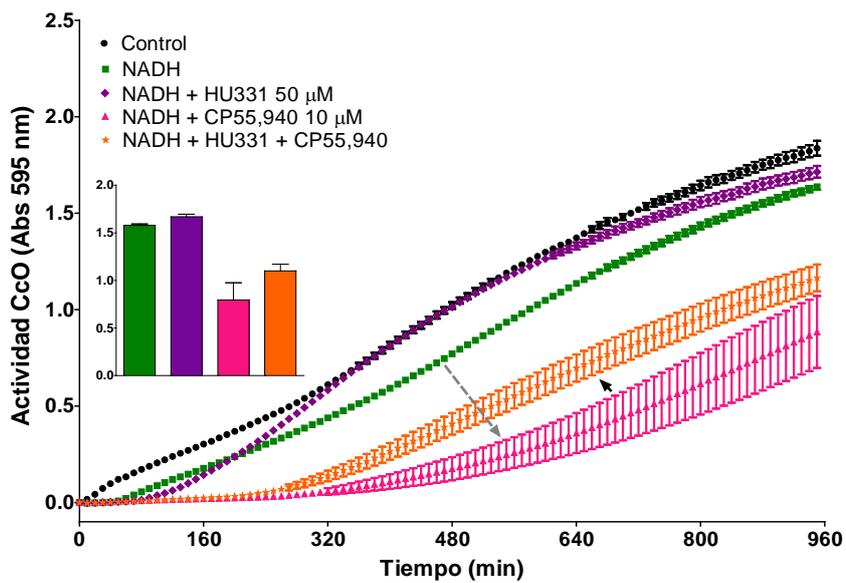


Fig. 5.3-18. Efecto conjunto de los ligandos cannabinoides CP55,940 (10  $\mu$ M) y HU331 (50  $\mu$ M) sobre la actividad citocromo c oxidasa en presencia del sustrato NADH. Los datos del histograma estan tomados en el min 900.

## Sumario

1. La actividad NADH deshidrogenasa resulta inhibida por el ligando cannabinoide CP55,940 (50  $\mu\text{M}$ ) y en menor medida por el ligando WIN55,212-2 y el AM251 (100  $\mu\text{M}$ ), sin embargo, los ligandos AM281 (100  $\mu\text{M}$ ) y HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) no ejercen ningún efecto en la actividad de esta enzima.

2. La actividad succinato deshidrogenasa sólo es inhibida por los cannabinoides WIN55,212-2 (100  $\mu\text{M}$ ) y HU331 (50  $\mu\text{M}$ ). No obstante, en presencia de dUQ (10  $\mu\text{M}$ ) y/o antimicina A (5  $\mu\text{M}$ ) los ligandos ejercen efectos diferentes. Así, el CP55,940 (50  $\mu\text{M}$ ) realiza el mismo efecto que la antimicina A, la cual bloquea el paso de electrones y incrementándose la formación de  $\text{O}^{\cdot-}$ . Los compuestos cannabinoides WIN55,212-2 (100  $\mu\text{M}$ ), AM251 (100  $\mu\text{M}$ ) y HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) disminuyen la velocidad de la reacción pero el efecto máximo de la enzima se conserva o incluso aumenta. El AM281 (100  $\mu\text{M}$ ) no ejerce efecto.

3. Los ligandos cannabinoides CP55,940 y AM251 actúan disminuyendo la actividad citocromo c oxidasa detectada de una manera dosis dependiente, sin embargo, el WIN55,212-2 y el AM281 no realizan ningún efecto. El compuesto HU331 aumentó la velocidad de la reacción.

4. En presencia de NADH, los ligandos CP55,940, WIN55,212-2 y AM251 actúan potenciando el efecto inhibitorio que realiza el NADH en la oxidación de la DAB, el HU331 bloquea parcialmente esta inhibición y el AM281 no ejerce efecto.

5. La inhibición de la oxidación de la DAB producida por el CP55,940 en presencia de NADH es bloqueada por la dUQ a 10  $\mu\text{M}$ , sin embargo a 50  $\mu\text{M}$  este efecto es potenciado, al igual que ocurría con la rotenona, antimicina A o mixotiazol.

6. En presencia de succinato, los dos compuestos estudiados CP55,940 y HU331 producen los mismos efectos que con NADH.

7. El CP55,940 en presencia del inhibidor antimicina A potencia el efecto inhibitorio de éste sobre la actividad citocromo c oxidasa, esto mismo ocurre con mixotiazol aunque es menos evidente.

8. El ligando HU331 a 10 ó 50  $\mu\text{M}$  en presencia NADH bloquea parcialmente el efecto inhibitorio que provoca en la oxidación de la DAB la antimicina A, el mixotiazol, la rotenona y el CP55,940.





## **DISCUSIÓN**



## **1. Optimización de protocolos de autorradiografía en microarrays de membranas celulares de rata.**

El primero de los objetivos del presente trabajo fue desarrollar las condiciones óptimas para el estudio autorradiográfico de la densidad y funcionalidad de diferentes tipos de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), mediante la utilización de microarrays de membranas celulares.

El primer paso fue la optimización de los protocolos de autorradiografía de receptor. Para este propósito se partió de los protocolos empleados por el grupo de Neuroquímica y Neurodegeneración del Departamento de Farmacología de la UPV/EHU para el estudio autorradiográfico en secciones de tejido de rata de los receptores GABAérgicos tipo B (modificado de Bischoff et al., 1999), muscarínicos (Rodríguez-Puertas et al., 1997; Barreda-Gómez et al., 2015), opiodes tipo  $\mu$  (modificado de McBride et al., 1998) y cannabinoides (Manuel et al., 2014).

Como se puede observar en el apartado de resultados, los protocolos utilizados permitieron un correcto estudio de los 4 tipos de GPCR, aunque fue necesario incrementar el tiempo de exposición de los microarrays al film radiosensible en comparación con los experimentos en secciones de tejido. En este sentido, el tiempo de exposición de un tejido incubado con un radioligando depende principalmente de la actividad específica del radioligando con el que ha sido incubado y de la densidad de sitios de unión en nuestra muestra (Manuel et al., 2015) aunque hay otros factores que pueden influir como la concentración de radioligando (Happe et al., 2001) o el tiempo de congelación de la muestra (González-Maeso et al., 2000). A pesar de ello, es posible que la inmovilización de las membranas celulares en el soporte sea una de las causas para el aumento de los tiempos de exposición debido a que la concentración de muestra por unidad de superficie es menor en los microarrays que en las secciones, por tanto, también habrá menos receptores y por consiguiente, será necesario un tiempo de exposición mayor para su visualización. La distribución de los lugares de unión de los diferentes radioligandos en los tejidos analizados mediante microarrays de membranas celulares fue similar a la observada en las secciones de tejido. En el caso de la unión de los receptores GABAérgicos se obtuvo una elevada densidad en membranas de cerebelo y corteza tal y como se ha descrito en la literatura

(Young y Chu, 1990; Bischoff et al., 1999). La densidad más elevada de receptores muscarínicos se determinó en estriado y corteza cerebral, lo cual se corresponde con lo descrito por el grupo de Yamada y colaboradores en ratones en los que observan una mayor fijación de [<sup>3</sup>H]-NMS en estriado seguido de corteza (Oki et al., 2005). Con respecto a los receptores opioides  $\mu$  se observó una elevada densidad en estriado. Este resultado fue similar a lo descrito en autorradiografía de [<sup>3</sup>H]-DAMGO (Tempel y Zukin, 1987). Por último, en la determinación de los receptores cannabinoides en los microarrays de membranas se obtuvo una distribución elevada en cerebelo y corteza cerebral, lo que coincide con lo publicado (Herkenham et al., 1991). En este sentido, se han obtenido resultados similares a los observados en los microarrays de membranas celulares en estudios previos de autorradiografía de receptor en microarrays tanto de células (Ziauddin y Sabatini, 2001; Bailey et al., 2002), como de proteínas de membranas (Fang et al., 2002a) y de GPCR (Posner et al., 2007), así como en experimentos de autorradiografía de acople funcional en microarrays de GPCR (Hong et al., 2005).

Una vez validados los microarrays y los protocolos para la autorradiografía de receptor se continuó con la optimización de los mismos para los estudios de acople funcional a la proteína G. Para ello, se partió de los protocolos previos desarrollados para medir el efecto del agonista galanina (Rodríguez-Puertas et al., 2007) y del agonista WIN55,212-2 (Manuel et al., 2015) sobre los receptores galaninérgicos y cannabinoides, respectivamente.

En este sentido, se efectuó un ensayo en presencia DAMGO y carbacol, agonistas de los receptores opioides  $\mu$  y muscarínicos, respectivamente, para evaluar el tiempo óptimo de incubación del microarray de membranas celulares con el radioligando [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S y el agonista. Se utilizaron microarrays de membranas de estriado y cerebelo. Así, se determinó que tras 2 horas de incubación se conseguía la mayor estimulación del receptor por parte de los agonistas, tiempo de incubación utilizado habitualmente en los experimentos de autorradiografía funcional (Sim et al., 1995; Rodríguez-Puertas et al., 2000). Por otro lado, bajo estas condiciones, los antagonistas naloxona y atropina no bloquearon la estimulación de los receptores opioides y muscarínicos, respectivamente. Esto sólo se observó en los microarrays de membranas no siendo así en las secciones de tejido, que se incubaron simultáneamente, por lo que es probable que no sea un problema de

especificidad del fármaco sino una posible fijación inespecífica del radioligando a otras GTPasas presentes en los microarrays.

La concentración de GDP y [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S utilizadas de forma rutinaria en secciones de rata no fueron válidas para los microarrays de membranas ya que aún con tiempos de exposición muy elevados la señal proporcionada por el autorradiograma era muy débil. Por este motivo se trató de ajustar aún más el protocolo modificando las concentraciones de GDP y [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S. En este sentido, diversos trabajos han descrito que para obtener una fijación óptima de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S inducida por un agonista es necesaria la presencia de concentraciones elevadas de GDP, tanto en homogeneizados de membranas (Lorenzen et al., 1993; Traynor y Nahorski, 1995), como en secciones de tejido, siendo recomendable que el ratio GDP/[<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S sea mayor en el caso de la autorradiografía (Sim et al., 1995). El GDP reduce la velocidad y la cantidad de unión del [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S a la subunidad G $\alpha$  ya que ambos compiten por el mismo sitio de unión (Lorenzen et al., 2002; Harrison y Traynor, 2003). Así, el GDP promueve que las proteínas G estén en su estado inactivo, reduciendo de este modo los niveles basales de fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, lo que permite ser una mejor detección de las estimulaciones inducidas por los agonistas (Happe et al., 2001; Harrison y Traynor, 2003).

En los experimentos de autorradiografía en secciones de encéfalo de rata control, utilizando una concentración de GDP 2 mM y [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S 0,04 nM, no se observó fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S inducida por DAMGO en cerebelo. Sin embargo, en corteza y en estriado sí hubo estimulaciones, siendo ésta mayor en estriado. Esta distribución es similar a lo descrito previamente en la bibliografía (Sim et al., 1995; Sim y Childers, 1997), por lo que se tomó de referencia en los experimentos de optimización llevados a cabo en microarrays de membranas celulares de corteza, estriado y cerebelo de rata control.

La condición que mejor se ajustó a estos resultados de las testadas fue la correspondiente a 50  $\mu$ M de GDP y 0,1 nM de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S. No obstante, se observó una fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S inducida por DAMGO en cerebelo de en torno a un 40%, lo cual puede deberse a una fijación inespecífica del radioligando ya que el antagonista selectivo de los receptores opioide  $\mu$  no fue capaz de bloquear totalmente la estimulación inducida por DAMGO en cerebelo y estriado. En esta condición (50  $\mu$ M GDP y 0,1 nM [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S) se disminuía la concentración de GDP a los niveles utilizados en los estudios en

homogeneizados de membrana y el [<sup>35</sup>S]GTPγS a una concentración intermedia entre la empleada en estos estudios y la usada en autorradiografía (González-Maeso et al., 2000; Barreda-Gómez et al., 2005). Más aún, el aumento de la concentración de [<sup>35</sup>S]GTPγS conlleva un menor tiempo de exposición al film (Happe et al., 2001), lo que acelera el protocolo. En el resto de condiciones el agonista DAMGO indujo estimulaciones elevadas en cerebelo, aunque estas estimulaciones tampoco fueron bloqueadas por la naloxona.

Viendo la importancia que tiene la presencia de GDP, algunos autores habían utilizado preincubaciones con GDP para incrementar la cantidad de receptores desacoplados antes de incubar con el agonista con el fin de incrementar la capacidad de estimulación y, de esta manera, poder estudiar receptores con baja expresión como los receptores para neuropéptidos (Barreda-Gómez et al., 2005). Dicha preincubación, no sólo no mejoró sino que en algunos casos empeoró la estimulación producida tanto por el agonista de los receptores GABAérgicos baclofen como la inducida por el agonista muscarínico carbacol en los microarrays de membranas celulares, motivo por el que se descartó su inclusión en el protocolo. Las condiciones establecidas en este protocolo permitieron observar una mayor estimulación de los receptores GABAérgicos en cerebelo y corteza cerebral en comparación con la obtenida en estriado, al igual que ha sido descrito en estudios previos por diversos autores (Young y Chu, 1990; Sim et al., 1995; Bischoff et al., 1999). De la misma manera, la estimulación muscarínica obtenida con dicho protocolo fue mayor en estriado en comparación con la observada en cerebelo y corteza. No obstante, el hecho de que por un lado en cerebelo no se haya registrado con anterioridad apenas estimulación por parte de dichos receptores (Capece et al., 1998), junto con la incapacidad de los antagonistas por bloquear totalmente la acción de los agonistas, indica que estas condiciones de GDP/[<sup>35</sup>S]GTPγS en determinados tejidos probablemente están favoreciendo la estimulación inespecífica de otros subtipos de GPCR. Otra posibilidad podría ser que al modificar las concentraciones de GDP y [<sup>35</sup>S]GTPγS para autorradiografía *in vitro* se esté forzando el sistema favoreciendo el agonismo o incluso el acople de los receptores a otros subtipos de proteínas G.

Por último, y con el objetivo de comprobar la robustez del método para su aplicación al cribado de fármacos, se probó este protocolo a varias concentraciones de agonista. Como era de esperar, la concentración que

mayor porcentaje de estimulación provocó fue la más elevada para los tres agonistas estudiados 100  $\mu\text{M}$  para carbacol, y 10  $\mu\text{M}$  para DAMGO y WIN55,212-2. A estas concentraciones ya había sido descrito que estos ligandos alcanaban el efecto máximo (González-Maeso et al., 2000; Prather et al., 2000).

Una vez establecidas las condiciones para el ensayo de acople funcional en los receptores previamente descritos, se decidió comprobar si dicho protocolo podía emplearse para el estudio de otros GPCR como los receptores para esfingosina 1-fosfato tipo 1 ( $\text{S1P}_1$ ). La expresión génica de este tipo de receptores presenta una amplia distribución en cerebro (Ishii et al., 2004; Rosen et al., 2009). El agonista CYM-5442 indujo un incremento sobre la fijación basal de  $[\text{35S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  del 80% en cerebelo y del 21% en estriado, mientras que en la corteza cerebral la estimulación obtenida no llegó a ser significativa en los microarrays de membrana. De la misma manera, en estudios previos del grupo se determinó que la mayor estimulación de la fijación de  $[\text{35S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  producida por este agonista en secciones de tejido se daba sustancia gris de cerebelo, seguida de corteza motora, hipocampo y estriado. Las discrepancias en las estimulaciones obtenidas en corteza podrían deberse a que en las secciones se mide un área determinada, mientras que las membranas impresas en los microarrays han sido aisladas a partir de toda la corteza cerebral sin distinguir áreas concretas, situación similar a la que se observa cuando se comparan estudios de autorradiografía con experimentos de fijación en homogeneizados.



## 2. Validación de los microarrays de membranas celulares de modelos animales y líneas celulares

Una vez optimizadas las condiciones para el estudio autorradiográfico de GPCR mediante microarrays de membranas celulares de corteza cerebral, estriado y cerebelo de rata se procedió a validar esta técnica en microarrays de membranas celulares de tejidos nerviosos y periféricos de rata control, de líneas celulares que sobreexpresan GPCR o proteínas G, de un modelo de la enfermedad de Parkinson (EP) y de tejidos de ratón *knockout* para el receptor CB<sub>1</sub>.

### 2.1 Rata

La validación de los microarrays de membranas celulares de tejidos de rata se realizó mediante el estudio de los receptores GABAérgicos tipo B, muscarínicos y cannabinoides.

Para el estudio de la densidad de receptores GABA<sub>B</sub> se utilizó el radioligando [<sup>3</sup>H]-CGP54626 el cual posee una alta afinidad por el subtipo GABA<sub>B</sub>, no uniéndose al GABA<sub>A</sub> (Bischoff et al., 1999).

En los microarrays de membrana, todos los tejidos nerviosos presentaron una elevada fijación de [<sup>3</sup>H]-CGP54626 siendo destacable el cerebelo, amígdala y la corteza cerebral. Según diversos autores, los receptores GABA<sub>B</sub> se encuentran distribuidos ampliamente por todo el cerebro siendo más numerosos en tejidos como tálamo, corteza cerebral, cerebelo y núcleo cortical posteromedial de la amígdala (Young y Chu, 1990; Bischoff et al., 1999), lo que concuerda con los resultados obtenidos en microarrays. Esta distribución también ha sido demostrada mediante estudios de inmunohistoquímica y mRNA (Bischoff et al., 1999; Margeta-Mitrovic et al., 1999; Charles et al., 2001; Charles et al., 2003).

En cuanto a la localización del receptor GABA<sub>B</sub> en tejidos periféricos se obtuvo una mayor densidad en tejido adiposo y piel. A pesar de que la literatura no muestra resultados en piel, en tejido adiposo sí que se ha descrito una elevada expresión de los subtipos GABA<sub>B1a</sub> y GABA<sub>B1b</sub> mediante RT-PCR (Calver et al., 2000). Asimismo se ha observado fijación de [<sup>3</sup>H]-CGP54626 en prácticamente todos los tejidos periféricos depositados en los

microarrays de membranas, resultados que concuerdan con la distribución descrita mediante estudios inmunohistoquímicos y de mRNA en tejidos como corazón, pulmón, hígado, intestino, riñón, estómago, vejiga urinaria y testículos (Castelli et al., 1999; Calver et al., 2000).

Con respecto al acople funcional inducido por estos receptores, en los microarrays de membranas se obtuvieron estimulaciones elevadas en corteza cerebral, seguida de ganglios raquídeos y colículo. Esta distribución es coincidente con lo descrito en estudios similares tanto en secciones de tejido como en homogeneizados de membrana donde se observan estimulaciones elevadas en corteza (Sim et al., 1995; Moran et al., 2001), además de en tálamo, colículo superior y cerebelo (Sim et al., 1995). En cuanto a los tejidos periféricos, se obtuvieron estimulaciones elevadas en varios tejidos como hígado, ciego e intestino delgado. No obstante, la falta de estudios similares en tejido periférico ha impedido la comparación de los resultados obtenidos en microarrays. Sin embargo, es común la utilización de agonistas y antagonistas GABAérgicos en la regulación de la motilidad intestinal (Bowery et al., 2002). Más aún, los receptores GABA<sub>B</sub> ejercen funciones en otros órganos encargados de funciones autónomas como bronquiolos, vejiga urinaria y vasos sanguíneos, entre otros (Bowery, 1993), lo que apoya los resultados obtenidos en los microarrays.

En lo que respecta a los receptores muscarínicos, la densidad de estos receptores se determinó en los tejidos incluidos en el microarray de membranas celulares de rata mediante la fijación del antagonista [<sup>3</sup>H]-NMS (Smith et al., 1991). La mayor densidad de lugares de unión para este radioligando se obtuvo en amígdala, estriado y corteza cerebral en cuanto a tejidos nerviosos se refiere. Esta distribución concuerda con lo observado en cerebro de ratones donde áreas como el estriado y corteza presentan una elevada fijación de [<sup>3</sup>H]-NMS (Oki et al., 2005). Asimismo, estudios *in vivo* con [<sup>3</sup>H]-escopolamina e *in vitro* mediante [<sup>3</sup>H]-QNB tanto en secciones de rata (Frey et al., 1985) como en homogeneizados de membranas (Kellar et al., 1985), junto con ensayos de inmunoprecipitación e inmunocitoquímica (Levey et al., 1991) confirman esta distribución de los receptores muscarínicos.

En cuanto a los tejidos periféricos incluidos en el microarray, se determinó una alta fijación del radioligando en grasa, próstata y conducto deferente. Para el tejido adiposo no se han encontrado datos, sin embargo, se ha descrito presencia del subtipo M<sub>1</sub> en el conducto deferente (Brann et al.,

1993) y de los subtipos M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> en próstata mediante inmunoprecipitación (Pontari et al., 1998). La fijación del antagonista muscarínico observada en otros tejidos periféricos, como los que forman parte del sistema digestivo, coincide con la descrita por el grupo de Yamada y colaboradores que detectaron una mayor fijación de [<sup>3</sup>H]-NMS en tejidos como el colon, íleon y estómago (Ito et al., 2009). Otros tejidos periféricos que presentan receptores muscarínicos son el corazón y el pulmón (Brann et al., 1993; Caulfield y Birdsall, 1998; Abrams et al., 2006) lo que coincide con los resultados en los microarrays de membranas celulares.

En cuanto a la autorradiografía funcional en presencia de carbacol (100 μM), los tejidos que reportaron una mayor estimulación fueron colículo, amígdala, tronco cerebral y estriado. Esta distribución mayoritaria en áreas cerebrales de inervación colinérgica coincide en gran medida con la determinada en estudios previos del grupo de Neuroquímica y Neurodegeneración de la UPV/EHU (Barreda-Gómez G. Tesis Doctoral, 2007) y con la observada en estudios en homogeneizados de membrana (Odagaki et al., 2014). En tejidos periféricos se determinó estimulación en la mayoría de los tejidos incluidos en los microarrays de membranas siendo especialmente relevante la registrada en conducto deferente, ciego y pulmón. Así por ejemplo, el conducto deferente presenta una elevada expresión de mRNA de M<sub>2</sub>, mientras que el pulmón la presenta de los subtipos M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub> (Brann et al., 1993).

Para finalizar, se estudió la densidad de receptores cannabinoides en los diferentes tejidos incluidos en los microarrays de membranas celulares de rata mediante el agonista no selectivo de subtipo [<sup>3</sup>H]-CP55,940 (Howlett et al., 2002). Se obtuvo una fijación muy elevada en cerebelo, estriado e hipocampo, tres regiones en las que se ha descrito una gran densidad de receptores cannabinoides tanto por autorradiografía de [<sup>3</sup>H]-CP55,940 (Herkenham et al., 1991) como por otras técnicas como la inmunohistoquímica (Tsou et al., 1998; Pettit et al., 1998; Egertová y Elphick, 2000; Moldrich y Wegner, 2000). De hecho, estos autores describen como otras áreas cerebrales como el bulbo olfatorio, sustancia *nigra* y amígdala también expresan abundantemente los receptores CB<sub>1</sub>, al igual que puede observarse en los resultados obtenidos en nuestros microarrays de membranas aisladas de rata. En cuanto a los tejidos periféricos se obtuvo una fijación muy elevada en grasa, timo y pulmón. En este sentido, Lynn y Herkemhan (1994) en sus estudios con [<sup>3</sup>H]-

CP55,940 describieron fijación en los tejidos periféricos aunque en su mayoría era fijación no específica (Lynn y Herkemhan, 1994). No obstante, se ha descrito la presencia de mRNA de CB<sub>1</sub> en tejido adiposo tanto de rata como de humano por inmunohistoquímica (Bensaid et al., 2003; Roche et al., 2006; Mølhøj et al., 2010). Del mismo modo se ha detectado la expresión del receptor CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en tejido pulmonar (Pertwee, 1997; Rice et al., 1997) y en timo (Pertwee, 1997).

Al estudiar el acople funcional inducido por el agonista de los receptores cannabinoides WIN55,212-2 (10 µM) en los microarrays de membranas celulares se observó que las estimulaciones más elevadas se producían en cerebelo, ganglios raquídeos y corteza cerebral, seguido de hipocampo y estriado. Estos datos están en consonancia con lo descrito en la bibliografía en estudios similares en globo pálido, estriado, hipocampo, corteza cerebral (Sim et al., 1995; Selley et al., 1996; Breivogel et al., 1997), amígdala, cerebelo y sustancia nigra (Sim et al., 1995). En los tejidos periféricos se determinó una elevada estimulación en membranas de pulmón, hígado, glóbulos rojos y tejido muscular. Como se ha mencionado anteriormente no está descrita la presencia de receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> en estos tejidos, aunque sí se ha demostrado la expresión de mRNA en ellos (Pertwee, 1997).

Se ha descrito la expresión de los receptores GABAérgicos, muscarínicos y/o cannabinoides en la mayoría de tejidos periféricos estudiados en los microarrays de membranas, no obstante, esto no explica ni la elevada densidad de receptores ni del acople inducido por sus agonistas hallada en algunos de estos tejidos, muchas veces por encima incluso de la cuantificada en los tejidos nerviosos. Si bien, una posibilidad sería que esta fijación pudiera deberse a uniones no específicas relacionadas con los lípidos presentes en el tejido (lo que podría explicar por qué la fijación en grasa fue la más elevada con todos los receptores estudiados); sin embargo, esta explicación no parece la más probable, dado que sólo podría aplicarse a los ligandos lipofílicos como los cannabinoides. Otra explicación más plausible sería que en el proceso de extracción de las membranas se concentrasen los receptores de membrana, de manera que en los depósitos de los microarrays la concentración efectiva de estos receptores sea mayor que en las técnicas convencionales, permitiendo de este modo la detección tanto de los receptores como del acople inducido tras la estimulación con un agonista. En este sentido, las correlaciones obtenidas entre el estudio de la densidad de los

receptores y la estimulación de los mismos por parte de los agonistas específicos para los tres receptores estudiados parecen apoyar esta hipótesis. No obstante, no puede descartarse que la acumulación de los ligandos lipofílicos en las membranas de los tejidos periféricos ejerza cierto efecto teniendo en cuenta que el coeficiente de variación de Pearson fue menor en el caso de los receptores cannabinoides (Lynn y Herkenham, 1994). De hecho, al realizar el mismo estudio con los tejidos incluidos en los microarrays de *Macaca fascicularis*, que en su mayoría son tejidos nerviosos, se obtuvo una mejor correlación con un coeficiente de variación de Pearson sustancialmente más alto.

Las correlaciones entre ambas técnicas no sólo aportan una evidencia de la fiabilidad de los microarrays de membrana sino que también dan una idea de la eficiencia del acople del receptor a la proteína G, y de la estequiometría del mismo, que parece mantenerse relativamente constante en los diferentes tejidos analizados.

## 2.2 Líneas celulares

En microarrays fabricados con membranas de líneas celulares que expresan diferentes GPCR se observó que las líneas que sobreexpresaban los receptores GABA<sub>B</sub>, M<sub>2</sub> y CB<sub>1</sub> presentaban la fijación más abundante de su radioligando específico, [<sup>3</sup>H]-CGP54626, [<sup>3</sup>H]-NMS y [<sup>3</sup>H]-CP55,940, respectivamente, aunque se obtuvo una unión prácticamente despreciable en otros tipos celulares. Resultados similares fueron obtenidos con otros radioligandos en experimentos previos de autorradiografía realizados utilizando diferentes tipos de microarrays como los de células (Ziauddin y Sabatini, 2001; Bailey et al., 2002), los de proteínas de membranas (Fang et al., 2002a) y los microarrays de GPCR (Posner et al., 2007).

En cuanto al acople funcional de los receptores CB<sub>1</sub>, el agonista WIN55,212-2 produjo un incremento de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS muy elevado confirmando, de este modo, la conservación de la funcionalidad de las proteínas de membrana una vez inmovilizadas en el microarray, así como la robustez de este método como herramienta de cribado de nuevos fármacos que actúen a través de GPCR. De hecho, otros autores también han determinado la activación de diversos GPCR en microarrays (NTS<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, opioide μ o CB<sub>1</sub>) mediante el ligando fluorescente Eu-GTP (Hong et al., 2005) o cuantificando el

flujo de calcio en microarrays de células transfectadas con GPCR del tipo M<sub>3</sub>, β<sub>2</sub>, α<sub>1A</sub> o D<sub>1</sub> (Mishina et al., 2004).

Con respecto a los microarrays desarrollados para el estudio de ligandos muscarínicos, se comprobó que el carbacol producía un incremento de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS no sólo en las membranas aisladas de líneas celulares que sobreexpresaban alguno de los 5 subtipos de receptores muscarínicos (M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub>), sino también en las líneas *wildtype*. Por tanto, parte de esta estimulación es debida a los receptores muscarínicos constitutivamente expresados en las diferentes líneas celulares utilizadas. De hecho, únicamente los subtipos M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> presentaron una estimulación significativamente superior a la determinada en las líneas *wildtype*, probablemente debido a una mayor cantidad de receptores sobreexpresados en esas líneas celulares en concreto.

Otro factor que también puede interferir en el acople inducido por un agonista, además de la cantidad de GPCR expresados, es la proporción relativa de los diferentes subtipos de proteínas G. De hecho, un mismo receptor puede acoplarse a diferentes proteínas G dependiendo de su conformación o estado de activación, es lo que se conoce como señalización dependiente de ligando (Hermans, 2003; Kenakin, 2003). Con el objetivo de desarrollar una herramienta capaz de identificar compuestos selectivos, no sólo de un subtipo de receptor muscarínico sino también de una vía de señalización en concreto, se crearon microarrays de membranas celulares que sobreexpresaban el receptor muscarínico M<sub>3</sub> sólo o junto a diferentes proteínas G con sus correspondientes controles.

Una primera observación al realizar los estudios de acople funcional fue la de constatar el incremento de la fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTPγS debida a la sobreexpresión de proteínas G, efecto especialmente relevante en el caso de las proteínas G<sub>01</sub>. Por otro lado, observamos que la expresión de proteínas G<sub>01</sub>, G<sub>s</sub> y G<sub>q</sub> afectó negativamente a la estimulación del acople funcional inducido por la activación de los receptores muscarínicos constitutivamente expresados. Sin embargo, la co-transfección con el receptor M<sub>3</sub> evitó la disminución del efecto máximo parcialmente en las G<sub>s</sub> y G<sub>q</sub> o totalmente en el caso de las G<sub>01</sub>, aunque en las G<sub>i2</sub> la expresión de dicho receptor provocó una leve reducción con respecto a la ausencia del mismo. En este sentido, Akam observó en líneas celulares que sobreexpresaban este receptor, que los receptores M<sub>3</sub>, además de estar acoplados a proteínas G<sub>q/11</sub>, también pueden activar diferentes subtipos de proteínas G<sub>i</sub> y G<sub>o</sub> en función del agonista utilizado (Akam et al., 2001). Más

aún otros subtipos de receptores muscarínicos presentan un comportamiento similar (Akam et al., 2001). De hecho, estudios en líneas celulares que sobreexpresan el receptor  $M_1$  demostraron que la unión de agonistas alostéricos y ortostéricos a este subtipo de receptor, estabilizaba la conformación asociada con la señalización dependiente de proteínas  $G_{q/11}$  y  $G_s$  pero sólo los ortostéricos también lo hacen con la  $G_{i1/2}$  (Thomas et al., 2008). Por tanto, y a la luz de estos estudios, queda más que acreditada la robustez de los microarrays desarrollados para la identificación de moléculas con actividad  $M_3$  selectivas de una vía concreta de señalización.

### **2.3 *Macaca fascicularis***

El siguiente de los modelos en los que se realizó la validación fue en microarrays fabricados con membranas de diversos tejidos de *Macaca fascicularis* tratados con la neurotoxina MPTP y los mismos tejidos de individuos control. El tratamiento con MPTP destruye selectivamente las neuronas dopaminérgicas de la zona nigroestriatal (*pars compacta* de la sustancia *nigra*) y produce cambios comportamentales y neuroquímicos parecidos a la enfermedad de Parkinson (Przedborski y Vila, 2001; Dauer y Przedborski, 2003).

Al analizar la densidad de receptores GABAérgicos, se observó una disminución de la densidad de lugares de fijación para el [ $^3$ H]-CGP54626 en cerebelo, hipotálamo, amígdala y bulbo olfatorio del grupo tratado con MPTP, pero no se observaron cambios en otras áreas cerebrales como el caudado, putamen y los núcleos talámicos. Coincidiendo con estos resultados, el grupo de Di Paolo (Calon et al., 2000) tampoco observó cambios significativos en la fijación del antagonista [ $^{125}$ I]-CGP64213 en el caudado, putamen y en los núcleos talámicos en este modelo animal. Sin embargo, este grupo observó un aumento del 29% de la densidad de receptores GABAérgicos en el segmento interno del globo pálido y una disminución de un 40% en la *pars compacta* de la sustancia *nigra* tras el tratamiento con MPTP. Esta disminución de los receptores GABAérgicos en sustancia *nigra* también ha sido observada en estudios de autorradiografía en secciones de ratón y mono tratados con MPTP (Calon et al., 2001) así como en estudios de expresión de mRNA con modelos de rata lesionada con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Johnston y Duty, 2003). Esta discrepancia con respecto a nuestros resultados puede deberse al hecho

de que en la preparación de los homogeneizados de membranas utilizados en la elaboración de los microarrays no se ha separado la *pars reticulata* de la *pars compacta* de la sustancia *nigra* ni el segmento interno del externo en el globo pálido.

En cuanto a los receptores opioides  $\mu$ , el grupo tratado con MPTP presentó un aumento del número de receptores en cerebelo, hipocampo, amígdala y mesencéfalo, mientras que en sustancia *nigra* se redujo. Una disminución similar, aunque no significativa, de la fijación de [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO en sustancia *nigra* fue registrada en un estudio en ratas lesionadas con 6-OHDA (Johansson et al., 2001). Sin embargo, en ese mismo estudio (Johansson et al., 2001) Johansson y colaboradores también observaron una disminución de la densidad de receptores opioides  $\mu$  en estriado y globo pálido, áreas en las que no se registraron diferencias utilizando nuestros microarrays. Estas diferencias pueden deberse tanto al modelo animal empleado como al tratamiento utilizado, ya que en un estudio de fijación de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S inducido por DAMGO llevado a cabo en secciones de cerebro de monos tratados con MPTP (*Saimiri sciureus*) no se encontraron cambios significativos en las áreas de caudado, putamen, globo pálido y corteza, lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestros microarrays de membranas (Chen et al., 2005).

Respecto a los receptores muscarínicos, se cuantificó un aumento de densidad en hipocampo de los animales tratados con MPTP. En sintonía con estos resultados, se ha descrito una tendencia al aumento de estos receptores en dicha área en pacientes con EP (Smith et al., 1988). Sin embargo, en ratas lesionadas con 6-OHDA se ha observado una disminución de los receptores tipo  $M_1$  en hipocampo y amígdala de la zona lesionada no observándose cambios en sustancia *nigra* ni en estriado (Wang et al., 2014). Esta discrepancia en los resultados puede deberse a que en los microarrays se utilizó [ $^3\text{H}$ ]-NMS que es un ligando no selectivo de subtipo mientras que en estos estudios sólo se cuantificó el subtipo  $M_1$ , además de haberse realizado en una especie y con un tratamiento diferente. Por otro lado, se determinó una disminución de la densidad de receptores muscarínicos en las membranas de corteza frontal depositadas en los microarrays de membranas. En tejido *post mortem* se ha registrado un incremento de la fijación de [ $^3\text{H}$ ]-NMS en corteza parietal, temporal y occipital de pacientes con EP (Perry et al., 1990), pero no existen datos en corteza frontal con los que comparar.

Asimismo se ha detectado en los microarrays de membranas una disminución de los receptores muscarínicos en bulbo olfatorio y un aumento en cerebelo y tálamo. Estos cambios observados en tálamo, corteza y cerebelo pueden ser debidos al circuito cerebelotalámico que está directamente implicado en los temblores que provoca la EP (Helmich et al., 2011). Por último, no existe en la literatura estudios referentes a los receptores muscarínicos en el bulbo olfatorio, los cambios en esta área pueden deberse a que está inervada con neuronas dopaminérgicas provenientes de la sustancia *nigra* (Höglinger et al., 2015), aunque tampoco sorprende dado que esta es una de las primeras áreas que degenera en la enfermedad de Parkinson. Otros estudios de autorradiografía de [<sup>3</sup>H]-pirenzepina (agonista de receptores M<sub>1</sub>) y [<sup>3</sup>H]-AF-DX384 (antagonista M<sub>2</sub>/M<sub>4</sub>) no observaron cambios en pacientes con EP en las áreas de caudado, putamen, globo pálido y corteza (Piggott et al., 2003), esto concuerda con lo determinado en caudado, putamen y globo pálido en los microarrays de membranas.

Por último, el estudio de los receptores cannabinoides reveló un aumento en la fijación de [<sup>3</sup>H]-CP55,940 en áreas de cerebelo, sustancia *nigra*, globo pálido y bulbo olfatorio, así como una disminución en putamen. El sistema endocannabinoide está involucrado en los mecanismos de señalización de varias áreas del cerebro implicadas con la función motora. En los ganglios basales la regulación mediada por cannabinoides de diferentes neurotransmisores da lugar a importantes cambios en el comportamiento motor (van der Stelt et al., 2005; Papa, 2008; Sierra et al., 2015). Los aumentos en las áreas observados en los microarrays de membranas, todas directamente relacionadas con la EP, pueden representar un mecanismo de compensación por la pérdida de dopamina, debido al papel neuromodulador que está descrito que ejercen los cannabinoides endógenos, lo que a su vez podría inducir un aumento en la densidad de estos receptores (van der Stelt et al., 2005). En este sentido, Fernández-Ruíz y colaboradores en 2001 realizaron un estudio de fijación de [<sup>3</sup>H]-CP55,940 tanto en pacientes como en mono (*Callithrix jacchus*) tratado con MPTP. En ambos modelos se observó un aumento de la densidad de receptores cannabinoides en caudado y putamen (Lastres-Becker et al., 2001). En cambio, en un estudio en rata lesionada con 6-OHDA no se observaron cambios en la densidad de estos receptores en caudado-putamen aunque sí se registró un aumento en sustancia *nigra* (González et al., 2006).

En el caso de los cannabinoides también se estudió su activación mediante el análisis del acople a la proteína G inducido por el agonista cannabinoide WIN55,212-2 y se observó un aumento en corteza frontal y una disminución en globo pálido. Sin embargo, en el estudio de Fernández-Ruiz y colaboradores 2001 mencionado anteriormente, se obtuvo un aumento de la estimulación de los receptores cannabinoides inducido por WIN55,212-2 en pacientes en globo pálido lateral, caudado, putamen y sustancia *nigra* y en mono tratado con MPTP en caudado y putamen (Lastres-Becker et al., 2001).

Por otro lado, en los microarrays de membranas se detectaron además cambios en la fijación basal del radioligando en muchas de las áreas estudiadas, tanto aumento (sustancia *nigra*, globo pálido, bulbo olfatorio) como disminución (cerebelo, hipocampo, tálamo, hipotálamo, amígdala), lo cual indica que el tratamiento con MPTP estaría produciendo cambios en la actividad constitutiva de la población total de GPCR.

A pesar de que los cambios observados en la densidad y la actividad de los receptores cannabinoides no se produjeron en las mismas áreas sí se obtuvo una correlación positiva en ambos grupos de animales (control y lesionado). Esto indica de nuevo, al igual que en los microarrays de membranas de rata, la existencia de relación estequiométricas entre proteínas G y receptor que se mantiene constante en los diferentes tejidos. En este caso, y como ya se ha mencionado anteriormente, el coeficiente de variación de Pearson fue mayor que en los microarrays de membranas de rata debido probablemente a que la mayoría de los tejidos estudiados pertenecen al sistema nervioso.

Con respecto al cerebelo, a pesar de no ser un área especialmente estudiada en la EP se observaron cambios en los 4 tipos de receptores estudiados mediante microarrays de membranas modelo de EP. En relación con dichos cambios, algunos autores proponen que el cerebelo puede jugar un papel importante en la patofisiología de la EP y por tanto, los cambios observados en cerebelo podrían estar inducidos por la degeneración dopaminérgica o por una conexión anormal desde los ganglios basales (Wu y Hallet, 2013; Zhang et al., 2014).

### **Estudios mitocondriales en *Macaca fascicularis***

Tras evaluar los cambios que provoca el MPTP en los diferentes tipos de GPCR estudiados mediante el uso de microarrays de membranas se determinaron las posibles alteraciones que podía generar esta toxina sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Uno de los efectos que provoca el tratamiento con MPTP, es que su metabolito activo, el MPP<sup>+</sup>, inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial por la unión al mismo sitio o a un sitio cercano al de rotenona, de manera que impide la reducción adecuada de la ubiquinona. La unión de MPP<sup>+</sup> al complejo I interrumpe el flujo de electrones lo que implica un déficit en la formación de ATP, aumenta la producción de ROS y provoca la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Przedborski y Vila, 2001; Jakowec y Petzinger, 2004).

El radioligando [<sup>3</sup>H]-DHR se utiliza para determinar el complejo I mitocondrial por su elevada especificidad (Higgins y Greenamyre, 1996). Mediante autorradiografía de [<sup>3</sup>H]-DHR se obtuvo un aumento en la fijación de la toxina en las membranas impresas en los microarrays de membranas celulares aisladas del putamen, hipotálamo, globo pálido y bulbo olfatorio de los monos tratados con MPTP. Este incremento en los lugares de unión de la rotenona puede deberse a un mecanismo compensatorio de manera que las mitocondrias para paliar la inhibición inducida por la toxina expresen una mayor densidad de complejo I en esas áreas que, como se ha comentado anteriormente, son áreas de especial importancia en la EP.

Sin embargo, se ha descrito una disminución de alrededor del 25-30% en la actividad del complejo I mitocondrial en sustancia *nigra* y corteza frontal de cerebros de EP (Winklhofer y Haass, 2010; Exner et al., 2012; Perier y Vila, 2012). De la misma manera, se ha descrito una disminución de un 33% en la subunidad de 8 kDa del complejo I mitocondrial en corteza frontal de pacientes de EP lo que sugiere que el estrés oxidativo (causado por el mal funcionamiento de las mitocondrias) podría causar una reducción de la estabilidad de las subunidades del complejo I mitocondrial (Exner et al., 2012). No obstante, no hay estudios acerca de la variación de la densidad de complejos I o lugares de unión de la rotenona en modelos de la EP.

Se ha estudiado además la actividad succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa en los microarrays de membranas. El grupo tratado con

MPTP presentó un aumento en la actividad succinato deshidrogenasa y una disminución en la actividad citocromo c oxidasa en sustancia *nigra*. Un estudio en ratas lesionadas con 6-OHDA describió un aumento en la actividad succinato deshidrogenasa en esta área, así como un incremento en la actividad citocromo c oxidasa (Porter et al., 1994). Igualmente, con respecto a la actividad citocromo c oxidasa en monos tratados con MPTP se ha descrito un aumento en sustancia *nigra* (Vila et al., 1996), aunque otros autores no encontraron cambios en la actividad citocromo c oxidasa en sustancia *nigra* (Chicken et al., 2003). Estas discrepancias pueden ser debidas a diferencias en el grado de degeneración de esta área por los diferentes protocolos y pautas de administración empleadas, ya que como se ha mencionado antes es una de las más sensibles a esta toxina.

Por otro lado, se han determinado cambios en el mismo sentido que los descritos en estos estudios mediante microarrays de membranas en otras áreas como el hipocampo e hipotálamo. Concretamente, los monos tratados con MPTP, presentaron en ambas actividades enzimáticas un aumento en estas dos regiones cerebrales y una disminución en membranas de cerebelo e hígado. Asimismo, se ha observado un incremento en la actividad succinato deshidrogenasa en bulbo olfatorio y una disminución en cuerpo caloso y corazón, además de un aumento en la actividad citocromo c oxidasa en cuerpo caloso y una disminución en amígdala y corteza frontal.

En general, se ha descrito un incremento en las actividades de las enzimas mitocondriales en ratas lesionadas con 6-OHDA y en primates tratados con MPTP en el núcleo subtalámico y sus núcleos de proyección (Blandini et al., 2000) de manera similar a lo observado en los microarrays de membranas. Sin embargo, no hay en la literatura estudios sobre las actividades enzimáticas en el resto de los tejidos dispuestos en los microarrays de membranas, por lo que serán necesarios estudios complementarios que confirmen los cambios observados.

## **2.4 Ratones KO CB<sub>1</sub>**

Por último, se estudiaron los receptores cannabinoides en dos tipos de microarrays fabricados con membranas de tejido de animales KO para el receptor CB<sub>1</sub>.

En los microarrays de membrana de cerebelo de ratón KO para el receptor CB<sub>1</sub> y *wildtype* no se detectó fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS inducida por el agonista WIN55,212-2 en los tejidos de ratón KO, hallándose únicamente estimulaciones significativas en los tejidos de ratón *wildtype*.

Por otra parte, en los microarrays de hipocampo de ratón KO para el receptor CB<sub>1</sub> se cuantificó, además del acople, la densidad de receptores cannabinoides. Como era de esperar, en las membranas de ratón KO no se observó ni fijación de [<sup>3</sup>H]-CP55,940 ni estimulación de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS por WIN55,212-2. Asimismo, se determinó un aumento de la densidad y la actividad de receptores en individuos KO infectados con virus que contenían el material genético para que expresasen el receptor CB<sub>1</sub> normal o con la mutación DN22 con respecto a los KO no infectados. La mutación DN22 consiste en la delección de 22 aminoácidos N-terminal del gen que codifica el receptor CB<sub>1</sub>. Esta modificación genética no afecta a la localización de los receptores CB<sub>1</sub> en la membrana plasmática pero sí evita la aparición de los mismos en las mitocondrias. Mediante la utilización de microarrays de membranas se pudo determinar no sólo la eficiencia de la infección en el hipocampo de cada individuo, sino también la eficiencia de estos receptores en el acople a las proteínas G constitutivamente expresadas en dichos animales. Los resultados indicaron que la infección permitía recuperar parcialmente la densidad de receptores CB<sub>1</sub> en el hipocampo y que ambas variantes del receptor (tanto el normal como el mutado) conservaban la funcionalidad.



### **3. Estudio de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.**

#### **3.1 Estudio de la actividad mitocondrial en membranas celulares de corazón de rata**

En estos estudios se utilizaron homogeneizados de membranas de corazón de rata dado que este órgano posee una gran población de mitocondrias y las actividades de los complejos mitocondriales son, en general, más elevadas que en otros tejidos debido al elevado consumo energético de sus células (Harris y Das, 1991; Athanasiou et al., 2007). Asimismo, se comprobó mediante la actividad malato deshidrogenasa (figura 4.1-1) que estos homogeneizados carecían de mitocondrias enteras por tanto, de las proteínas solubles de la matriz mitocondrial.

Posteriormente, se procedió a estudiar el efecto de los inhibidores selectivos de cada complejo de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (rotenona, antimicina A, mixotiazol y azida sódica), en los diferentes ensayos de actividad enzimática realizados en este estudio (NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa en ausencia y en presencia de NADH y succinato) con el objetivo de caracterizar tanto las interacciones entre los diferentes complejos, incluyendo los transportadores de electrones, como la actividad de los supercomplejos. Asimismo, para estudiar el papel del transportador de electrones ubiquinona se utilizó su análogo, la decilubiquinona (dUQ) (Tabla 10).

<b>Tabla 10. Efecto producido por los inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y dUQ</b>					
	<b>dUQ</b>	<b>Rotenona</b>	<b>Antimicina A</b>	<b>Mixotiazol</b>	<b>Azida sódica</b>
<b>NADH DHasa</b>	> V	↓	↓*		
<b>NADH DHasa + dUQ</b>		↓	-		
<b>SDH</b>	↑	↓	↑		↑
<b>SDH + dUQ</b>		↓	↑		↑
<b>CcO</b>	-	-	↓	↓	↓
<b>CcO + NADH</b>	-	→	→	→	
<b>CcO + NADH + dUQ</b>		↑↓	↑↓	↑↓	
<b>CcO + Succinato</b>	←				

NADH DHasa: actividad NADH deshidrogenasa; SDH: actividad succinato deshidrogenasa; CcO: actividad citocromo c oxidasa; - : sin efecto; >V: aumenta la velocidad; ↓: inhibe; ↑: aumenta actividad; ↑↓: efecto bifásico; →:ralentiza consumo de sustrato; ← : acelera consumo sustrato. \*: concentraciones bajas.

Como cabría esperar, la presencia de dUQ en el medio aumentó la velocidad de reducción del DCIP por parte del complejo I debido a que se incrementa el número de transportadores capaces de captar los electrones provenientes de la oxidación de NADH (Janssen et al., 2007). Del mismo modo, la presencia de dUQ incrementó la actividad del complejo II, provocando un aumento en la formación de radicales superóxidos  $O_2^{\cdot-}$  que, a su vez, incrementaron la reducción del NBT a formazán (Fig. 4.3-1). En este sentido, se ha descrito que los estados intermedios de la UQ, generados en el proceso de reducción de la misma, pueden reaccionar con el  $O_2$  y formar  $O_2^{\cdot-}$ , por lo que al aumentar la concentración de dUQ es lógico que se incremente su formación (Genova y Lenaz, 2011; Wang y Hekimi, 2016).

Por último, se estudió el efecto de este transportador en la actividad citocromo c oxidasa utilizando una modificación del protocolo original, que permite analizar no sólo la actividad endógena de este complejo, sino la actividad de los supercomplejos (Wong-Riley, 1979). Concretamente, y como viene detallado en el apartado 11.3 de Materiales y Métodos, se evaluó el cambio de color que se produce cuando la DAB se oxida al ceder los electrones

al citocromo c, que posteriormente es reoxidado por el complejo IV, y por tanto, está de nuevo disponible para un nuevo ciclo (Roels, 1974). No obstante, y a diferencia del protocolo original, se ha incrementado el tiempo de reacción a 16 horas con el fin de poder comparar con las pruebas realizadas en microarrays ya que requerían tiempos más largos que los empleados en los ensayos con homogeneizados de membrana. Esto nos permitió comprobar que la oxidación de la DAB y por tanto, la actividad citocromo c oxidasa, se mantenía durante este periodo de tiempo. Más aún, los experimentos de optimización del protocolo en los que se han incluido condiciones en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de citocromo c, permitieron constatar que el citocromo endógeno, presente en las membranas era suficiente para medir esta actividad. Esto es posible dado que el citocromo c permanece anclado a la MMI unido a las cardiolipinas, moléculas fundamentales tanto para la estabilización como para la funcionalidad de los complejos y supercomplejos (Rytömaa et al., 1994; Schlame et al., 2000; Pfeiffer et al., 2003).

Con estas condiciones, fue posible determinar la funcionalidad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Para ello, se añadieron los sustratos del complejo I y del II, NADH y succinato respectivamente, observándose una inhibición de la oxidación de la DAB al no haber disponible citocromo c oxidado, ya que éste era reducido por los electrones que le llegaban de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Esta inhibición de la oxidación de la DAB, proporcional a la concentración de sustrato, se mantenía hasta que se consumía dicho sustrato, momento en el cual se volvía a incrementar la señal. En este sentido, cabe mencionar que la activación del complejo I con NADH es más eficiente que la generada desde el complejo II con succinato (Fig. 4.4-2 B y C). Probablemente, esta mayor eficiencia sea debida a la capacidad del complejo I de formar supercomplejos con los complejos III y IV, de manera que, una vez activado el supercomplejo el citocromo c queda protegido de la DAB (Schägger y Pfeiffer, 2000; Schäfer et al., 2006, Vonck y Schäfer, 2009; Chaban et al., 2014). Apoyando esta hipótesis, se observó que la dUQ producía una leve disminución de la actividad citocromo c oxidasa en ausencia de sustrato (Fig. 4.4-2 A), sin embargo, en presencia de NADH como sustrato del complejo I, la dUQ no modificaba ni el tiempo ni el efecto máximo alcanzado (Fig. 4.4-2 B). En cambio, cuando se utilizó succinato como sustrato del complejo II, la

presencia de dUQ redujo el tiempo y el efecto máximo de la inhibición de la oxidación de la DAB provocada por el succinato (Fig. 4.4-2 C). Por tanto, la dUQ exógena no favorece el transporte de electrones en los supercomplejos presentes en las mitocondrias de corazón de rata, probablemente por la propia naturaleza de los mismos, condicionados por factores estequiométricos y estéricos. Sin embargo, cuando se activa el complejo II, que no forma supercomplejos (Dudkina et al., 2010; Chaban et al., 2014), la presencia de un mayor número de transportadores contribuye a una mayor tasa de oxidación de sustrato, acelerando su consumo.

Para comenzar con el estudio de los inhibidores se utilizó la molécula rotenona. La rotenona es un inhibidor selectivo del complejo I mitocondrial que ha sido ampliamente utilizado en diversos estudios dada su elevada especificidad (Sharma et al., 2009). Por este motivo se utilizó como referencia en nuestros ensayos de la actividad NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa.

En consonancia con numerosos estudios publicados, la rotenona 10  $\mu\text{M}$  produjo un efecto inhibitorio de la actividad NADH deshidrogenasa tanto en ausencia como en presencia de dUQ (Degli Esposti, 1998; Janssen et al., 2007). Esta concentración de rotenona no produjo ningún efecto en la actividad succinato deshidrogenasa, aunque concentraciones superiores (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) sí que indujeron una disminución en la formación de formazán, tanto en presencia como en ausencia de dUQ. Por tanto, la rotenona a altas concentraciones reduce la formación de  $\text{O}_2^-$  cuando se oxidan sustratos desde el complejo II. Este efecto podría ser debido a que a elevadas concentraciones, la rotenona es capaz de unirse al complejo I en ausencia de NADH y bloquear el flujo inverso de electrones del complejo II al complejo I, siendo este flujo inverso fuente de una elevada producción de  $\text{O}_2^-$  (Brand, 2010; Wang y Hekimi, 2016).

En cuanto a la actividad citocromo c oxidasa, la presencia de rotenona 10  $\mu\text{M}$  en el medio no produjo cambios en la oxidación de la DAB. Sin embargo, cuando se utilizó NADH como sustrato del complejo I, la rotenona prolongó la inhibición de la oxidación de la DAB (Fig. 4.4-3). Este fenómeno podría deberse a que el supercomplejo respiratorio permanece acoplado mientras el complejo I está activo, impidiendo así que la DAB ceda los electrones al citocromo c aun cuando no hay flujo de electrones a través de la cadena. En este sentido, se ha observado que la rotenona presenta una mayor

afinidad por el complejo I cuando éste está en la conformación activa (Higgins y Greenamyre, 1996; Grivennikova et al., 1997), estabilizándola y provocando el desvío de los electrones a la formación de ROS (Kussmaul y Hirst, 2006; Fato et al., 2009; Quinlan et al., 2013). Por otro lado, la eficiencia de la vía oxidasa, que conduce a la formación de ROS en el complejo I, es menor que la vía de transporte de electrones a través de la ubiquinona (Fato et al., 1996; Glinn et al., 1997). Por tanto, se esperaría que el consumo del sustrato fuese menor, lo que explicaría el incremento de tiempo registrado en presencia de rotenona (Fig. 4.4-3).

Debido a que la unión de la rotenona al complejo I impide la reducción de la ubiquinona a ubiquinol (Lümmen, 1998), se ha estudiado si la adición de dUQ exógena podría evitar este efecto. Como se observa en la figura 4.4-4, la presencia de 10  $\mu\text{M}$  de dUQ redujo levemente el efecto de la rotenona, pero a 50  $\mu\text{M}$  de dUQ se potenció su efecto en presencia del sustrato del complejo I. En relación con estos resultados, Yagi observó que la capsaicina actúa como un inhibidor no competitivo de la ubiquinona-1 a bajas concentraciones de la misma (<20  $\mu\text{M}$ ) mientras que a concentraciones elevadas (>50  $\mu\text{M}$ ) se comportaba como un inhibidor competitivo (Yagi, 1990). Por tanto, y teniendo en cuenta que el lugar de unión de la rotenona se solapa con el de la piericidina A y con el de la capsaicina, aunque estos últimos no parecen superponerse (Okun et al., 1999), se podría concluir que el efecto bifásico observado se debe a un mecanismo cinético diferente en función de la concentración de dUQ.

Tras evaluar los efectos producidos por la rotenona sobre las diferentes actividades enzimáticas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se procedió al estudio de los inhibidores del complejo III antimicina A y mixotiazol.

El inhibidor específico antimicina A actúa en el sitio de reducción de la ubiquinona,  $Q_N$ , inhibiendo la correcta oxidación del ubiquinol al bloquear la transferencia de electrones entre el citocromo  $b$  y  $c_1$  (Huang et al., 2005; Ma et al., 2011). De nuevo, se determinó la actividad del complejo I mitocondrial en presencia y ausencia del transportador dUQ. Mientras que en presencia de la quinona no se observó efecto alguno por parte de la antimicina A, en ausencia de dUQ, y a concentraciones bajas del inhibidor, se produjo una inhibición de la actividad NADH deshidrogenasa, aunque conforme se aumentó la concentración de la antimicina A esta inhibición fue disminuyendo (Fig. 4.2-2).

Al contrario, en el estudio de la actividad succinato deshidrogenasa, una concentración baja de antimicina A (5  $\mu\text{M}$ ) produjo un gran aumento de la actividad de este complejo que fue disminuyendo conforme se aumentó la concentración del inhibidor (Fig. 4.3-4). En consonancia con estos resultados, se ha descrito que la antimicina A incrementa la concentración de semiquinona por inhibición de la oxidación del grupo hemo  $b_H$ , lo que se traduce en un aumento en la producción de  $\text{O}_2^-$  (Chandel, 2010), que a su vez produciría un incremento en la formación de formazán.

Por tanto, en el estudio de ambas actividades enzimáticas, una concentración baja de antimicina A produce un gran efecto, que va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración. Esto podría ser debido a la estructura de dímero que presenta el complejo III (Lenaz y Genova, 2010), de manera que el complejo seguiría en parte activo a concentraciones bajas del inhibidor, mientras que concentraciones elevadas lo bloquearían por completo. En este sentido, se ha observado una cinética de unión de la antimicina A al complejo III que explicaría este efecto bifásico (Covian y Trumpower, 2006; Ransac y Mazat, 2010).

En último lugar, al evaluar el efecto de la antimicina A sobre la actividad citocromo c oxidasa se observó una disminución de la oxidación de la DAB de manera dosis dependiente, a concentraciones superiores a 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 4.4-6). Esta inhibición podría ser debida a la capacidad que tiene la antimicina A para liberar del citocromo c al citosol (Choi y Lee, 2011) bloqueando de este modo el ciclo. No obstante, también podría ocurrir que las ROS formadas inutilizasen el citocromo c, dado que este tiene actividad peroxidasa (Wang et al., 2003).

De la misma manera, se observó una disminución de la actividad citocromo c oxidasa en presencia de otro inhibidor del complejo III, el mixotiazol (Fig. 4.4-9). El mixotiazol actúa uniéndose al centro  $Q_P$  desplazando el ubiquinol de su lugar de unión e impidiendo la formación de semiquinonas. No obstante, a concentraciones bajas, aumenta la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Starkov y Fiskum, 2001). En este sentido, es conocido que peroxidases como el citocromo c (Wang et al., 2003; Bertini et al., 2006) en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden oxidar la DAB (Dannenberg et al., 1994).

Por otro lado, se quiso estudiar además el efecto que producían estos dos inhibidores del complejo III en los supercomplejos en presencia del sustrato del complejo I NADH. Con ambos inhibidores aumentó el tiempo en el

que la oxidación de la DAB está inhibida, siendo más potente el mixotiazol. Este fenómeno podría deberse de nuevo al acoplamiento que parece tener lugar mientras el complejo I está activo, impidiendo así que la DAB ceda los electrones al citocromo c. Al incluir en el medio el transportador de electrones dUQ se observó un efecto bifásico con los dos inhibidores, de modo que concentraciones bajas de dUQ (10  $\mu\text{M}$ ) revertían la oxidación de la DAB mientras que concentraciones altas (50  $\mu\text{M}$ ) la prolongaban, de la misma manera que ocurría con la rotenona (Fig. 4.4-8 B y 4.4-11 B).

Para finalizar, se utilizó el inhibidor azida ( $\text{N}_3^-$ ) sódica que inhibe el complejo IV mitocondrial al reconocer el lugar de unión del  $\text{O}_2$  (grupo hemo  $\alpha_3$  oxidado y  $\text{Cu}_B$ ) (Lenaz y Genova, 2010), la presencia de azida hace que el citocromo c no se pueda reoxidar y, por tanto, impide que la DAB le pueda ceder los electrones (Fig. 4.4-1).

En cuanto a la actividad succinato deshidrogenasa, la presencia de la azida sódica (2,5 mM) aumentó la reducción del NBT incrementándose dicho efecto en presencia de dUQ (Fig. 4.3-5). Este efecto podría ser debido a que al no poderse reoxidar el citocromo c, los electrones provenientes de las UQ reducidas se dirigirían a la formación de ROS en el complejo III, lo que incrementaría el  $\text{O}_2^-$  con la consiguiente elevación en la reducción de NBT.

### **3.2 Efecto de los ligandos cannabinoides sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

Numerosos estudios han demostrado la relevancia del sistema endocannabinoide en la regulación del metabolismo energético, aunque aún existen ciertas incógnitas sobre el mecanismo de acción (Costa y Colleoni, 2000; Giuliano et al., 2006; Tedesco et al., 2010; Fonseca et al., 2013a). Por este motivo, en el presente trabajo se estudió el efecto de los cannabinoides sobre los complejos que integran la cadena de transporte mitocondrial mediante diferentes aproximaciones experimentales.

Para el estudio del complejo I, se comenzó analizando la fijación del análogo radiactivo de la rotenona, [ $^3\text{H}$ ]-DHR, en presencia de los agonistas cannabinoides CP55,940 y WIN55,212-2, así como de los antagonistas AM251 y AM281. El CP55,940 a 100  $\mu\text{M}$  inhibió la unión de la [ $^3\text{H}$ ]-DHR en aproximadamente un 75%, el WIN55,212-2 y el AM251 lo hicieron en un 50%,

mientras que el AM281 no sólo no produjo una disminución en la fijación de la [<sup>3</sup>H]-DHR sino que incluso llegó a aumentarla (Fig. 3.2-1).

A la vista de estos resultados sorprende el efecto del AM251, ya que a pesar de ser un antagonista selectivo de los receptores CB<sub>1</sub>, realiza un efecto similar al de los agonistas CP55,940 y WIN55,212-2 sobre el complejo I. No obstante, este efecto ya había sido evidenciado en el estudio de Fišar y colaboradores donde observaron que ambos ligandos cannabinoides, el AM251 y el WIN55,212-2, actuaban como inhibidores parciales de la tasa respiratoria mediada por el complejo I en mitocondrias aisladas de cerebro de cerdo (Fišar et al., 2014). Para tratar de explicar los efectos de los cannabinoides sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial, este grupo propuso un modelo basado en la coexistencia de dos mecanismos diferentes, uno mediado por receptor y otro independiente de receptor.

En cuanto al mecanismo mediado por receptores, numerosos estudios describen la participación de los receptores cannabinoides en la modulación de la actividad mitocondrial a través de la regulación de diversas vías de señalización intracelular (Nunn et al., 2012; Lipina et al., 2014). Es más, recientemente se ha descrito que aproximadamente el 30% de las neuronas presentan receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> en la MME (Bénard et al., 2012). Estos receptores una vez activados modulan la actividad de la adenilato ciclasa soluble presente en la matriz mitocondrial, inhibiendo la formación de AMPc con la consiguiente reducción de la actividad PKA, lo que conduce a la inhibición de los complejos mitocondriales (Bénard et al., 2012). Estos efectos mediados por receptores se producen a concentraciones submicromolares, aunque a concentraciones superiores, los cannabinoides parecen regular la actividad mitocondrial por un mecanismo independiente de dichos receptores (Maccarrone et al., 2000; Sarafian et al., 2003; Vaccani et al., 2005; Athanasiou et al., 2007; Zaccagnino et al., 2012; Fišar et al., 2014; Singh et al., 2015). En este sentido, la similitud de las IC<sub>50</sub> obtenidas en los experimentos de competición del inhibidor selectivo del complejo I mitocondrial [<sup>3</sup>H]-DHR con CP55,940 tanto en homogeneizados de membranas de cerebelo (WT: 137 µM vs KO-CB<sub>1</sub>: 151 µM) como en los microarrays de hipocampo (WT: 55 µM vs KO-CB<sub>1</sub>: 63) de ratones *wildtype* y KO para el receptor CB<sub>1</sub>, reforzaría este último punto (Figs. 3.1-1 y 3.2-4). Sin embargo, los ligandos cannabinoides, aunque ejercen mayoritariamente su acción a través de receptores cannabinoides, también pueden mediar parte de sus

efectos a través de otros receptores diferentes como el receptor huérfano acoplado a proteínas G (GPR55), el receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) o el receptor activador de la proliferación del peroxisoma (PPAR) (Fonseca et al., 2013b; D'Addario et al., 2014).

Con el fin de descartar la participación de otros receptores en la inhibición de los complejos mitocondriales, se comprobó la existencia de células o mitocondrias enteras en los homogenizados de membranas que contuviesen todas las proteínas necesarias para transducir la señal mediada por dichos receptores. Para ello, se evaluó la actividad malato deshidrogenasa, enzima soluble de la matriz mitocondrial (Mullinax et al., 1982; Minárik et al., 2002), en membranas aisladas mediante nuestro protocolo o utilizando otro exclusivamente diseñado para aislar mitocondrias enteras (Gross et al., 2011). Como se puede observar en la figura 4.1-1, utilizando el protocolo de extracción de membranas no hubo modificación de la señal, confirmando la ausencia de mitocondrias enteras en los homogenizados de membrana utilizados tanto en los experimentos como en la fabricación de microarrays. Este hecho, implicaría que es posible descartar las vías mediadas por receptores de membrana que impliquen la participación de proteínas solubles tanto citoplasmáticas como de la matriz mitocondrial, ya que éstas han sido eliminadas en los sucesivos pasos de lavado y centrifugación realizados en el proceso de aislamiento de las membranas.

Como se ha mencionado previamente, varios estudios (Maccarrone et al., 2000; Athanasiou et al., 2007; Fišar et al., 2014; Singh et al., 2015) apuntan a que los ligandos cannabinoides, además de interactuar con la mitocondria a través de los receptores cannabinoides (Bénard et al., 2012; Hebert-Chatelain et al., 2014), también pueden hacerlo a través de mecanismos no mediados por receptor. Así, se ha descrito que el  $\Delta^9$ -THC, el AEA y el 2-AG provocan cambios en la fluidez de las membranas mitocondriales (Athanasiou et al., 2007; Zaccagnino et al., 2012). Esta observación junto con el hecho de que la potencia con la que los cannabinoides ejercen su acción sobre la actividad mitocondrial fuese sustancialmente diferente a la publicada y que agonistas y antagonistas realizasen el mismo efecto, hizo plantear la hipótesis de que la acumulación de cannabinoides en las partes hidrofóbicas de la MMI podría ocasionar la interrupción de las interacciones moleculares entre los diferentes complejos mitocondriales alterando el ensamblaje y la función de la cadena respiratoria

(Fišar et al., 2014). Concretamente, Fišar observó que los fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THC y CBD, el endocannabinoide AEA y los ligandos sintéticos WIN55,212-2 y AM251 inhibían la tasa respiratoria mitocondrial mediante el bloqueo del complejo I mitocondrial (Fišar et al., 2014; Singh et al., 2015). Sin embargo, el hecho de que la potencia con la que los cannabinoides inhiben la respiración mitocondrial no esté relacionada con su lipofilicidad (Fišar et al., 2014) y de que la capsaicina, agonista de los receptores TRPV1 sobre los cuales también actúan ciertos cannabinoides como la AEA (Maccarrone et al., 2000; D'Addario et al., 2014), comparta un dominio de unión en el complejo I mitocondrial que se solapa con el de la rotenona (Okun et al., 1999), hizo plantear la hipótesis de un mecanismo alternativo basado en la interacción de los cannabinoides con los lugares de unión de la ubiquinona presentes en los complejos. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se decidió estudiar en detalle la acción del CP55,940 y de otras moléculas cannabinoides sobre la actividad de los distintos complejos mitocondriales (Tabla 11).

**Tabla 11. Efecto producido por los ligandos cannabinoides sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

	CP55940	WIN55,212-2	AM251	AM281	HU331
<b>NADH DHasa</b>	↓	-	-	-	-
<b>NADH DHasa + dUQ</b>	↓	↓	↓	-	> V
<b>SDH</b>	-	↓	-	-	↓
<b>SDH + dUQ</b>	↑	< V	< V	-	< V
<b>CcO</b>	↓	-	↓	-	↑
<b>CcO + NADH</b>	→	→	↓ Emáx	-	←
<b>CcO + NADH + dUQ</b>	↑↓				
<b>CcO + Succinato</b>	↑↓				←

NADH DHasa: actividad NADH deshidrogenasa; SDH: actividad succinato deshidrogenasa; CcO: actividad citocromo c oxidasa; - : sin efecto; >V: aumenta la velocidad; ↓ : inhibe; ↑ : aumenta actividad; ↑↓ : efecto bifásico; → :ralentiza consumo de sustrato; ← : acelera consumo sustrato; Emáx: efecto máximo; <V: disminuye la velocidad.

El ligando CP55,940 a 50  $\mu\text{M}$  inhibió la actividad NADH deshidrogenasa en presencia del transportador dUQ de una manera similar a lo que se observó con el inhibidor selectivo rotenona (Fig. 5.1-1), lo que indicaría que el CP55,940 podría unirse al lugar de la dUQ del complejo I evitando el paso de electrones a la molécula de DCIP (Tabla 12).

En cuanto a la actividad succinato deshidrogenasa, el CP55,940 en presencia de dUQ provocó un aumento análogo al producido por la antimicina A. Sin embargo, la presencia simultánea de ambas moléculas en el medio no provocó un aumento de este efecto (Fig. 5.2-1), lo que podría indicar que la entrada de uno de ellos al complejo III impide la unión del otro debido probablemente a que compartan alguna región del lugar de unión. En este sentido, el incremento en la actividad del complejo II por el cannabinoide CP55,940 indica que se está produciendo un aumento en la generación de  $\text{O}_2^-$ , necesario para la formación de formazán. Estos resultados concuerdan con diversos estudios en los que se ha descrito un aumento en la producción de ROS en presencia de ligandos cannabinoides (Shrivastava et al., 2011; Zaccagnino et al., 2009; Donadelli et al., 2011). No obstante, existe cierta controversia en este punto ya que otros autores han observado un efecto protector del CP55,940 en cuanto a la formación estas especies reactivas de ROS (Wei et al., 2009; Rángel-López et al., 2015), aunque, como se ha mencionado anteriormente, esta discrepancia puede ser debida a las concentraciones utilizadas y por tanto, al mecanismo de acción.

Por último, en el estudio de la actividad citocromo c oxidasa se observaron diferentes efectos. Por un lado, en ausencia de cualquier otra molécula las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  de CP55,940 inhibieron la actividad del complejo IV de una manera dosis dependiente (Fig. 5.3-1 A). Por otro lado, en presencia de NADH una concentración de 10  $\mu\text{M}$  fue suficiente para proporcionar una inhibición de la oxidación de la DAB hasta el minuto 300 (aproximadamente el doble de tiempo que en ausencia del CP55,940) y concentraciones más elevadas inhibieron por completo la reacción (Fig. 5.3-1 B). Sin embargo, la inclusión de dUQ en el experimento produjo un efecto bifásico en el que a 10  $\mu\text{M}$  de dUQ el tiempo de inhibición se revirtió casi a niveles basales, en ausencia de CP55,940, mientras que a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  se inhibió casi por completo la oxidación de DAB (Fig. 5.3-2). Estos efectos fueron similares a los obtenidos en presencia del inhibidor del complejo III antimicina A. En este sentido, se ha descrito una liberación del

citocromo c en presencia del cannabinoide AEA (Maccarrone et al., 2000) análoga a lo que se produce en presencia de antimicina A (Choi y Lee, 2011). Para comprobar si estos compuestos actuaban sobre el mismo lugar de unión, se estudió conjuntamente el CP55,940 y los inhibidores antimicina A o mixotiazol. La presencia de estos compuestos provocó una inhibición de la actividad citocromo c oxidasa más pronunciada que la obtenida individualmente, por lo que el CP55,940 podría estar actuando como un inhibidor del complejo III de la cadena de transporte de electrones (Fig. 5.4-1 y 2).

Cuando la cadena se activó a través del complejo II con el sustrato succinato, el CP55,940 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  incrementó levemente la reducción del NBT mientras que a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  la actividad disminuyó (Fig. 5.3-1 C). No obstante, esta disminución podría ser debida al bloqueo que produce este cannabinoide sobre la oxidación basal de DAB.

Por último, el estudio conjunto del ligando CP55,940 y los inhibidores antimicina A o mixotiazol provocaron una inhibición que más pronunciada que individualmente en la actividad citocromo c oxidasa, por lo que el CP55,940 podría estar actuando como un inhibidor de la cadena de transporte de electrones (Fig. 5.3-7 y 8).

A continuación se procedió a estudiar el resto de ligandos cannabinoides empezando por el WIN55,212-2. Concretamente, en el estudio de la actividad del complejo I este ligando, así como el resto de cannabinoides, se utilizó a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , concentración mayor que la usada con el CP55,940 dada su menor eficiencia en el desplazamiento de la fijación de [ $^3\text{H}$ ]-DHR. A esta concentración y en presencia de dUQ se obtuvo una inhibición de la actividad NADH deshidrogenasa, aunque la inhibición fue más débil que la obtenida con el CP55,940 (Fig. 5.1-2) (Tabla 12). En este sentido, se ha descrito que el cannabinoide WIN55,212-2 disminuye la actividad del complejo I mitocondrial en mitocondrias aisladas de cerebro de ratón (Bénard et al., 2012). Curiosamente, el ligando AM251 realizó un efecto similar al WIN55,212-2 (Fig. 5.1-3). No obstante, la similitud de los efectos producidos por estos dos cannabinoides ya había sido evidenciada en un estudio realizado en mitocondrias de cerebro de cerdo en el cual eran definidos como inhibidores parciales del complejo I y II (Fišar et al., 2014).

En referencia al complejo II, el ligando WIN55,212-2 en las membranas de corazón de rata provocó una disminución de la actividad succinato

deshidrogenasa en ausencia y presencia de antimicina A. Este cannabinoide, en presencia de dUQ, produjo una disminución de la velocidad en la reacción, aunque el efecto máximo alcanzado fue el misma (Fig. 5.2-2). Este hecho podría indicar que el WIN55,212-2 actúa reduciendo la velocidad de la formación de superóxido, lo que concuerda con un estudio realizado en macrófagos aislados de rata donde el tratamiento con WIN55,212-2 produjo una disminución dosis dependiente de la producción de ROS (Hao et al., 2010). Utilizando el ligando AM251 se obtuvo una disminución de la velocidad de la enzima de la misma manera que con el WIN55,212-2 pero solamente en presencia de dUQ y antimicina A (Fig. 5.2-3). En este sentido, a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de WIN55,212-2 y AM251 no se han descrito cambios significativos en la actividad del complejo II, aunque sí se observó una ligera inhibición en presencia de antimicina A (Singh et al., 2015). En este mismo estudio, Singh describió la inhibición de este enzima por parte de estos 2 ligandos cannabinoideos en membranas de cerebro de cerdo (Singh et al., 2015).

Sin embargo, en el estudio de la actividad citocromo c oxidasa realizado en membranas de corazón sí se observaron diferencias entre los efectos producidos por los ligandos WIN55,212-2 y AM251. Concretamente, el WIN55,212-2 no produjo inhibición de la actividad a ninguna de sus concentraciones (Fig. 5.3-3 A), en cambio, el AM251 produjo una disminución de la actividad citocromo c oxidasa a 50 y 100  $\mu\text{M}$  siendo esta inhibición igual a ambas concentraciones (Fig. 5.3-4 A). Cuando se activó el sistema mediante la adición de NADH también se observaron diferencias entre los dos ligandos. Por un lado, el WIN55,212-2 a 10  $\mu\text{M}$  retardó la oxidación de la DAB hasta 180 min y con las dos concentraciones más elevadas lo prolongó hasta 210 min disminuyendo el efecto máximo en estas dos concentraciones (Fig. 5.3-3 B). Por otro lado, el AM251 redujo la actividad en cuanto a efecto máximo cuantificado pero no desplazó el tiempo de inicio de oxidación de la DAB (Fig. 5.3-4 B). Por tanto, estos resultados reflejan un comportamiento similar del AM251 al inhibidor antimicina A sobre la actividad citocromo c oxidasa en ausencia de NADH, aunque, en presencia del sustrato del complejo I, se mantiene el mismo tiempo de inhibición, a diferencia de lo que ocurre con la antimicina A. No obstante, la disminución del efecto máximo registrado tanto en presencia como en ausencia de NADH, indicaría que el AM251 no inhibe la oxidación de la NADH y, probablemente, no altera el paso de electrones del

complejo I al IV. Por el contrario, el WIN55,212-2 parece que hace un efecto más similar a la rotenona ya que no afecta directamente a la oxidación de la DAB.

Posteriormente, y dada la homología estructural con el AM251, se procedió a estudiar el ligando cannabinoide AM281. Este compuesto disminuyó levemente la actividad citocromo c oxidasa y, en presencia de NADH, aumentó de una forma leve el efecto máximo incluso por encima del valor de NADH. No obstante, el AM281 no ejerció ningún efecto significativo sobre el resto de actividades enzimáticas estudiadas a pesar de tener una estructura en la que la única diferencia con el AM251 es un oxígeno en un anillo de la molécula (Tabla 12).

Como se ha podido determinar hasta el momento estudiando las diferentes actividades enzimáticas, los ligandos cannabinoides realizan efectos diferentes a los descritos cuando actúan sobre sus receptores convencionales, si bien, este hecho ya había sido evidenciado en otros estudios (Fišar et al., 2014; Singh et al., 2015). Estos mismos autores descartan que dichas diferencias sean debidas a la lipofiliidad de los cannabinoides ya que son similares entre sí.

Por último, con el fin de discernir si el efecto de los ligandos cannabinoides estaba mediado por su unión directa a diferentes lugares de unión de la UQ, y no por alteraciones inespecíficas de la membrana mitocondrial, se realizaron los ensayos enzimáticos con otro compuesto de origen cannabinoide, el HU331 (Fig. 3.2-1'). Esta molécula se forma por la oxidación del ligando cannabinoide CBD, convirtiéndose en una quinona (Peters y Kogan, 2007). El HU331 es utilizado como agente anticancerígeno ya que media la muerte celular debido a su papel como inhibidor de la actividad ATPasa de la topoisomerasa II. A pesar de su origen cannabinoide, este compuesto no actúa sobre los receptores cannabinoides y no provoca la formación de ROS ni de radicales libres (Kogan et al., 2007; Peters y Kogan, 2007; Regal et al., 2014). Sin embargo, debido a su estructura de quinona y a su naturaleza cannabinoide se creyó útil en este estudio para comprobar si el efecto de estos compuestos se realizaba sobre los lugares de unión del transportador de electrones UQ.

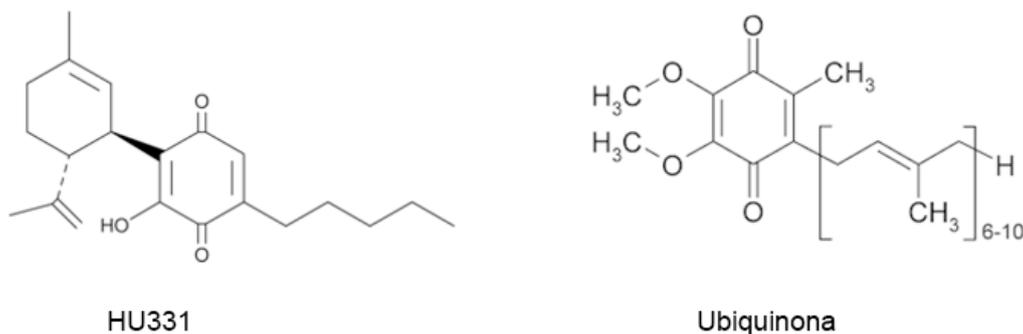


Fig. 3.2-1'. Estructura química de las moléculas HU331 y ubiquinona.

Cuando se ensayó la actividad NADH deshidrogenasa en presencia de HU331 (50  $\mu\text{M}$ ) y dUQ, se registró un aumento leve de la velocidad de reacción (Fig. 5.1-5). En cuanto a la actividad succinato deshidrogenasa, este cannabinoide disminuyó considerablemente la reacción en ausencia de dUQ exógena, mientras que en su presencia se dio una leve disminución de la velocidad (Fig. 5.2-5). Esta inhibición en la formación de formazán indica que se está bloqueando la formación de ROS, lo cual podría ser debido a que el HU331 compete por los lugares de unión con la dUQ.

En este sentido, la velocidad de la actividad citocromo c oxidasa en presencia de HU331 a 50  $\mu\text{M}$  aumentó, de manera similar, al efecto observado en presencia de concentraciones bajas (5 ó 10  $\mu\text{M}$ ) de antimicina A. En este sentido, el HU331 desplazó levemente el efecto de la rotenona a 10 y 50  $\mu\text{M}$  y el del mixotiazol a 10  $\mu\text{M}$ , sin embargo, en presencia de antimicina A pareció incrementar un poco su efecto. Por otro lado, el bloqueo de la oxidación de la DAB registrado por la activación de la cadena de transporte de electrones mediante los sustratos NADH o succinato, fue sustancialmente revertido por las dos concentraciones de HU331 (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) ensayadas (Fig. 5.3-6). Más aún, el HU331 a estas concentraciones (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) en presencia del sustrato del complejo I NADH, evitó el efecto de los inhibidores rotenona, antimicina A o mixotiazol, de manera similar a lo observado a bajas concentraciones de dUQ.

Para finalizar, la incubación conjunta de CP55,940 y HU331 dio como resultado que el HU331, en presencia del sustrato NADH, revertía el efecto inhibitorio generado por el CP55,940, al igual que hacía con los inhibidores de la cadena de transporte de electrones. Por tanto, el hecho de que el HU331, module el efecto producido por los inhibidores selectivos de la cadena de

transporte mitocondrial, así como por cannabinoides como el CP55,940, de forma similar a la dUQ, apoya nuestra hipótesis de que estos compuestos cannabinoides actúan a través de los sitios de unión de la ubiquinona.

**Tabla 12. Posibles lugares de unión de los ligandos cannabinoides**

	<b>Complejo I</b>	<b>Complejo II</b>	<b>Complejo III</b>
<b>CP55940</b>	Sí	No	Sí
<b>WIN55,212-2</b>	Sí	Sí	No
<b>AM251</b>	Sí	No	Sí
<b>AM281</b>	No	No	No
<b>HU331</b>	Sí	Sí	Sí

Los resultados obtenidos que revelan una actuación directa de los cannabinoides con la mitocondria a través de su unión a los complejos mitocondriales podrían indicar un mecanismo mediante el cual a concentraciones por debajo de micromolar actuarían a través de la unión de los receptores cannabinoides de la membrana celular y los CB<sub>1</sub> descritos en la mitocondria modulando mediante las diferentes cascadas de señalización el metabolismo celular (Bénard et al., 2012; Hebert-Chatelain et al., 2014).

En definitiva y a la luz de los resultados obtenidos tanto en los ensayos de actividad enzimática como de fijación de [<sup>3</sup>H]-DHR en un sistema en el que sólo están presentes las proteínas de membrana, se puede concluir que los cannabinoides actúan directamente sobre los complejos mitocondriales mediante su acción sobre los diferentes lugares de unión de la ubiquinona. Este hecho explicaría la presencia de receptores cannabinoides en la mitocondria de ciertas células como las neuronas, ya que estos receptores podrían inhibir la actividad de la cadena de transporte mitocondrial antes de que se produjese una acumulación excesiva de endocannabinoides en la mitocondria que, al incrementar la producción de ROS comprometiese la integridad de dicha célula. Del mismo modo, este mecanismo de acción podría explicar los efectos antitumorales observados para ciertos cannabinoides (Vaccani et al., 2005; Blázquez et al., 2006; Adinolfi et al., 2013; Niu et al., 2015).





## **CONCLUSIONES**



1. Los microarrays de membranas celulares permiten el estudio de la densidad y actividad de las proteínas de membrana, incluyendo los GPCR y los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, obteniéndose resultados similares a los descritos previamente mediante técnicas convencionales.
2. La correlación entre los datos obtenidos mediante autorradiografía de receptor y de acople funcional a proteínas G demuestran la robustez de los microarrays de membranas celulares como herramienta para el estudio de GPCR.
3. Los microarrays de membranas celulares son válidos para la determinación de la expresión y actividad de proteínas de membrana mediante ensayos enzimáticos.
4. La metodología desarrollada permite elaborar microarrays de membranas celulares funcionales para el estudio de diferentes patologías a partir de diferentes modelos experimentales como las líneas celulares normales o transfectadas, animales control, modificados genéticamente o sometidos a diferentes tratamientos.
5. Es posible determinar la funcionalidad de los supercomplejos en homogeneizados de membranas celulares mediante el estudio de la actividad citocromo c oxidasa en presencia del sustrato del complejo I mitocondrial NADH.
6. Los ligandos cannabinoides actúan interaccionando de manera directa con la mitocondria en el lugar de unión del transportador ubiquinona en los complejos mitocondriales. Esta acción, junto con las desarrolladas tras la activación o bloqueo de los receptores cannabinoides, está implicada en la regulación del metabolismo celular.
7. En definitiva, los microarrays de membranas celulares son una herramienta útil para el estudio de las proteínas de membrana mediante diferentes técnicas farmacológicas, pudiéndose determinar la densidad y la actividad de las proteínas de membrana en múltiples muestras simultáneamente,

contribuyendo de este modo, a disminuir la variabilidad intraexperimental así como a reducir la cantidad de tejido a utilizar, los reactivos y el tiempo de experimentación y análisis.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abrams P., Andersson K. E., Buccafusco J. J., Chapple C., de Groat W. C., Fryer A. D., Kay G., Laties A., Nathanson N. M., Pasricha P. J., Wein A. J. (2006) Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br. J. Pharmacol.* 148, 565-578.
- Achilli C., Grandi S., Ciana A., Balduini C., Minetti G. (2014) Reduction of nitroblue tetrazolium to formazan by folic acid. *Chemical papers.* 5, 662-667.
- Adinolfi B., Romanini A., Vanni A., Martinotti E., Chicca A., Fogli S. and Nieri P. (2013) Anticancer activity of anandamide in human cutaneous melanoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 718, 154-159.
- Akam E. C., Challiss R. A. and Nahorski S. R. (2001) G(q/11) and G(i/o) activation profiles in CHO cells expressing human muscarinic acetylcholine receptors: dependence on agonist as well as receptor-subtype. *Br. J. Pharmacol.* 132, 950-958.
- Alger B. E., Tang A. H. (2012) Do cannabinoids reduce brain power? *Nat. Neurosci.* 15, 499-501.
- Al-Hasani R., Bruchas M. R. (2011) Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology.* 115, 1363-1381.
- Andreeva A. V., Kutuzov M. A., Voyno-Yasenetskaya T. A. (2008) G alpha12 is targeted to the mitochondria and affects mitochondrial morphology and motility. *FASEB J.* 22, 2821-2831.
- Arnold S. (2012) The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion.* 12, 46-56.
- Athanasiou A., Clarke A. B., Turner A. E., Kumaran N. M., Vakilpour S., Smith P. A., Bagiokou D., Bradshaw T. D., Westwell A. D., Fang L., Lobo D. N., Constantinescu C. S., Calabrese V., Loesch A., Alexander S. P., Clothier R. H., Kendall D. A., Bates T. E. (2007) Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 131-137.
- Babbitt S. E., Sutherland M. C., Francisco B. S., Mendez D. L., Kranz R. G. (2015) Mitochondrial cytochrome c biogenesis: no longer an enigma. *Trends Biochem. Sci.* 40, 446-455.
- Bailey S. N., Wu R. Z., Sabatini D. M. (2002) Applications of transfected cell microarrays in high-throughput drug discovery. *Drug Discov. Today.* 7, S113-8.
- Barreda-Gomez G. (2007) Receptores de galanina y su interacción con el sistema colinérgico.

- Barreda-Gomez G., Giralt M. T., Rodriguez-Puertas R. (2005) Effects of central galanin administration on muscarinic cholinergic and galanin receptor G protein coupling. *Neuropeptides*. 39, 157-160.
- Barreda-Gomez G., Lombardero L., Giralt M. T., Manuel I., Rodriguez-Puertas R. (2015) Effects of galanin subchronic treatment on memory and muscarinic receptors. *Neuroscience*. 293, 23-34.
- Bartova A., Birmingham M. K. (1976) Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on mitochondrial NADH-oxidase activity. *J. Biol. Chem.* 251, 5002-5006.
- Benard G., Massa F., Puente N., Lourenco J., Bellocchio L., Soria-Gomez E., Matias I., Delamarre A., Metna-Laurent M., Cannich A., Hebert-Chatelain E., Mulle C., Ortega-Gutierrez S., Martin-Fontecha M., Klugmann M., Guggenhuber S., Lutz B., Gertsch J., Chaouloff F., Lopez-Rodriguez M. L., Grandes P., Rossignol R., Marsicano G. (2012) Mitochondrial CB(1) receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.* 15, 558-564.
- Bensaid M., Gary-Boho M., Esclangon A., Maffrand J. P., Le Fur G., Oury-Donat F., Soubrie P. (2003) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol. Pharmacol.* 63, 908-914.
- Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 127-152.
- Bertini I., Cavallaro G., Rosato A. (2006) Cytochrome c: occurrence and functions. *Chem. Rev.* 106, 90-115.
- Bischoff S., Leonhard S., Reymann N., Schuler V., Shigemoto R., Kaupmann K., Bettler B. (1999) Spatial distribution of GABA(B)R1 receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 412, 1-16.
- Blandini F., Nappi G., Tassorelli C., Martignoni E. (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 62, 63-88.
- Blazquez C., Carracedo A., Barrado L., Real P. J., Fernandez-Luna J. L., Velasco G., Malumbres M. and Guzman M. (2006) Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J.* 20, 2633-2635.
- Bleier L., Droese S. (2013) Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim. Biophys. Acta.* 1827, 1320-1331.
- Blohm D. H., Guiseppi-Elie A. (2001) New developments in microarray technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 41-47.
- Bowery N. G. (2006) GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 37-43.

- Bowery N. G. (1993) GABAB receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33, 109-147.
- Bowery N. G., Bettler B., Froestl W., Gallagher J. P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T. I., Enna S. J. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol. Rev.* 54, 247-264.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brand M. D. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466-472.
- Brann M. R., Ellis J., Jorgensen H., Hill-Eubanks D., Jones S. V. (1993) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes: localization and structure/function. *Prog. Brain Res.* 98, 121-127.
- Breivogel C. S., Sim L. J., Childers S. R. (1997) Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 1632-1642.
- Brown D. A. (2010) Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms. *J. Mol. Neurosci.* 41, 340-346.
- Bumgarner R. (2013) Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 22, Unit 22.1.
- Calon F., Lavertu N., Lemieux A. M., Morissette M., Goulet M., Grondin R., Blanchet P. J., Bedard P. J., Di Paolo T. (2001) Effect of MPTP-induced denervation on basal ganglia GABA(B) receptors: correlation with dopamine concentrations and dopamine transporter. *Synapse.* 40, 225-234.
- Calon F., Morissette M., Goulet M., Grondin R., Blanchet P. J., Bedard P. J., Di Paolo T. (2000) 125I-CGP 64213 binding to GABA(B) receptors in the brain of monkeys: effect of MPTP and dopaminomimetic treatments. *Exp. Neurol.* 163, 191-199.
- Calver A. R., Medhurst A. D., Robbins M. J., Charles K. J., Evans M. L., Harrison D. C., Stammers M., Hughes S. A., Hervieu G., Couve A., Moss S. J., Middlemiss D. N., Pangalos M. N. (2000) The expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience.* 100, 155-170.
- Capdevila D. A., Oviedo Rouco S., Tomasina F., Tortora V., Demicheli V., Radi R., Murgida D. H. (2015) Active Site Structure and Peroxidase Activity of Oxidatively Modified Cytochrome c Species in Complexes with Cardiolipin. *Biochemistry.* 54, 7491-7504.

- Capece M. L., Baghdoyan H. A., Lydic R. (1998) Carbachol stimulates [35S]guanylyl 5'-(gamma-thio)-triphosphate binding in rapid eye movement sleep-related brainstem nuclei of rat. *J. Neurosci.* 18, 3779-3785.
- Castel D., Pitaval A., Debily M. A., Gidrol X. (2006) Cell microarrays in drug discovery. *Drug Discov. Today.* 11, 616-622.
- Castelli M. P., Ingianni A., Stefanini E., Gessa G. L. (1999) Distribution of GABA(B) receptor mRNAs in the rat brain and peripheral organs. *Life Sci.* 64, 1321-1328.
- Catanzaro G., Rapino C., Oddi S., Maccarrone M. (2009) Anandamide increases swelling and reduces calcium sensitivity of mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 439-442.
- Caulfield M. P., Birdsall N. J. (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* 50, 279-290.
- Chaban Y., Boekema E. J., Dudkina N. V. (2014) Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1837, 418-426.
- Chandel N. S. (2010) Mitochondrial complex III: an essential component of universal oxygen sensing machinery? *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 175-181.
- Chang S., Lamm S. H. (2003) Human health effects of sodium azide exposure: a literature review and analysis. *Int. J. Toxicol.* 22, 175-186.
- Charles K. J., Calver A. R., Jourdain S., Pangalos M. N. (2003) Distribution of a GABAB-like receptor protein in the rat central nervous system. *Brain Res.* 989, 135-146.
- Charles K. J., Evans M. L., Robbins M. J., Calver A. R., Leslie R. A., Pangalos M. N. (2001) Comparative immunohistochemical localisation of GABA(B1a), GABA(B1b) and GABA(B2) subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion. *Neuroscience.* 106, 447-467.
- Chen L., Togasaki D. M., Langston J. W., Di Monte D. A., Quik M. (2005) Enhanced striatal opioid receptor-mediated G-protein activation in L-DOPA-treated dyskinetic monkeys. *Neuroscience.* 132, 409-420.
- Chiken S., Hatanaka N., Tokuno H. (2003) Cytochrome oxidase activity in the monkey globus pallidus and subthalamic nucleus after ablation of striatal interneurons expressing substance P receptors. *Neurosci. Lett.* 353, 103-106.
- Chiu P., Karler R., Craven C., Olsen D. M., Turkanis S. A. (1975) The influence of delta9-tetrahydrocannabinol, cannabiniol and cannabidiol on tissue oxygen consumption. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 12, 267-286.

- Choi E. M., Lee Y. S. (2011) Mitochondrial defects and cytotoxicity by antimycin A on cultured osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2459-2463.
- Console-Bram L., Marcu J., Abood M. E. (2012) Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 38, 4-15.
- Contet C., Kieffer B. L., Befort K. (2004) Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 370-378.
- Costa B. and Colleoni M. (2000) Changes in rat brain energetic metabolism after exposure to anandamide or Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Eur. J. Pharmacol.* 395, 1-7.
- Covian R., Trumpower B. L. (2006) Regulatory interactions between ubiquinol oxidation and ubiquinone reduction sites in the dimeric cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* 281, 30925-30932.
- Crofts A. R. (2004) The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 689-733.
- D'Addario C., Micioni Di Bonaventura M. V., Pucci M., Romano A., Gaetani S., Ciccocioppo R., Cifani C., Maccarrone M. (2014) Endocannabinoid signaling and food addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 47, 203-224.
- Dannenberg A. M., Jr, Schofield B. H., Rao J. B., Dinh T. T., Lee K., Boulay M., Abe Y., Tsuruta J., Steinbeck M. J. (1994) Histochemical demonstration of hydrogen peroxide production by leukocytes in fixed-frozen tissue sections of inflammatory lesions. *J. Leukoc. Biol.* 56, 436-443.
- Dauer W., Przedborski S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 39, 889-909.
- Debets M. F., van der Doelen C. W., Rutjes F. P., van Delft F. L. (2010) Azide: a unique dipole for metal-free bioorthogonal ligations. *Chembiochem.* 11, 1168-1184.
- Degli Esposti M. (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364, 222-235.
- Dencker D., Thomsen M., Wortwein G., Weikop P., Cui Y., Jeon J., Wess J., Fink-Jensen A. (2012) Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes as Potential Drug Targets for the Treatment of Schizophrenia, Drug Abuse and Parkinson's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* 3, 80-89.
- Dhawan B. N., Cesselin F., Raghbir R., Reisine T., Bradley P. B., Portoghese P. S., Hamon M. (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.* 48, 567-592.
- Donadelli M., Dando I., Zaniboni T., Costanzo C., Dalla Pozza E., Scupoli M. T., Scarpa A., Zappavigna S., Marra M., Abbruzzese A., Bifulco M., Caraglia M., Palmieri M. (2011) Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in

- pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism. *Cell. Death Dis.* 2, e152.
- Dudkina N. V., Kouril R., Peters K., Braun H. P., Boekema E. J. (2010) Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797, 664-670.
- Egertova M., Elphick M. R. (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J. Comp. Neurol.* 422, 159-171.
- Eglen R. M. (2012) Overview of muscarinic receptor subtypes. *Handb. Exp. Pharmacol.* (208):3-28. doi, 3-28.
- Eglen R. M., Bosse R., Reisine T. (2007) Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev. Technol.* 5, 425-451.
- Eisen M. B., Brown P. O. (1999) DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* 303, 179-205.
- Epstein C. B., Butow R. A. (2000) Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 36-41.
- Esfandiari N., Sharma R. K., Saleh R. A., Thomas A. J., Jr, Agarwal A. (2003) Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J. Androl.* 24, 862-870.
- Esser L., Quinn B., Li Y. F., Zhang M., Elberry M., Yu L., Yu C. A., Xia D. (2004) Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome bc(1) complex. *J. Mol. Biol.* 341, 281-302.
- Exner N., Lutz A. K., Haass C., Winklhofer K. F. (2012) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J.* 31, 3038-3062.
- Fang Y., Frutos A. G., Lahiri J. (2002a) G-protein-coupled receptor microarrays. *Chembiochem.* 3, 987-991.
- Fang Y., Frutos A. G., Lahiri J. (2002b) Membrane protein microarrays. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2394-2395.
- Fang Y., Lahiri J., Picard L. (2003) G protein-coupled receptor microarrays for drug discovery. *Drug Discov. Today.* 8, 755-761.
- Fang Y., Peng J., Ferrie A. M., Burkhalter R. S. (2006) Air-stable G protein-coupled receptor microarrays and ligand binding characteristics. *Anal. Chem.* 78, 149-155.

- Fato R., Bergamini C., Bortolus M., Maniero A. L., Leoni S., Ohnishi T., Lenaz G. (2009) Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787, 384-392.
- Fato R., Estornell E., Di Bernardo S., Pallotti F., Parenti Castelli G. and Lenaz G. (1996) Steady-state kinetics of the reduction of coenzyme Q analogs by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in bovine heart mitochondria and submitochondrial particles. *Biochemistry.* 35, 2705-2716.
- Feng Y., He X., Yang Y., Chao D., Lazarus L. H., Xia Y. (2012) Current research on opioid receptor function. *Curr. Drug Targets.* 13, 230-246.
- Fillingame R. H., Steed P. R. (2014) Half channels mediating H(+) transport and the mechanism of gating in the Fo sector of Escherichia coli F1Fo ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1837, 1063-1068.
- Fisar Z. (2010) Inhibition of monoamine oxidase activity by cannabinoids. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 381, 563-572.
- Fisar Z., Singh N., Hroudova J. (2014) Cannabinoid-induced changes in respiration of brain mitochondria. *Toxicol. Lett.* 231, 62-71.
- Fonseca B. M., Correia-da-Silva G. and Teixeira N. A. (2013a) The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation. *Apoptosis.* 18, 1526-1535.
- Fonseca B. M., Costa M. A., Almada M., Correia-da-Silva G., Teixeira N. A. (2013b) Endogenous cannabinoids revisited: a biochemistry perspective. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 102-103, 13-30.
- Frey K. A., Ehrenkauf R. L., Agranoff B. W. (1985) Quantitative in vivo receptor binding. II. Autoradiographic imaging of muscarinic cholinergic receptors. *J. Neurosci.* 5, 2407-2414.
- Fujita W., Gomes I., Devi L. A. (2014) Revolution in GPCR signalling: opioid receptor heteromers as novel therapeutic targets: IUPHAR review 10. *Br. J. Pharmacol.* 171, 4155-4176.
- Garcia-Jimenez A., Cowburn R. F., Winblad B., Fastbom J. (1997) Autoradiographic characterisation of [35S]GTP gamma S binding sites in rat brain. *Neurochem. Res.* 22, 1055-1063.
- Genova M. L., Baracca A., Biondi A., Casalena G., Faccioli M., Falasca A. I., Formiggini G., Sgarbi G., Solaini G., Lenaz G. (2008) Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochim. Biophys. Acta.* 1777, 740-746.
- Genova M. L., Lenaz G. (2014) Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1837, 427-443.

- Genova M. L., Lenaz G. (2011) New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *Biofactors*. 37, 330-354.
- Gether U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21, 90-113.
- Giege P., Grienenberger J. M., Bonnard G. (2008) Cytochrome c biogenesis in mitochondria. *Mitochondrion*. 8, 61-73.
- Giuliano M., Calvaruso G., Pellerito O., Portanova P., Carlisi D., Vento R. and Tesoriere G. (2006) Anandamide-induced apoptosis in Chang liver cells involves ceramide and JNK/AP-1 pathway. *Int. J. Mol. Med.* 17, 811-819.
- Glinn M. A., Lee C. P. and Ernster L. (1997) Pro- and anti-oxidant activities of the mitochondrial respiratory chain: factors influencing NAD(P)H-induced lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1318, 246-254.
- Gonzalez S., Scorticati C., Garcia-Arencibia M., de Miguel R., Ramos J. A., Fernandez-Ruiz J. (2006) Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1073-1074, 209-219.
- Gonzalez-Cabrera P. J., Jo E., Sanna M. G., Brown S., Leaf N., Marsolais D., Schaeffer M. T., Chapman J., Cameron M., Guerrero M., Roberts E., Rosen H. (2008) Full pharmacological efficacy of a novel S1P1 agonist that does not require S1P-like headgroup interactions. *Mol. Pharmacol.* 74, 1308-1318.
- Gonzalez-Maeso J., Rodriguez-Puertas R., Gabilondo A. M., Meana J. J. (2000) Characterization of receptor-mediated [<sup>35</sup>S]GTPgammaS binding to cortical membranes from postmortem human brain. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 25-36.
- Grimm S. (2013) Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1827, 565-572.
- Grivennikova V. G., Maklashina E. O., Gavrikova E. V. and Vinogradov A. D. (1997) Interaction of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase with rotenone as related to the enzyme active/inactive transition. *Biochim. Biophys. Acta.* 1319, 223-232.
- Gross V. S., Greenberg H. K., Baranov S. V., Carlson G. M., Stavrovskaya I. G., Lazarev A. V., Kristal B. S. (2011) Isolation of functional mitochondria from rat kidney and skeletal muscle without manual homogenization. *Anal. Biochem.* 418, 213-223.
- Haelterman N. A., Yoon W. H., Sandoval H., Jaiswal M., Shulman J. M., Bellen H. J. (2014) A mitocentric view of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 37, 137-159.
- Hao M. X., Jiang L. S., Fang N. Y., Pu J., Hu L. H., Shen L. H., Song W., He B. (2010) The cannabinoid WIN55,212-2 protects against oxidized LDL-induced inflammatory response in murine macrophages. *J. Lipid Res.* 51, 2181-2190.

- Happe H. K., Bylund D. B., Murrin L. C. (2001) Agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS autoradiography: optimization for high sensitivity. *Eur. J. Pharmacol.* 422, 1-13.
- Harrington C. A., Rosenow C., Retief J. (2000) Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 285-291.
- Harris D. A., Das A. M. (1991) Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.* 280 ( Pt 3), 561-573.
- Harrison C., Traynor J. R. (2003) The [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* 74, 489-508.
- Hebert-Chatelain E., Reguero L., Puente N., Lutz B., Chaouloff F., Rossignol R., Piazza P. V., Benard G., Grandes P., Marsicano G. (2014) Cannabinoid control of brain bioenergetics: Exploring the subcellular localization of the CB1 receptor. *Mol. Metab.* 3, 495-504.
- Heilker R., Wolff M., Tautermann C. S., Bieler M. (2009) G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug Discov. Today.* 14, 231-240.
- Helmich R. C., Janssen M. J., Oyen W. J., Bloem B. R., Toni I. (2011) Pallidal dysfunction drives a cerebellothalamic circuit into Parkinson tremor. *Ann. Neurol.* 69, 269-281.
- Henchcliffe C., Beal M. F. (2008) Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 4, 600-609.
- Heng B. C., Aubel D., Fussenegger M. (2013) An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. *Biotechnol. Adv.* 31, 1676-1694.
- Herkenham M., Lynn A. B., Johnson M. R., Melvin L. S., de Costa B. R., Rice K. C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563-583.
- Hermans E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 99, 25-44.
- Higgins D. S., Jr, Greenamyre J. T. (1996) [<sup>3</sup>H]dihydrorotenone binding to NADH: ubiquinone reductase (complex I) of the electron transport chain: an autoradiographic study. *J. Neurosci.* 16, 3807-3816.
- Hirst J. (2013) Mitochondrial complex I. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 551-575.
- Hoglinger G. U., Alvarez-Fischer D., Arias-Carrion O., Djufri M., Windolph A., Keber U., Borta A., Ries V., Schwarting R. K., Scheller D., Oertel W. H. (2015) A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathol.* 130, 333-348.

- Hong Y., Webb B. L., Pai S., Ferrie A., Peng J., Lai F., Lahiri J., Biddlecome G., Rasnow B., Johnson M., Min H., Fang Y., Salon J. (2006) G-protein-coupled receptor microarrays for multiplexed compound screening. *J. Biomol. Screen.* 11, 435-438.
- Hong Y., Webb B. L., Su H., Mozdy E. J., Fang Y., Wu Q., Liu L., Beck J., Ferrie A. M., Raghavan S., Mauro J., Carre A., Mueller D., Lai F., Rasnow B., Johnson M., Min H., Salon J., Lahiri J. (2005) Functional GPCR microarrays. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15350-15351.
- Howlett A. C., Barth F., Bonner T. I., Cabral G., Casellas P., Devane W. A., Felder C. C., Herkenham M., Mackie K., Martin B. R., Mechoulam R., Pertwee R. G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161-202.
- Huang L. S., Cobessi D., Tung E. Y., Berry E. A. (2005) Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J. Mol. Biol.* 351, 573-597.
- Hulme E. C., Birdsall N. J., Buckley N. J. (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 633-673.
- Hwang M. S., Rohlena J., Dong L. F., Neuzil J., Grimm S. (2014) Powerhouse down: Complex II dissociation in the respiratory chain. *Mitochondrion.* 19 Pt A, 20-28.
- Ishii I., Fukushima N., Ye X., Chun J. (2004) Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 321-354.
- Ito Y., Oyunzul L., Seki M., Fujino Oki T., Matsui M., Yamada S. (2009) Quantitative analysis of the loss of muscarinic receptors in various peripheral tissues in M1-M5 receptor single knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 156, 1147-1153.
- Jakowec M. W., Petzinger G. M. (2004) 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Lesioned Model of Parkinson's Disease, with Emphasis on Mice and Nonhuman Primates. *Comp. Med.* 54, 497-513.
- Jakubik J., Michal P., Machova E. and Dolezal V. (2008) Importance and prospects for design of selective muscarinic agonists. *Physiol. Res.* 57 Suppl 3, S39-47.
- Janssen A. J., Trijbels F. J., Sengers R. C., Smeitink J. A., van den Heuvel L. P., Wintjes L. T., Stoltenborg-Hogenkamp B. J., Rodenburg R. J. (2007) Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin. Chem.* 53, 729-734.
- Jiang X., Wang X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 87-106.

- Johansson P. A., Andersson M., Andersson K. E., Cenci M. A. (2001) Alterations in cortical and basal ganglia levels of opioid receptor binding in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol. Dis.* 8, 220-239.
- Johnston T., Duty S. (2003) Changes in GABA(B) receptor mRNA expression in the rodent basal ganglia and thalamus following lesion of the nigrostriatal pathway. *Neuroscience.* 120, 1027-1035.
- Jonckheere A. I., Smeitink J. A., Rodenburg R. J. (2012) Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 211-225.
- Junge W., Nelson N. (2015) ATP synthase. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 631-657.
- Kadenbach B., Huttemann M. (2015) The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion.* 24, 64-76.
- Kamoto 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, Galpha/q,11. *Front. Cardiovasc. Med.* 2, 14.
- Kellar K. J., Martino A. M., Hall D. P., Jr, Schwartz R. D., Taylor R. L. (1985) High-affinity binding of [3H]acetylcholine to muscarinic cholinergic receptors. *J. Neurosci.* 5, 1577-1582.
- Kenakin T. (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 346-354.
- Khawaja X., Dunlop J., Kowal D. (2008) Scintillation proximity assay in lead discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 3, 1267-1280.
- Kihara Y., Maceyka M., Spiegel S., Chun J. (2014) Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *Br. J. Pharmacol.* 171, 3575-3594.
- Klabunde T., Hessler G. (2002) Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem.* 3, 928-944.
- Kodadek T. (2001) Protein microarrays: prospects and problems. *Chem. Biol.* 8, 105-115.
- Kogan N. M., Schlesinger M., Priel E., Rabinowitz R., Berenshtein E., Chevion M., Mechoulam R. (2007) HU-331, a novel cannabinoid-based anticancer topoisomerase II inhibitor. *Mol. Cancer. Ther.* 6, 173-183.
- Koval A., Kopein D., Purvanov V., Katanaev V. L. (2010) Europium-labeled GTP as a general nonradioactive substitute for [(35)S]GTPgammaS in high-throughput G protein studies. *Anal. Biochem.* 397, 202-207.
- Kowaltowski A. J., de Souza-Pinto N. C., Castilho R. F., Vercesi A. E. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333-343.

- Krauss S. (2001) Mitochondria: Structure and Role in Respiration, in eLS, (Anonymous ). John Wiley & Sons, Ltd.
- Kussmaul L. and Hirst J. (2006) The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7607-7612.
- Lastres-Becker I., Cebeira M., de Ceballos M. L., Zeng B. Y., Jenner P., Ramos J. A., Fernandez-Ruiz J. J. (2001) Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1827-1832.
- Ledent C., Valverde O., Cossu G., Petitet F., Aubert J. F., Beslot F., Bohme G. A., Imperato A., Pedrazzini T., Roques B. P., Vassart G., Fratta W., Parmentier M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science.* 283, 401-404.
- Lenaz G., Baracca A., Barbero G., Bergamini C., Dalmonte M. E., Del Sole M., Faccioli M., Falasca A., Fato R., Genova M. L., Sgarbi G., Solaini G. (2010) Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797, 633-640.
- Lenaz G., Fato R., Formiggini G., Genova M. L. (2007) The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion.* 7 Suppl, S8-33.
- Lenaz G., Genova M. L. (2010) Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 961-1008.
- Lenaz G., Genova M. L. (2009) Mobility and function of coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787, 563-573.
- Levey A. I., Kitt C. A., Simonds W. F., Price D. L., Brann M. R. (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* 11, 3218-3226.
- Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J. A., Robinson J. P. (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* 278, 8516-8525.
- Lipina C., Irving A. J., Hundal H. S. (2014) Mitochondria: a possible nexus for the regulation of energy homeostasis by the endocannabinoid system? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 307, E1-13.
- Lorenzen A., Beukers M. W., van der Graaf P. H., Lang H., van Muijlwijk-Koezen J., de Groote M., Menge W., Schwabe U., IJzerman A. P. (2002) Modulation of agonist responses at the A(1) adenosine receptor by an irreversible antagonist, receptor-G protein uncoupling and by the G protein activation state. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1251-1265.

- Lorenzen A., Fuss M., Vogt H., Schwabe U. (1993) Measurement of guanine nucleotide-binding protein activation by A1 adenosine receptor agonists in bovine brain membranes: stimulation of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding. *Mol. Pharmacol.* 44, 115-123.
- Lummen P. (1998) Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364, 287-296.
- Lynn A. B., Herkenham M. (1994) Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 1612-1623.
- Lyssand J. S., Bajjalieh S. M. (2007) The heterotrimeric [corrected] G protein subunit G alpha i is present on mitochondria. *FEBS Lett.* 581, 5765-5768.
- Ma X., Jin M., Cai Y., Xia H., Long K., Liu J., Yu Q., Yuan J. (2011) Mitochondrial electron transport chain complex III is required for antimycin A to inhibit autophagy. *Chem. Biol.* 18, 1474-1481.
- Maccarrone M., Lorenzon T., Bari M., Melino G., Finazzi-Agro A. (2000) Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 31938-31945.
- Mackie K., Stella N. (2006) Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* 8, E298-306.
- Maklashina E., Cecchini G. (2010) The quinone-binding and catalytic site of complex II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797, 1877-1882.
- Manuel I., Barreda-Gomez G., Gonzalez de San Roman E., Veloso A., Fernandez J. A., Giralt M. T., Rodriguez-Puertas R. (2015) Neurotransmitter receptor localization: from autoradiography to imaging mass spectrometry. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 362-373.
- Manuel I., Gonzalez de San Roman E., Giralt M. T., Ferrer I., Rodriguez-Puertas R. (2014) Type-1 cannabinoid receptor activity during Alzheimer's disease progression. *J. Alzheimers Dis.* 42, 761-766.
- Margeta-Mitrovic M., Mitrovic I., Riley R. C., Jan L. Y., Basbaum A. I. (1999) Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 405, 299-321.
- Mavridou D. A., Ferguson S. J., Stevens J. M. (2013) Cytochrome c assembly. *IUBMB Life.* 65, 209-216.
- McBride W. J., Chernet E., McKinzie D. L., Lumeng L., Li T. K. (1998) Quantitative autoradiography of mu-opioid receptors in the CNS of alcohol-naive alcohol-preferring P and -nonpreferring NP rats. *Alcohol.* 16, 317-323.

- McCarson K. E., Enna S. J. (2014) GABA pharmacology: the search for analgesics. *Neurochem. Res.* 39, 1948-1963.
- McDonald J., Lambert D. G. (2005) Opioid receptors. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain.* 5, 22-25.
- Milligan G. (2003) Principles: extending the utility of [<sup>35</sup>S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 87-90.
- Minarik P., Tomaskova N., Kollarova M., Antalík M. (2002) Malate dehydrogenases--structure and function. *Gen. Physiol. Biophys.* 21, 257-265.ø Choi
- Mishina Y. M., Wilson C. J., Bruett L., Smith J. J., Stoop-Myer C., Jong S., Amaral L. P., Pedersen R., Lyman S. K., Myer V. E., Kreider B. L., Thompson C. M. (2004) Multiplex GPCR assay in reverse transfection cell microarrays. *J. Biomol. Screen.* 9, 196-207.
- Mitchell P. (2002) A perspective on protein microarrays. *Nat. Biotechnol.* 20, 225-229.
- Mitchell P. (1961) Coupling of phodphorilation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 144-148.
- Miyoshi H. (1998) Structure-activity relationships of some complex I inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364, 236-244.
- Moldrich G., Wenger T. (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides.* 21, 1735-1742.
- Molhoj S., Hansen H. S., Schweiger M., Zimmermann R., Johansen T., Malmlof K. (2010) Effect of the cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant on lipolysis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 646, 38-45.
- Moran J. M., Enna S. J., McCarson K. E. (2001) Developmental regulation of GABA(B) receptor function in rat spinal cord. *Life Sci.* 68, 2287-2295.
- Mullinax T. R., Mock J. N., McEvily A. J., Harrison J. H. (1982) Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase. Evidence for an allosteric citrate-binding site. *J. Biol. Chem.* 257, 13233-13239.
- Musatov A., Robinson N. C. (2014) Bound cardiolipin is essential for cytochrome c oxidase proton translocation. *Biochimie.* 105, 159-164.
- Nachlas M. M., Tsou K. C., de Souza E., Cheng C. S., Seligman A. M. (1957) Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* 5, 420-436.
- Nelson D. L., Cox M. M., Lehninger A. L. (2013) *Lehninger principles of biochemistry.* W. H. Freeman and Company, New York.

- Niu F., Zhao S., Xu C. Y., Sha H., Bi G. B., Chen L., Ye L., Gong P. and Nie T. H. (2015) Potentiation of the antitumor activity of adriamycin against osteosarcoma by cannabinoid WIN-55,212-2. *Oncol. Lett.* 10, 2415-2421.
- Nunn A., Guy G., Bell J. D. (2012) Endocannabinoids in neuroendopsychology: multiphasic control of mitochondrial function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367, 3342-3352.
- Odagaki Y., Kinoshita M., Toyoshima R. (2014) Functional activation of G-proteins coupled with muscarinic acetylcholine receptors in rat brain membranes. *J. Pharmacol. Sci.* 125, 157-168.
- Oki T., Takagi Y., Inagaki S., Taketo M. M., Manabe T., Matsui M., Yamada S. (2005) Quantitative analysis of binding parameters of [<sup>3</sup>H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 133, 6-11.
- Okun J. G., Lummen P., Brandt U. (1999) Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *J. Biol. Chem.* 274, 2625-2630.
- Okuno D., Iino R., Noji H. (2011) Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. *J. Biochem.* 149, 655-664.
- O'Sullivan C., Dev K. K. (2013) The structure and function of the S1P1 receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 401-412.
- Papa S. M. (2008) The cannabinoid system in Parkinson's disease: multiple targets to motor effects. *Exp. Neurol.* 211, 334-338.
- Perier C., Vila M. (2012) Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 2, a009332.
- Perry E. K., Marshall E., Perry R. H., Irving D., Smith C. J., Blessed G., Fairbairn A. F. (1990) Cholinergic and dopaminergic activities in senile dementia of Lewy body type. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 4, 87-95.
- Pertwee R. G. (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* 74, 129-180.
- Pertwee R. G., Howlett A. C., Abood M. E., Alexander S. P., Di Marzo V., Elphick M. R., Greasley P. J., Hansen H. S., Kunos G., Mackie K., Mechoulam R., Ross R. A. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol. Rev.* 62, 588-631.
- Peters M., Kogan N. M. (2007) HU-331: a cannabinoid quinone, with uncommon cytotoxic properties and low toxicity. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 16, 1405-1413.

- Pettit D. A., Harrison M. P., Olson J. M., Spencer R. F., Cabral G. A. (1998) Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 51, 391-402.
- Pfeiffer K., Gohil V., Stuart R. A., Hunte C., Brandt U., Greenberg M. L. and Schagger H. (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 52873-52880.
- Piggott M. A., Owens J., O'Brien J., Colloby S., Fenwick J., Wyper D., Jaros E., Johnson M., Perry R. H., Perry E. K. (2003) Muscarinic receptors in basal ganglia in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *J. Chem. Neuroanat.* 25, 161-173.
- Pontari M. A., Luthin G. R., Braverman A. S., Ruggieri M. R. (1998) Characterization of muscarinic cholinergic receptor subtypes in rat prostate. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 18, 151-166.
- Porter R. H., Greene J. G., Higgins D. S. Jr., Greenamyre J. T. (1994) Polysynaptic regulation of glutamate receptors and mitochondrial enzyme activities in the basal ganglia of rats with unilateral dopamine depletion. *J. Neurosci.* 14, 7192-7199.
- Posner B., Hong Y., Benvenuti E., Potchoiba M., Nettleton D., Lui L., Ferrie A., Lai F., Fang Y., Miret J., Wielis C., Webb B. (2007) Multiplexing G protein-coupled receptors in microarrays: a radioligand-binding assay. *Anal. Biochem.* 365, 266-273.
- Poulin B., Butcher A., McWilliams P., Bourgoignon J. M., Pawlak R., Kong K. C., Bottrill A., Mistry S., Wess J., Rosethorne E. M., Charlton S. J. and Tobin A. B. (2010) The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9440-9445.
- Prager B., Spampinato S. F., Ransohoff R. M. (2015) Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier. *Trends Mol. Med.* 21, 354-363.
- Prather P. L., Martin N. A., Breivogel C. S., Childers S. R. (2000) Activation of cannabinoid receptors in rat brain by WIN 55212-2 produces coupling to multiple G protein alpha-subunits with different potencies. *Mol. Pharmacol.* 57, 1000-1010.
- Przedborski S., Vila M. (2001) The last decade in Parkinson's disease research. *Basic sciences. Adv. Neurol.* 86, 177-186.
- Quinlan C. L., Orr A. L., Perevoshchikova I. V., Treberg J. R., Ackrell B. A., Brand M. D. (2012) Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 287, 27255-27264.

- Quinlan C. L., Perevoshchikova I. V., Hey-Mogensen M., Orr A. L., Brand M. D. (2013) Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.* 1, 304-312.
- Rangel-Lopez E., Colin-Gonzalez A. L., Paz-Loyola A. L., Pinzon E., Torres I., Serratos I. N., Castellanos P., Wajner M., Souza D. O., Santamaria A. (2015) Cannabinoid receptor agonists reduce the short-term mitochondrial dysfunction and oxidative stress linked to excitotoxicity in the rat brain. *Neuroscience.* 285, 97-106.
- Ransac S., Mazat J. P. (2010) How does antimycin inhibit the bc1 complex? A part-time twin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797, 1849-1857.
- Regal K. M., Mercer S. L., Deweese J. E. (2014) HU-331 is a catalytic inhibitor of topoisomerase IIalpha. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 2044-2051.
- Rice W., Shannon J. M., Burton F., Fiedeldej D. (1997) Expression of a brain-type cannabinoid receptor (CB1) in alveolar Type II cells in the lung: regulation by hydrocortisone. *Eur. J. Pharmacol.* 327, 227-232.
- Rich P. R., Marechal A. (2010) The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 47, 1-23.
- Rieske J. S., Lipton S. H., Baum H., Silman H. I. (1967) Factors affecting the binding of antimycin A to complex 3 of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 242, 4888-4896.
- Roche R., Hoareau L., Bes-Houtmann S., Gonthier M. P., Laborde C., Baron J. F., Haffaf Y., Cesari M., Festy F. (2006) Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem. Cell Biol.* 126, 177-187.
- Rodriguez-Puertas R., Barreda-Gomez G., Fernandez-Gonzales J. A., Astigarraga E., Aranzabe A., Marcaide A., Gomez-Plaza D. (2008) Method for the surface treatment of solid substrates. (WO/2008/012391).
- Rodriguez-Puertas R., Barreda-Gomez G., Giralt M. T., Fernandez-Pastor B. (2007) Method of quantifying the G protein-coupled receptor (GPCR)/G protein coupling using a cell membrane array. (WO/2007/012688).
- Rodriguez-Puertas R., Gonzalez-Maeso J., Meana J. J., Pazos A. (2000) Autoradiography of receptor-activated G-proteins in post mortem human brain. *Neuroscience.* 96, 169-180.
- Rodriguez-Puertas R., Pascual J., Vilaro T., Pazos A. (1997) Autoradiographic distribution of M1, M2, M3, and M4 muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease. *Synapse.* 26, 341-350.
- Roels F. (1974) Letter: Cytochrome c and cytochrome oxidase in diaminobenzidine staining of mitochondria. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 442-444.

- Rosen H., Gonzalez-Cabrera P. J., Sanna M. G., Brown S. (2009) Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 743-768.
- Rosen H., Stevens R. C., Hanson M., Roberts E., Oldstone M. B. (2013) Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 637-662.
- Ruiz L., Miguel A., Diaz-Laviada I. (1999) Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Lett.* 458, 400-404.
- Rytomaa M. and Kinnunen P. K. (1994) Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 269, 1770-1774.
- Samadi P., Bedard P. J., Rouillard C. (2006) Opioids and motor complications in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 512-517.
- Sarafian T. A., Kouyoumjian S., Khoshaghideh F., Tashkin D. P., Roth M. D. (2003) Delta 9-tetrahydrocannabinol disrupts mitochondrial function and cell energetics. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L298-306.
- Saraste M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science.* 283, 1488-1493.
- Schafer E., Dencher N. A., Vonck J., Parcej D. N. (2007) Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria. *Biochemistry.* 46, 12579-12585.
- Schafer E., Seelert H., Reifschneider N. H., Krause F., Dencher N. A., Vonck J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 281, 15370-15375.
- Schagger H., Pfeiffer K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777-1783.
- Schapira A. H. (2010) Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Exp. Neurol.* 224, 331-335.
- Schlame M., Rua D. and Greenberg M. L. (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* 39, 257-288.
- Schweitzer B., Kingsmore S. F. (2002) Measuring proteins on microarrays. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 14-19.
- Seligman A. M., Karnovsky M. J., Wasserkrug H. L., Hanker J. S. (1968) Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol.* 38, 1-14.

- Selley D. E., Stark S., Sim L. J., Childers S. R. (1996) Cannabinoid receptor stimulation of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding in rat brain membranes. *Life Sci.* 59, 659-668.
- Sharma L. K., Lu J., Bai Y. (2009) Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr. Med. Chem.* 16, 1266-1277.
- Shrivastava A., Kuzontkoski P. M., Groopman J. E., Prasad A. (2011) Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol. Cancer. Ther.* 10, 1161-1172.
- Sielaff H., Borsch M. (2012) Twisting and subunit rotation in single F(O)(F1)-ATP synthase. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20120024.
- Sierra S., Luquin N., Rico A. J., Gomez-Bautista V., Roda E., Dopeso-Reyes I. G., Vazquez A., Martinez-Pinilla E., Labandeira-Garcia J. L., Franco R., Lanciego J. L. (2015) Detection of cannabinoid receptors CB1 and CB2 within basal ganglia output neurons in macaques: changes following experimental parkinsonism. *Brain Struct. Funct.* 220, 2721-2738.
- Sim L. J., Childers S. R. (1997) Anatomical distribution of mu, delta, and kappa opioid- and nociceptin/orphanin FQ-stimulated [35S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in guinea pig brain. *J. Comp. Neurol.* 386, 562-572.
- Sim L. J., Selley D. E., Childers S. R. (1995) In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7242-7246.
- Singh N., Hroudova J., Fisar Z. (2015) Cannabinoid-Induced Changes in the Activity of Electron Transport Chain Complexes of Brain Mitochondria. *J. Mol. Neurosci.* 56, 926-931.
- Smith C. J., Perry E. K., Perry R. H., Candy J. M., Johnson M., Bonham J. R., Dick D. J., Fairbairn A., Blessed G., Birdsall N. J. (1988) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in hippocampus in human cognitive disorders. *J. Neurochem.* 50, 847-856.
- Smith R. A., Hartley R. C., Cocheme H. M., Murphy M. P. (2012) Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 341-352.
- Smith R. P., Wilcox D. E. (1994) Toxicology of selected nitric oxide-donating xenobiotics, with particular reference to azide. *Crit. Rev. Toxicol.* 24, 355-377.
- Smith T. D., Annis S. J., Ehlert F. J., Leslie F. M. (1991) N-[3H]methylscopolamine labeling of non-M1, non-M2 muscarinic receptor binding sites in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 1173-1181.
- Sovago J., Dupuis D. S., Gulyas B., Hall H. (2001) An overview on functional receptor autoradiography using [35S]GTPgammaS. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38, 149-164.

- Starkov A. A., Fiskum G. (2001) Myxothiazol induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from mitochondrial respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 645-650.
- Strange P. G. (2010) Use of the GTPgammaS ([<sup>35</sup>S]GTPgammaS and Eu-GTPgammaS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1238-1249.
- Tedesco L., Valerio A., Dossena M., Cardile A., Ragni M., Pagano C., Pagotto U., Carruba M. O., Vettor R. and Nisoli E. (2010) Cannabinoid receptor stimulation impairs mitochondrial biogenesis in mouse white adipose tissue, muscle, and liver: the role of eNOS, p38 MAPK, and AMPK pathways. *Diabetes.* 59, 2826-2836.
- Tempel A., Zukin R. S. (1987) Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 4308-4312.
- Templin M. F., Stoll D., Schrenk M., Traub P. C., Vohringer C. F., Joos T. O. (2002) Protein microarray technology. *Drug Discov. Today.* 7, 815-822.
- Thomas R. L., Mistry R., Langmead C. J., Wood M. D. and Challiss R. A. (2008) G protein coupling and signaling pathway activation by m1 muscarinic acetylcholine receptor orthosteric and allosteric agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 365-374.
- Thomasy S. M., Moeller B. C., Stanley S. D. (2007) Comparison of opioid receptor binding in horse, guinea pig, and rat cerebral cortex and cerebellum. *Vet. Anaesth. Analg.* 34, 351-358.
- Tieu K. (2011) A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 1, a009316.
- Traynor J. R., Nahorski S. R. (1995) Modulation by mu-opioid agonists of guanosine-5'-O-(3-[<sup>35</sup>S]thio)triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Pharmacol.* 47, 848-854.
- Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M. C., Mackie K., Walker J. M. (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 83, 393-411.
- Turrens J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335-344.
- Tzamelis I. (2012) The evolving role of mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 417-419.
- Unnerstall J. R., Niehoff D. L., Kuhar M. J., Palacios J. M. (1982) Quantitative receptor autoradiography using [<sup>3</sup>H]ultrafilm: application to multiple benzodiazepine receptors. *J. Neurosci. Methods.* 6, 59-73.

- Vaccani A., Massi P., Colombo A., Rubino T. and Parolaro D. (2005) Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 144, 1032-1036.
- van der Stelt M., Fox S. H., Hill M., Crossman A. R., Petrosino S., Di Marzo V., Brotchie J. M. (2005) A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J.* 19, 1140-1142.
- Vartak R., Porras C. A., Bai Y. (2013) Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell.* 4, 582-590.
- Velez-Pardo C., Jimenez-Del-Rio M., Lores-Arnaiz S., Bustamante J. (2010) Protective effects of the synthetic cannabinoids CP55,940 and JWH-015 on rat brain mitochondria upon paraquat exposure. *Neurochem. Res.* 35, 1323-1332.
- Vila M., Levy R., Herrero M. T., Faucheux B., Obeso J. A., Agid Y., Hirsch E. C. (1996) Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neuroscience.* 71, 903-912.
- Vila M., Ramonet D., Perier C. (2008) Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues. *J. Neurochem.* 107, 317-328.
- Vonck J., Schafer E. (2009) Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793, 117-124.
- Wang Q., Wei X., Gao H., Li J., Liao J., Liu X., Qin B., Yu Y., Deng C., Tang B., Huang X. F. (2014) Simvastatin reverses the downregulation of M1/4 receptor binding in 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats: the association with improvements in long-term memory. *Neuroscience.* 267, 57-66.
- Wang Y., Hekimi S. (2016) Understanding Ubiquinone. *Trends Cell Biol.*
- Wang Z. B., Li M., Zhao. Y., Xu J. X. (2003) Cytochrome C is a hydrogen peroxide scavenger in mitochondria. *Protein Pept. Lett.* 10, 247-253.
- Watson A., Mazumder A., Stewart M., Balasubramanian S. (1998) Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 609-614.
- Wei Y., Wang X., Wang L. (2009) Presence and regulation of cannabinoid receptors in human retinal pigment epithelial cells. *Mol. Vis.* 15, 1243-1251.
- Wellhausen R., Seitz H. (2012) Facing current quantification challenges in protein microarrays. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 831347.
- Whyte D. A., Al-Hammadi S., Balhaj G., Brown O. M., Penefsky H. S., Souid A. K. (2010) Cannabinoids inhibit cellular respiration of human oral cancer cells. *Pharmacology.* 85, 328-335.

- Wilson D. S., Nock S. (2002) Functional protein microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 81-85.
- Winklhofer K. F., Haass C. (2010) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1802, 29-44.
- Wolff V., Schlagowski A. I., Rouyer O., Charles A. L., Singh F., Auger C., Schini-Kerth V., Marescaux C., Raul J. S., Zoll J., Geny B. (2015) Tetrahydrocannabinol induces brain mitochondrial respiratory chain dysfunction and increases oxidative stress: a potential mechanism involved in cannabis-related stroke. *Biomed. Res. Int.* 2015, 323706.
- Wong-Riley M. (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.* 171, 11-28.
- Wu T., Hallett M. (2013) The cerebellum in Parkinson's disease. *Brain.* 136, 696-709.
- Xia D., Esser L., Tang W. K., Zhou F., Zhou Y., Yu L., Yu C. A. (2013) Structural analysis of cytochrome bc<sub>1</sub> complexes: implications to the mechanism of function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1827, 1278-1294.
- Yagi T. (1990) Inhibition by capsaicin of NADH-quinone oxidoreductases is correlated with the presence of energy-coupling site 1 in various organisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 281, 305-311.
- Young A. B., Chu D. (1990) Distribution of GABAA and GABAB receptors in mammalian brain: Potential targets for drug development. *Drug Dev. Res.* 21, 161-167.
- Zaccagnino P., D'Oria S., Romano L. L., Di Venere A., Sardanelli A. M., Lorusso M. (2012) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol decreases calcium induced cytochrome c release from liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 44, 273-280.
- Zaccagnino P., Saltarella M., D'Oria S., Corcelli A., Saponetti M. S., Lorusso M. (2009) N-arachidonylglycine causes ROS production and cytochrome c release in liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 585-592.
- Zhang D., Liu X., Chen J., Liu B. (2014) Distinguishing patients with Parkinson's disease subtypes from normal controls based on functional network regional efficiencies. *PLoS One.* 9, e115131.
- Zhang D., Zhao Q., Wu B. (2015) Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Cells.* 38, 836-842.
- Zhang R., Xie X. (2012) Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 372-384.
- Zhu H., Snyder M. (2003) Protein chip technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 55-63.

Ziauddin J., Sabatini D. M. (2001) Microarrays of cells expressing defined cDNAs.  
Nature. 411, 107-110.





