



Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

Facultad de Medicina

Universidad de Sevilla

***Estudios de efectos neurobiológicos del Δ^9 -
tetrahidrocannabinol (THC) en modelos animales***

TESIS DOCTORAL

Rocío Moreno Paublete

DIRECTOR

Emilio Fernández Espejo

Sevilla, 2012



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

D. EMILIO FERNÁNDEZ ESPEJO, Catedrático de Universidad, Área de Fisiología, adscrito al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que Doña Rocío Moreno Paublete ha realizado en el Departamento de Fisiología Médica y Biofísica y bajo su dirección el trabajo de investigación titulado “Estudio de efectos neurobiológicos del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) en modelos animales”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se firma en Sevilla a 12 de febrero de 2012,

Fdo. Emilio Fernández Espejo

Director de la Tesis Doctoral

Doña Rocío Moreno Paublete ha sido becaria adscrita al proyecto PROYECTO DE INVESTIGACIÓN BFU2008-01060, Ministerio de Ciencia e Innovación y, en el año 2011, del proyecto PROYECTO DE INVESTIGACION DEL PLAN NACIONAL SOBRE DROGAS 2009I039, Ministerio de Sanidad.

El trabajo doctoral de Doña Rocío Moreno Paublete ha sido financiado mediante los siguientes proyectos de investigación concedidos al Dr. Emilio Fernández Espejo y grupo BIO127 (PAIDI).

- PROYECTO: “Neurobiología de opiáceos y aminas biógenas” Grupo BIO127 de la comunidad Andaluza (según P.A.I.) desde 1993 hasta la fecha.
- PROYECTO COORDINADO DE INVESTIGACION FINANCIADO POR FUNDACIÓ MARATÓ TV3 DE CATALUÑA, "Estudi de noves dianes terapeutiques per al desenvolupament de farmacs neuroprotectors". Investigador coordinador: Rafael Maldonado López.
- PROYECTO DE INVESTIGACION DEL PLAN NACIONAL SOBRE DROGAS 2009I039. Título: "Estudio de la D-serina como nuevo mediador de psicosis cocaínica, y de los cambios plásticos neuronales inducidos por cocaína crónica". Entidad financiadora: Ministerio de Sanidad y Consumo
- PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE LA RED TEMÁTICA DE TRASTORNOS ADICTIVOS G03/005. 2003 hasta la fecha.
- PROYECTO DE INVESTIGACIÓN BFU2008-01060. 2009-2011. Título: "Terapia neurotrófica antiparkinsoniana con células cromafines extraadrenales y búsqueda de células progenitoras"

INDICE

Introducción. Sistema cannabinoide9

1. Introducción al sistema cannabinoide
 - 1.1. Compuestos cannabinoideos endógenos o endocannabinoideos
Metabolismo de los endocannabinoideos: Síntesis, liberación, recaptación y degradación.
 - 1.2. Compuestos cannabinoideos
Metabolismo del $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol y Farmacocinética
2. Receptores del sistema endocannabinoide
 - 2.1. Receptores cannabinoideos.
Receptores CB1. Localización
Receptores CB2. Localización
 - 2.1.1. Ligandos para los receptores cannabinoideos.
 - 2.1.1.1. Agonistas:
Agonistas no selectivos
Agonistas CB1 selectivos
Agonistas CB2 selectivos
 - 2.1.1.2. Antagonistas/agonista inverso y neutros.
Antagonistas/ agonista inverso
Antagonistas neutros del receptor cannabinoide
 - 2.2. Receptores acoplados a proteínas G.
Receptor GRP55. Localización
Receptor GRP119. Localización
 - 2.2.1. Ligandos cannabinoideos de los receptores GRPs.
 - 2.3. Receptores activados por potencial transitorios (TRP).
Receptore Vanilloide TRPV
Receptor TRPA1
 - 2.3.1. Ligandos cannabinoideos de los receptores TRPs
 - 2.4. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas o PPAR α , PPAR β y PPAR γ .
 - 2.4.1. Ligandos cannabinoideos de los receptores PPARs
 - 2.5. Actividad de $\Delta 9$ -THC en receptores y canales no CB1/CB2 del sistema endocannabinoide.
3. Mecanismos de traducción de señales del Sistema Cannabinoide.
 - 3.1. Mecanismo de señalización de receptores cannabinoideos CB1/CB2.
 - 3.1.1. Acoplamiento del receptor CB a efector
 - 3.1.2. Cascada de señalización intracelular
 - 3.1.3. Regulación de la expresión de genes
 - 3.2. Mecanismo de señalización de receptores GRP55
 - 3.3. Mecanismo de señalización de receptores GRP199
 - 3.4. Mecanismo de señalización de receptores vanilloideos
 - 3.5. Mecanismo de señalización de receptores PPARs.
4. Mecanismo de acción molecular de los cannabinoideos en el sistema nervioso central.
5. Acciones Fisiológicas del sistema endocannabinoide y efectos de los cannabinoideos
 - 5.1. Efectos de los cannabinoideos sobre el control motor
 - 5.1.1. Ganglios basales. Presencia del Sistema endocannabinoide
 - 5.1.2. Función del sistema cannabinoide en los ganglios basales.

- Neuromodulación de GABA
- Neuromodulación de glutamato
- Neuromodulación de dopamina
- 5.1.3. Efectos del fitocannabinoide Δ^9 -THC a nivel motor
- 5.2. Sistema cannabinoide y enfermedad de Parkinson
 - Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson
 - Implicación del sistema cannabinoide en la enfermedad y potencial terapéutico
 - Modelo animal de enfermedad de Parkinson. 6.hidroxi-dopamina
- 5.3. Neurotoxicidad y neuroprotección de los cannabinoides.
 - Neuroprotección
 - Neurotoxicidad
- 5.4. Efectos de los cannabinoides sobre el control emocional. Esquizofrenia
 - Esquizofrenia
 - Hipótesis cannabinoide de la esquizofrenia
 - Cannabis en la adolescencia
 - Valoración del estado psicótico en animales de laboratorio
 - Modelo animal para el estudio de la esquizofrenia
 - Utilización de fármacos relacionados con el sistema cannabinoide en pacientes esquizofrénicos
- 5.5. Sistema cannabinoide y proliferación
 - 5.5.1. Participación del sistema cannabinoide en el desarrollo neural
 - 5.5.2. Participación del sistema cannabinoide en la proliferación y mantenimiento de nichos neurogénicos en el cerebro adulto
 - 5.5.2.1. Antecedentes
 - Centros germinativos en el adulto
 - 5.5.2.2. Características de las células progenitoras del cerebro adulto
 - Astroцитos
 - Glia radial
 - Células ependimales o ependimocitos
 - 5.5.2.3. Nuevos nichos progenitores en el cerebro adulto
 - Control de neurogénesis en cerebro adulto por cannabinoides.

Materiales y métodos	103
Resultados	145
Discusión	215
Conclusiones	225
Bibliografía	229



INTRODUCCIÓN

Sistema Cannabinoide.

1 .Introducción al sistema cannabinoide

El sistema cannabinoide endógeno es un importante sistema de modulación de múltiples respuestas fisiológicas tanto a nivel central como periférico, constituido por una serie de receptores cannabinoides, ligandos endógenos y enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación de estos ligandos. Debe su nombre al hecho de que su descubrimiento se produjo en el seno de la investigación sobre los mecanismos de acción de los compuestos psicoactivos de la planta *Cannabis sativa*.

La planta contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes, de los cuales 60 forman parte de la familia de los cannabinoides (fitocannabinoides). Los fitocannabinoides son sustancias que forman parte del metabolismo secundario de la planta que se presentan de forma casi exclusiva en algunas variedades de la misma (Dewey, 1986)

Aunque las primeras referencias históricas del uso de dicha planta con fines médicos y recreativos datan de hace más de 4000 años, no fue hasta pasada la mitad del siglo XX cuando se identificó la estructura química de su principal compuesto activo, el Δ^9 - tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Mechoulam y Gaoni, 1965). Dicho hallazgo supuso el inicio para años de investigación fructífera, los cuales se encuentran resumidos en las referencias que se muestran en la tabla 1.

Los compuestos cannabinoides son algo más que los constituyentes psicoactivos de una droga de abuso. El término "cannabinoide" abarca todos aquellos compuestos que son activos sobre el sistema endógeno de señalización de tipo cannabinoide, e incluye no sólo a los compuestos derivados de la planta *Cannabis sativa* ("fitocannabinoides"), sino también a los compuestos endógenos que forman parte de este sistema de neuromodulación (Ramos y Fernández-Ruiz, 2003).

Tabla 1. Resumen de los eventos más relevantes en el campo de la investigación sobre el sistema cannabinoide.

Evento	Fecha	Referencia
Primeros usos médicos del cannabis	3000	Mechoulam, 1986; Dewey, 1986
Aislamiento del Δ^9 -Tetrahidrocannabinol	1964	Gaoni y Mechoulam, 1964
Cannabinoides sintéticos	1980-1988	Dewey, 1986; Mechoulam y cols., 1987.
Descripción de los receptores cannabinoideos	1988	Devane y cols., 1988
Clonación y cartografía cerebral de los receptores cannabinoideos CB1	1990	Herkenham y cols., 1990, 1991 ^a ; Matsuda y cols., 1990
Neurofarmacología CB1	1988-1995	Howlett y cols., 1986; Howlett 1995; Mackie y Hille, 1992; Mackie y cols., 1995; Deadwyler y cols., 1995; Bouaboula y cols., 1995.
Aislamiento y bioquímica de la anandamida	1992-1995	Devane y cols., 1992; Di Marzo y cols., 1994; Sugiura y cols., 1996; Cadas y cols., 1996; Desamaud y cols., 1995
Neurofarmacología de la anandamida	1993-1997	Fride y Mechoulam, 1993; Crawley y cols., 1993; Feder y cols., 1993; Smith y cols., 1994; Beltramo y cols., 1997.
Síntesis del antagonista de CB1	1994	Rinaldi-Carmona y cols., 1994.
Aislamiento y funciones del 2-araquidonil glicerol,	1995-1997	Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995; Stella y cols., 1997; Bisogno y cols., 1997
Identificación y funciones del transportador de la anandamida	1999	Ledent y cols., 1999; Steiner y cols., 1999; Zimmer y cols., 1999
Clonación y funciones de la FAAH	1996-2002	Cravatt y cols., 1996, 2001; Sipe y cols., 2002

Actualmente se conocen muchos de los elementos que forman parte del sistema endocannabinoide y se han diseñado herramientas farmacológicas (ligandos sintéticos y otros compuestos capaces de actuar sobre diversos puntos de su metabolismo y mecanismos de acción) que han permitido en los últimos años avances fundamentales en el conocimiento de este sistema que han abierto las puertas a múltiples potenciales acciones terapéuticas.

A partir de los hallazgos que han acontecido en el último tercio del siglo XX, el conocimiento sobre la complejidad del sistema endocannabinoide y su relevancia fisiológica ha ido creciendo sin cesar y ha permitido descubrir el importante potencial terapéutico que presenta en numerosas patologías, incluyendo los trastornos emocionales (Fowler, 2005)

Uno de los principales inconvenientes de su uso son los efectos psíquicos que producen y que fueron utilizados en ocasiones como complemento en prácticas religiosas, o simplemente para la búsqueda de placer. A lo largo del tiempo, los cannabinoides han pasado por etapas de uso generalizado, por otras de un uso más restringido o incluso por largas etapas de prohibición.

Los endocannabinoides, junto con los receptores cannabinoides clásicos tipo 1(CB1) y tipo 2 (CB2), y la maquinaria bioquímica para su síntesis y degradación, conforman el sistema endocannabinoide. A pesar de haber establecido los cimientos de este sistema cannabinoide endógeno, las investigaciones prosiguen y los descubrimientos que se realizan en relación a nuevos ligandos endógenos, precursores de rutas de síntesis alternativas, mecanismos de regulación de las enzimas implicadas en su síntesis y degradación, etc., son constantes. Actualmente siguen siendo numerosas las incógnitas que rodean a ciertos elementos del sistema endocannabinoide; sin embargo, hay un punto que no admite discusión, y es la importancia de un correcto funcionamiento de este sistema para el mantenimiento de la homeostasis, ya que se han observado cambios en el sistema endocannabinoide en numerosísimas

situaciones patológicas. Por este motivo, la manipulación farmacológica de este sistema se ha planteado también como una herramienta terapéutica muy prometedora en el tratamiento de diversas patologías.

1.1 Cannabinoides endógenos o endocannabinoides.

Los endocannabinoides se definen como compuestos endógenos producidos en diferentes órganos y tejidos, capaces de unirse a los receptores de cannabinoides. En la actualidad se han identificado varios tipos de cannabinoides endógenos, todos de naturaleza lipídica y derivados de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga (figura 1).

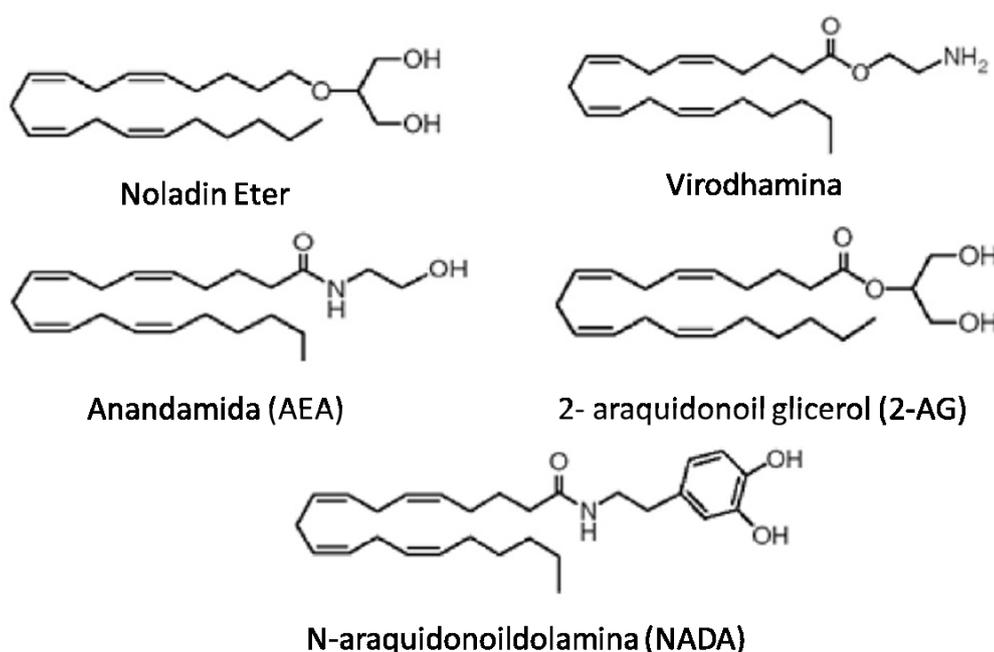


Figura 1. Estructura química de algunos cannabinoides endógenos.

De manera similar a los neurotransmisores clásicos, los endocannabinoides son sintetizados en las neuronas, liberados en el espacio sináptico donde activan receptores de membrana y finalmente inactivados por recaptación y degradación enzimática. No obstante, los endocannabinoides presentan una clara diferencia respecto a los neurotransmisores clásicos ya que no se almacenan en vesículas sinápticas. De modo que los endocannabinoides son

mediadores que se sintetizan según la demanda (Di marzo, y cols., 1994), y actúan en las proximidades del lugar dónde se han liberado, siendo rápidamente inactivados una vez han actuado (Piomelli, 2003).

Los Ligandos endógenos más estudiados hasta el momento son anandamida (AEA) (Devane y cols., 1992) que fue el primer endocannabinoide descubierto y 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Mechoulam y cols., 1995) que a pesar de ser descubierto posteriormente parece ser el agonista cannabinoide selecto por excelencia (Sigiura y cols., 2002). También se conoce la existencia de otros endocannabinoides de más reciente descubrimiento y cuya importancia biológica aún está por determinar como noladín éter y virodhamina (Porter y cols., 2002); NADA y N-oleoildopamina (Pertwee y cols., 2008).

Metabolismo de los endocannabinoides: Síntesis, liberación, recaptación y degradación.

Síntesis y liberación. La síntesis y liberación de anandamida (AEA) en las neuronas se produce por un mecanismo dependiente de aumento de la concentración de calcio, producido por despolarización o bien por activación de un receptor metabotrópico acoplado a proteína $G_{9/11}$ (Mackie, 2006). Todavía no se ha descrito un mecanismo realmente eficiente para la síntesis de AEA. Dos rutas posibles de síntesis de AEA serían:

- LA AEA se sintetiza desde un ácido graso presente en la membrana lipídica, N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (N-ArPE) o N-acil-fosfatidiletanolamina, interviniendo enzimas de hidrólisis como la fosfolipasa C (PLC) (liu y cols., 2008) o la hidrolasa Abh4 (Simón y cols., 2006).

- La AEA se sintetiza gracias a una enzima fosfolipasa D dependiente de calcio recientemente clonada (NAPE-PLD) (Okamoto y cols., 2007). Esta enzima hidroliza N-ArPE dando como resultado AEA y ácido fosfatídico.

Recaptación. Al ser compuestos lipofílicos podrían atravesar la membrana por difusión (Hillard y cols., 2003). Pero se ha comprobado que la cinética de recaptación no responde a la ley de Fick para procesos de difusión simple. El transporte de anandamida es un proceso saturable que se inhibe farmacológicamente (Fowler y Jacobsson, 2002). De este modo es evidente que debe existir un transportador específico, sugerido por primera vez por Di Marzo y cols., 1994. Este mecanismo de transporte sería bidireccional, pudiendo funcionar tanto para introducir los cannabinoides liberados como para liberarlos tras su síntesis (Di Marzo, 2008).

Degradación. La anandamida se metaboliza por cuatro mecanismos principales: Hidrólisis producida por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Cravatt y cols., 1996), Oxidación por Citocromo P450 mitocondrial (Bomheim y cols., 1995), Oxidación por Cicloxigenasa2 y a través de la Lipoxigenasa (Guindon y Hohmann, 2008)

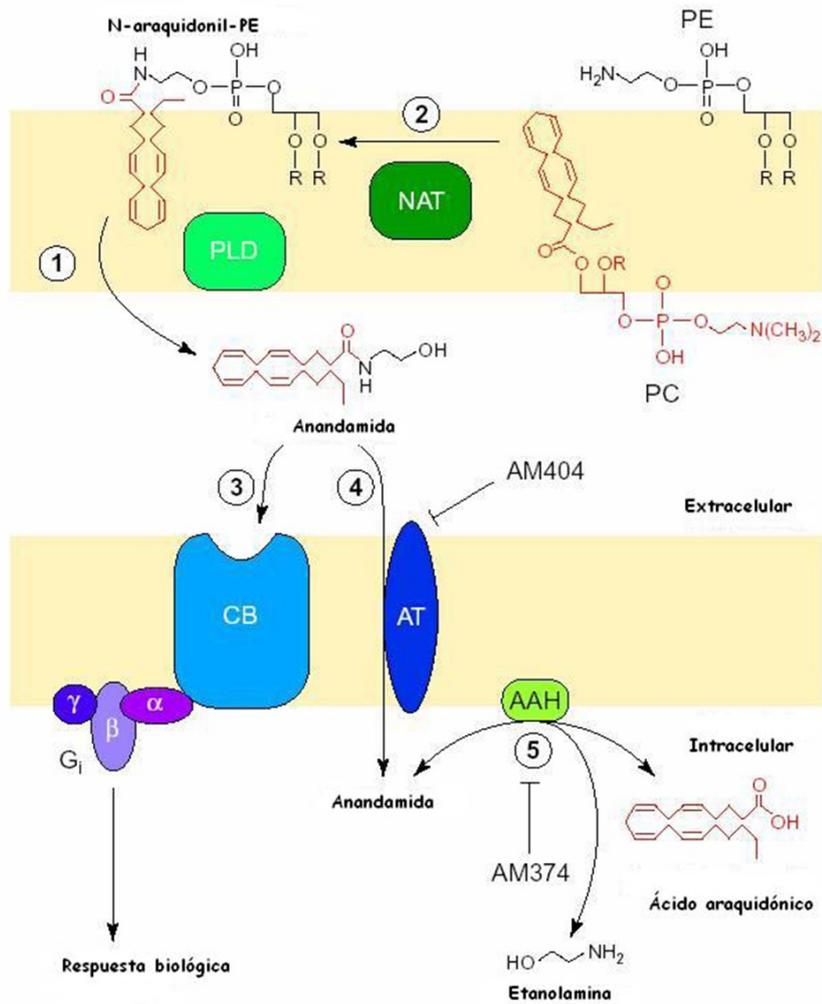


Figura 2. Formación e inactivación de anandamida. 1 y 2. Síntesis de anandamida, 3. Interacción con el receptor, 4. Recaptación y 5. Degradación (Piomelli y cols., 2000).

1.2 Compuestos cannabinoides

El término cannabinoide inicialmente describía aquellas sustancias que tienen estructura carbocíclica con 21 carbonos formados por tres anillos, ciclohexano, tetrahidropirano y benceno (estructura de dibenzopirano). Existen hasta 60 cannabinoides diferentes en la planta, variando en su concentración dependiendo de la variedad de la misma, de las condiciones de cultivo, de la región y clima donde se cultive, etc. Los principales cannabinoides exógenos son Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN).

El Δ^9 -THC es, de todos los componentes de la planta, el cannabinoide con mayor potencial psicoactivo. Presenta un marcado carácter hidrofóbico que hace que tanto su distribución en el organismo como su eliminación presenten diferencias con lo descrito para otras drogas de abuso. El Δ^8 -THC tiene un perfil farmacológico muy parecido al del Δ^9 -THC, aunque sus efectos son más débiles, solo aparece en algunas variedades de la planta y su concentración siempre es menor (Mechoulam y cols., 1992).

El CBN también tiene propiedades psicoactivas, que son aproximadamente una décima parte de las descritas para el Δ^9 -THC. Presenta mayor afinidad por el receptor CB2 que por el CB1. Su actuación sobre el receptor CB2 en esplenocitos y timocitos, provoca en último término una disminución de la transcripción del gen para la interleuquina-2(IL-2). El descenso en la liberación de IL-2 explicaría en parte la capacidad de inmunomodulación atribuida a los cannabinoideos, dado que esta proteína participa en la regulación de la actividad del sistema inmune (Condie y cols., 1996).

El CBD es un compuesto bicíclico, al estar el anillo de tetrahidropirano escindido. Es un cannabinoide prácticamente desprovisto de propiedades psicoactivas, razón por lo que se están investigando sus posibles efectos clínicos. Así, el tratamiento con CBD atenúa algunas de las alteraciones psicológicas inducidas por altas dosis de THC (0,5 mg/kg), como por ejemplo los sentimientos de ansiedad y de pánico (Zuardi y cols., 1982)

Se ha atribuido al CBD un papel neuroprotector al comprobar su actuación como antioxidante frente a los efectos oxidativos producidos en las neuronas ante la liberación de glutámico (Hampson y cols., 1998). También ha sido relacionado desde hace tiempo con el sistema inmune. Recientemente se ha visto que en algunas líneas celulares del sistema inmune inhibe la liberación de varios tipos de citoquinas (IL-8, IL-10, TNF- α , IFN γ). Estos resultados, que indican sus posibles efectos beneficiosos en enfermedades

inflamatorias/autoinmunes y en artritis, también advierten de su peligrosidad en relación con el SIDA, tumorogénesis e inflamación alérgica en pulmones (Srivastava y cols., 1998).

Las propiedades farmacológicas de estos compuestos dependen de su estructura química. Pequeñas modificaciones en estas estructuras pueden provocar cambios importantes en su actividad. Así el estudio de las relaciones entre estructura y actividad ha permitido diseñar análogos estructurales, modificando su marcado carácter hidrofóbico o aumentando la afinidad por sus receptores, que han resultado de gran utilidad para su estudio farmacológico y fisiológico (Howlett y cols., 2002).

Metabolismo del Δ^9 -tetrahidrocannabinol y Farmacocinética

La molécula de THC (Figura 3) es bastante inestable, pudiendo ser degradada por calor, luz, ácido y por oxígeno atmosférico. La cinética varía dependiendo de la vía de administración. Por vía oral THC es captado principalmente por coabsorción con lípidos y su biodisponibilidad se ve reducida debido a su sensibilidad a la acidez gástrica y por el metabolismo hepático e intestinal (Bobes y Calafat, 2000). En cambio por vía inhalatoria su biodisponibilidad es mayor, apareciendo rápidamente en la sangre. La entrada de THC en sangre y su posterior distribución en tejidos es muy rápida y su cinética es parecida a una administración intravenosa. Tras aspirar el humo de un cigarrillo de marihuana o hachís los efectos son inmediatos, alcanzando su máximo a los 20-30 min, pudiendo durar unas 2-3 horas.

Tras la administración aguda de THC se acumula en tejidos como pulmón, riñón, hígado corazón, bazo, corteza adrenal, tiroides y tejido adiposo, y sin embargo en testículos y cerebro se encuentra en menor concentración. De hecho la porción que pasa al cerebro es de alrededor de 0,6%. La baja proporción que pasa al cerebro a pesar de

su liposubilidad, parece ser consecuencia de unión a lipoproteínas plasmáticas. Solo alrededor del 3% del THC en sangre se encuentra en forma libre. Por otro lado debido al carácter hidrofóbico de esta molécula, se acumula en tejido adiposo, siendo este, junto con el bazo, los principales depósitos tres días después del cese de la administración.

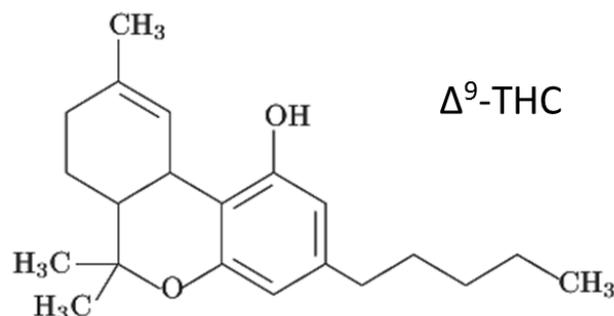


Figura 3. Estructura química de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC)

El Δ^9 -THC se metaboliza principalmente en el hígado por el sistema microsómico hepático, originando gran cantidad de metabolitos. Otros órganos como el pulmón e intestinos también participan en menor medida en su metabolismo. La primera enzima que actúa en el catabolismo de THC es el citocromo P-450, que la oxida a derivados mono-, di- o trihidroxilados (Matsunaga y *cols.*, 1995). Los compuestos hidroxilados son transformados, posteriormente, en otros metabolitos de naturaleza menos hidrófoba, por ruptura de la cadena lateral y oxidación al correspondiente ácido carboxílico. El 9-carboxi-THC es el principal compuesto que se elimina por orina usándose como marcador del consumo de la droga (Gustafson y *cols.*, 2004). La vida media del THC en el organismo varía dependiendo de los hábitos de consumo, siendo en humanos alrededor de 50 horas de media, que puede ser más reducida en usuarios crónicos de la droga. Estas variaciones, podrían relacionarse con una inducción de las enzimas que

lo metabolizan o con un mayor secuestro por parte de los distintos tejidos (Bobes y Calafat, 2000).

2 . Receptores del sistema endocannabinoide

El carácter altamente lipofílico de los cannabinoides naturales dificultó durante años la identificación de los receptores específicos para este tipo de sustancias. De hecho algunos autores atribuían inicialmente los efectos farmacológicos del THC a su interacción con la membrana celular alterando sus propiedades (Lawrence y Gill, 1975). A pesar de que esta teoría no puede descartarse totalmente, actualmente está claro que la mayoría de los efectos que producen los cannabinoides están mediados por receptores específicos.

Entre los receptores que participan en el sistema endocannabinoide tenemos los receptores de cannabinoides propiamente dicho CB1 y CB2, y luego un amplio número de receptores, y canales iónicos de los que aún queda mucho por estudiar, pero que en principio, según la literatura actual son activados o inhibidos por el grupo de ligandos cannabinoides, cannabimiméticos y por aquellos agonistas de receptores CB1y/o CB2, no-cannabinoides. Aunque claro está, con eficacias y potencias dispares.

- CB1
- CB2
- GRP55
- GRP119
- Receptores o canales vanilloides TRPV1, TRPV2 y TRPA1
- Los receptores nucleares PPAR_γ y PPAR_α
- Otros receptores acoplados a proteína G: β-adrenoreceptores, receptor de 5-hidroxitriptamina, receptor de acetilcolina de tipo muscarínico, receptor opioide, receptor de adenosina y receptor parecido a imidazol.
- Receptor de acetilcolina de tipo nicotínico, receptor ionotrópico de glutamato y receptor 5-HT₃.
- Receptor de glicina

- Canal de calcio
- Canal de potasio
- Canal de sodio

Aunque hay que señalar que la interacción de los ligandos por estos receptores no-CB1/no-CB2 se realiza a concentraciones superiores a las que actúan sobre los receptores cannabinoides, que solo algunos de los ligandos cannabinoides tienen acción sobre estos receptores, pero no todos, y que en el caso de los canales muscarínicos, de sodio, y receptores de acetilcolina, opioides, 5-HT₃ y de glicina, los agonistas CB1/CB2 se unen a sitios diferentes de los sitios activos típicos de éstos. (Pertwee, 2010)

2.1 Receptores cannabinoides.

Los receptores cannabinoides se denominan por las siglas CB y un subíndice que indica el orden en el que fueron descubiertos (Howlett, 2002). Hasta el momento hay dos tipos de receptores de cannabinoides identificados CB1 y CB 2. Estos dos receptores pertenecen a la familia de los receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (GPCRs) que atraviesan 7 veces la membrana plasmática. Presentan un dominio amino-terminal extracelular, un dominio carboxi-terminal intracelular y en su estructura se encuentran residuos específicos típicos como sustratos de fosforilación, lugares de fijación de ligandos, lugares de unión a proteína G, etc. (Figura 4)

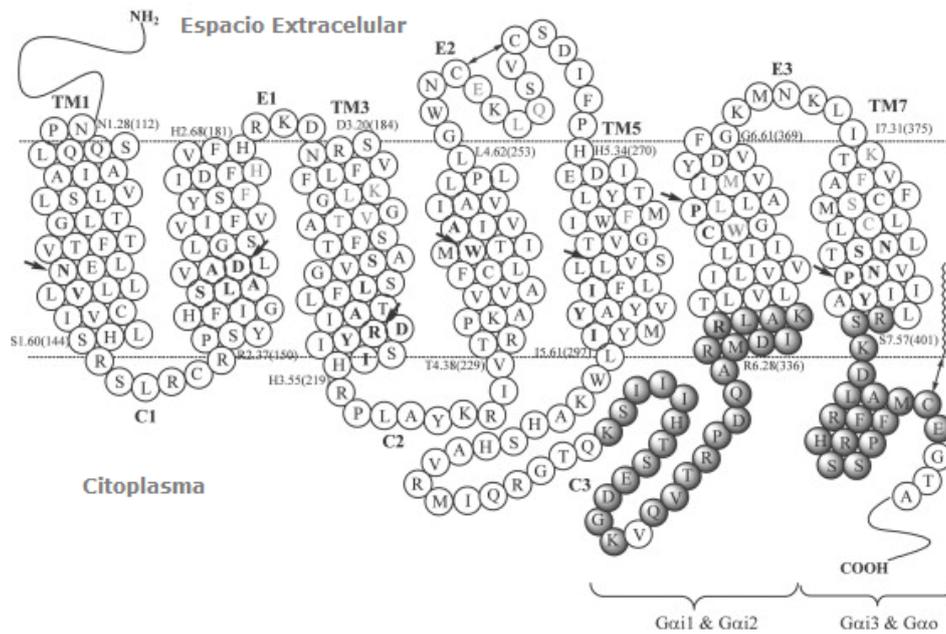


Figura 4. Estructura del receptor CB1 humano. Se representa tres regiones extracelulares (E1, E2 y E3), tres intracelulares (C1, C2 y C3) y los siete dominios transmembrana (TM1-7). También están representadas las regiones importantes para la interacción con proteínas G_{ai1} y G_{ai2} (loop intracelular C3) y para la interacción con proteínas G_{ao} y G_{ai} (región C terminal) (Mukhopayay y cols., 2002).

Desde el punto de vista filogenético, CB1 y CB2 se asemejan a los receptores de esfingosina-1-P ($S1P_{1-5}$) implicados en la regulación de la supervivencia y crecimiento celular (Huwiler y cols., 2008).

El **receptor CB₁** (Devane y cols., 1988) es un polipéptido de entre 472-473 aminoácidos organizados en una secuencia típica, altamente conservada para todas las especies estudiadas. Este receptor media, entre otros, los efectos psicoactivos, motores, y de pérdidas cognitivas y de memoria de los cannabinoides tanto en humanos (Gerard y cols., 1991) como en ratas (Matsuda y cols., 1990),

Se ha descrito una variante del ARN mensajero de CB1 resultante de un proceso de "splicing" alternativo (Shire y cols., 1995). A este receptor se le denomina CB1a de acuerdo con la normativa de la IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacological). Es una isoforma con 61 aminoácidos menos en el extremo amino-terminal que a pesar de presentar un modelo de

distribución y propiedades parecidas al receptor CB1, su nivel de expresión es mucho menor y no ha sido detectado *in vivo*, por lo que hasta el momento no existen pruebas concluyentes sobre su papel farmacológico

Localización

Este receptor se localiza fundamentalmente en el sistema nervioso central, donde es más abundante que otros receptores para neurotransmisores (Helkenham y cols., 1991b; Tsou y cols., 1998). Su distribución neuronal se encuentra en estrecha relación con muchos de los efectos farmacológicos que producen los cannabinoides.

La mayor densidad se localiza en los ganglios basales (sustancia negra, globo pálido, núcleo entopeduncular y caudado-putamen lateral), en la capa molecular del cerebelo y en ciertas partes del hipocampo (región CA3 del asta de Ammón y capa molecular del giro dentado). Esta localización explicaría los efectos de los cannabinoides sobre la actividad motora y sobre la memoria y aprendizaje (Herkenham y cols., 1990). La densidad de este receptor es más moderada en las capas I y IV de la corteza, mientras que un escaso número de receptores se encuentran en hipotálamo, tronco encefálico y médula espinal. En estas regiones se asocian a los efectos neuroendocrinos y con el control nociceptivo, respectivamente.

A pesar de la baja densidad de los receptores en el hipotálamo, los cannabinoides inducen hipotermia después de una administración intracerebroventricular o tras una inyección directamente en el área preóptica (Fitton y Pertwee, 1982). De todas formas, esta baja densidad de receptores en el tallo cerebral (área que controla las funciones cardiovasculares y respiratorias) explica la baja toxicidad y ausencia de letalidad de la marihuana.

A nivel periférico encontramos también receptores CB1 en bazo, amígdalas, corazón, próstata, testículos, útero, ovarios y en terminales

nerviosos simpáticos a nivel presináptico (Galiegue y cols., 1995; Isahac y cols., 1996).

En cuanto a la ontogenia, los receptores CB1 aparecen en edades tempranas del desarrollo, presentando en el cerebro una distribución transitoria que va variando durante el periodo de maduración hasta alcanzar el perfil clásico del estado adulto (Berrendero y cols., 1998). Pudiendo estar relacionado con eventos del desarrollo como son la proliferación y migración celular, la elongación axonal y la sinaptogénesis (Fernandez-Ruiz y cols., 2000).

A menor escala los receptores cannabinoides CB1, se encuentran preferentemente en las fibras presinápticas y en terminales, y menos en cuerpos celulares y dendritas (Herkenham y cols., 1990; Herkenham y cols., 1991b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Pettit y cols., 1998). Existen muchas evidencias electrofisiológicas que sugieren que la localización presináptica tiene su fin en la modulación de la liberación de diferentes tipos de neurotransmisores (Schilicker y Kathmann, 2001). El receptor de cannabinoides CB1 colocaliza con botones sináptico de liberación de receptores como GABA (Katona y cols., 1999; Hajos y cols., 2000), glutamato (Gerdeman y Lovinger, 2001), Dopamina (Cadogan y cols., 1997; Tandra y cols., 1997; Kathmann y cols., 1999; Cheer y cols., 2003), noradrenalina (Schlicker y cols., 1997; Kathmann y cols., 1999; Trendelenburg y cols., 2000; Tzavara y cols., 2001) y serotonina (Nakazi y cols., 2000; Egashira y cols., 2002).

El **Receptor CB2** (Munro y cols., 1993) es un polipéptido de 347-360 aminoácidos. Presenta una homología global del 44% (68% en las regiones transmembrana) con los receptores CB1, y exhibe más divergencia en cuanto a homologías entre especies que los receptores CB1 (Begg y cols., 2005).

Localización

Estos receptores cannabinoides son principalmente periféricos. Se localizan abundantemente en las células hematopoyéticas, así como en distintos

tipos celulares del sistema inmune, hecho por el cual se le atribuyen los efectos inmunomoduladores de los compuestos cannabinoides (Mato y cols., 2003). Así pues, los receptores CB2 están implicados en la regulación de funciones inmunes como la liberación de citoquinas y la migración de las células inmunes (Klein y cols., 2003).

También podemos encontrarlos en el sistema nervioso central en estructuras específicas. Se ha descrito la presencia de receptores CB2 en el tallo cerebral, en estructuras donde posiblemente estén implicados en el control de la émesis (Van Sickle y cols., 2005) como son el hipocampo y en el cerebelo (Gong y cols., 2006). Aunque las implicaciones fisiológicas de estos receptores en el SNC no han sido suficientemente estudiadas, se ha sugerido que podrían tener participación en los procesos depresivos y de adicción a drogas de abuso (Gong y cols., 2006; Onaivi y cols., 2006). En los últimos años también se ha documentado receptores CB2 en células progenitoras, embrionarias, y en el cerebro adulto (Arevalo-Martin y cols., 2007; Goncales y cols., 2008; Molina-Holgado y cols., 2007, Pazuelos y cols., 2006).

También se ha visto aumento en la expresión de estos receptores en algunos tipos celulares del SNC en condiciones patológicas agudas, como isquemias (Ashton y cols., 2007; Zhang y cols., 2007) y crónicas, como la enfermedad de Alzheimer (Benito y cols., 2003), la corea de Huntington (Sagredo y cols., 2007) y esclerosis múltiple (Benito y cols., 2007).

La localización central del receptor CB2 está asociada preferentemente en células gliales (microglía reactiva o astrocitos), donde podría ejercer un papel en procesos celulares fundamentales como la proliferación y la supervivencia neuronal (Fernández-Ruiz y cols., 2007).

2.1.1 Ligandos para los receptores cannabinoides.

Existen una gran variedad de moléculas que se comportan como ligandos de cannabinoides ya sea como agonista o como antagonista /agonista inverso. Mucho de estos son usados como herramientas en investigación. Lo cierto es que de

momento hay muchos datos sobre algunas de las propiedades farmacológicas de estas moléculas, pero sin embargo es necesario destacar que los datos son aun contradictorios en muchos casos, y una misma molécula en una investigación parece actuar como agonista y en otra como antagonista, o una con radicalmente diferente eficacia entre diferentes experimentos (Pertwe, 2010).

2.1.1.1 Agonistas

Muchas moléculas han sido identificadas y/o sintetizadas como agonista de receptor CB1/CB2 (tabla 2). Aún queda mucho trabajo por hacer para una adecuada clasificación, pero se contemplan 3 grupos de agonistas según su farmacología: Agonistas no selectivos, agonistas selectivos CB1 y agonistas selectivos CB2

Agonistas no selectivos

Este grupo típicamente se clasifica según su estructura química en cuatro grupos (Tabla 2).

✿ **Cannabinoides clásicos.** Contienen los derivados de dibenzopirano. A este grupo pertenecen los cannabinoides naturales de la planta fitocannabinoides y los análogos sintéticos de estos. Dos particularmente notables son por un lado, la molécula de estudio de este trabajo de tesis, (-)- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), que es el principal constituyente psicoactivo del cannabis, y por otro lado un análogo sintético de (-)- Δ^8 -THC, (-)-11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimethylhetil (HU-210). Muchos de los cannabinoides de este grupo se usan como herramienta de estudio en investigación.

✿ **Cannabinoides no-clásicos.** En este grupo están los análogos bicíclicos y tricíclicos del tetrahidrocannabinol a los que le faltan el anillo pirano. Uno de este grupo está particularmente extendido en el uso de herramienta experimental, CP55940, que posee parecida eficacia en su unión al CB1 y al CB2 que el HU-210.

✿ **Cannabinoides eicosanoides.** Presentan estructuras marcadamente diferentes a las de los grupos clásicos y no clásicos. Los compuestos típicos de este grupo son la anandamida y el 2-araquidonil glicerol. Además de los endocannabinoides endógenos, este grupo también contiene eicosanoides sintéticos no endógenos.

✿ **Aminoalquilindoles.** Tienen estructuras completamente diferentes a los otros 3 grupos. El miembro mejor conocido del grupo es R-(+)-WIN55212.

Los cannabinoides clásicos, no-clásicos y aminoalquilindoles contienen un centro quiral, que en (-)trans poseen una mayor actividad farmacológica en los experimentos de receptores que sus esteroisómeros en (+)cis (Howlett y *cols.*, 2002; Pertwee, 2006). En contraste ni la anandamida ni el 2-araquidonil glicerol tiene grupos quirales.

Tabla 2. Principales agonistas CB1 y CB2

Ligandos	CB1 valores K_i (nM)	CB2 valores K_i (nM)	Referencia
Agonistas con afinidad similar por CB1 Y CB2			
(-)- Δ^9 -THC	5.05-80.3	3.13-75.3	Felder y cols., 1995; Bayewitch y cols., 1996; Showalter y cols., 1996; Rhee y cols., 1997; Rinaldi-Carmona y cols., 1994.
(-)- Δ^8 -THC	47.6	39.3	Busch-Petersen y cols., 1996
HU-210	0.06-0.73	0.17-0.52	Felder y cols., 1995; Rhee y cols., 1997; Showalter y cols., 1996
CP55940	0.5-5.0	0.69-2.8	Ross y cols., 1999; Felder y cols., 1995; Rinaldi-Carmona y cols., 1994
R-(+)-WIN55212	1.89-123	0.28-16.2	Rinaldi-Carmona y cols., 1994; Hillard y cols., 1999; Showalter y cols., 1996; Felder y cols., 1995; Shire y cols., 1996
Anandamida	61-543	279-1940	Lin y cols., 1998; Showalter y cols., 1996; Felder y cols., 1995; Hillard y cols., 1999; Mechoulam y cols., 1995.
2-Araquidonil glicerol	58.3 ; 472	145,1; 1400	Mechoulam y cols., 1995
Agonistas con mayor afinidad por CB1			
ACEA	1.4 ; 5.29	195; >2000	Hillard y cols., 1999
ACPA	2.2	715	Hillard y cols., 1999
R-(+)-metanandamida	17.9-28.3	815-868	Lin y cols., 1998; Khanolkar y cols., 1996.
2-Araquidonil glicerol	21.2	>3000	Hanus y cols., 2001
Noladín éter			
Agonistas con mayor afinidad por CB2			
JWH-133	677	3.4	Huffman y cols., 1999
HU-308	>10000	22.7	Hanus y cols., 1999
JWH-015	383	13.8	Showalter y cols., 1996
AM1241	280	3.4	

Agonistas CB1 selectivos

Son cuatro las moléculas con selectividad CB1 más usadas en investigación (Howlett y cols, 2002; Pertwee, 2005; Pertwee, 1999; Pertwee, 2008), todas cannabinoides sintéticos del grupo eicosanoides (Figura 5). Éstas son, los tres análogos sintéticos de la anandamida, R-(+)-metanandamida, araquidonil-2'-cloroetilamide (ACEA) y araquidonilciclopropilamida (ACPA) (15,16), y el análogo del 2-araquidonil glicerol, noladín éter (2-araquidonil glicerol éter), el cual puede que sea o no un endocannabinoide (Bradshaw y cols., 2005). Los 3 análogos de anandamida, poseen significativas potencias y eficacia de unión al receptor CB1. Es importante, sin embargo, que mientras que R-(+) metanandamida es más resistente a la hidrólisis por la acción de la FAAH que ACEA y ACPA.

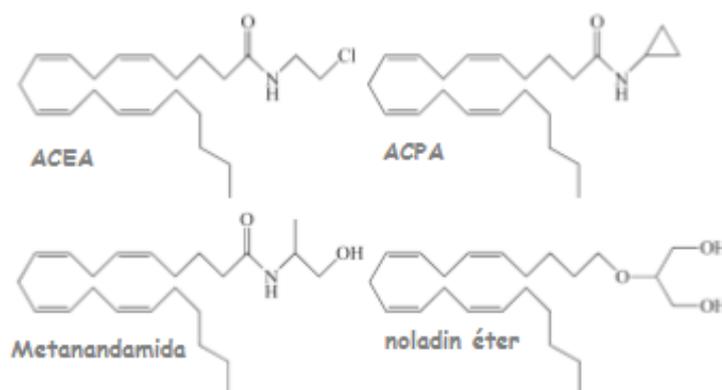


Figura 5. Agonistas cannabinoides selectivos del receptor CB1.

Agonistas CB2 selectivos

Los ligandos que más se han usado en investigación, por su actividad sobre el receptor CB2, son nuevamente 4 (Figura 6): el cannabinoide clásico JWH-133, del grupo de los no clásicos, HU-308, y los aminoalquilindoles, JWH-015 y AM1241 (Howlett y cols, 2002; Pertwee, 2006; Pertwee, 1999; Pertwee, 2008).

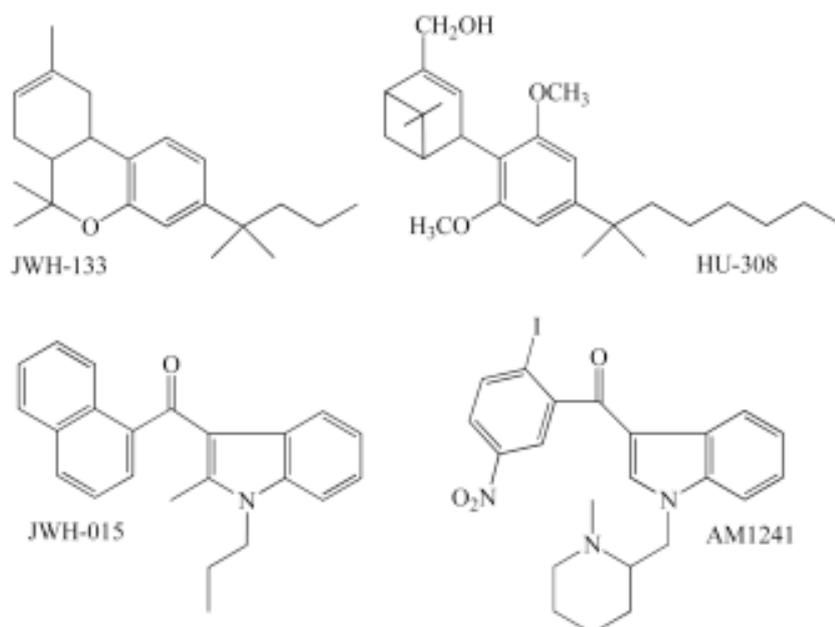


Figura 6. Agonistas cannabinoides selectivos del receptor CB2

2.1.1.2 Antagonistas/agonistas inversos y neutros

Antagonistas/agonistas inversos

Actualmente hay varias moléculas desarrolladas para ser usadas en investigación bloqueando la activación inducida por agonista en los receptores CB1 de modo competitivo, tanto in vitro como in vivo. Las más usadas son rimonabant y sus análogos estructurales, AM251 y AM281. LY320135, que es una molécula con diferencias estructurales al rimonabant, también se ha usado a veces en investigación, aunque tiene menos afinidad por CB1 que rimonabant, AM251 o AM281 (Tabla 3).

Estas 4 moléculas poseen más afinidad por CB1 que por CB2 (tabla1). Y aunque hay evidencias, de que cuando se administran solos pueden desencadenar respuesta en receptores CB1 de algunos tejidos, en realidad, desencadena una respuesta opuesta a la que se genera cuando son activados por agonistas. En algunos casos, esto puede ser el resultado de la liberación de endocannabinoides provocada por la competencia directa de los antagonistas, o por otro lado, pudiera ser que actúen como agonista inverso, produciendo efectos cannabimiméticos inversos, que de alguna manera disminuye los

mecanismos efectores de la unión espontánea del receptor CB1, que se piensa pueden ocurrir en la ausencia de agonistas CB1 exógenos o endógenos (Pertwee, 2005). La molécula taranabant, del grupo Merck, se desarrolló como un tratamiento de la obesidad. Se caracteriza por comportarse como un agonista competitivo y como un agonista inverso del receptor CB1 (tabla 3) y además también con capacidad de unión a receptores no CB1 y no CB2 (Fong y cols., 2009). Se han aportado datos además que sugieren que el rimonabant, y por consiguiente posiblemente también AM251 y AM281 y taranabant, pueden provocar efectos cannabimiméticos inversos no solo por la activación del receptor CB1 sino también a través de otros mecanismos independientes de éste receptor (Cinar R y Szücs M, 2009).

Tabla 3. Principales antagonistas y/o agonistas inversos del receptor cannabinoide CB1 (Pertwee, 2011)

	Valores Ki (nM)	Valores Ki (nM)
Antagonistas CB1 selectivos		
Rimonabant	1.8-12.3	514-13200
AM251	7.49	2290
AM281	12	4200
LY320135	141	14900
Taranabant	0.13, 0.27	170,310
Antagonistas CB2 selectivos		
SR144528	50.3->10000	0.28-5.6
AM630	5152	31.2
JTE-907	2370	35.9

En cuanto a las moléculas que se han usado en investigación para bloquear el receptor CB2 (Howlett y cols, 2002; Pertwee, 2005; Pertwee, 1999; Pertwee, 2008), tenemos: 6-iodopravadolina (AM630) y diarilpirazol SR144528. Ambas

moléculas presentan una mayor afinidad por CB2 que por CB1 (Tabla 3) y pueden producir efectos tanto por bloqueo competitivo del receptor como por agonismo inverso.

Los agonistas inversos del CB2 podrían tener una importante acción terapéutica. Ciertamente, hay evidencias de que pueden inhibir la migración de células inflamatorias de tal manera que podría ser efectivos contra la dermatitis, inflamación en el sistema nervioso central y daño óseo en artritis nomoarticular inducida por antígeno (Lunn y cols., 2008).

Antagonistas neutros del receptor cannabinoide

Los antagonistas por competencia neutra son moléculas que se comportan como agonistas, en cuanto al sitio ortostérico de unión al receptor, pero no tienen la capacidad de modular ninguna señal de las que este receptor desencadena en la ausencia de administración exógena, o por liberación del agonista. De momento se conocen:

Tabla 4. Principales agonistas neutros de los receptores cannabinoide

AM6527 y AM4113	SinK y cols., 2009
NESS 0327	Ruiu y cols., 2003
3-alkuil-5.5'-difenilimidazolidinediones	Ooms y cols., 2002
VCHR	Hurst y cols., 2006
O-2654	Thomas y cols., 2007
O-2050	Pertwee RG, 2005
Δ^8 - y Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin	Thomas y cols., 2005
(S)-(-)-WIN55212	Govaerts y cols., 2004

Hay evidencias de que AM4113, AM6527 y NESS 0327 tienen mayor afinidad por CB1 que por CB2 (Ruiu y cols., 2003; Sink y cols., 2009). Pero no se ha investigado sobre su posible acción en receptores no-CB1 no-CB2.

Los agonistas neutros son una muy buena herramienta para la investigación, ya que permite calcular de un modo más fiable el valor de K_B de estos con los receptores. Además los antagonistas neutros parecen que

presentan mayor ratio beneficios-riesgos que los antagonistas/agonistas inversos, cuando son usados como medicinas (Sink y cols., 2008; Chamber y cols., 2007).

2.2 Receptores acoplados a proteínas G.

El **Receptor GRP55** (Sawzdargo y cols., 1999) es una proteína de 319-328 aminoácidos, que se ha sugerido recientemente como nuevo receptor de cannabinoides (Johns DG y cols., 2007; Baker y cols, 2006; Ryberg y cols., 2007) y que podría convertirse en el receptor CB3.

Este receptor es también, como los receptores CB1 y CB2 una proteína de 7 pasos de membrana, acoplada a proteínas G. Se ha encontrado ARN mensajero de esta proteína transmembrana expresado abundantemente por todo el organismo, y en altos niveles en glándulas adrenales, intestino, bazo, y en el sistema nervioso central, sobretodo en el los núcleos del estriado, caudado y putamen en humanos (Ryberg E y cols., 2007). También se ha encontrado la expresión del receptor activo en células óseas (osteoclastos y osteoblastos), donde podría tener un papel importante en la fisiología del hueso, contribuyendo a la regulación del número y función de los osteoclastos (Whyte y cols., 2009).

El **Receptor GRP199** (Fredriksson y cols., 2003) es también un receptor de membrana acoplado a proteínas G. Está formada de 399 aminoácidos y se ha propuesto como el receptor endógeno para la oleiletanolamida.

Hasta la fecha se ha localizado en humanos predominantemente en tejido pancreático y en células L enteroendocrinas del tracto gastrointestinal, y en ratones se ha encontrado en sistema nervioso central (incluyendo cerebelo, corteza, plexo coroideo, hipocampo e hipotálamo), tracto gastrointestinal, y páncreas (Bonini y cols., 2002, Chu y cols., 2008). En el páncreas se le relaciona con control del balance energético (Brown 2007), debido a que su activación eleva la insulina plasmática en ratones (Jones 2006) y disminuye el consumo de

alimentos y el peso en ratas (Rodríguez de Fonseca y cols., 2001; Overton y cols., 2006).

2.3.1. Ligandos cannabinoides de los receptores GRPs

Para el receptor GRP55 se han documentado varios ligandos (Tabla 5) de tres categorías de moléculas. Entre estos hay algunos de los antagonistas y agonistas para los receptores CB1 y CB2 que tienen también afinidad por el receptor GRP55, cuando se administra in vitro a bajas concentraciones, del orden de nanomolar o micromolar, aunque por encima de las concentraciones a las que exhiben normalmente con los receptores CB1 o CB2. Este receptor también tiene ligandos que no son ligandos de los receptores CB1 ni CB2. Ligandos CB1/CB2 que interaccionan con el receptor GRP55 son, por ejemplo, WIN55212 y AM630 (Yin y cols., 2009; Lauckner y cols., 2008), aunque es cierto que de momento hay todavía muy poca bibliografía al respecto y datos contradictorios entre diferentes experiencias.

Tabla 5. Ligandos del receptor GRP55. Drmota y cols., 2004; Ryberg y cols., 2007; Ryberg y cols., 2007; Yin y cols., 2009; Pertwee 2011

Endocannabinoides	Fitocannabinoides	Cannabinoides sintéticos
AEA	Δ^9 - THC	HU210
Noladin éter	CBD	R-(+)-Metanandamida
PEA	CBN	JWH-015
Virodamina		AM251
2-AG		AM281
OEA		CP55940
		Cannabidiol anormal

El receptor GRP119, no sólo está histológicamente más restringido, sino que parece también que tiene un menor número de agonistas (tabla 6). Además aunque por ejemplo haya presentado algo de actividad ante la anandamida, hay que destacar que ésta ha sido mínima. Asumiéndose, hasta la fecha OEA y los endovanilloides, N-oleoildopamina y olvanil como los agonistas endógenos del

receptor GRP119. Aunque ninguno de los tres presente una potencia ni selectividad importante por el receptor.

Tabla 6. Ligandos del receptor GRP199	
Ácido retinoico	Bonini y cols., 2001
factor activador plaquetario (PAF) (1- alquil-2-acetil-sn-glicerol-3fosfocolina)	
LISO-PAF	
Oleoil-lisofosfatidilcolina	Soga y cols., 2005
Estearol-lisofosfatidilcolina	
Palmitoilil-lisofosfatidilcolina	
Lisofosfatidiletanolamina	
Lisofosfatidilinositol	
AEA	Overton y cols 2006
PSN632408 y PSN375963	Fyte y cols., 2005
OEA	Overton y cols., 2006; Fyte y cols., 2006)
N-oleoildopamina	Chu y cols., 2007
Ovanil	
AR-231453	Arena Pharmaceuticals paten WO- 2004065380

2.3 Receptores activados por potencial transitorios (TRPs).

Los canales TRP son una familia de canales catiónicos, formada por 7 subfamilias (Figura 7), altamente conservada desde nematodos hasta humanos: TRPC (clásico), TRPV (vanilloide), TRPM (melastatina), TRPN , TRPA(ankirina), TRPP (policisteina), TRPML (mucolipinas).

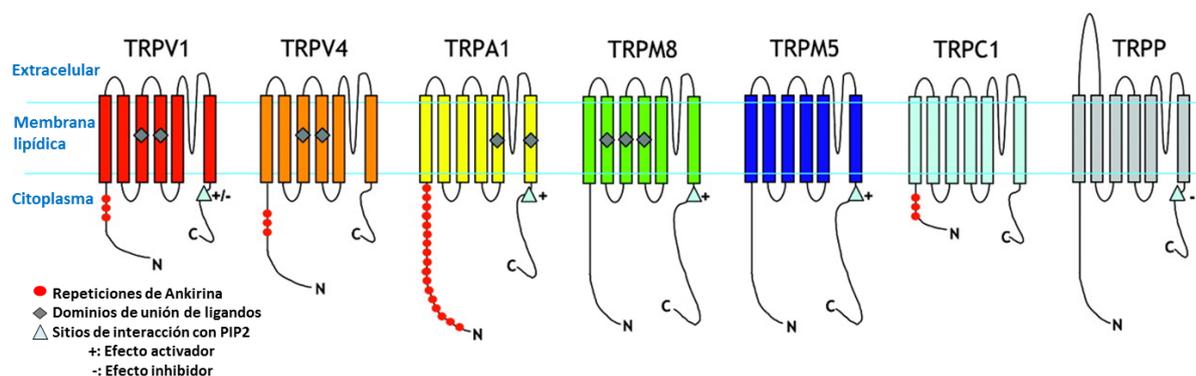


Figura 7. Familias de receptores catiónicos activados por potencial transitorio (TRP) (Blackshaw y Brierley, 2009)

Estos receptores ejercen su función en células sensoriales, poseen activación polimodal, transportan diferentes tipos de iones y algunos se activan por la integración de varios estímulos (Montell, 2005; Ramsey y cols., 2006). Hasta la fecha sólo se ha estudiado la participación en el sistema cannabinoide dos receptores vanilloides (TRPV1 y TRPV2), el receptor de ankirina 1 (TRPA1) y el TRPM8.

Receptores Vanilloides TRPV

El receptor vanilloide más estudiado hasta el momento es el TRPV1. Todos los TRPVs están formados por 4 monómeros cada uno de ellos presenta 6 dominios transmembrana. Los monómeros unidos dejan un pequeño poro hidrofóbico, por el que realizan su función como transportadores de iones (Na^+ , Ca^{2+} , H^+). Todos llevan un dominio N-terminal de ankirina, con el que regulan la entrada iónica y la homeostasis, y que es esencial para su ensamblado y regulación.

Se encuentra altamente expresado en los ganglios sensoriales trigémino y vagal, así como en numerosas zonas cerebrales, entre ellas la zona de control del movimiento y en las células sanguíneas mononucleares (Caterina y cols., 1997; Schumacher y cols., 2000)

Es activado por capsaicina (Caterina y cols., 1997), por temperaturas elevadas ($> 43^{\circ} C$) y pH bajo (Tominaga y cols., 1998), por voltaje (Piper y cols., 1999) y por varios tipos de lípidos (Julius y Basbaum, 2001; Caterina y Julius, 2001), entre los que se encuentran los endocannabinoides e icosanoides productos de lipoxigenasa (Zygmunt y cols., 1999; Hwang y cols., 2000).

En las células es inactivado por la unión de PIP_2 y se libera de este bloqueo mediante la hidrólisis que realiza la PLC-mediated PIP_2 (Prescott y Julius, 2003).

Fue Di Marzo y colaboradores quienes descubrieron la interacción de este receptor con el sistema cannabinoide, siendo la anandamida el primer ligando en el que se vio la interacción (Di Marzo y cols., 1998).

Receptor TRPA1

Este receptor es también un canal iónico no selectivo y se encuentra expresado en las mismas neuronas que el TRPV. Su papel central parece estar relacionado con el control del dolor producido por inflamación y por exposición de moléculas volátiles irritables como el ajo, el aceite de mostaza y la acroleína. Pero también puede tener un papel como mecanorreceptor en el oído interno para la percepción del sonido.

Probablemente actúa a través del segundo mensajero, fosfatidilinositol (Story y cols., 2003; Corey y cols., 2004; Bandell y cols., 2004; Nagatak y cols., 2005).

2.3.1 Ligandos cannabinoides de los receptores TRPs.

Entre los ligandos encontramos algunos endocannabinoides, como anandamida, que efectivamente activan *in vivo* el receptor TRPV1, como se demuestra ya en un centenar de experimentos e incluso experimentos con ratones Knock-out de TRPV1. Además, aunque Δ^9 -THC presente sólo efectos débiles sobre estos receptores, hay fitocannabinoides que no activan los receptores CB1/Cb2, y también análogos sintéticos CB1/CB2 que han demostrado tener actividad sobre estos receptores con potencias significativas. Se podría denominar a los TRPV1 como "receptores cannabinoides ionotrópicos", aunque este canal tiene menos especificidad que los receptores CB1/CB2 y su actividad puede ser directamente modulada por varias moléculas endógenas y xenobióticas que no son ligandos del receptor CB1/CB2. La capacidad del cannabidiol para inhibir la respuesta funcional de TRPM8 podría ser una consecuencia de, al menos en parte, su actividad como agonista sobre el TRPV1, ya que en estudios donde se investiga la relación de los receptores TRPA1 con los efectos farmacológicos del Δ^9 -THC y/ o de compuestos Δ^9 -THC-miméticos, se ha observado que la mayoría de los procesos de regulación que ocurren en este canal de una determinada manera, ocurren en el receptor TRPM8 de modo inverso (De Petrocellis y cols., 2007).

Tabla 7. Ligandos cannabinoides de receptores TRP. (modificada de Pertwee, 2010)

Agonistas TRPV1	Agonista TRPV2	Antagonista TRPM8	Agonista TRPA1
Anandamida	Δ^9 -THC	Δ^9 -THC	Δ^9 -THC
2-AG	HU-210	Anandamida	Anandamida
NADA	CP55940	NADA	NADA
OEA	Cannabidiol	Rimonabant	CP55940
HU-210	Cannabinol	Cannabidiol	R-(+)-WIN55212
R-(+)WIN55212		Cannabinol	JWH-015
Rimonabant		Cannabicromeno	Cannabidiol
JWH-015		Cannabigerol	Cannabinol
Cannabidiol			Cannabicromeno
Cannabicromeno			Cannabigerol
Cannabigerol			

2.4 Receptores activados por proliferadores de peroxisomas o PPAR α , PPAR β y PPAR γ

Los receptores activados por proliferados de peroxisomas (PPARs) son un grupo de receptores nucleares que participan en la expresión de genes como factores de transcripción activados por ligandos (Michalik y cols., 2006). Los PPARs tienen un papel esencial en la regulación de la diferenciación celular, desarrollo, metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y en tumorigénesis (Belfiore y cols., 2009). Además estos receptores juegan un papel importante en muchos tejidos, teniendo funciones específicas en la expresión de los genes implicados en la señalización celular por neurotransmisores y participan en procesos complejos como envejecimiento, neuroprotección, aprendizaje y memoria (Moreno y cols., 2004).

Hasta el momento hay descrito 3 tipos de PPARs: PPAR α , PPAR β y PPAR γ . Cada uno de estos con una expresión determinada (Berger J y Moller DE, 2002).

PPAR α , expresado en múltiples tejidos periféricos como hígado, riñones, corazón, músculo y tejido adiposo.

PPAR β , que se expresa también en muchos tejidos, pero sobre todo, de manera notable en el cerebro, tejido adiposo, y piel.

PPAR γ , tiene tres isoformas diferentes formadas por "splicing" alternativo.

- PPAR γ 1, expresado en prácticamente todos los tejidos, incluidos corazón, músculo, colon, riñón, páncreas y pulmón.
- PPAR γ 2, expresado sobre todo en tejido adiposo.
- PPAR γ 3, expresado en macrófagos, intestino largo, y tejido adiposo.

Todos los PPAR dimerizan con el receptor de retinoides RXR, para unirse a regiones específicas de ADN. Existe una secuencia consenso (AGGTCA \overline{X} AGGTCA), que suele encontrarse en el promotor de los genes con elementos de respuesta a PPARs (PPRE). Cuando el heterodímero se une a esta región del gen la transcripción aumenta o disminuye dependiendo del gen en

concreto. La función de los PPARs es modulada además por una serie de proteínas coactivadoras y correpresoras (Yu y Reddy, 2007).

Los Ligandos endógenos de los PPAR incluyen ácidos grasos, y derivados de eicosanoides.

2.4.1 Ligandos cannabinoides de los receptores PPARs.

Tabla 8. Ligandos cannabinoides de los receptores PPARs	
Agonistas PPARγ	
Δ^9 -THC	O'Sullivan y cols., 2005
CP55940	Sullivan y cols., 2006
Rimonaban	
AM251	
AEA	Pertwee, 2010
CBD	
R-(+)-WIN55212	Mestre y cols., 2009; Giuliano y cols., 2009
R-(+)-MethAEA	Eichele y cols., 2009
Noladin eter	Rockwell y cols., 2006
Agonistas PPARα	
R-(+)-WIN55212	Sun y cols., 2007
Noladin eter	
Agonistas PPARβ	
Noladin eter	Sun y cols., 2007

2.5 Actividad de Δ^9 -THC en receptores y canales no CB1/CB2 del sistema endocannabinoide.

Recientemente se ha ido descubriendo que, tanto los ligandos endocannabinoideos como las moléculas diversas de unión a receptores cannabinoideos CB1/CB2, pueden tener como diana y ejercer una función en diversos receptores y canales iónicos conocidos por otras funciones. Muchos de las nuevas averiguaciones al respecto, son aun datos aislados, que hablan de condiciones de experimentación muy concretas. Quedando pues, mucho trabajo por hacer, para un buen entendimiento de los mecanismos fisiológicos que subyacen de las nuevas aportaciones de la literatura sobre los componentes foráneos del sistema cannabinoide.

De todos los receptores y canales que podrían formar parte del sistema cannabinoide endógeno, quiero destacar en esta tesis aquellos que el THC tiene como diana (Tabla 9), para intentar entender más claramente la pluripotencia que este fitocannabinoide tiene en el organismo.

Tabla 9. Receptores y canales No CB1/CB2 sobre los que Δ^9 -THC tiene algún efecto

Receptor/canal	Referencia
GRP55	Kapur y cols., 2009 Oka y cols., 2007 Oka y cols., 2009
Receptor opioide μ	Vaysse y cols., 1987 Kathmann y cols., 2006
Receptor opioide δ	Kathmann y cols., 2006
β -Adrenoreceptor	Hillard y Bloom, 1982
5-HT _{3A}	Barann y cols., 2002
Receptor de glicina	Hejazi y cols., 2006
Canal de Ca ⁺⁺ tipo T	Ross y cols., 2008
Canal de K ⁺	Poling y cols., 1996
TRPA1	Jordt y cols., 2004 Hinman y cols., 2006 Cavanaugh y cols., 2008
TRPV2	Neeper y cols., 2007
PPAR γ	O'Sullivan y cols., 2006

3 Mecanismo de transducción de señales del Sistema Cannabinoide.

3.1 Mecanismos de señalización de Receptores Cannabinoideos CB1/CB2.

3.1.1 Acoplamiento del receptor CB a efector.

El receptor de cannabinoide pertenece al sistema receptor-acoplador-efector, en el que los acopladores son proteínas G o FAN y los efectores son canales iónicos o enzimas. La proteína G esta formada por 3 tipos de subunidades: α , β y γ . La unión del agonista al receptor aumenta la afinidad de la subunidad α por GTP . Cuando se une a GTP se produce una disociación de las subunidades separándose la subunidad α de las subunidades $\beta\gamma$. La activación de los diferentes efectores puede ser producida por la subunidad α , o bien por $\beta\gamma$. Cuando el GTP unido a α es hidrolizado, se produce un aumento de afinidad de las subunidades de la proteína G , que se ensamblan nuevamente comenzando un nuevo ciclo. Hay varios tipos de proteínas G , clasificadas por el tipo de subunidad α . En la mayoría de los tejidos los receptores cannabinoideos CB están acoplado a sus efectores por proteína inhibidora $G_{i/o}$, acoplada negativamente a adenilato ciclasa (Pertwee, 1997) y positivamente a MAPK (Bouaboula y cols., 1995). En algunos casos se acoplan a proteínas G_s o $G_{q/11}$ (Diaz-Laviada y cols., 2005).

✳ **Acoplamiento a través de la subunidad α de proteínas G .** En la mayoría de los tejidos analizados el receptor cannabinoide se acopla a distintos efectores mediante proteínas G inhibitorias $G_{i/o}$ (sensibles a proteína pertúsica). Una vez activada la proteína G , inhibe la adenilato ciclasa a través de la subunidad α . De este modo disminuyen los niveles de AMPc intracelular. Esta caída en los niveles de AMPc provoca la inhibición de la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc o proteína quinasa A (PKA) (Childers y Deadwyler, 1996). Aunque esto pase en la mayoría de los casos estudiados, se ha descrito también la estimulación de la actividad adenilato ciclasa que incrementan los

niveles de AMPc intracelulares, a través de receptores CB1 acoplados a proteínas estimuladoras G_s (Childers y cols., 1993; Bonhaus y cols., 1998). A través de la proteína G , se activa también la PLC. La PLC hidroliza el fosfatidil inositol en diacilglicerol (DAG) e inositol fosfato (IP). El DAG activa la proteína quinasa C (PKC).

✳ **Acoplamiento a través del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G .** Cuando el cannabinoide se une al receptor CB, el dímero $\beta\gamma$ de la proteína G puede ejercer función en otros efectores como canales de potasio y canales de calcio. En los canales de potasio dependiente de voltaje los receptores cannabinoides acoplados a canales de K^+ a través de proteínas G , provocan un aumento de la conductancia al K^+ (Deadwyler y cols., 1995), esta salida de potasio de la célula, se traduce en disminución de la excitabilidad neuronal y por tanto, reducción de la liberación de neurotransmisores desde el terminal presináptico. En el terminal postsináptico los cannabinoides contrariamente pueden disminuir la salida de iones K^+ , aumentando así la excitabilidad de la membrana (Schweitzer, 2000). Por otro lado en canales de calcio sensibles a voltaje, los cannabinoides también provocan la disminución en la liberación de neurotransmisores desde el terminal presináptico a través de la inhibición de los canales Ca^{++} . Esta señalización esta mediada por la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G . La subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G inhibe los canales de Ca de tipo N y P/Q, que son los mayoritarios en las neuronas presinápticas (Twitchell y cols., 1997; Schlicker y Kathmann, 2001). Los cannabinoides también inhiben los canales de calcio de tipo L en la musculatura lisa de las arterias, que explica el papel vasodilatador de estos compuestos (Howlet y Mukhopadhyay, 2000).

✳ **Acoplamiento a través de otras proteínas.** Por otro lado en algunos tejidos el receptor CB puede activar directamente a la proteína FAN (Sanchez y cols., 2001). En este caso el sistema efector es una enzima, esfingomielinasa neutra, que hidroliza la esfingomielina produciendo ceramidas. La producción de

ceramidas está relacionada en procesos de diferenciación, apoptosis y proliferación.

3.1.2 Cascada de transducción intracelular.

Tras la activación del receptor cannabinoide CB, este puede actuar a través de segundos mensajeros amplificándose la señal, en lo que se denomina cascada de transducción. Existen varios tipos de segundos mensajeros que actúan en la señalización tras la activación de los receptores cannabinoides mediante su unión a proteína *G*, como son AMP cíclico, inositoles fosfatos, inositoles calcio, y ceramidas. Cada uno de estos mensajeros dispara una cascada de señalización diferente y por tanto una función biológica diferente.

✳ **Ruta de las MAP quinasas.** Esta ruta incluye la activación en cascada de una serie de tres tipos de enzimas: MEKK (MEK quinasa), MEK (MAP-ERK quinasas) y MAPK. La cascada de MAPK es un mecanismo de señalización importante que, entre otras, transduce señales extracelulares al núcleo y regula muchos aspectos celulares como son, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular programada o apoptosis (Sweatt, 2001). Esta vía de señalización consiste en la activación secuencial de proteínas quinasas, que fosforilan residuos serina/treonina y/o tirosina. En mamíferos hay descritas 4 grupos de cascadas MAPK que se activan por diferentes tipos de estímulos con diversas funciones biológicas. Los cannabinoides activan la vía Raf/MEK/ERK en multitud de células y tejidos (Demuth y Molleman, 2006; Morantas y *cols.*, 2007). Aunque la vía por la que se activa aún no está esclarecida, parece que participa en la decisión de destino celular de células progenitoras en cerebro adulto (Rueda y *cols.*, 2002).

✳ **Fosfolipasa C.** La ruta PLC/PKC también se puede poner en marcha como consecuencia de la activación de la vía de las MAPK (Shi y *cols.*, 2003).

✳ **Fosfolipasa D y fosfolipasa A₂.** Otra de las posibles vías de actuación de los cannabinoides es la formación de ácido araquidónico (AA). Este ácido graso puede formarse por la acción de la enzima fosfolipasa A₂ o por la

fosfolipasa D. Ambas enzimas pueden ser activadas por cannabinoides a través de receptores CB aunque no en todos los tipos celulares (Burststein y *cols.*, 1994). El AA acumulado, puede metabolizarse en la célula dando lugar a prostaciclina, tromboxanos e hidroperoxiácidos con actividad biológicas. También puede ejercer un efecto directo como AA activando enzimas, canales y receptores nucleares. El AA puede usarse además para la formación de eicosanoides que en el cerebro puede alterar diferentes funciones, como la percepción del tiempo y el ritmo cardíaco (Perez-Reyes y *cols.*, 1991).

✱ **PI3/PKB.** Esta ruta de señalización está implicada en el crecimiento y metabolismo celular (Gómez del Pulgar y *cols.*, 2000).

✱ **Óxido nítrico (NO).** El óxido nítrico se forma en las células por la acción de la enzima, óxido nítrico sintasa (NOS). Existen dos tipos de esta enzima, una constitutiva que se encuentra en algunos tipos celulares, entre ellos neuronas y otra inducible que se genera en respuesta a estímulos relacionados con la inflamación. La unión de cannabinoides a receptores CB provoca la generación de NO principalmente a través de la NOS constitutiva (Stefano, 2000). Esto puede estar relacionado con algunos de los efectos de los cannabinoides como son el efecto vasodilatador, la disminución de la función inmunovascular y la inhibición de la liberación de neurotransmisores. También se ha registrado la producción de NO provocada por CB a través de NOS inducible (Esposito y *cols.*, 2001).

✱ **Cascada Pi3K/Akt,** Esta vía también parece ser una vía importante de activación cannabinoide, que participa en supervivencia y destino celular (Molina-Holgado y *cols.*, 2007).

3.1.3 Regulación de la expresión de genes.

La mayoría de las cascadas desembocan en la producción de proteínas. Estas proteínas son factores de transcripción que en el núcleo, regulan la expresión de determinados genes que dará lugar al aumento de la producción de proteínas responsables de un efecto biológico determinado. Parece ser que existen múltiples cascadas de señalización, que activadas por cannabinoides provocan la activación de factores de transcripción diversos, quedando aún mucho trabajo por hacer. Por ejemplo los cannabinoides pueden activar los factores de transcripción temprano Krox-24 (Bouaboula y *cols.*, 1995), modular factores como Fos/Jun, NF κ B (Kaminski, 1998) y CREB/ATF (Herring y *cols.*, 2001)

3.2 Mecanismos de señalización de receptores GRP55.

Este receptor está acoplado a proteínas G de tipo $G_{11/12}$ y G_q . La activación de este receptor por cannabinoides en neuronas del ganglio dorsal induce movilización del reservorio de calcio. En los mecanismos por el cual se provoca la salida de Ca^{++} están implicadas las proteínas $G_{11/12}$, G_q , RhoA y PLC (Lauckner y *cols.*, 2008).

3.3 Mecanismo de señalización de receptores GPR119.

Parece ser que este receptor actúa acoplado a proteína G de tipo G_s (Brown, 2007). Aunque su papel fisiológico no está aún determinado.

3.4 Mecanismo de señalización de receptores vanilloides.

Como se ha explicado anteriormente algunos cannabinoides pueden también unirse a receptores vanilloides tipo 1 y 2. Se sabe que la activación de los receptores TRPV1 puede producir la activación de la muerte programada o apoptosis. De tal modo que la unión del cannabinoide al receptor vanilloide provoca aumento del calcio intercelular, activación de la cascada de señalización

de AA, caída del potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c y activación de caspasas-3, y caspasas-9 (Maccarrone y *cols.*, 2000).

3.5 Mecanismo de señalización de receptores PPAR.

La unión de los ligandos a este receptor provoca 2 tipos diferentes de mecanismos de actuación: Transactivación dependiente de ligando y transrepresión dependiente de ligando, que controla los efectos vasculares (Gervois y *cols.*, 2007). En el mecanismo de transactivación, el PPAR α regula la transcripción de sus genes diana por heterodimerización con el receptor X del ácido 9-cis retinoico (RXR). El heterodímero PPAR α /RXR se une al elemento respuesta a proliferadores peroxisómicos (PPRE) localizado en el promotor de sus genes diana. El heterodímero PPAR α /RXR, una vez activado por el ligando, se asocia con cofactores que presentan actividad acetiltransferasa de histonas (HAT), lo que modifica la estructura del nucleosoma, posibilita el contacto con los factores de transcripción generales y permite la transcripción del gen.

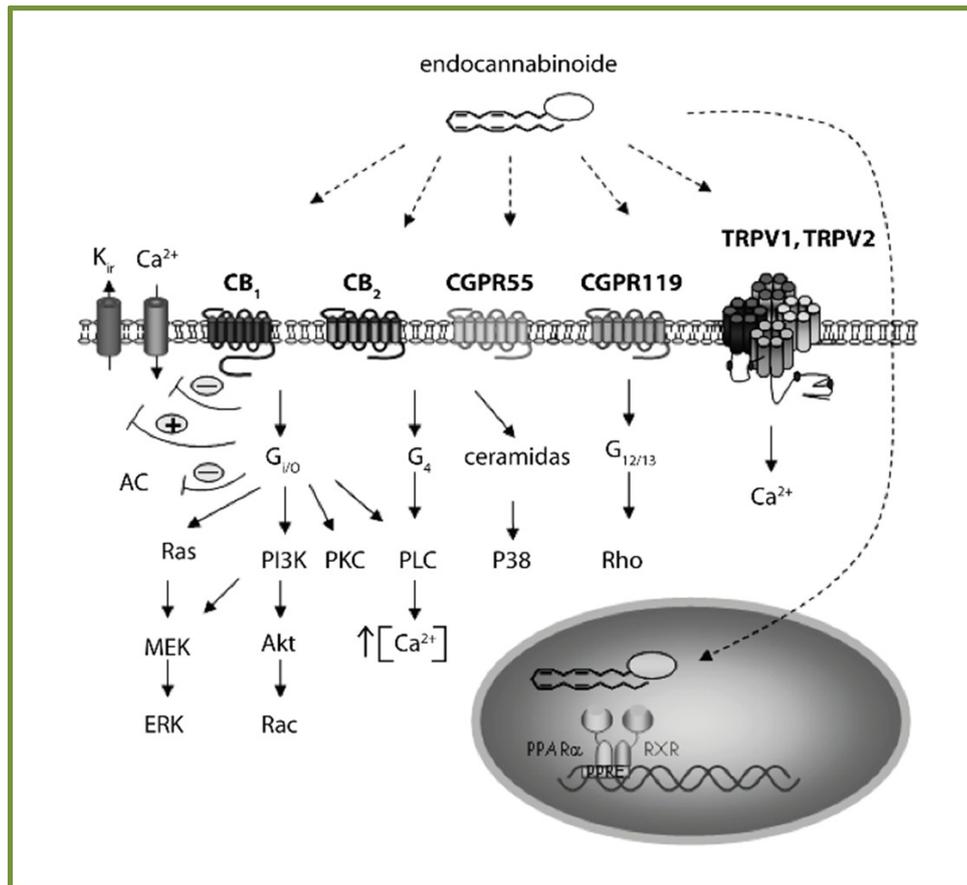


Figura 8 Esquema de los principales receptores cannabinoides y sus vías de señalización (Ramos Atance y cols., 2009).

4 Mecanismo de acción molecular de los cannabinoides en el sistema nervioso central.

Los endocannabinoides, en contraste con los otros neurotransmisores, se caracterizan por su actuación como mensajeros retrógrados para muchos de los tipos de sinapsis centrales. Es decir, estos compuestos son liberados desde la neurona postsináptica tras la despolarización. Liberados hacia la neurona presináptica donde activan los receptores cannabinoides, inhibiendo la liberación del neurotransmisor. Esta acción de los cannabinoides les confiere un importante papel fisiológico como reguladores de la actividad sináptica (Alger, 2002). Se cree que la señalización retrógrada de las moléculas endocannabinoides está ampliamente distribuida en todo el SNC, aunque parece que está más concentrada en ciertos fenotipos neuronales, como las neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y colinérgicas (Hoffman y cols., 2003). Mediante

la señalización retrógrada, los endocannabinoides son capaces de participar por un lado en la regulación a corto plazo de sinapsis inhibitorias (neuronas GABAérgicas) y excitatorias (neuronas glutamatérgicas), dando lugar a fenómenos de supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI) y supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE) (Chevalleyre y cols., 2006). Y por otro lado participan también por este mecanismo en plasticidad sináptica a largo plazo (LTD) (Robbe y cols., 2002). Estos 3 tipos de procesos, DSI, DSE y LTD inducidos por cannabinoides se han descrito en diversas áreas cerebrales, como núcleo acumbens, hipocampo, amígdala, corteza y cerebelo, donde son de vital importancia en procesos de plasticidad sináptica y reafirmación de circuitos neuronales, que contribuyen a la formación de la memoria asociada a la experiencia (Freud y cols., 2003).

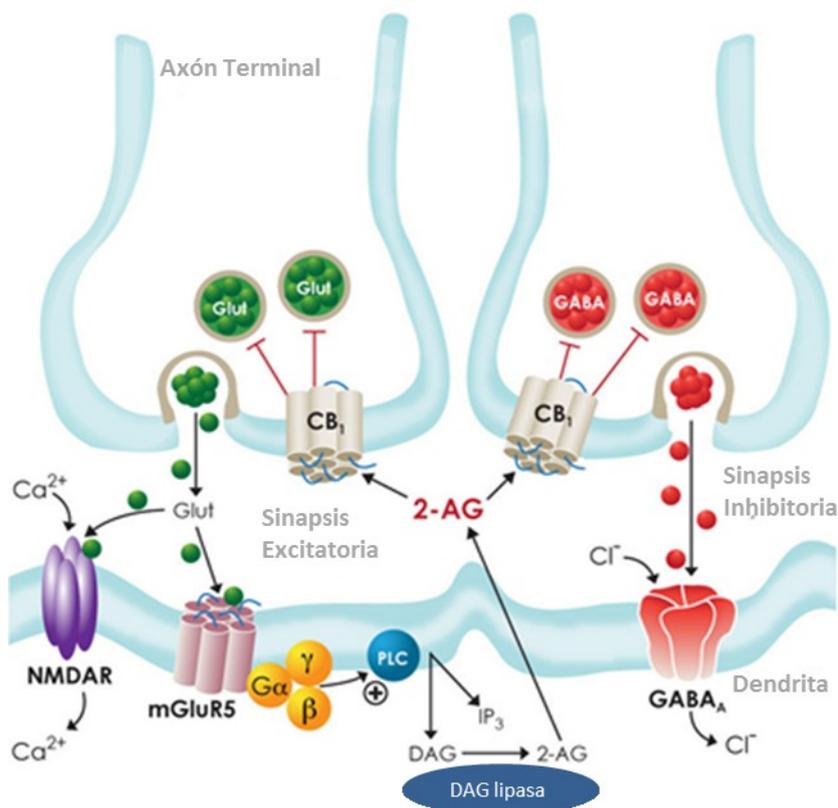


Figura 9. Mecanismos de señalización retrógrada a través de los cuáles actúan los endocannabinoides. Abrev.: 2-AG, 2-acilglicerol; PLC, fosfolipasa C, DAG, diacil-glicerol; Glut, glutamato; mGluR5, receptor metabotrópico de glutamato 5; NMDAR, receptor N-metil-D-aspartato de glutamato; Ca, calcio; IP₃, trifosfato de inositol.

5 Acciones fisiológicas del sistema endocannabinoide y efectos de los cannabinoides

Entre los efectos producidos por los cannabinoides encontramos los relacionados con las funciones fisiológicas de los endocannabinoides por un lado, y los efectos adversos que pueden ser a nivel central o no relacionados con el sistema nervioso. De hecho la principal dificultad técnica para el uso de cannabinoides en terapias es la incapacidad de separar los efectos colaterales indeseables, de los efectos terapéuticos beneficiosos. Los efectos secundarios más importantes a nivel central de los cannabinoides son euforia, desinhibición, sedación, pérdida de memoria, alucinaciones, distorsión de la imagen corporal y la percepción sensorial, ataques de pánico y exacerbación de los síntomas esquizofrénicos. Y por otro lado, los efectos secundarios no relacionados con el sistema nervioso incluyen: taquicardia, hipotensión postural, sequedad de boca, ataxia e inmunosupresión.

Algunas de las funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide, y por tanto dianas de acción terapéutica del uso de cannabinoide están resumidas en la tabla 10.

Tabla 10. Algunos efectos fisiológicos, fisiopatológicos y farmacológicos de los cannabinoides.			
Proceso Biológico	Efecto del SEC	Localización de receptores	Referencia
Actividad motora	Hipolocomoción, catalepsia y ataxia	Ganglios basales; cerebelo; sustancia negra	Fernandez-Ruiz y cols., 2002; Sagredo y cols., 2007.
Memoria	Déficit cognitivos	Hipocampo	Rieles y Davies, 2005
Nocicepción	Analgesia espinal y supraespinal	Diferentes áreas cerebrales y espinales	Cravatt y Lichman, 2004
Procesos vegetativos	Regulación de la émesis hipotermia	Hipotálamo, área postrema	Wenger y Moldrich, 2002; Durán y Capellà, 2003
Procesos cognitivos	Alteraciones de la realidad, alteraciones en motivación, emotividad, ansiedad y sistema de recompensa	Corteza cerebral y sistema límbico	Viveros y cols., 2005; Solinas y cols., 2008; Fernandez-Espejo y cols., 2008; Parolaro y cols., 2010.
Control supervivencia celular	Neuroprotección/ Neurotoxicidad	Nivel celular en diversas áreas cerebrales.	Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Kim y cols., 2008.
Proliferación neuronal	Antitumoral / Regulación proliferación neuronal Modulador epigenético	Embriología del sistema nervioso. Diversas áreas proliferativas en cerebro adulto, dianas tumorales	Fernandez-Ruiz y cols., 2004 Velasco y cols., 2007; Aguado y cols., 2005.
Regulación neuroendocrina	Cambio en liberación de hormonas adenohipofisarias	Hipotálamo medio basal	Gammon y cols., 2005
Apetito e ingesta	Aumento del apetito , regulación del balance energético	Hipotálamo y mecanismos periféricos	Di Marzo y Matias, 2003; Costa, 2008
Sueño	Estimulación del sueño	Hipotálamo lateral	Murillo-Rodriguez, 2008
Metabolismo óseo	Estimulación de la formación de hueso, Inhibición de la reabsorción	Masa ósea	Bab y Zimmer, 2008
Sistema reproductor	Inhibición secreción hormonal	Eje hipotálamo-hipofisario y gónadas	Rossato y cols., 2008
Inflamación	antiinflamatorio	Regiones centrales y periféricas	Ashton, 2007

5.1 Efectos de los cannabinoides sobre el control motor

El sistema cannabinoide está estrechamente ligado al movimiento y participa en su control. De hecho entre las patologías que mayor interés suscita en relación a la posible utilidad de los cannabinoides están las enfermedades motoras, como la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington. La relevancia del sistema cannabinoide en el control motor se pone de manifiesto cuando se descubre que los cannabinoides son capaces de producir importantes cambios en la actividad motora en humanos y animales (Rodríguez de Fonseca y *cols.*, 1997), que los diferentes componentes del sistema cannabinoide están presentes en los ganglios basales abundantemente (Helkenham y *cols.*, 1991), que los cannabinoides son capaces de alterar la funcionalidad de los tres neurotransmisores que participan en la señalización de las estructuras nerviosas involucradas con el movimiento (Glass y *cols.*, 1997) y que los ratones sin el receptor CB1 presentan anomalías motoras (Valverde y *cols.*, 2005).

5.1.1 Ganglios basales. Presencia del Sistema endocannabinoide.

Los ganglios basales es una estructura funcional del encéfalo compuesta por un conjunto de núcleos interconectados entre sí, involucrados en diversos aspectos del control de la conducta motora (Alexander y Crutcher, 1995). Los ganglios basales es un circuito a ambos lados del tálamo formado por:

- Estriado. Estructura que recibe aferencias desde el tálamo, el cortex sensorial, el cortex motor y el límbico, y está compuesta por el núcleo caudado y el putamen.
- Una estructura compuesta por el globo pálido externo (GPe). Los núcleos subtalámicos (NST) y la sustancia negra pars compacta (SNc).
- Una estructura que envía eferencias a áreas motoras del tálamo y el tronco del encéfalo, formada por el globo pálido interno (GPi), la sustancia negra pars reticulada (SNr).

Un modelo simplificado de los ganglios basales comprende dos circuitos: directo e indirecto (Figura 11).

- **Directa:** las neuronas glutamatérgicas de la corteza motora inervan dos tipos principales de neuronas GABAérgicas del estriado. Un tipo de neuronas coexpresan los neuropéptidos dinorfina (dyn) y sustancia P (SP) y posee receptores dopaminérgicos D1. Estas neuronas proyectan directamente sobre el globo pálido parte interna (GPi), y a la sustancia negra (SN), con acción inhibitoria.

- **Indirecta:** Otro tipo de neuronas GABAérgicas expresan encefalinas (enk) y receptores dopaminérgicos D2. Estas neuronas proyectan indirectamente al GPi y a SN, a través del globo pálido externo (GPe) y NST. En primer lugar envían estímulos inhibitorios al GPe, que a su vez ejerce efecto inhibitorio (GABA) sobre el NST. El NST ejerce un efecto excitatorio glutamatérgico sobre globo pálido externo e interno, y la sustancia negra.

Los ganglios basales no solo están implicados en el inicio y cese de la actividad motora, sino también en otras facetas importantes del comportamiento motor como: la regulación de la postura y del tono muscular, el aprendizaje motor y a los aspectos emocionales de las respuestas motoras (Aldridge y Berridge, 1998).

Los componentes del sistema cannabinoide, receptores CB1 y sus ligandos, anandamida y 2-araquidonil glicerol, están ampliamente presente en las diversas estructuras de los ganglios basales (Berrendero y cols., 1999), aunque es importante destacar que el receptor CB1 está siempre localizado en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas y nunca en neuronas dopaminérgicas a excepción del periodo de desarrollo encefálico (Hernandez y cols.,2000).

Como se muestra en la figura (Figura 11) los receptores CB1 se han localizado principalmente en las terminales axónicas presinápticas de las neuronas GABAérgicas que proyectan desde el estriado a la sustancia negra pars reticulada y al globo pálido (Herkenham y *cols.*, 1991; Westlake y *cols.*, 1994) y también en las neuronas de glutamato que proyectan desde el núcleo subtalámico a la sustancia negra pars reticulada (Glass y *cols.*, 1997). Se ha documentado también la presencia de receptores CB1 en las neuronas glutamatérgicas corticoestriatales y en algunas poblaciones de interneuronas GABAérgicas del estriado (Fusco y *cols.*, 2004). Pero hasta la fecha, no se han encontrado receptores CB1 expresados en las neuronas dopaminérgicas que inervan el estriado desde la sustancia negra. Aunque sí se han encontrado de manera postsináptica, colocalizando con receptores dopaminérgicos en las neuronas del estriado (Julian y *cols.*, 2003).

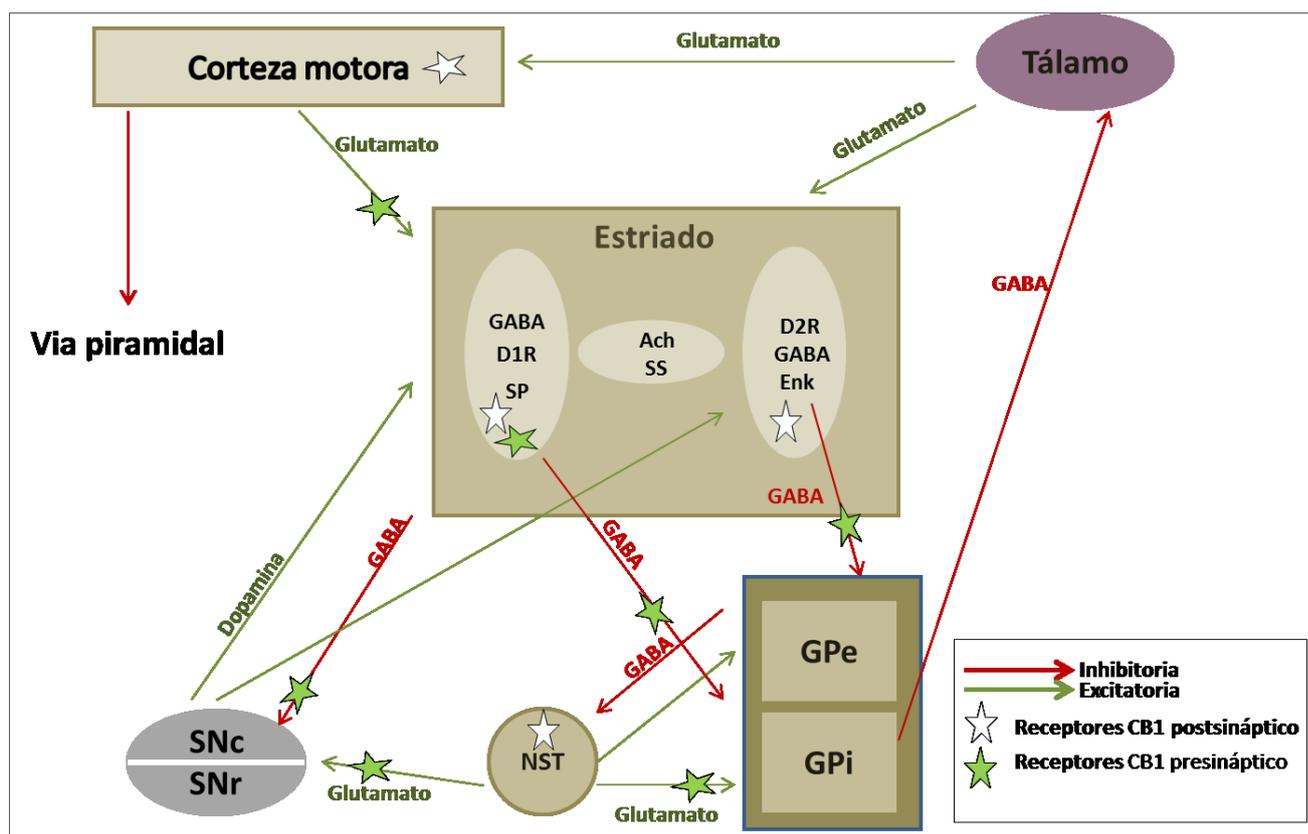


Figura 10. Esquema simplificado de conexiones de los ganglios basales. Y distribución de los receptores cannabinoides CB1. En la figura se representan los principales núcleos y las interacciones destacadas entre ellos (flechas), SNc, sustancia negra pars compacta; SNr, sustancia negra pars reticulada; NST, núcleo subtalámico; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; D1R, receptor D1 de dopamina; D2R, receptor D2 de dopamina; SP, sustancia P; Enk, encefalina (Fernández-Espejo, 2004).

Por otro lado en el globo pálido y en la sustancia negra hay presencia de los ligandos endógenos cannabinoides, y una alta actividad de la enzima que degrada la anandamida, la ácido graso amida hidrolasa (FAAH) (Tsou y cols., 1998).

Otro importante receptor del sistema cannabinoide presente abundantemente en los ganglios basales es el receptor TRPV1. El cual se ha encontrado en neuronas dopaminérgicas, colocalizando con la enzima tiroxina hidroxilasa (Mezey y cols., 2000), y en terminales glutamatérgicos que inervan la sustancia negra pars compacta (Marinelli y cols., 2007)

5.1.2 Función del sistema cannabinoide en los ganglios basales.

Los efectos motores provocados por la activación de los receptores CB1 con los diferentes tipos de cannabinoides vegetales, sintéticos o endógenos, son el resultado de la capacidad de estas sustancias de interferir en la actividad de los tres principales neurotransmisores implicados en la funcionalidad de los ganglios basales, GABA, glutamato y dopamina. Los efectos de los cannabinoides, observados en experimentación con animales, sobre estos neurotransmisores se encuentra resumida en la tabla 11 extraída de Fernández-Ruiz y cols., 2002.

Tabla 11. Efectos del delta-9-tetrahidrocannabinol sobre algunos neurotransmisores implicados en el control del movimiento a nivel de los ganglios basales (modificada de Fernández-Ruiz y cols., 2002)

Neurotransmisor	Efectos neuroquímicos	Referencia
Dopamina	-Disminución de receptores D1 y D2 en el estriado por agonistas CB1.	Romero y cols., 1995
	-Descenso de actividad TH por agonistas CB1.	Navarro y cols., 1993.
	-Descenso in vitro de la liberación de DA en fragmentos de estriado por agonistas cannabinoides	Navarro y cols., 1993.
	-Efectos sobre la generación de potenciales de acción por antagonistas y agonistas CB1.	Tersigni y cols., 1996
GABA	-Los antagonistas GABA-B reducen la inhibición motora inducida por cannabinoides.	Romero y cols., 1996
	-Reducción de la recaptación de GABA por agonistas cannabinoides,	Maneuf y cols., 1996
	-Modulación de la liberación de GABA por agonistas cannabinoides (medido por electrofisiología)	Miller y cols., 1998
	-Reducción de la actividad GABAérgica por antagonistas CB1	Gueudet y cols., 1995
Glutamato	-Inhibición de la liberación de glutamato en sustancia negra y estriado por agonistas cannabinoides	Gerdeman y cols., 2001

Neuromodulación de GABA

En relación a la neurotransmisión por GABA, hay aun datos contradictorios, pero se ha descrito que los cannabinoides incrementan la acción de GABA en las sinapsis, incrementando la liberación del neurotransmisor GABA (Miller y cols., 1998) y/o inhibiendo la recaptación del mismo (Romero y cols., 1996), en el globo pálido, sustancia negra y en neuronas GABAérgicas estriatonigrales (Maneuf y cols., 1996). Es, en parte, por esta razón, y teniendo en cuenta que GABA es neurotransmisor inhibitor, que los cannabinoides presentan efectos hipoquinéticos (Fernandez-Ruiz y cols., 2002). Se sabe además que este efecto está mediado por el receptor GABA-B (Romero y cols., 1996).

Neuromodulación de glutamato

Los cannabinoides vegetales, sintéticos y endógenos son capaces de alterar la actividad de las neuronas glutamatérgicas. En concreto los cannabinoides actúan en el terminal presináptico glutamatérgico inhibiendo la liberación de glutamato en neuronas de distintas estructuras del encéfalo, como el hipocampo, el cerebelo, así como también en los ganglios basales (Levenes y cols., 1998)

Neurotransmisión de dopamina

La liberación de dopamina en relación con el comportamiento motor y en el contexto de los ganglios basales, tiene lugar en la inervación del estriado desde las neuronas de la sustancia negra. La disfunción de esta ruta origina la enfermedad de Parkinson (Graybiel y cols., 1994).

La interacción de los receptores cannabinoide y dopaminérgico tiene un sustrato neurobiológico, debido a que ambos son receptores asociados a proteínas *G* (Matsuda y cols., 1990). Al encontrarse ambos receptores acoplados al mismo sistema de traducción de señales, la activación del receptor CB1 localizado en las principales áreas dopaminérgicas produciría una modulación directa en las neuronas dopaminérgicas.

Los diferentes estudios muestran que el mecanismo por el cual el sistema cannabinoide produce modificaciones en la neurotransmisión dopaminérgica puede explicarse por varias vías:

- **Inhibición directa.** La activación de los receptores CB1 implicaría la inhibición directa de la liberación de dopamina mediante la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (Glass y Felder, 1997).
- **Inhibición indirecta.** Debido a que los receptores CB1 se localizan también presinápticamente en los terminales GABAérgicos estriatopalidales y estriatonigrales, produciría un mecanismo de inhibición indirecta. Esto es así, porque como ya se ha visto la activación de CB1 de los terminales presinápticos provocarían una liberación y/o inhibición de la recaptación de GABA, neurotransmisor inhibitorio, sobre las neuronas dopaminérgicas.

En otro nivel de regulación se han observado otros mecanismos de modulación de la actividad de ambos sistemas:

- La activación del sistema cannabinoide produce una inhibición de la actividad del precursor de la síntesis de dopamina, la tiroxina hidroxilasa (TH) (Romero y cols., 1995).
- Los cannabinoides parecen modular el perfil ontogénico de los receptores D1 y D2 (Fernández-Ruiz y cols., 1994).

- La expresión del gen CB1 parece estar bajo el control negativo de las neuronas de la sustancia negra (Lastres-Becker y cols., 2001).

5.2.3. Efectos del fitocannabinoide Δ^9 -THC a nivel motor.

En la Tabla 12 se recoge un resumen de los efectos motores producidos por la administración de Δ^9 -THC en animales de experimentación. En general los principal efecto farmacológico a nivel motor son hipoactividad motora y la catalepsia (Dewey, 1986). No obstante, el efecto de los cannabinoides parece ser bifásico. A dosis bajas los cannabinoides tienen un efecto estimulante y a dosis altas un efecto inhibitor sobre la actividad locomotora (Davis y cols., 1972). Por otra parte, la administración de dosis muy elevadas puede producir hiperreflexia, dando lugar al efecto conocido como "pop-corn behaviour" en ratones y "barrel rotation behaviour" en ratas (Martin y cols., 1991).

Tabla 12. Efectos en el comportamiento motor producidos por Δ^9 -THC en animales de experimentación. Fernández-Ruiz y cols., 2002

Efecto motor	Referencia
Disminución de la actividad espontánea y estereotipias en ratas	Romero y cols., 1995; Navarro y cols., 1993
Aumento de inactividad en ratas	Romero y cols., 1995; Rodríguez de Fonseca y cols., 1994
Incremento de hipoquinesia inducida por reserpinas en ratas	Moss y cols., 1981
Disminución de Hiperactividad inducida por anfetamina en ratas	Gorriti y cols., 1999
Deterioro del control motor fino en ratas	McLaughlin y cols., 2000
Aumento de actividad motora a dosis bajas	Sañudo-Peña., 2000
Reducción de actividad motora espontanea e inducción de catalepsia en ratones	Wickens y cols., 1993; Pertwee y cols., 1988

5.2 Sistema cannabinoideas y enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson o "parálisis agitante" es una enfermedad crónica y progresiva que pertenece al grupo de enfermedades de trastornos del movimiento. Fue descrita por primera vez por James Parkinson, en 1817. Siendo definida como "movimiento trémulo involuntario, con debilidad muscular, en parte sin estar en acción; afecta incluso al apoyo normal, con tendencia al encorvamiento hacia delante y la aceleración involuntaria del paso, sin merma de la integridad de sentidos e intelecto". Hoy se sabe que esta definición no es exacta ya que, por ejemplo, posteriormente en el transcurso de la enfermedad aparecen deficiencias cognitivas (Lang y cols., 1998).

Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson está causada por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta, lo que conlleva la pérdida de dopamina en el núcleo caudado y putamen, la manifestación patológica incluye cambios degenerativos, tales como la muerte neuronal, la despigmentación en la sustancia negra y la aparición de inclusiones intracelulares en las neuronas dopaminérgicas denominadas cuerpos de Lewy. La muerte de neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral y en otras neuronas monoaminérgicas también ocurre, aunque en menor medida y más tardíamente.

La ruta dopaminérgica que está dañada en pacientes de Parkinson. Esta ruta (Figura 10) que parte de la sustancia negra (SN) libera dopamina en el estriado. La dopamina provoca inhibición de las neuronas GABAérgicas estriatales con receptores dopaminérgicos D2 y efecto excitatorio sobre las neuronas con receptores dopaminérgicos D1. El hecho de que GABA se encuentre no-inhibido provoca la disminución de actividad del núcleo globo pálido externo (GPe), frenando así la acción inhibitoria del GPe sobre el núcleo subtalámico (NST). Se produce de este modo la liberación del NST al desaparecer esta inhibición, con lo que aumenta el estímulo excitatorio de dicho núcleo a todos los niveles: SN, GPe, GPi. Por otro lado, la disminución de la acción dopaminérgica sobre neuronas con receptores dopaminérgicos D1 estriatales conlleva una amortiguación de la acción inhibitoria GABAérgica de las neuronas estriatales sobre GPi. Por lo tanto, como resultado final, en ambas vías se produce un incremento de la acción GABAérgica del GPi. Esta hiperactividad causa la inhibición del tálamo motor que es el responsable del control motor de las áreas corticales implicadas en la iniciación del movimiento. La hipoactividad glutamatérgica tálamo-cortical se relaciona con síntomas como la rigidez, lentitud de movimientos, acinesia, etc. El temblor se cree debido al "escape" del tálamo motor a la potente inhibición procedente del GPi, originando ráfagas de disparo hacia la corteza.

Los individuos sanos poseen una amplia reserva de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Así los síntomas parkinsonianos no ocurren hasta que la pérdida de neuronas es entorno al 80%. La actividad compensadora de las neuronas restantes, tales como el aumento de la síntesis de la tiroxina hidroxilasa, o el desarrollo de hipersensibilidad de receptores dopaminérgicos actúan como mecanismos de neuroadaptación.

Implicación del sistema cannabinoide en la enfermedad y potencial terapéutico.

En la enfermedad de Parkinson hay una regulación al alza de los receptores CB1, en humanos (Lastres-Becker y *cols.*, 2001) y animales de experimentación (Di Marzo y *cols.*, 2001; Romero y *cols.*, 2001) esto puede deberse a que como ya se ha mencionado, la expresión del gen CB1 parece estar bajo el control negativo de las neuronas de la sustancia negra (Lastres-Becker y *cols.*, 2001). Y quizás es por esto que en algunos pacientes se da disminución de receptores CB1, provocada quizás por el tratamiento con levodopa. Asumiendo la hiperactividad cannabinoide en los enfermos de Parkinson en principio el tratamiento con antagonistas cannabinoides debería de paliar síntomas, aunque se debe tener en cuenta que el efecto cannabinoide es diferente en cada núcleo encefálico:

- **Estriado:** la hiperfuncionalidad cannabinoide en la enfermedad de Parkinson agrava la pérdida dopaminérgica a niveles estriatales. Por esta razón los antagonistas cannabinoides pueden tener efectos positivos sobre la sintomatología motora, ya que actuaría facilitando la vía directa que expresa receptores D1 (Fernández-Espejo y *cols.*, 2005). La vía directa sufre disminución de la salida de GABA desde el estriado al pálido interno y sustancia negra, por lo que el aumento de CB1 en esta zona agrava los síntomas, por lo que los antagonistas a este nivel mejoraría la sintomatología. Por otro lado, el uso de antagonistas cannabinoides compensaría la vía directa inhibiendo la actividad neuronal.

- **Corteza motora:** propio de la enfermedad es la hipoactividad glutamatérgica, procedente de la corteza, que se ve agravada por el exceso cannabinoide a nivel estriatal, por lo que los antagonistas cannabinoides podrían compensar dicha hiperactividad, mejorando la sintomatología (García-Arencibia y *cols.*, 2008).

- **Globo pálido:** En los enfermos de Parkinson la vía indirecta se caracteriza por un exceso de actividad GABAérgica estriatopalidal, que puede ser paliada con el uso de antagonistas cannabinoides (Fernandez-Espejo y cols., 2005). La vía directa sufre disminución de la salida de GABA desde el estriado al pálido interno y sustancia negra, luego el aumento de CB1 en esta zona agrava los síntomas, por lo que los antagonistas a este nivel mejoraría la sintomatología.

- **Núcleo subtalámico:** Por la enfermedad el núcleo subtalámico presenta hiperactividad. En este caso la regulación al alza de receptores CB1 actuaría como un mecanismo compensador, ya que disminuye la salida glutamatérgica hacia la sustancia negra y el globo pálido interno. En este caso, los estudios demuestran que el uso de agonistas cannabinoides facilita el movimiento ante las pérdidas motoras parkinsonianas (Sañudo-Peña y Walker, 1997).

- **Sustancia negra:** En la enfermedad se da una disminución GABAérgica desde el estriado en la sustancia negra, pero sobre todo a tener en cuenta el predominante aumento glutamatérgico desde el núcleo subtalámico. Es por esto que los antagonistas no funcionarían por agravar la hiperactividad glutamatérgica, así como tampoco serían funcionales los agonistas ya que mermarían aún más la ya de por sí disfunción dopaminérgica.

En el uso de cannabinoides como paliativos de la sintomatología parkinsoniana es importante tener en cuenta el grado de lesión que subyace al paciente, ya que según la gravedad de la enfermedad algunos de los inconvenientes del uso podrían hacerse insignificantes. De hecho en los casos más graves el uso de antagonistas cannabinoides pueden ser útiles donde la medicación actual pierde eficacia.

Entre los problemas sintomatológicos que tiene que afrontar un enfermo de Parkinson se encuentran las discinesias o movimientos involuntarios, junto a fluctuaciones motoras. Estas complicaciones están provocadas por el tratamiento a largo plazo con levodopa (Nutt, 2000). Actualmente se considera que las discinesias se deben a una respuesta anormal por hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos D1 del estriado, así como a la entrada glutamatérgica cortico-estriatal alterada. Luego tanto los agonistas como los antagonistas cannabinoides podrían actuar sobre dichos fenómenos (Segovia y cols., 2003), contrarrestando la desregulación glutamatérgica y la hipersensibilidad dopaminérgica respectivamente. Pero los datos con antagonistas son inconsistentes, mientras que los agonistas cannabinoides parecen ser más eficaces en enfermos de Parkinson tratados con levodopa tanto en humanos como en animales de experimentación. Entre los agonistas, WIN55,212-2 se ha mostrado como el más eficaz. Esto parece deberse a que además de agonista cannabinoide es un inhibidor del receptor vanilloide TRPV1. De hecho, actualmente se investiga más profundamente la interacción de este receptor en el control motor y su posible acción terapéutica (Fernandez-Ruiz y cols., 2010)

Por otro lado los cannabinoides pueden procurar neuroprotección en la enfermedad de Parkinson. La neuroprotección vendría dada por su capacidad para disminuir el estrés oxidativo que es la principal causa etiológica de la enfermedad. Este efecto cannabinoide se explica en el apartado 5.3. Cannabinoides neuroprotección/neurotoxicidad.

Modelo animal de enfermedad de Parkinson. 6-hidroxidopamina

En la actualidad existen una buena variedad de modelos animales para el estudio de esta enfermedad neurodegenerativa, entre ellos hay modelos de origen genético y modelos tóxicos de daño dirigido a neuronas dopaminérgicas. El modelo que se ha usado en el desarrollo de esta tesis doctoral es el modelo de Parkinson por daño tóxico con de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

La 6-OHDA es, por otro lado, la neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales. Fue la primera sustancia química a la que se le describieron efectos neurotóxicos en las vías de transmisión catecolaminérgicas (Sachs y cols., 1975). La 6-OHDA es una molécula de estructura análoga a la dopamina, por lo que usa el mismo transportador que dopamina y noradrenalina para dirigirse al interior de la neurona. Es por esto que se muestra tan eficaz ya que puede dirigirse, y por tanto, dañar, exclusivamente a las neuronas dopaminérgicas, si podemos inhibir el resto de transportadores noradrenérgicos.

En esta tesis, se ha usado el modelo de hemiparkinsonismo intranigral. En este modelo la 6-OHDA es inyectada directamente en la sustancia negra homolateralmente, por medio de técnicas estereotáxicas. Al inyectar el tóxico en la sustancia negra se induce una degeneración estática y rápida.

Una vez ha sido inyectada la toxina, esta entra en las neuronas dopaminérgicas por el transportador específico. Dentro de la célula la 6-OHDA posee una potente acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial, aunque la muerte de estas células por 6-OHDA está básicamente asociada a la formación de H_2O_2 , radicales libres de hidroxilo y quinonas que se producen en la metabolización de la molécula. Estos agentes oxidantes provocan peroxidación de lípidos, mutaciones, rupturas de DNA y desorganización de citoesqueleto, que provocan la muerte rápida de las neuronas afectadas.

Una de las ventajas de este modelo es que al ejercer una lesión unilateral, aparecen asimetrías motoras, que nos permiten fácilmente cuantificar la magnitud del daño *in vivo*.

5.3 Neurotoxicidad y neuroprotección mediada por los cannabinoides

En los últimos años los cannabinoides han adquirido un creciente interés. Parte del interés que suscita está en la relevancia que ha ido adquiriendo por su capacidad neuroprotectora, que se enfrenta a la capacidad neurotóxica que también presenta en situaciones patológicas.

En los últimos hallazgos científicos al sistema cannabinoide se le está atribuyendo la función biológica neuroprotectora, pero además se encuentra que si bien en situaciones normales el sistema cannabinoide, en general y los agonistas cannabinoides en concreto, presentan capacidad neuroprotectora, en situaciones patológicas estos mismo agonistas pueden provocar la muerte programada, celular o apoptótica.

Neuroprotección

Tanto los cannabinoides endógenos como los exógenos, ya sean de origen sintético o natural, se han revelado como potentes agentes anti-inflamatorios y neuroprotectores (Mechoulam, 2002), por lo que se investiga su potencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como es el caso del Parkinson. Los efectos antioxidantes que se han ido documentando, al parecer no están mediados por receptores CB1 (Hampson y cols., 1998), implicando mecanismos moleculares diversos que frecuentemente se complementan entre si. Entre estos mecanismos cabe destacar:

- Prevención de la muerte neuronal por excitotoxicidad glutamatergica, en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* , gracias a su capacidad para modular la transmisión glutamatérgica excitatoria a través de receptores CB1 presinápticos (Molina-Holgado y cols. ,1997)

- Modulación de la respuesta inmune y de la liberación de mediadores proinflamatorios, a través de su acción sobre receptores CB1, CB2 e incluso a través de mecanismos no mediados por receptores CB1, ni CB2 (Stella, 2004)
- Activación de rutas de señalización de protección celular como las mediadas por quinasas B/Akt (Molina-Holgado y cols., 2002), PKA (Kim y cols., 2005).
- Modulación de la excitabilidad neuronal y la homeostasis del calcio a través de efectos sobre canales de calcio, potasio y sodio, receptores NMDA y AMPA, uniones gap y reservas intracelulares de calcio (Caulfield y Brows, 1992; Hampson y cols., 2000).
- Propiedades antioxidantes *per se* de algunos cannabinoides (Marsicano y cols., 2002) por sus propiedades moleculares.
- Inhibición de la liberación de óxido nítrico (Molina-Holgado y cols., 2003).

Aunque hasta la fecha aún no se conoce el mecanismo de acción preciso por el cual los cannabinoides tienen esta acción neuroprotectora, se ha documentado la implicación en neuroprotección de los receptores CB1, TRPV1, y PPARs (O'Sullivan y cols., 2005). A través de receptores CB1 se ha comprobado, por ejemplo, que tanto el cannabinoide endógeno anandamida, como el fitocannabinoide Δ^9 -THC, son capaces de atribuir protección ante el modelo de excitotoxicidad inducido por ouabaína (van der Stelt y cols., 2001). Al receptor TRPV1 se le atribuye un papel en la supervivencia, ya que se conoce que su activación puede promover la muerte programada por apoptosis en células dopaminérgicas mesencefálicas tanto en cultivos como *in vivo* (Kim y cols., 2007). Y por otro lado, los receptores PPARs también están implicados en el efecto neuroprotector de los cannabinoides en procesos inflamatorios (Chen y cols., 2007) y de estrés oxidativo (Beltowski y cols., 2002).

Entender los mecanismos por los cuales los cannabinoides confieren protección a las neuronas, es de suma importancia para su posible uso terapéutico en enfermedades como la enfermedad de Parkinson. En esta enfermedad, se ha visto que el daño de la sustancia negra y en los circuitos nigroestriatales, es de origen oxidativo, aunque la causa que impulsa hacia el estrés oxidativo sea aún desconocida (Fernandez-Espejo, 2004). Así en el desarrollo de la enfermedad se observan niveles de hierro incrementados (Sofic y cols., 1988), así como disminuidos los niveles del péptido antioxidante glutatión (Shapira y cols., 1989), pudiendo originar la formación de radicales altamente oxidantes, como es el ion superóxido. La enzima sintetasa de óxido nítrico también está aumentada en la glía de la sustancia negra (Hunot y cols., 1996), lo que lleva a la formación de peroxinitritos y radicales hidroxilo. El ambiente altamente oxidativo provoca daño en proteínas, lípidos, RNA, y DNA. Y además del daño oxidativo se ha comprobado que en la sustancia negra en esta situación patológica se da también un ciclo tóxico neurodegenerativo caracterizado por la disfunción mitocondrial, excitotoxicidad mediada por glutamato, e inflamación de la sustancia negra, que explica la rápida progresión de la enfermedad de Parkinson una vez que la sintomatología se manifiesta.

En este marco fisiopatológico, el potencial neuroprotector de los cannabinoides podría ser de gran utilidad en el retraso de la progresión de la enfermedad.

Neurotoxicidad

Diversos cannabinoides, inducen muerte celular programada o apoptosis de células transformadas de origen glial (Sánchez y cols., 1998) y neuronal (Macarrone y cols., 2000) en cultivos y en modelos preclínicos en animales. Lo cierto es que el poder antitumoral de los agonistas cannabinoides actúa no solo promoviendo la apoptosis, si no que inhiben la proliferación de las células tumorales, inhibición de vascularización del tumor o angiogénesis, inhibe la invasividad de las células tumorales y promueven su diferenciación. (Velasco y cols., 2007).

Esta capacidad antiproliferativa de los cannabinoides parece ser selectiva de las células tumorales, donde la unión del agonista al receptor cannabinoide induce la cascada de señalización que origina la síntesis del mensajero proapoptótico, ceramidas. (Guzman, 2003). Así el uso y beneficios de los agonistas cannabinoides en pacientes con cáncer se extiende más allá de los ya conocidos efectos favorables en la atenuación de náuseas y vómitos, estimulación del apetito o disminución del dolor, y abre una vía terapéutica nueva para luchar contra la progresión de la enfermedad y para su posible cura.

5.4 Efectos de los cannabinoides sobre el control emocional. Esquizofrenia

El cannabis es una de las sustancias de abuso más frecuentemente consumida, ocupando el tercer lugar después del tabaco y el alcohol. Es por esto por lo que el estudio de las consecuencias neurobiológicas de su consumo se hace importante, ya que se postula que el uso de esta droga ilícita puede causar el padecimiento de enfermedades psiquiátricas, como es la esquizofrenia. Aunque la asociación entre cannabis y psicosis es aún un motivo de controversia, hay algunos autores que postulan la capacidad psicotogénica del cannabis y/o la capacidad del mismo como factor de riesgo por si solo o ante vulnerabilidad genética. En concordancia con ello, es un hecho conocido, que las intoxicaciones agudas por cannabis en personas sanas puede generar un cuadro psicótico, de naturaleza temporal, que cesa tras la metabolización y eliminación del principal componente psicoactivo del cannabis, Δ^9 -THC del organismo (D'Souza y cols., 2005). Además el tratamiento crónico con Δ^9 -THC produce cambios permanentes en la actividad del sistema endocannabinoide (di Marzo y cols., 2000).

Tabla 13. Efectos de la exposición crónica a Δ^9 -THC en el sistema endocannabinoide de ratas (di Marzo y cols., 2000)

Zona del cerebro	Efectos de Δ^9 -THC sobre el sistema cannabinoide
Tallo cerebral	Disminución significativa de niveles de CB1
Cerebelo	
Estriado	
Corteza cerebral	Disminución significativa de funcionalidad de CB1
Hipocampo	
Estriado	Disminución de niveles de anandamida y 2-araquidonil-glicerol
Sistema límbico	Disminución de anadamida

Los cambios observados en ratas por el grupo de di Marzo (Tabla 13), son un ejemplo de como el Δ^9 - THC puede alterar el normal funcionamiento del cerebro. En este caso las alteraciones están centradas en el sistema límbico y en zonas de control motor, pudiendo ser importante para entender en este contexto la posible causa etiológica de la esquizofrenia por el abuso del cannabis y/o para comprender mejor y diferenciar tratamientos para los pacientes consumidores de cannabis de los que no.

Esquizofrenia

La esquizofrenia es un desorden discapacitante de carácter psiquiátrico, cuyo nombre viene del griego y significa "mente escindida". Esta enfermedad se compone de un conjunto muy variado de síntomas, entre los que predominan, la alteración de la conciencia de realidad, de la sensopercepción, trastornos de pensamiento, afectivos y trastornos de las funciones ejecutivas, que provocan de manera significativa disfunción social. Estos síntomas se clasifican en, síntomas positivos y negativos (Andreasen y Olsen, 1982).

- Síntomas positivos: exceso o distorsión de las funciones normales.

Alucinaciones visuales y auditivas, ideas delirantes, lenguaje desorganizado o incoherente y comportamiento gravemente desorganizado.

- Síntomas negativos: disminución o pérdida de las funciones normales

Aplanamiento afectivo, alogia, amimia, anhedonia, catatonia, deficiencias en el filtrado sensorial.

Tradicionalmente la esquizofrenia se ha dividido en tres subtipos (Emil Kraepelin, 1898): subtipo paranoide, con predominio de síntomas positivos; subtipo catatónica, predominio de trastornos motores, pudiendo llegar a la inactividad total; subtipo hebefrénica, con predominio de síntomas negativos

Aunque hasta la fecha las causas de la enfermedad permanecen desconocidas. Existen, sin embargo, diversos hallazgos surgidos de las numerosas investigaciones, dando lugar a diversas hipótesis etiológicas (Coffey, 1998):

Hipótesis Genética, Hipótesis Neuroquímica (dopaminérgica, noradrenérgica, glutamatérgica o de NMDA, serotoninérgica, GABAérgica), Hipótesis Neurovirales e Inmunológicas, Hipótesis Estructurales, Hipótesis del desarrollo nervioso alterado, Hipótesis Psicosocial y Modelo de vulnerabilidad

En general, en la actualidad, se piensa que la esquizofrenia es el resultado de una serie de interacciones sinérgicas entre genes, denominados de riesgo, que presentan alteraciones funcionales y a las anomalías en la actividad de los neurotransmisores como dopamina, glutámico, GABA y serotonina principalmente que conduce a la aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Entre los cambios neuroquímicos más destacados tenemos:

- La hiperactividad dopaminérgica subcortical, que se relacionan con los síntomas positivos. Y hipoactividad dopaminérgica prefrontal, relacionada con los síntomas negativos (Lisman y cols., 2008). También se ha detectado anomalías en la expresión del transportador DAT y receptor D1.
- Hiperactividad serotoninérgica 5HT₂ que se ha involucrado en la génesis de ciertos síntomas positivos, como las alucinaciones y los delirios.
- Hipofunción glutamatérgica del receptor NMDA.
- Reducción de actividad GABA.

La hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia se ve fuertemente apoyada por el hecho que los antipsicóticos efectivos son bloqueadores de receptores de dopamina, principalmente del tipo D₂. Los endocannabinoides podrían disregular la actividad dopaminérgica mesolímbica participando en el estado psicótico (Gardner y Vorel, 1998), pues el sistema cannabinoide endógeno es un sistema homeostático que regula la liberación de dopamina (Rodríguez de Fonseca y cols., 1998).

Hipótesis cannabinoide de la esquizofrenia.

La hipótesis cannabinoide postula que algunos síntomas psicóticos podrían estar relacionados con la disregulación del sistema cannabinoide endógeno. Así se sabe que las estructuras implicadas en la patogénesis de la esquizofrenia, como son las áreas límbicas y la corteza prefrontal, presentan una importante

densidad de receptores CB1 (Herkenham y *cols.*, 1991; Tsou y *cols.*, 1998) y abundantes cantidades de cannabinoides endógenos (Bisogno y *cols.*, 1999). Teniendo en cuenta que el sistema cannabinoide participa como un sistema homeostático neuroquímico, por su cualidad fisiológica como mensajero retrogrado, capaz de modificar la actividad del resto de neurotransmisores de modo directo o indirecto, la hipótesis cannabinoide de la esquizofrenia, así como el consumo de cannabis como factor de riesgo en la aparición de la esquizofrenia adquieren una importante relevancia.

En apoyo a esta teoría se ha comprobado que administraciones intravenosas de Δ^9 -THC induce en controles sanos síntomas psicóticos parecidos a los que caracterizan la enfermedad, como delirios, alucinaciones y alteraciones cognitivas, y en esquizofrénicos medicados un aumento pasajero de los síntomas positivos, cuya intensidad depende de la dosis administrada (D'Souza y *cols.*, 2005).

Además se han descrito alteraciones en el sistema endocannabinoide de pacientes esquizofrénicos. Estas alteraciones son:

✱ **Aumento de densidad de receptores CB1.** Estudios *post-mortem* realizados con cerebros de pacientes esquizofrénicos demuestran un aumento de la densidad de los receptores CB1 en la zona dorsolateral de la corteza prefrontal (Dean y *cols.*, 2001), en la corteza cingulada anterior (Zavitsanou y *cols.*, 2006) y en las capas I y II de la corteza cingulada posterior (Newell y *cols.*, 2006). Teniendo en cuenta las funciones fisiológicas de estas zonas encefálicas, el aumento de la densidad de receptores CB1 podría estar relacionado con las alteraciones propias de la esquizofrenia, La desregulación cannabinoide podría afectar, en esta región cerebral, a otros sistemas de neurotransmisión. Aunque también pudiera ser, contraria a lo que esta teoría postula, que el aumento de receptores CB1 se deba a un mecanismo de compensación por el aumento de actividad dopaminérgica.

✱ **Aumento de los niveles de anandamida en el líquido cefalorraquídeo (LCR).** Se han descrito aumento de niveles de anandamida en el

LCR de pacientes esquizofrénicos del tipo paranoide agudo sin tratamiento o tratados con antipsicóticos atípicos, y niveles normales en pacientes tratados con antipsicóticos típicos (Giuffrida y cols., 2004). Luego los niveles de anandamida se correlacionan con la actividad de los receptores D2, ya que se sabe que ésta está aumentada en general en los esquizofrénicos y los antipsicóticos típicos a diferencia de los atípicos son antagonistas D2. En consecuencia podemos afirmar que hay una relación directa entre actividad D2 y niveles de anandamida, aunque no podemos saber si este aumento de la anandamida en LCR es causa etiológica que provoca la enfermedad o consecuencia fisiológica que se deriva de ella.

Aunque la anandamida parece no tener propiedades psicotogénicas. Actualmente se cree que el aumento de 2-AG, el otro cannabinoide endógeno, sí está relacionado con la psicosis, pues el exceso de este cannabinoide disregula la actividad de glutamato y podría ser importante en la génesis de la esquizofrenia

✳ **Vulnerabilidad genética.** Como se ha mencionado entre las hipótesis etiológicas existe una hipótesis genética. Esta hipótesis surge del descubrimiento de una variedad de genes que en cierta medida podrían estar relacionados con la enfermedad. Aunque la esquizofrenia probablemente tiene una herencia bastante compleja. Entre estos genes estarían por ejemplo el gen de la neuregulina (Boucher y cols., 2007), Así ratones knock-out heterocigóticos para este gen presentarían una mayor susceptibilidad para desarrollar esquizofrenia por la exposición aguda de Δ^9 -THC. También se les supone mayor vulnerabilidad a la aparición de psicosis promovida por el consumo de cannabis a los homocigóticos o heterocigóticos de la variante genética de la enzima catecol-O-metil-transferasa (enzima que participa en el metabolismo de la dopamina), que porta una valina en lugar de metionina para el codón 158 de la proteína, polimorfismo debido al cambio de un sólo nucleótido de G a A en el gen. Entre los genes implicados podría encontrarse el CNR1 (gen que codifica para el receptor CB1). Dos son los polimorfismos del gen CNR1 más estudiados en su

relación con la esquizofrenia: a) repetición del microsatélite AAT en el extremo 3' del exón codificador (que mayoritariamente es el exón 1). Parece ser que el número de repeticiones podría correlacionarse con una mayor susceptibilidad genética al padecimiento de la esquizofrenia de tipo hebefrénico (Ujike y cols., 2002). b) Polimorfismo de un único nucleótido en la posición 1359 en la que una guanina es sustituida por una adenina. Los estudios de este polimorfismo no han dado de momento resultados concluyentes en cuanto a la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, aunque sí parece influir en la efectividad de los antipsicóticos (Madani y cols., 2008). Por otro lado también se ha estudiado si los polimorfismos en el gen para la enzima FAAH (hidrolasa de amidas de ácidos grasos) implicada, como ya se ha visto en el metabolismo de la anandamida. De momento no se ha encontrado polimorfismos de FAAH asociados a esquizofrenia.

Cannabis en la adolescencia y esquizofrenia.

En los últimos años se ha publicado un importante número de trabajos acerca de las consecuencias psicológicas que el consumo de cannabis tienen en el ser humano, además de un, incluso mayor número, de publicaciones sobre los posibles usos terapéuticos de los cannabinoides. Y aunque quizá no se haya establecido aún una linealidad entre consumo y generación de esquizofrenia, hay autores que postulan la existencia de una relación causa-efecto entre el consumo de cannabis y la aparición de psicosis, que es dependiente de dosis, precediendo el consumo a la aparición de la psicosis (Henquet y cols., 2005) y una creciente bibliografía que postula que cuando el consumo se produce al inicio de la adolescencia el riesgo posterior de psicosis aumenta (Rubio y cols., 2008). Recientes datos estiman el comienzo del consumo de cannabis entre los 12 y los 18 años (Samhsa, 2004) y a pesar de este hecho no hay aún suficiente información sobre las consecuencias neurobiológicas a largo plazo. Es un hecho conocido que la adolescencia es una fase crítica del desarrollo cerebral, caracterizado por una fuerte plasticidad neural, con creación y destrucción de

sinapsis, mielinización de nervios, cambios en patrón de expresión de neurotransmisores y de los receptores correspondientes en las áreas del cerebro esenciales para el comportamiento y las capacidades cognitivas (Rice y Barone, 2000). Además aunque aún no ha sido estudiado el papel que el sistema cannabinoide ejerce en esta remodelación cerebral en la adolescencia, es posible que sea significativo ya que si se conoce, como se explicará en el siguiente apartado, su importante papel en el desarrollo temprano del cerebro (Viveros y cols., 2005).

A este respecto se debe tener en cuenta y valorar diferencialmente las consecuencias del consumo de cannabis en relación al sexo del usuario. Medida que debe ser tomada en cuenta, ya que se conoce que el Δ^9 -THC es capaz de modificar diferencialmente diversos parámetros reproductivos tanto en animales de laboratorios como en humanos (Kolodny y cols., 1974), en relación a la liberación hormonal, tamaño gonadal y comportamiento sexual. Y sobre todo, porque las hormonas esteroideas son capaces de alterar la densidad y afinidad del receptor cannabinoide, por un lado. Y porque la actividad del Δ^9 -THC sobre la actividad dopaminérgica varía con el ciclo hormonal en las hembras (Fernández-Ruiz y cols., 1992).

Por otro lado, puede ser que la causa de la enfermedad esté asociada a perturbaciones producidas durante el desarrollo del sistema nervioso temprano, que quedarían silentes hasta la adolescencia. En este caso la maduración del cerebro adolescente podría verse afectada por la presencia de las anomalías generadas en el desarrollo, y no tendrían entonces relación con el consumo de cannabis o al menos no como factor unitario.

Valoración del estado psicótico en animales de laboratorio

El estudio de la esquizofrenia en modelos animales es una tarea complicada, debido al importante componente de alteración del pensamiento en

el ser humano. Sin embargo, hay ciertas manifestaciones psicóticas con correlato funcional en modelos animales y que permiten una aproximación aceptable al problema. Un signo psicótico típico que puede ser abordado a nivel experimental preclínico es el de la alteración de la inhibición por prepulso (PPI), la cual ha sido usada en la realización de esta tesis doctoral. La PPI es un fenómeno donde la respuesta de sobresalto ante un estímulo brusco e inesperado se atenúa si el estímulo se precede de otro de menor intensidad (Graham, 1975; Braff y *cols.*, 2001). Representa pues una respuesta de filtrado sensorial normal que se sabe alterada en enfermos esquizofrénicos, es decir, los pacientes con esquizofrenia no presentan atenuación de la respuesta por prepulso (Figura 11).

En lo que respecta al papel de cannabinoides en la esquizofrenia, en nuestro laboratorio se ha observado que el empleo agudo y crónico del agonista cannabinoide indirecto AM404, que aumenta la disponibilidad de 2-AG en la biofase, es capaz de alterar el PPI en ratones (Fernández-Espejo y Galán-Rodríguez, 2004).

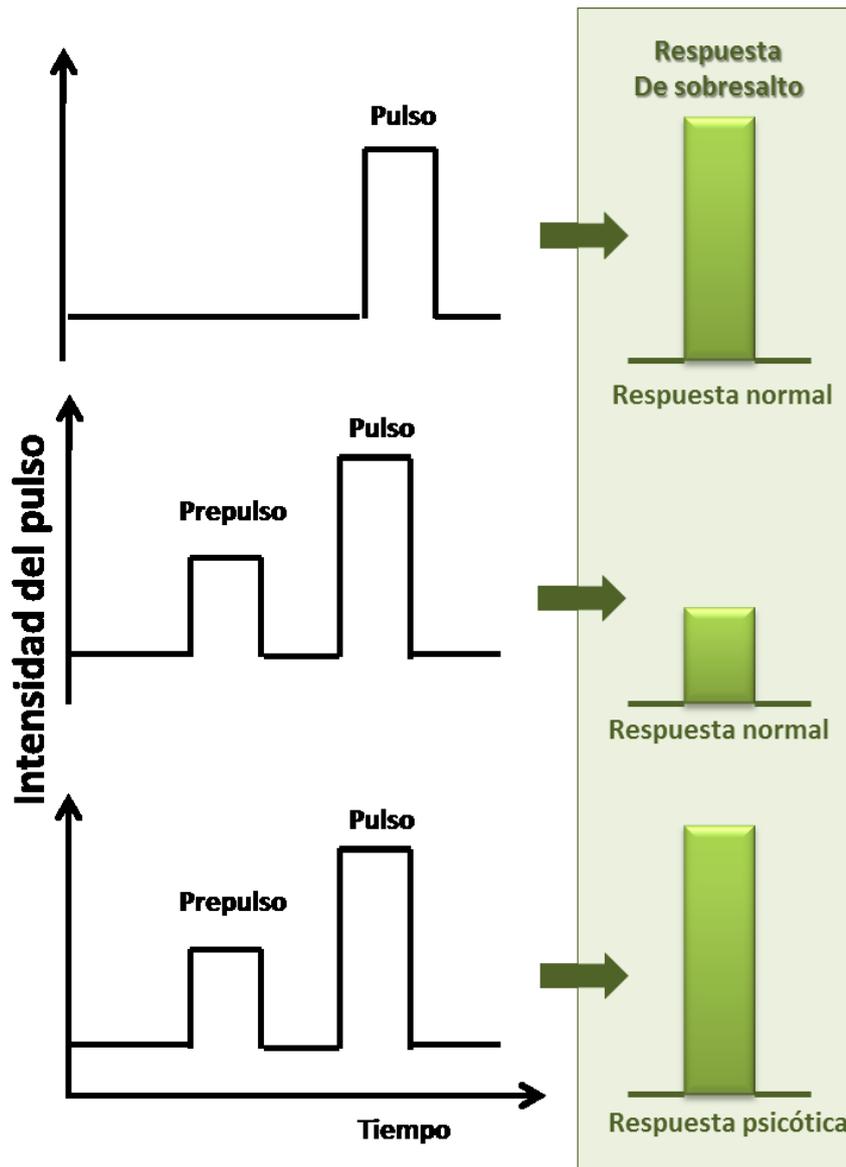


Figura 11. Representación esquemática de la función de la inhibición por prepulso o PPI. La presentación de un pre-estímulo de menor intensidad, es capaz de disminuir la amplitud de la respuesta a estímulos de gran intensidad en condiciones de normalidad si ambos estímulos son presentados lo suficientemente cercanos en el tiempo, mientras ante esquizofrenia esta función estaría defectuosa, y la respuesta sería igualmente amplia.

Modelo de experimentación en animales para el estudio de la esquizofrenia.

En el transcurso de esta tesis doctoral hemos usado el apoyo experimental de un modelo de esquizofrenia en animales, que al igual que el consumo de cannabis estaría clasificado en causas ambientales de la esquizofrenia. Se trata de un modelo de privación maternal temprana. La

privación maternal temprana puede tener efectos disruptores sobre el normal filtrado sensorial y por tanto modificar el valor del test de inhibición por prepulso. Este modelo se basa en la observación de que la temprana separación parental en los niños en periodos anteriores a la adolescencia, puede ser un factor que aumenta el riesgo de padecer depresión y/o psicosis en la edad adulta (Kendler y *cols.*, 2002; Morgan y *cols.*, 2007). De este modo se ha experimentado en animales con la privación maternal con resultados positivos. Parece ser que la explicación más plausible sería que, durante un periodo temprano del desarrollo postnatal, las ratas muestran una gran reducción de la sensibilidad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (eje cerebral de control y respuesta al estrés). Este periodo, que en ratas se extendería entre los días 4-14, es llamado generalmente periodo de hiporespuesta al estrés. Dicho periodo se caracteriza por una disminución de ACTH y de respuesta a corticosterona o diferentes estresores (Rosenfeld y *cols.*, 1991). La explicación biológica que se le da a este periodo, es la de proteger el cerebro de los efectos nocivos que supondría un nivel excesivamente alto de corticosterona (Kloet y *cols.*, 1988). Un modo de fatigar este periodo de hiporrespuesta es mediante la aplicación de un estrés severo, como en este caso sería la separación prolongada de la madre (Levine, 1994). Parece ser que el incremento en los niveles basales de corticosterona provocado en este periodo clave, persisten en el tiempo e incluso se prolonga hasta las edades adultas (Rots y *cols.*, 1996). Este nivel elevado de actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal persistente parece que también genera otras anormalidades en el animal adulto, como es la génesis de psicosis medible por test de inhibición por prepulso (Ellenbroek y *cols.*, 1998)

Utilización de fármacos relacionados con el sistema cannabinoide para pacientes esquizofrénicos.

Como se ha visto existe una variedad de hipótesis sobre la etiología de la esquizofrenia. Los primeros tratamientos que surgieron para curar o paliar los

síntomas de los enfermos se referían al sistema dopaminérgico alterado, creando un grupo de antipsicóticos llamados típicos o de primera generación, que básicamente son antagonistas dopaminérgicos D2. Posteriores a estos surgió un amplio grupo de antipsicóticos llamados atípicos o de segunda generación, con afinidades por receptores diferentes del D2. Todos estos antipsicóticos presentan más o menos eficacia en el tratamiento de muchos de los síntomas de la enfermedad, pero generan una amplia gama de problemas o efectos secundarios indeseables.

Existe una hipótesis llamada hipótesis de la automedicación, que describe el hecho de que un porcentaje bastante alto de los esquizofrénicos son además consumidores habituales de cannabis. En estos, tras el consumo de la droga, ha sido documentada por varios autores la desaparición de los síntomas negativos de la enfermedad (Bersani y cols., 2002; Buhler y cols., 2002). Hay incluso estudios con el uso de dronabiol (molécula sintética de Δ^9 -THC) que presentan mejoras en los pacientes (Schwarcz y cols., 2009)

Lo cierto es que debido al hecho, conocido recientemente, de que el sistema cannabinoide aparece alterado en los enfermos de esquizofrenia, abre la posibilidad de generar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de los enfermos, menos dañinas y quizás más certeras que los ya conocidos cocteles de psicóticos típicos y atípicos.

A este respecto de momento se está investigando con tratamientos basados en cannabinoides, entre ellos destacamos:

✳ **Rimonabant.** Antagonista del receptor CB1. Los estudios realizados con el uso de Rimonabant ha generado buenos resultados. Así en modelos animales era capaz de revertir la alteración producida en la inhibición por prepulso (Ballmaier y cols., 2007). Aun así, en pacientes esquizofrénicos no parece la mejor opción, ya que en el uso de este fármaco en la lucha contra la obesidad, se han dado no pocos casos de depresión y ansiedad (Ugur y cols., 2008). De todos modos, se sigue investigando los efectos del uso del rimonabant

en pacientes esquizofrénicos. Es importante destacar aquí que el rimonabant no sólo tiene interacción con el receptor CB1, sino que además es capaz de activar receptores como los PPAR γ e inhibir otros como los TRPV, o receptor de adenosina A1 (Pertwee, 2010).

✿ **Cannabidiol.** Los estudios realizados en modelos animales sugieren que este compuesto posee propiedades antipsicóticas con un perfil farmacológico similar al de los antipsicóticos atípicos. Este reduciría síntomas sin producir los efectos secundarios nocivos de los antipsicóticos conocidos (Zuardi y cols., 2006). En estudios sobre pacientes esquizofrénicos también ha obtenido resultados positivos (Leweke y cols., 2000). Existían ya evidencias que mostraban que el consumo de cannabis con una relación elevada cannabidiol/THC experimentaban menos síntomas parecidos a psicosis esquizofrénicas (Morgan y cols., 2008). Este compuesto antagoniza además receptores GRP55, es agonista del receptor 5-HT $_{1A}$ y al igual que rimonabant es agonista PPAR γ .

✿ **Análogos de THC.** Como ya se ha mencionado hay estudios realizados con Δ^9 -THC y análogos, donde se han podido constatar algunos efectos beneficiosos (Crippa, 2010).

Si bien es verdad que aún no se conoce un tratamiento cannabinoide efectivo en la cura de la esquizofrenia, sí que se puede afirmar que se ha abierto el camino para un mayor esfuerzo científico a este respecto, con la esperanza de encontrar una solución mejor que las que se conocen hasta la fecha para una enfermedad discapacitante de alta incidencia en la población adulta, como es la esquizofrenia.

5.5 Sistema cannabinoide y proliferación.

5.5.1 Participación del sistema cannabinoide en el desarrollo neuronal

Como ya ha sido mencionado, hoy sabemos que el sistema cannabinoide participa activamente en el desarrollo temprano del sistema nervioso. Recientes datos demuestran la importancia del correcto funcionamiento del sistema cannabinoide para el desarrollo embrionario. De hecho es importante desde antes incluso que la formación del sistema nervioso, se está estudiando su implicación incluso en la embriogenia, desde la correcta expulsión de los óvulos, hasta el desarrollo del cigoto, pasando por la implantación del blastocito en el útero, corroborándose que los cannabinoides tienen efectivamente un papel importante en todo este proceso (Klinger y *cols.*, 2006).

Los cannabinoides participan activamente en el desarrollo temprano del sistema nervioso. Como se comentó al principio de esta tesis, se sabe que la localización del receptor cannabinoide CB1 es diferente en etapas de formación y desarrollo de la que posteriormente presenta un cerebro adulto (Berrendero y *cols.*, 1998). El receptor CB1 está presente en el cerebro desde los momentos iniciales. En un estudio pionero se observó que ya en la semana 14 de gestación se localizan en las zonas CA2-CA3 del hipocampo, aunque en menos densidad de las que se encuentran en el cerebro adulto (Mato y *cols.*, 2003).

Se ha detectado enzima FAAH en la glía radial en las últimas etapas de la gestación y postnatalmente. La localización celular de dicha enzima, unida al control que ejerce los cannabinoides en la astrogliogénesis, sugiere la implicación del sistema cannabinoide en diferenciación de los progenitores neurales. Por lo que endocannabinoides producidos en microentornos pueden proporcionar señales extracelulares que modulen algunas de las etapas relacionadas con la elección del destino final y con la proliferación de los progenitores neurales, así como contribuir al mantenimiento del adecuado balance neurona-glía durante el desarrollo cerebral (Aguado y *cols.*, 2006).

En la migración de interneuronas durante el desarrollo embrionario parece ser que está implicada la transactivación del receptor TrkB (receptor de BDNF) por el receptor CB1 (Marsicano y *cols.*, 2003). De hecho en la misma línea, se ha descubierto que la anandamida, en cooperación con el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), induce la migración de las interneuronas GABAérgicas que poblarán la corteza embrionaria. De hecho tanto la anandamida como el THC provocan modificaciones estructurales en este núcleo (Berghius y *cols.*, 2007). Así pues los cannabinoides en lo que a desarrollo se refiere actuarían como morfógenos, pudiendo estar relacionado en procesos neurogénicos como la proliferación, diferenciación celular y maduración, así como en la elongación axonal y la sinaptogénesis (Kim y *cols.*, 2001; Harkany y *cols.*, 2007).

El receptor CB2 también podría estar implicado ya que se ha observado igualmente su presencia en células progenitoras en embriones de ratón. La activación de cualquiera de los receptores cannabinoides, ya sea CB1 o CB2 es capaz de promover la proliferación de estas células, en un proceso dependiente de la ruta de señalización PI3K/Akt (Molina-Holgado y *cols.*, 2007).

Hoy se sabe que los cannabinoides participan en la regulación de la diferenciación de las células progenitoras neurales, por lo que puede ser importante en el desarrollo cerebral y como se verá en el siguiente punto, también en la plasticidad del cerebro adulto.

5.5.2 Participación del sistema cannabinoide en la proliferación y mantenimiento de nichos neurogénicos en el cerebro adulto.

La hipótesis de que la generación de nuevas neuronas en el hipocampo durante toda la vida del individuo puede jugar un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria (Kempermann y *cols.*, 2004) y el hecho de

que un trastorno en este proceso puede participar en la etiología de enfermedades como demencia, epilepsia y esquizofrenia (Kempermann y Kronenberg, 2003; Galve-Roperh y cols., 2009), junto con la búsqueda de avances terapéuticos para la cura de enfermedades neurodegenerativas, hace del estudio de los nichos neurogénicos un tema actualidad de suma relevancia.

5.5.2.1 Antecedentes

Desde que Rudolf Virchow (1856) descubriera lo que él denominó como "tejido glial", la historia del entendimiento de este tejido ha estado colmada de dogmas equivocados difíciles de abolir. Durante mucho tiempo, se pensó que dicho tejido tenía un origen mesenquimático. Esta idea fue refutada en la última parte del siglo XIX, cuando las técnicas histológicas comenzaron a revelar la estructura del epitelio neuronal temprano (His, 1889). Aunque equivocadamente His W. pensó que provenían de células progenitoras diferentes de las que generarían neuronas.

Asociado con la idea de los orígenes separados para glía y neuronas surgió otro dogma, ampliamente difundido: Durante varias décadas, desde que se postulara la "teoría neuronal" (Ramón y Cajal, 1883) y aunque Santiago Ramón y Cajal, ya en su época vaticinara la regeneración neuronal, se ha pensado que la generación de nuevas células nerviosas solo ocurría durante los estados embrionarios y el desarrollo perinatal. Esta opinión fue reforzada por la escasez de mitosis observada en el sistema nervioso central (SNC) adulto. Además, los centros cerebrales germinales son notablemente modificados en la etapa post natal y muchos investigadores pensaron que la zona ventricular, se convertía en capa endodimial postnatal (The Boulder Committee, 1970). Extensamente se creía que estos centros germinales se hacían vestigiales o quiescentes poco después del nacimiento. Cualquier actividad proliferativa postnatal por lo general era asociada con la generación de glía más que de neuronas.

El concepto de que ninguna neurona nueva se formaba en el cerebro adulto comenzó a cambiarse en los años 1960 con el trabajo pionero de Joseph Altman, quien sugirió que se producían nuevas neuronas en algunas regiones restringidas del cerebro adulto (Altman y Das, 1966; Altman y Gopal, 1965). Estos trabajos pioneros no fueron tenidos en cuenta debido, principalmente, a cuestiones técnico-metodológicas. Así, la idea de que el cerebro adulto era incapaz de tener neurogénesis prevaleció durante más de dos décadas hasta que Nottebohm y colegas de manera concluyente, demostrara el reemplazamiento neuronal en el telencéfalo de aves adultas, investigando sobre *Serinus Canarius* (Burd y Nottebohm, 1985; Goldman y Nottebohm, 1983). También se demostró que existía neurogénesis en individuos adultos trabajando en otros taxones, y ahora se acepta como un rasgo común del cerebro de vertebrados (Alvarez-Buylla y Lois, 1995).

Es importante, sin embargo, clarificar que aunque se incorporen en ciertas regiones del cerebro adulto nuevas neuronas, hay otras regiones donde esto no parece ocurrir. Además, en todas las regiones de cerebro adulto donde el reclutamiento neuronal ha sido demostrado, sólo un subconjunto de los tipos neuronales son realmente producidas (Altman, 1970; Bayer, 1983; Peñafiel y cols., 1996; Trice y Stanfield, 1986; Alvarez-Buylla y cols. 1988, 1994; Scharff y cols., 2000). De modo que, muchos tipos neuronales, no parece que se sustituyan a lo largo de la vida del organismo. Se ha sugerido, para esta cuestión, que son las restricciones evolutivas la que han limitado el reemplazamiento de estos tipos celulares en el cerebro adulto (Rakic, 1985).

Centros germinativos en el adulto

Las regiones cerebrales donde se ha documentado que persiste una actividad germinativa son la capa subgranular (CSG) del giro dentado (GD) del hipocampo (Kaplan y Bell, 1984; Cameron y cols., 1993; Gage y cols., 1998) y la zona subventricular (SVZ, del inglés, subventricular zone) de ventrículo lateral (García-Verdugo y cols., 1998). En estas zonas se han descrito tres grandes

tipos celulares: las células tipo A, B y C. Las células que proliferan en la capa subgranular dan lugar a las neuronas jóvenes que emigran una distancia corta y maduran en el hipocampo como neuronas granulares (Gage y cols., 1998; Gould y cols., 1997). La composición celular y la arquitectura del SVZ han sido ampliamente descritas (Figura 12).

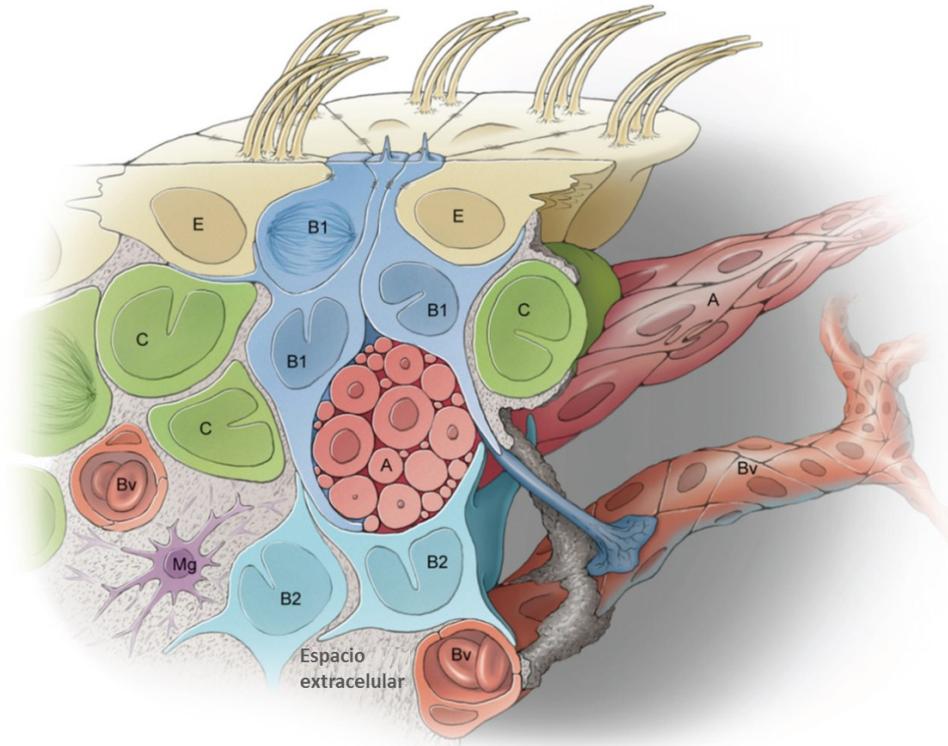


Figura 12. . Esquema de nicho proliferativo en cerebro adulto de rata, zona subventricular (SVZ), Células endociliares (E), en contacto con el lumen del ventrículo son multiciliadas, con estos orientados en la dirección del líquido cefalorraquídeo (CSF). Además estas células endociliares forman una estructura circular alrededor de los procesos apicales de las células B1. Las células de tipo B1, presentan un pequeño único cilio, sin capacidad de movimiento hacia el lumen ventricular, del que se desprenden cuando se dividen. Normalmente las células B1 también presentan un proceso basal en contacto con algún vaso sanguíneo (Bv). Las células tipo B2, presentan características de astrocitos sin contacto con el ventrículo. Las células tipo C se localizan cerca de las de tipo B y de los vasos sanguíneos. Los neuroblastos o células tipo A, se localizan en cadenas de células en movimiento, con las que también contacta las tipo B1, que alcanzan el bulbo olfatorio para su completa diferenciación en células maduras. Modificado de Ihrie R y Álvarez-Buylla A, 2011.

Los neuroblastos del SVZ (células tipo A) expresan PSA-NCAM y nestina (Figura 12). Las células A migran en cadenas homotípicas (Lois y cols., 1996; Wichterle y cols., 1997), a través de una red de rutas interconectadas distribuidas por toda la pared del ventrículo lateral (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996). Estas cadenas están envueltas por los procesos de células tipo B, con capacidad proliferativa lenta. Hay dos tipos de células tipo B, células B1 y células B2. Las tipo B1, presentan un único cilio corto, sin capacidad de movimiento hacia el lumen del ventrículo, del que se desprenden cuando entran en fase de división, y un proceso basar que contacta con algún vaso sanguíneo. Estas células expresando GFAP, Sox-2 y Nestina (Lois y cols., 1996; Ihrie y Alvarez-Buylla, 2010). Normalmente las células B1 presentan uniones homotípicas entre ellas y uniones heterotípicas con células endodiales mediante uniones gap. Las células tipo B2 están normalmente más cercanas al parénquima. Dispersadas a lo largo de las cadenas de células de tipo A se localizan un grupo de células inmaduras de tipo C o células de división rápida, que expresan el marcador nestina pero no GFAP ni PSA-NCAM. Estas células C, que derivan de las células B1 y son las progenitoras de los neuroblastos, se encuentran, a menudo, entre las células A, B1 y algún vaso sanguíneo (Doetsch y cols., 1997).

Muchas de las cadenas de células A se combinan en SVZ anterior y dorsal, formando una ruta restringida, llamada la ruta rostral migratoria (RMS). La RMS transporta más de 30,000 neuroblastos por día al bulbo olfativo, donde una fracción de estos se diferencian a neuronas granulares y periglomerulares (Lois y Alvarez-Buylla, 1994).

Una capa de células endodiales multiciliadas (células tipo E) se encuentra adyacente a la ZSG y en contacto con el ventrículo. Estas células tipo E, expresan nestina, GFAP y vimentina. Algunos autores han sugerido que éstas pueden funcionar como células madres bajo condiciones específicas de cultivo (Johansson, 1999). Pero hay otros autores que no apoyan esta hipótesis (Doetsch y cols., 1999; Laywell y cols., 2000; Chiasson y cols., 1999). Estos

sugieren que la importancia de las células endocelulares radica en que interacciones célula-célula, de tipo gap con las células tipo B1, siendo estas interacciones, cruciales para el mantenimiento del microambiente local o del nicho neurogénico (Lim, 2000).

También se ha descrito, que las células madres se extienden más allá de las paredes de los ventrículos laterales y III ventrículo, a nivel mesencefálico. Se ha propuesto que podría existir un reemplazamiento continuo de células catecolaminérgicas a nivel mesencefálico, aunque este hecho está sujeto a controversia.

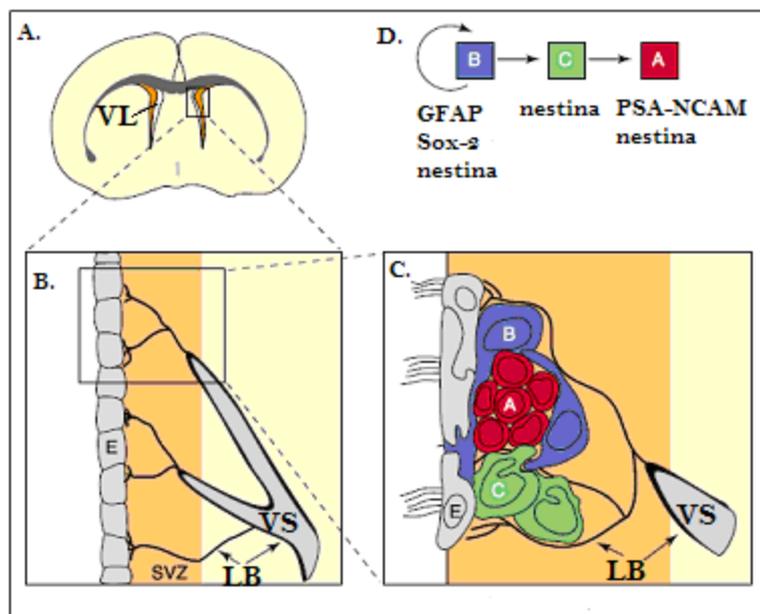


Figura 13. Dibujo ilustrativo, mostrando el nicho celular de la SVZ y el linaje progenitor. (A.) Esquema frontal del cerebro adulto de ratón, mostrando las SVZ en naranja, entre los ventrículos laterales (VL). (B.) detalle de la zona marcada en (A.) donde se observa los vasos sanguíneos (VS) muy comunes en la SVZ constituyendo una fuente de señales para la neurogénesis. Se localiza en esta zona una lámina basal especializada (LB) que se extiende desde los vasos sanguíneos, por el SVZ, hasta terminar en pequeños bulbos adyacentes a las células endocelulares (E). (C.) Esquema ampliado de la zona marcada en (B.) donde se pueden ver los neuroblastos en rojo (A) las células indiferenciadas de alta proliferación en verde (C) y los astrocitos en azul (B). (D.) Modelo de neurogénesis aceptado de la SVZ, mostrando los marcadores de proliferación que posee cada tipo celular. (Modificado de Doetsch, 2003).

5.5.2.2 Características de las células progenitoras del cerebro adulto

Desde que fuera definitivamente aceptada la idea de la proliferación neuronal en el cerebro adulto, muchos han sido los estudios llevados a cabo para desenmascarar a la insigne célula progenitora. Los primeros trabajos se basaban en cultivos de células procedentes de la SVZ. En estos trabajos se observaba tanto proliferación *in vitro*, con el uso de factores de crecimiento (Reynolds y Weiss, 1992; Morshead, 1994; Gage y col., 1995; Weiss, 1996), como su multipotencialidad, pudiéndose diferenciar la progenie a distintos tipos celulares propios de tejido nervioso, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (McKay, 1997).

Una vez superado este primer paso, el siguiente debía ser el estudio y caracterización de las células madres *in vivo*. Esto fue complicado, ya que en principio se esperaba encontrar células inmaduras e indiferenciadas. Esto estaba basado en la idea errónea de que dichas células progenitoras debían de tener marcaje y estructura iguales al de las células embrionarias (Fuchs y Segre, 2000; Coulombe y cols., 1989; Vasioukhin y cols., 1999; Hu, 1997). Y sin embargo los trabajos recientes realizados sobre la SVZ, demuestran que éstas tienen características previamente atribuidas a células gliales maduras.

Astrocitos

De menor tamaño que las neuronas, los astrocitos constituyen el grupo más numeroso dentro de las denominadas células gliales, un conjunto heterogéneo de células específicas del tejido nervioso con numerosas y diversas funciones, aunque en ningún caso relacionadas directamente con la transmisión de señales intercelulares, principal función del tejido nervioso. El número de astrocitos es muy superior al del resto de células del tejido nervioso; algunas estimaciones colocan a los astrocitos en una proporción de 3 a 1 con respecto a las neuronas.

Las funciones más destacadas de los astrocitos, clásicamente han sido: regulación de la composición iónica del líquido extracelular del sistema nervioso central, inducción de la formación de la barrera hematoencefálica (BHE), actuar de soporte y guía de las neuronas durante la migración y ayudar a mantener los niveles de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en las neuronas (Kimelberg y Norenberg, 1989; Miller y *cols.*, 1989).

Parece ser que a la multitud de funciones que se le atribuyen a los astrocitos habría que añadir el de célula progenitora. Son muchos los trabajos realizados sobre astrocitos de la SVZ, todos con la misma conclusión, inverosímil hace tres décadas, de que efectivamente ejercen un papel de progenitoras (Figura 14). Los astrocitos de la SVZ responden a EGF (del inglés, Ependimal Ground Factor, factor de crecimiento ependimal) *in vitro*, produciendo neuronas y glia (Doetsch y *cols.*, 1999). Además se ha comprobado también su capacidad proliferativa *in vivo*, con el uso de la droga antimitótica Ara-C (citosina- β -D-arabinofuranodido) inyectada en la SVZ y de bromodeoxiuridina (BrdU), un intercalante de ADN que marca las células proliferativas y su descendencia. La aplicación de esta droga ha corroborado que los astrocitos de esta zona dan lugar a células tipo C, que a su vez dan lugar a neuroblastos (Doetsch y *cols.*, 1999).

Los astrocitos de la SVZ como cualquier otro tipo de astrocito, sufren un complejo proceso de compartimentación en la SVZ y se marcan con GFAP (del inglés, *Glial Fibrillar Acidic Protein*). Pero en un análisis detenido de las características de estas células, en comparación con las células madres embrionarias, se observan similitudes interesantes:

a. Ambos tipos celulares expresan nestina (Doetsch y *cols.*, 1997), una proteína del citoesqueleto que pertenece al grupo de filamentos intermedios característicos de células madres (Lendahl y *cols.*, 1990).

b. Están en contacto con el lumen del ventrículo y aunque en principio se pensaba que los astrocitos estaban separados del líquido cefalorraquídeo (LCR) por la capa de células ependimales, en un examen concienzudo, en la SVZ de

ratón se puede observar que algunos astrocitos conectan directamente con el lumen del ventrículo, por prolongaciones que corren entre las células ependimales (Doetsch y cols., 1999).

c. Presentan un único cílio corto que se extiende en el LCR, y contiene 9+0 microtúbulos, al igual que el de las células madres (Doetsch y cols., 1999; Sotelo y Trujillo-Cenóz, 1958; Cohen y Meisinger, 1987).

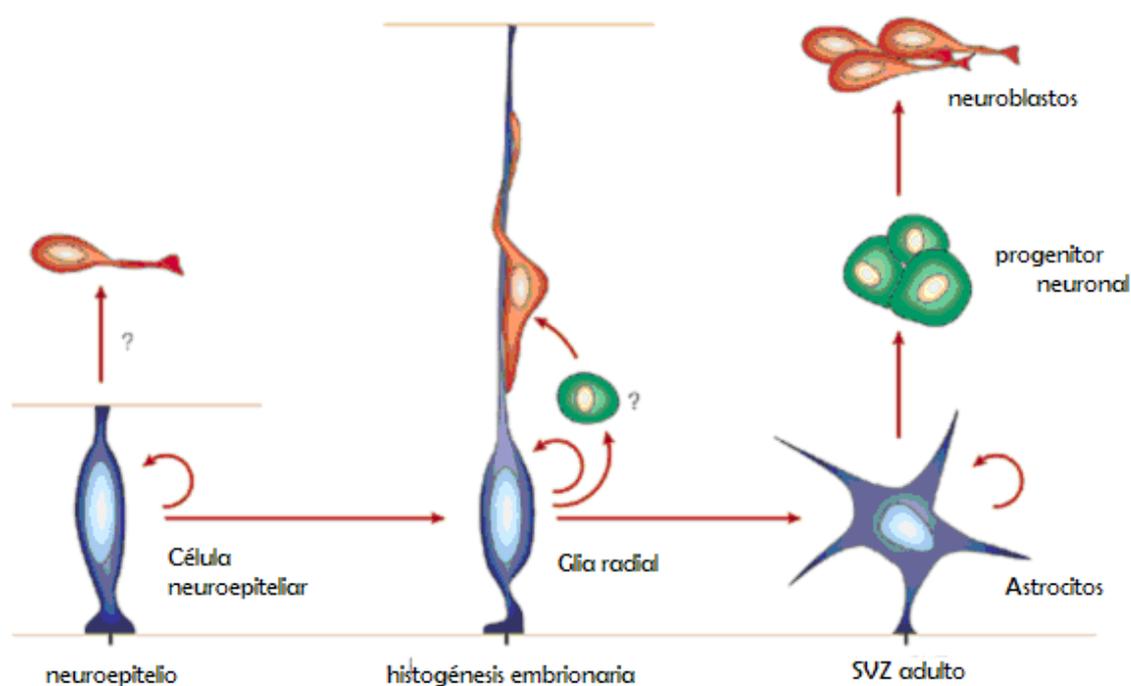


Figura 14. Esquema ilustrativo de los diferentes tipos de células progenitoras y la secuencia de aparición. Las células madres en el neuroepitelio temprano (izquierda) se extienden desde el ventrículo hasta la superficie pial, estas tienen la capacidad de autorregenerarse, y de producir diferentes tipos de células del tejido nervioso; la glía radial (centro) podría comportarse como célula madre neural, proviniendo quizá de las neuroepiteliares embrionarias. La glía radial se divide simétrica o asimétricamente, dando lugar a neuronas (rojo) que migran usando las proyecciones de la misma glía radial. La glía radial además puede producir neuronas de forma directa o a través de un tipo celular diferente (verde); la glía radial en el cerebro adulto, parece ser que se transforman en astrocitos (derecha). Estos astrocitos actúan como células proliferativas en algunas zonas del cerebro adulto, como la SVZ, donde pueden autorenovarse o dar lugar a neuroblastos de modo indirecto a través de un progenitor intermediario. Los tres tipos de células presentan un único cílio corto con disposición microtubular 9+0, extendido al lumen (Modificado de Alvarez-Buylla y García-Verdugo 2001).

Glía radial

A estas células, que presentan largos procesos (Figura 15), se les ha adjudicado, comúnmente, la función de actuar como guía para la migración de los neuroblastos hacia su destino final dentro del tejido (Rakic, 1972). Aunque se ha observado que al finalizar este proceso de guiado, estas células se retraen y se diferencian a astrocitos (Figura 14) (Schmechel y Rakic, 1979; Ramón y Cajal, 1911; Levitt y *cols.*, 1981; Pixley y De Vellis, 1984; Voigt, 1989).

La glía radial es ubicua en el cerebro en desarrollo, y genera la mayoría de las neuronas y glía (Malatesta y *cols.*, 2000; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Sin embargo, cuando cesa la neurogénesis, la glía radial desaparece y da lugar a astrocitos o endoteliales de la pared ventricular, excepto en algunas regiones en la que persiste.

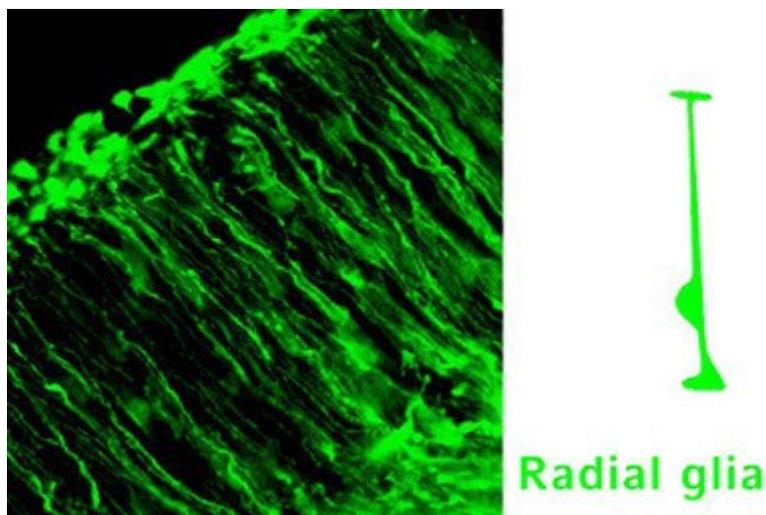


Figura 15. Glía radial cortical del cerebro en desarrollo, mostrando los procesos radiales por los que se desplazan las células nerviosas en desarrollo. A la derecha dibujo esquemático de una célula de glía radial.

Al igual que ocurre con los astrocitos, las células de la glía radial presentan características comunes a las células neuroepiteliares del embrión temprano:

- a. La glía radial contacta tanto con la superficie pial como con la superficie del ventrículo, al igual que ocurre con las embrionarias.
- b. Ambos tipos celulares expresan los filamentos intermedios de nestina (Lendahl y *cols.*, 1990; Hockfield. y McKay, 1985).
- c. La glía radial sufre mitosis y migración interquinética muy similar a la que acaece en las células madres neuroepiteliares (Misson y *cols.*, 1988; Frederiksen y McKay, 1988; McKay, 1989)
- d. Estas células extienden, también, un único cilio corto (Alvarez-Buylla y *cols.*, 1998), con disposición microtubular 9+0 (Sotelo y Trujillo-Cenóz 1958; Stensaas y Stensaas, 1968; Cohen y Meininger, 1987) al lumen del ventrículo.

La cadena de acontecimientos más aceptada actualmente en relación a la proliferación celular que parece ocurrir en el cerebro, desde los estados embrionarios hasta la edad adulta, sería la mostrada en la figura 16. En ésta, las células del neuroepitelio durante el desarrollo se modifican primero a glía radial y luego a astrocitos, conservando ambos tipos de células la capacidad proliferativa.

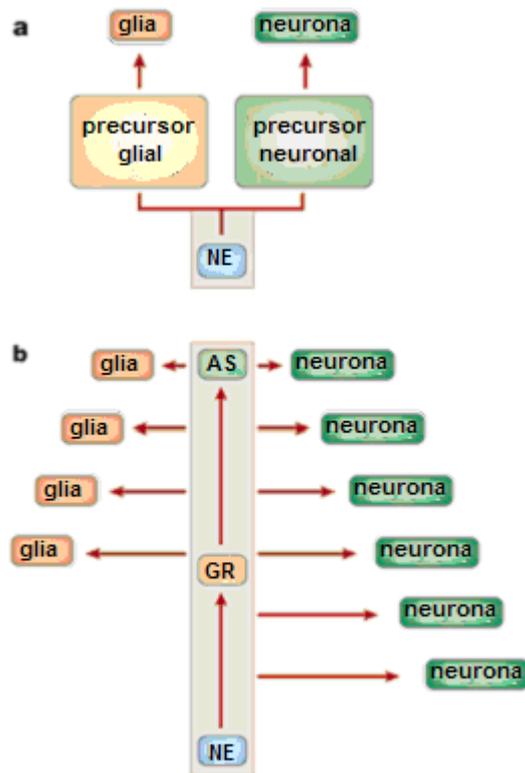


Figura 16. Gráfico comparativo de la visión clásica (a) y la actual (b) sobre proliferación neuronal. (a) visión histórica de la generación del tejido nervioso, en la que las células del neuroepitelio (NE) darían lugar a dos tipos de células proliferativas: las que originarían glía y las que darían por proliferación a neuronas. (b) visión actual, donde las células del neuroepitelio (NE) generan durante la embriogénesis, gran parte del tejido nervioso, hasta que se modifican a glía radial (GR). La GR se divide de modo asimétrico generando neuronas y glía. Y ya en el adulto parece ser esta GR originan un tipo de astrocito con capacidad de autoperpetuarse y de generar los tipos celulares del tejido nervio (Modificado de Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2001).

Células endimales o endimocitos

Las células endimales derivan de la glía radial, pero han perdido su capacidad neurogénica. Sin embargo, algunos autores han sugerido a las células endimales como células progenitoras, ya que parece ser que bajo algunas condiciones especiales éstas funcionan como tal *in vitro* (Johansson, 1999). Aunque, en otros estudios en los que se usaron diferentes condiciones de cultivo, no parecían actuar como tal (Doetsch y cols., 1999; Laywell y cols., 2000; Chiasson y cols., 1999), además de que no existen evidencias de la división

de estas células *in vivo* (Doetsch y cols., 1999), las células ependimales no presentan características de células madres.

Finalmente, en el adulto existen tanicitos en regiones cerebrales como el órgano subfornical (Figura 17) donde presentan aspecto de glía radial, pero no se ha demostrado neurogénesis. Estos tanicitos, aparentemente "quiescentes", pero positivos a nestina, han sido observados en la presente tesis doctoral.

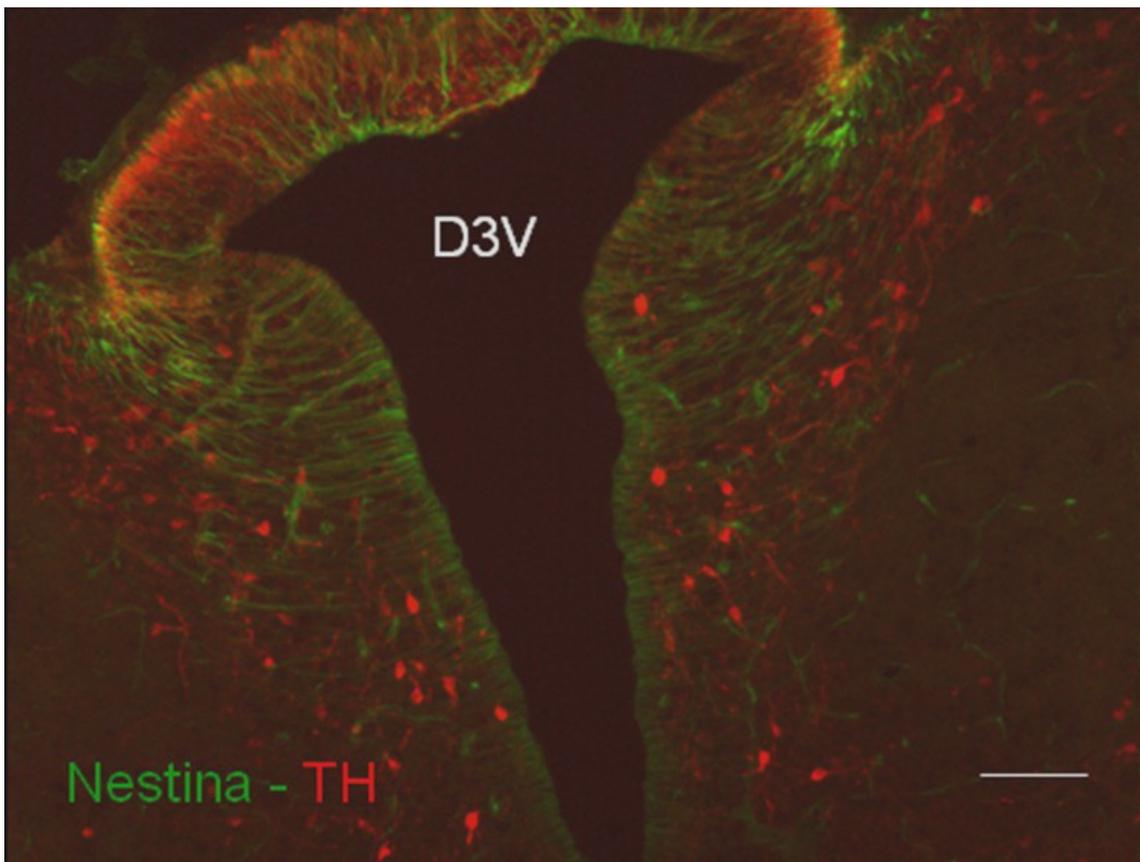


Figura 17. Órgano subfornical en la rata adulta, donde se observan tanicitos con apariencia de glía radial (células en verde), positivos a nestina, tapizando la pared del tercer ventrículo (D3V). En rojo se identifican células dopaminérgicas, positivas a tirosina-hidroxilasa. Barra: 100 μ m.

5.5.2.3 Nuevos nichos progenitores en el cerebro adulto

En el contexto de la temática de la presente tesis doctoral se ha documentado la existencia de otros nichos neurogénicos, distribuidos más ampliamente por el cerebro de animales adultos, que pueden en mayor o menor medida responder ante estímulos de daño cerebral, en un esfuerzo de invertir el daño. Así encontramos que existen otras zonas del mesencéfalo donde podemos observar células nestina positivas que mantienen, en cierta medida, la tipología de nicho neurogénico que existe en la SVZ, ya que se localizan fundamentalmente próximas a los ventrículos.

El descubrimiento de células progenitoras en el mesencéfalo, hecho que debe ser más profundamente estudiado, es de máxima importancia. Algunos laboratorios proponen la estimulación terapéutica de dichas zonas para la generación de células dopaminérgicas ante la pérdida que se produce en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Zhao y cols., 2002).

Así se ha podido observar células con filamentos de nestina en las proximidades del tercer y cuarto ventrículo (Chouaf-Lakhdar y cols., 2002). Estas células se localizan en el órgano subcomisural (SCO) y en el plexo coroideo (CP). La capa ependimaria del tercer ventrículo en el cerebro de la rata es una línea simple de células ciliadas y no ciliadas. Las células ciliadas se conocen como ependimocitos y las no ciliadas tienen largos procesos celulares que comunican con el parenquima del hipotálamo y se les conoce con el nombre de tanicitos (Flament-Durand y Brion, 1985). Los tanicitos mantienen características morfológicas de las células gliales embrionarias que han sido descritas como las células progenitoras en el desarrollo del SNC (Alvarez-Buylla, 1990).

Se ha encontrado células con filamentos de nestina entre los endimocitos y en las capas subendimales en un número normalmente reducido. Estas no sólo presentaban filamentos de nestina, sino que además pudo constatarse que experimentaban división celular por marcaje de BrdU (Xu y cols., 2004; Chouaf-Lakhdar y cols., 2002). Esa división era normalmente mayor en las capas subendimales que entre los endimocitos. La actividad mitótica de esta zona aumentaba mediante la administración de factores de crecimiento (Xu y cols., 2004). Mediante el cultivo de dichas células extraídas de la capa endimal del tercer ventrículo era posible generar neuroesferas proliferativas *in vitro*, que podían generar todos los tipos celulares del cerebro, incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Además pudo observarse *in vivo* que los productos de división de esta zona eran capaces de migrar y madurar a neuronas funcionales.

A estos esfuerzos se suman los trabajos de Hendrickson. Este grupo hace un amplio estudio de los diferentes tipos de células con filamentos de nestina que podemos encontrar en el cerebro adulto. Así describe la existencia de 4 clases de células (Hendrickson y cols., 2011):

- Clase I: están entre las células neuronales más pequeñas, ampliamente distribuidas por el cerebro adulto a muy baja densidad. Presentan somas muy pequeños ($23 \mu\text{m}^2$ aproximadamente), y de 3 a 4 procesos que frecuentemente bifurcan cerca del soma. Tras un daño cortical, estas proliferan en torno al daño (veinte veces más), sugiriendo relación con la microglía, pero el marcador de microglía demuestra que la microglía está en mucha mayor densidad y tiene un soma más grande que estas células clase I. No es poco razonable especular que estas células Clase I podrían ser una de las fuentes de células progenitoras neuronales que pueden ser observadas en cultivos de estriado, neocórtex y otras zonas no neurogénicas del cerebro adulto (Reynolds y cols., 1992; Palmer y cols., 1999).

- Clase II: se encuentra en la pared del acueducto, tercer ventrículo y en la pared media del ventrículo lateral inmediatamente rostral a su fusión con el tercer ventrículo. Estas células, que en algunas zonas reciben el nombre de tanicitos, tienen un soma redondeado de unos $65 \mu\text{m}^2$. Tienen pocos o ningún proceso celular. Presentan señal nestina +, pero no se detectó colocación de señal BrdU en los experimentos realizados, por lo que aún falta por determinarse si tienen actividad mitótica.

- Clase III: Se han observado sólo en la zona basal del prosencéfalo (zona colinérgica, el cuerpo estriado, y capas CA1-CA3 del hipocampo) y muy limitadas a la zona del hipocampo y cuerpo estriado. En humanos se ha encontrado también en los ganglios basales. Estas células parecen estructuralmente neuronas y coexpresan marcadores asociados exclusivamente a neuronas diferenciadas. Los experimentos de proliferación han demostrado que este tipo celular no es de reciente generación. En cambio, aparecen como células maduras en el cerebro adulto expresando nestina. Se supone que no existen neuronas que expresan nestina en el cerebro en ningún estado del desarrollo. Pero, dado que estas neuronas únicas se encuentran solo en las regiones del cerebro involucradas con funciones de alto grado de cognición, se postula que éstas podrían presentar filamentos de nestina debido a cambios morfológicos necesarios para la plasticidad que caracteriza a los procesos cognitivos. De este modo, la clase III, son en realidad "neuronas que expresan nestina" (NENs). Tiene un gran soma de media de $180\text{-}230 \mu\text{m}^2$ dependiendo de su localización, y tienen procesos neurales de complejidad variada que también son inmunopositivos para nestina. No se encuentran en el neocórtex, pero se han observado en regiones del cerebro adulto no relacionados con la neurogénesis: estriado, núcleo de la banda diagonal, núcleos medial septales, córtex piriforme, núcleos basales de Meynert, la capa piramidal del hipocampo y en el área posterior del hipotálamo; El

núcleo preoptico lateral, el área preóptica media, núcleo anterodorsal preóptico, núcleo medial preóptico y núcleo submamilotalámico. También se han encontrado en la habérnula media, en los islotes de calleja (acumulaciones de células en la circunvolución del hipocampo) , en la fasciola cinérea y en el indeseum griseum.

- Clase IV: se encuentran por todo el prosencéfalo (hemisferios, tálamo, e hipotálamo) y típicamente se encuentran inmediatamente adyacentes a otras neuronas en una posición satélite que podría dar la idea de que estas células son oligodendrocitos que expresan nestina. Sin embargo, estas células no expresan el marcador $GST-\pi$ propio de oligodendrocitos. Tampoco expresan GFAP, ni SOX-2, ni DCX, sugiriendo que no son astrocitos, ni células progenitoras, ni son neuronas recientemente generadas. Ni tampoco expresan NeuN o β III-tubulina, indicando que no son neuronas maduras. Tienen un soma de $115 \mu\text{m}^2$ de media, con largos y prominentes núcleos, escaso citoplasma y de tres a ocho finos procesos celulares que rara vez sobrepasan los $10\mu\text{m}$ desde el soma. Aún falta por determinarse si tienen actividad mitótica.

Bajo la influencia de estos descubrimientos, a los que se suma los hallazgos que constatan la actividad proliferativa ante daño cerebral en modelos animales (Korzhevskii y cols., 2008), se ha fundamentado una de las inquietudes de este trabajo de tesis doctoral, donde se estudió el posible aumento de proliferación en mesencéfalo tras el daño oxidativo provocado por el modelo de hemiparkinsonismo con 6-OHDA.

Control de neurogénesis en cerebro adulto por cannabinoides

La primera alusión al posible papel del sistema endocannabinoide en la neurogénesis del cerebro adulto, fue el descubrimiento de la expresión del receptor CB1 en las células progenitoras (Figura 18). Este receptor aparece en

las células progenitoras neuronales desde los estadios embrionarios hasta las células progenitoras del cerebro adulto (Galve-Roperh y cols., 2007).

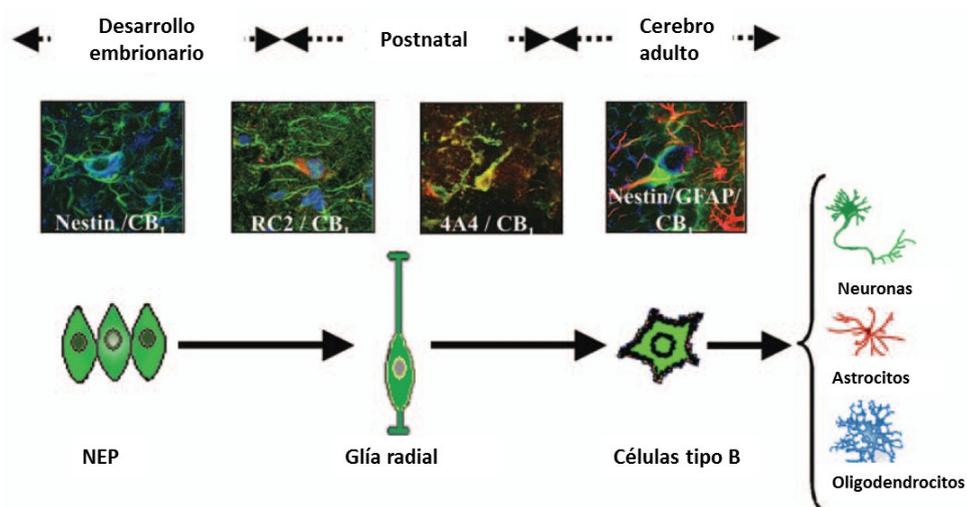


Figura 18. Expresión de receptores cannabinoides CB1 y progenitores neuronales. CB1R se expresan in vivo en células que expresan nestina, progenitor neural (NEP) o el marcador de glía radial RC2, en embriones E17.5 y ratones postnatales P2.5, respectivamente. CB1R está presente en progenitores radiales proliferativos, como lo revela la tinción con vimentina fosforilada. Los receptores CB1 también se expresan en células tipo B (nestina+ y GFAP+) de la zona subgranular del hipocampo del ratón adulto. CB = cannabinoide; GFAP = glial fibrillary acidic protein. Modificado de Aguado y cols., 2006.

Las células progenitoras encontradas en el cerebro adulto presentan muchos constituyentes del sistema cannabinoide como los receptores CB1, CB2 y TRPV; los ligandos endógenos como anandamida y ácido araquidónil-glicerol (2-AG); y enzimas del metabolismo de los cannabinoides, como la enzima FAAH y la enzima de síntesis de 2-AG, diacilglicerol lipasa (Harkany y cols., 2007; Aguado y cols., 2005; Goncalves y cols., 2008). Además, los ratones sin el receptor CB1, presentan dañada la proliferación de las células progenitoras de las zonas del hipocampo y subventriculares, así como la formación de neurosféricas en cultivos (Aguado y cols., 2005).

El desarrollo de las células progenitoras en el cerebro adulto es un balance regulado entre proliferación, diferenciación y supervivencia / muerte, controlado por señales extracelulares. Aunque el mecanismo implicado aún no está claro, las investigaciones recientes sugieren que parte de este control viene dado por el sistema endocannabinoide. En este contexto hay propuestas ya

algunas vías que podrían estar implicadas en el control que ejerce los cannabinoides en el destino celular, como la vía Rap/B-Raf/ERK y PI3K/Ark (Galve-Roperh, *cols.*, 2006). También se postula que el control de la proliferación por cannabinoides puede venir mediante la regulación de la óxido nítrico sintasa (Kim y *cols.*, 2006), ya que como se sabe los cannabinoides pueden regular la actividad de esta enzima y hay bibliografía reciente que propone al óxido nítrico entre los partícipes del control neurogénico (Matarreona y *cols.*, 2005). Además se ha propuesto la regulación cruzada con rutas de señalización de los factores de crecimiento. En esta línea se propuso que el factor de crecimiento de fibroblastos puede inducir la síntesis de 2-AG (Willian y *cols.*, 2003). También el sistema cannabinoide podría estar implicado en la neurogénesis a través de su función como neuromodulador (Lie y *cols.*, 2004) de otros neurotransmisores como la dopamina, la cual parece ser que tiene un papel en la regulación de la neurogénesis (Baker y *cols.*, 2004). Otra de las inquietudes que fundamentan este trabajo de tesis doctoral fue el estudio del posible cambio en la proliferación en mesencéfalo inducido por $\Delta 9$ -THC, empleando el modelo de hemiparkinsonismo con 6-OHDA.

Conseguir entender el funcionamiento de la actividad proliferativa, es una ambición de actualidad extrema, si tenemos en cuenta que hace poco más de dos décadas, aun se pensaba que no existía neurogénesis en el cerebro adulto. Hoy se mira al futuro con la esperanza de encontrar la clave de su control para tratar enfermedades para las que hoy sólo tenemos tratamientos paliativos. La neurogénesis en el cerebro adulto puede ser la clave para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Párkinson, pero también para enfermedades como la esquizofrenia, donde se ha visto hay una pérdida de dicha capacidad (Reif y *cols.*, 2006) y que por lo que sabemos bien podría ser la causa etiológica.



MATERIALES Y MÉTODOS

Tarea Experimental I

Efecto motor de inyecciones intraestriatales de $\Delta 9$ -THC y ligandos dopaminérgicos D3 en ratas hemiparkinsonianas.

1. Objetivos

Los experimentos realizados en ratas buscaron siguientes objetivos específicos:

- Valorar el efecto motor del $\Delta 9$ -THC en modelo de hemiparkinsonismo nigro.
- Detectar la posible implicación de los receptores dopaminérgicos D3 en el control motor de animales en modelo de hemiparkinsonismo nigro

2. Animales de experimentación

Se usaron Ratas Wistar adultas hembras (170-259 g), provenientes del



animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. Los animales fueron tratados en todo momento de acuerdo a las normas de uso y cuidado de los animales de laboratorio de la universidad de Sevilla. La temperatura y humedad en el laboratorio se mantuvieron constantes ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) y (30-60%, respectivamente),

con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. El agua y la comida fueron disponibles *ad libitum*.

3. Procedimiento experimental

Los animales eran sometidos a una operación estereotáxica por la que por un lado se les lesionaba la sustancia negra unilateralmente, y por otro lado se les implantaba una cánula al estriado ipsilateral. Una vez que los animales estaban recuperados de la operación, se les validaba el estado de parkinsonismo por test de comportamiento de inducción de giro por amfetamina. Y posteriormente se les estudió el cambio en dicho giro inducido por distintas sustancias. Para finalizar se corroboró que las cánulas estuvieran colocadas acertadamente.

3.1. Cirugía estereotáxica

Los animales fueron sometidos a una doble operación estereotáxica: Inyección intranigral unilateral de 6-OHDA y colocación de cánula de inyección fija intraestriatal.

a) Inyección intranigral unilateral de 6-OHDA

Ésta, consiste en la inyección de 6-OHDA, una droga conocida por el daño selectivo que hace sobre las neuronas catecolaminérgicas. 30 minutos antes de la operación se les inyecta desipramina (clorhidrato de desipramina, Sigma, EE.UU) 10mg/Kg intraperitonealmente (IP), para proteger a las neuronas noradrenérgicas del daño oxidativo, y penicilina (100000 UI) intramuscular (IM) como profilaxis antibiótica. Pasados los 30 minutos se anestesian los animales con ketamina (50mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) IP y son colocados en el aparato estereotáxico Kopf (Figura 19), mediante el uso de las barras interaurales y una barra de sujeción incisiva colocada a 3,3 mm bajo la línea interauricular.

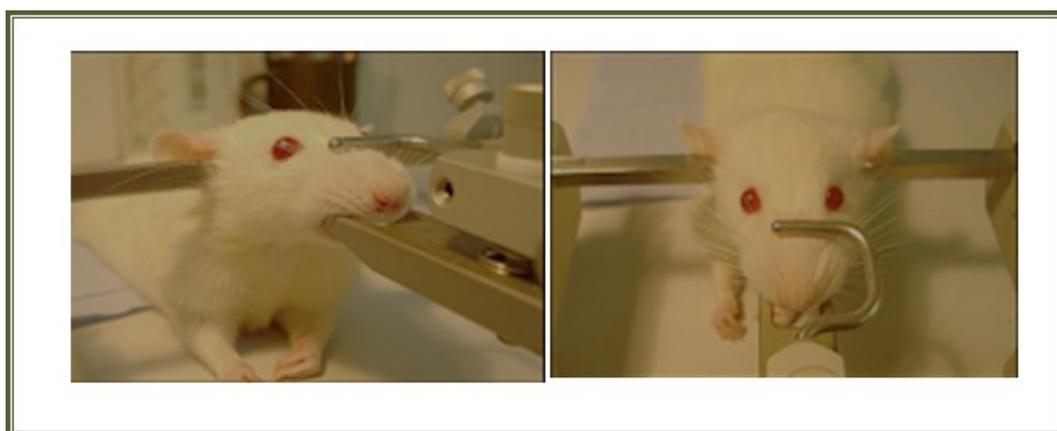


Figura 19. Fotografía de una rata Wistar colocada en el estereotáxico, antes de la operación donde se puede ver los punto de soporte

A continuación, se procede a la desinfección superficial de la cabeza del animal con antiséptico de uso tópico y se realizó, con bisturí, una incisión longitudinal limpia en la cabeza desde la comisura anterior de los ojos hasta el inicio de la musculatura del cuello. Una vez despegado y separado el periostio lateralmente, se expuso la calota para proceder a la localización del brazo móvil del estereotáxico hacia el bregma. El bregma supone el punto de unión de la sutura sagital con la sutura fronto-parietal del cráneo, se usa como punto de referencia a partir del que se calcula las coordenadas estereotáxicas, correspondientes a la sustancia negra, según el atlas estereotáxico para ratas Wistar de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005).

Las coordenadas utilizadas para la microinyección en la sustancia negra con respecto al bregma, en milímetros, son:

Antero-Posterior (AP)	Lateral (L)	Vertical (V)
-5.4	+2.2	-8.2
-5.2		

Una vez realizados los cálculos pertinentes, se fijaron las coordenadas, y mediante una fresa de corona esférica, se procedió a la craneotomía,

perforando la calota hasta dejar expuesta la duramadre, de tal modo que se permitiese el paso intracerebral de la microcánula con 6-OHDA. Para la inyección del fármaco se utilizó una jeringuilla Hamilton de 10 μl conectada a la microcánula de inyección a través del tubo de polietileno. Una vez situada la microcánula en el núcleo en cuestión se inyectaron 1,2 μl de una solución 6-hidroxidopamina ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Sigma), 0,9% de ClNa y 0,2% de ácido ascórbico en cada punto de lesión (Figura 20), durante cinco minutos, a velocidad constante mediante el uso de una bomba de inyección electrónica regulable (Inyector KDS-100 CE, Kd Scientific, EEUU). La microcánula se mantiene durante unos tres minutos una vez terminada la infusión, para permitir la correcta difusión del tóxico por el tejido retirándolo lentamente después. Una vez finalizada la lesión se procedió con la segunda operación estereotáxica.

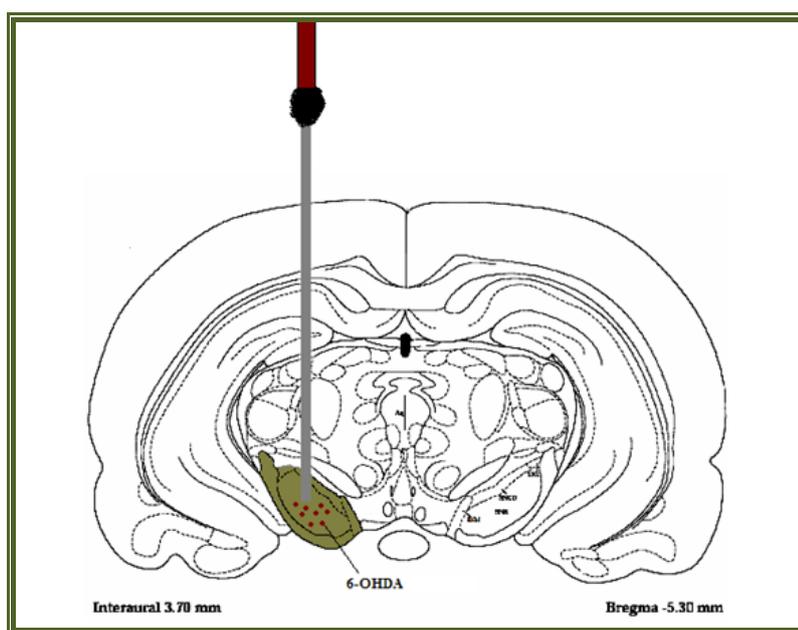


Figura 20. Gráfico ilustrativo, de una sección de cerebro. Durante la operación a través de la cánula, se libera de forma localizada 6-OHDA, para lesionar la SN izquierda (verde)

Las ratas control o con falsa lesión (ratas "sham"), fueron sometidas al mismo procedimiento quirúrgico, siguiendo el mismo protocolo, pero la solución inyectada no contenía 6-OHDA, sino que se les inyectó solo el vehículo correspondiente (salino 0,9%, ácido ascórbico 0,2%, en agua destilada).

b) Implante de cánula intraestriatal.

Para realizar esta operación, primero era necesario colocar la cánula en el brazo móvil del aparato estereotáxico, sustituyéndolo así la aguja usada para inyección del tóxico. Una vez colocada se procedió nuevamente con la localización del bregma, para calcular, ahora, las coordenadas correspondientes al estriado. Las cuales fueron en milímetros:

Antero-Posterior (AP)	Lateral (L)	Vertical (V)
+0.5	+3	-5.5

Tras los cálculos correspondientes, se procedió a taladrar el orificio por el que habría de penetrar la cánula. Dicha cánula consta de cánula guía de 22 gauge y 14mm y cánula interna obturadora de 30 gauge y 16mm. De esta forma la cánula obturadora interna sobresale 2mm, de la misma manera que sobresaldrá posteriormente la aguja por la que se le inyectará las distintas sustancias, permitiendo así una mejor difusión y éxito al experimento. Se realiza también un orificio (sin llegar a perforar el cráneo) cercano a la cánula. La cánula se inserta en las coordenadas correspondientes y en el orificio anexo se colocó un microtornillo bien fijado con sigma-tote, creando así un soporte para la cánula. Por último, con la ayuda de cemento de dentista, se hizo un bloque con la cánula, el tornillo y un "gorro" de plástico (Figura 21), que servirá de protección para evitar que el animal rompa el implante. Una vez endurecido el cemento, se suturó la incisión por delante y por detrás del implante, se identificó a los animales para su posterior utilización y se mantuvieron estables en el estabulario.

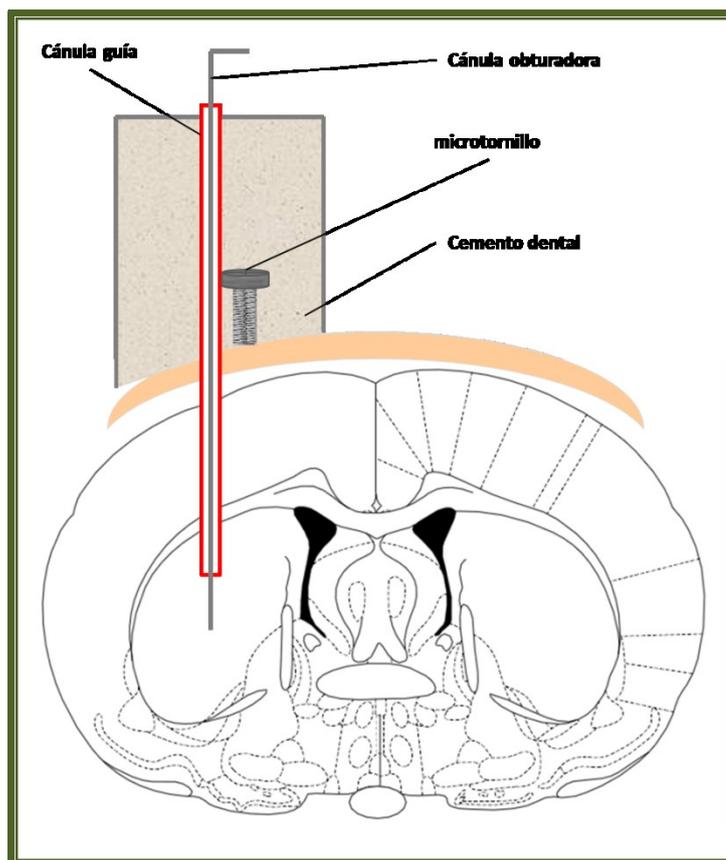


Figura 21. Esquema representativo de la colocación de la cánula en el estriado

c) Análisis de disfunción motora. Test de anfetamina.

El empleo del test de giro inducido por anfetamina, se usa para validar el grado de lesión provocado con la operación (Schwartz y Huston, 1996). Este test se basa en la administración de anfetamina (clorhidrato de anfetamina, Sigma, EEUU).

La anfetamina es un psicoestimulante que produce un incremento en la liberación de dopamina. En los animales lesionados en el circuito nigroestriatal induce una intensa rotación homolateral a la lesión. Este giro es provocado por el nivel descompensado de dopamina liberada por los terminales dopaminérgicos en un estriado y el otro.

Para la realización del test se les administró a las ratas una solución de clorhidrato de anfetamina (5mg/kg, sigma) en NaCl al 0,9% en el intraperitonealmente (IP), 15 días tras la lesión estereotáxica. Entre 30 y 90 minutos después de la administración de la anfetamina se contabilizan los giros

en el sentido de las agujas del reloj, es decir, rotaciones ipsilateral a la lesión y de 360°, dentro de un diámetro de 30 cm.

Este test permite seleccionar las ratas con parkinsonismo estable e intenso, ya que un número de rotaciones superior a 420 giros/hora es indicativo de una lesión superior al 85% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, que representa un daño similar, al acaecido en los humanos que presentan síntomas de la enfermedad. Las ratas que no giraron > 420% giros/hora fueron sacrificadas.

3.2. Protocolo de inyección intraestriatal.

Una vez comprobada y registrada, la disfunción motora de los animales, y tras 7 días del test de amfetamina, esto es 22 días después de la operación estereotáxica, se procedió a la inyección intraestriatal de varias sustancias. Las cuales fueron:

- Δ^9 -THC (Sigma, EEUU), agonista cannabinoide.
- GR103691 (Tocris, UK), antagonista dopaminérgico del receptor D3
- 7-OH-PIPAT (Tocris, UK), agonista dopaminérgico del receptor D3

Las sustancias se inyectaban en el estriado ipsilateral a la lesión y 30 min después se les sometían nuevamente al test de amfetamina para comprobar en qué medida modificaban el dato inicial de giro del animal.

Todos los animales recibían 1,5 μ l de la sustancia correspondiente a su grupo de experimentación, para ello se mantenía al animal inmovilizado manualmente, se le extraía la cánula y se le introducía una aguja de inyección de las mismas dimensiones que la obturadora (16mm), y mediante una aguja Hamilton conectada a la aguja por un tubo de polietileno y una bomba inyectora, se le administraba el producto a velocidad constante. Tras 30 minutos se les administraba la amfetamina IP y se procedía a la valoración de giro.

Se hicieron también grupos en los que los productos se inyectaron de forma conjunta. Esto se hizo una vez comprobada las dosis más efectivas de cada producto inyectado. Para ello, primero se inyectaba uno de los productos de interacción dopaminérgica, del mismo modo mencionado anteriormente, y 20 min después el Δ^9 -THC. A continuación, pasados 30 minutos se procedía con el test de giro, inyectando la anfetamina para realizar el test normalmente. Los grupos realizados fueron los que siguen:

Grupos de inyección simple

Producto	vehículo	Dosis inyectadas intraestriatalmente			
Δ^9 -THC	Alcohol	0mg/ml	5mg/ml	15mg/ml	25mg/ml
GR103691	DMSO	0nmol	1nmol	5nmol	10nmol
7-OH-PIPAT	DMSO	0 μ g/ μ l	1 μ g/ μ l	5 μ g/ μ l	10 μ g/ μ l

Grupos de doble inyección

Productos	Dosis inyectadas intraestriatalmente		
GR103691	0nmol GR103691	5nmol GR103691	5nmol GR103691
Δ^9 -THC	0mg/ml THC	5mg/ml THC	15mg/ml
7-OH-PIPAT	0 μ g/ μ l PIPAT	5 μ g/ μ l PIPAT	5 μ g/ μ l PIPAT
Δ^9 -THC	0mg/ml THC	5mg/ml	15mg/ml

Los grupos control en este caso, fueron aquellos animales que recibían intraestriatalmente, los vehículos de las sustancias, es decir, etanol, o DMSO, en la misma cantidad y ventana temporal que el resto de animales.

3.3. Verificación de colocación de cánula

Para constatar que los productos fueron inyectados correctamente, una vez se terminaron los test, los animales fueron nuevamente inyectados intraestriatalmente. Esta vez se les inyectó tinta china que, al no difundir con facilidad por los tejidos nos revelaría el punto exacto de infusión a través de las cánulas implantadas a los animales.

La tinta china fue inyectada a través de la cánula por una aguja que nuevamente media lo mismo que la cánula obturadora, y también por medio de la bomba de inyección y una aguja Hamilton. Los animales recibieron una infusión de 0,5 μ l de una solución de tinta china levemente diluida en agua.

1. Procesamiento del tejido

Tras suministrarles las inyecciones a los animales, éstos fueron sacrificados mediante decapitación con guillotina. Los cerebros se extrajeron rápidamente, se congelaron mediante inversión en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su posterior utilización.

Para realizarles la tinción, la zona de interés de los cerebros se cortaron en secciones coronales de $30\ \mu\text{m}$ de grosor con un criostato (MICROM HM 525, MICROM international GmbH, Italia) a una temperatura de -20°C . Dichas secciones se recogieron en portas SuperFrost (Menzel-Gläser), donde se les realizó la tinción.

2. Protocolo de tinción.

Los cortes de tejido colocados en los portas y perfectamente secos se pasaron por una batería de soluciones. En concreto por etanol 96% (un pase), xileno 100% (un pase), etanol 96%, 70% y 20% durante 2 minutos en cada una, y después se pasaron por agua destilada durante 5 minutos. Tras lo cual, se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente en una solución de violeta de cresilo (0.1% p/V; Sigma). Posteriormente, se lavaron en agua destilada (dos pases) y seguidamente se deshidrataron pasando los cortes primero por una disolución de 270 ml de etanol 70% y 30 ml de ácido acético al 10% (dos pases). Por último se introdujeron nuevamente en etanol 100% durante 1-2 minutos, se dejaron secar a temperatura ambiente y cubiertos con medio de montaje DPX y cubreobjetos. Los cortes teñidos eran fácilmente analizados mediante el uso de lupa (Figura 22), para comprobar que el punto de inyección era efectivamente el deseado.

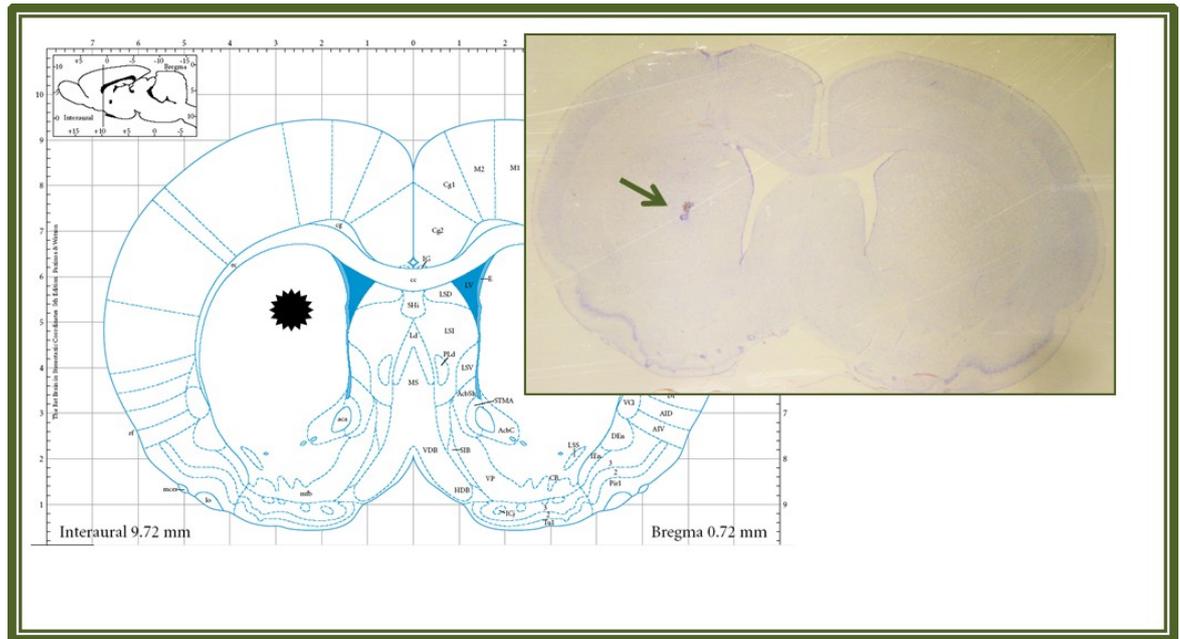


Figura 22. Ejemplo de verificación de correcta implantación de cánula En la figura puede verse una fotografía a un corte coronal de cerebro de rata teñido con violeta de cresilo donde puede apreciarse el punto de inyección intraestriatal (flecha) y una lámina del atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 2005) de la zona de interés.

Tarea Experimental II

Efecto Bifásico del Δ^9 -THC en la supervivencia de neuronas de la sustancia negra en cultivos. Papel diferencial de los receptores CB1, PPAR- α y TRPV1.

1. Objetivos.

- Estudiar los efectos del Δ^9 -THC en la supervivencia de cultivos de sustancia negra de ratones C57BL/6 *per se* y/o tras tratamiento tóxico con 6-OHDA.
- Discernir el papel en la supervivencia mediada por Δ^9 -THC de los receptores del sistema cannabinoide CB1, TRPV1 y PPAR- α mediante el uso de antagonistas como GW6471 (antagonista del receptor PPAR- α) y capsaicina (agonista TRPV1), y mediante el uso de ratones Knock-out.

2. Animales de experimentación.

Los experimentos se realizaron mediante el uso de ratones carentes de receptores PPAR- α , del receptor cannabinoide CB1 y del receptor vanilloide TRPV1

- Ratones C57BL/6J de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME)
- Ratones carentes (o knock-out, KO) del receptor PPAR- α , preparados con fondo genético de ratones C57 BL/6J, cedidos por la fundación IMABIS de Málaga.
- Ratones carentes del receptor CB1 y su correspondiente genotipo silvestre o wild-type, (WT) cedidos por la Dra. Olga Valverde (Universidad Pompeu Fabra, Barcelona)
- Ratones carente del receptor TRPV (B6.129S4-Trpv1^{tm1Jul}) procedentes de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME), con fondo genético de raton negro C57BL/6J

Todos fueron tratados en todo momento de acuerdo a las normas de uso y cuidado de los animales de laboratorio de la Universidad de Sevilla. Estos fueron preservados en el estabulario a temperatura y humedad constantes ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 30-60%, respectivamente), bajo un ciclo de luz- oscuridad de 12 horas. El agua y la comida estuvieron disponibles ad libitum.

3. Protocolo de Experimentación

Para esta tarea experimental se realizaron cultivos de neuronas de la sustancia negra de distintos tipos de ratón. Los cultivos fueron estudiados por fluorescencia para verificar que la población de neuronas se componía de las neuronas dopaminérgicas propias de este núcleo del cerebro. Después se estudió la supervivencia de los cultivos por el método de lactato deshidrogenasa (LDH) tras exponerlos a distintos productos.

3.1. Cultivo de neuronas.

Los cultivos primarios de neuronas de sustancia negra se realizaron siguiendo el método descrito anteriormente por Cardozo (Cardozo, 1993), con algunas modificaciones sugeridas por otros autores (Mena y cols., 1997; Burke y cols., 1998; Smeyne, 2002).

Para los cultivos, los ratones con tres semanas de edad fueron decapitados bajo condiciones de esterilidad, para extraerles el cerebro. Los cerebros fueron rápidamente colocados en una solución fría de HBBS (Hank's balanced salt solution, Gibco, invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) y sujetos en una matriz de disección, donde se hacen secciones coronales del mesencéfalo de unos 0,5-1mm. Con la ayuda de una lupa de disección, se toman entonces las zonas correspondientes a la sustancia negra, manteniendo especial cuidado de excluir las zonas mesencefálicas adyacentes como el área tegmental ventral).

Para la digestión del tejido se utiliza una solución enzimática de papaína (20 unidades/ml; Worthington, USA) con 0,2 mg/ml de L-cisteína en DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma Aldrich), 100mM de CaCl_2 y 50mM de EDTA. La solución se mantiene durante 40 minutos a 37°C en un baño de agitación. Después, el tejido es mecánicamente dissociado con la ayuda de una pipeta y centrifugado a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. Tras la centrifugación, el pellet se recoge y se deposita en un tubo con solución de inactivación que consta de 10% FCS (Foetal Calf Serum), 1% inhibidor de tripsina y 1% BSA (Bovine Serum Albumin) en DMEM. Se mantiene en la solución inactivante durante 5 minutos y posteriormente se centrifuga durante otros 5 minutos. El pellet se resuspende en medio de cultivo Neurobasal-A suplementado con 2% de B27 y 1% de Glutamax (Invitrogen Corp.), además de la solución antibiótica adecuada.

La solución celular resultante es ajustada a 30.000 células por pocillo en una placa multipocillo de 96. La suspensión celular resultante de la digestión de la sustancia negra de cada ratón permite sembrar entre 3-4 pocillos. Los cultivos, finalmente, se mantenían en un incubador a 37°C y 5% CO_2 .

3.2. Compuestos y dosis usados sobre los cultivos.

- El Δ^9 -THC (Sigma-Aldrich, Sanint Louis, USA), se usaba disuelto en etanol al 10% en medio de cultivo Neurobasal, a las dosis de 0, 30 y 300nM, y 1.5, 3 y $6\mu\text{M}$.
- El toxico dopaminérgico 6-OHDA (Sigma-Aldrich) se usaba disuelto en 0.15% de ácido ascórbico(para evitar su oxidación en el medio) y salino, a las concentraciones de 0, 40 y $60\mu\text{M}$
- GW6471 (antagonista del receptor PPAR- α) (Tocris, UK), se usaba disuelto en 10% DMSO a una concentración de $1\mu\text{M}$.
- Capsaicina (agonista del receptor TRPV1) (Tocris, UK), se usaba a dosis de $10\mu\text{M}$

3.3. Protocolo de tratamiento a los cultivos y ensayo de citotoxicidad (LDH)

Los cultivos de sustancia negra fueron tratados con las diversas sustancias a partir del cuarto día de cultivo. Para ello se retiró el medio de cultivo y se sustituía durante 2 horas por medio Neurobasal-A sin B27 (Molina-Holgado y cols., 2005). Es lo que se denomina "ayuno", de modo que las células estaban en un estado basal. El Δ^9 -THC era añadido durante 1 hora a los cultivos. En aquellos que recibían también GW6471 ($1\mu\text{M}$) y capsaicina ($10\mu\text{M}$), se les fueron incorporadas al medio durante 15 minutos justo antes de añadir el Δ^9 -THC. Y en los casos en los que se usaba 6-OHDA, ésta, era añadida al medio después de 1 hora tras el tratamiento con Δ^9 -THC. La 6-OHDA (0, 40 y $60\mu\text{M}$) se añadía a los cultivos recién preparada en ácido ascórbico al 0.15% y salino, durante 15 minutos en el incubador para producir la muerte de neuronas dopaminérgicas específicamente (Ding y cols., 2004). Pasados los 15 minutos, se retiraba el medio con 6-OHDA y se lavan los pocillos con Neurobasal-A 2 veces. Y se mantenían en este medio durante 24 horas, cuando comenzaba el ensayo de citotoxicidad o LDH.

La citotoxicidad producida por la 6-OHDA a las distintas dosis utilizadas es evaluada mediante un método indirecto ampliamente utilizado, como es el ensayo de la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima que es citosólica y que aparece en el medio extracelular (o, en este caso, en el medio de cultivo) al morir las células. Este ensayo se realiza mediante la utilización del kit comercial "Cytotoxicity Detection Kit" (Roche, Indianapolis, USA).

La cantidad máxima de LDH en relación a las condiciones de cultivo llevadas a cabo se calculaban incubando un pocillo sin tratamiento adicional, con tritón X-100 al 0.5% durante 1 hora para producir la máxima lisis celular. Por el contrario, la muerte basal del cultivo y sus condiciones particulares se obtienen de pocillos sin tratar y con medio suplementado con B27 hasta justo antes de empezar el ensayo (entonces hay que quitar el B27, ya que produce errores en los resultados durante el ensayo colorimétrico). La liberación de

LDH de fondo, es decir, del medio sólo se les resta a los valores obtenidos en todos los pocillos.

Los valores de muerte se calculan como:

$$\% \text{ muerte celular} = \frac{\text{valor LDH} - BK}{FK - BK} \times 100$$

BK, muerte basal del cultivo en un pocillo sin tratamiento

FK, muerte total generada con Tritón X-100 durante 1 hora

3.4. Procedimiento de Inmunohistoquímica

Con el propósito de confirmar la presencia de las neuronas dopaminérgicas en los cultivos, así como su integridad, algunos de los cultivos fueron examinados por inmunofluorescencia utilizando los marcadores tiroxina-hidroxilasa (TH, enzima limitante de la síntesis de dopamina) para detectar los terminales dopaminérgicos y V-GAT (transportador vesicular de GABA localizado en las membranas de las vesículas sinápticas), para localizar terminales GABAérgicos.

Las células colocadas en porta objetos sobre una superficie de poli-D-lisina, colágeno y ácido acético (1:1:3), se fijaron con una solución fría de paraformaldehído al 4% en PB (pH7.4), durante 10 minutos. Tras lo cual fueron lavadas con PBS (Phosphate Buffered Saline) e incubados en una solución de 0.1% Triton X-100 en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasados los 20 minutos a los cultivos se les aplicaba una solución bloqueante que contenía 5% FBS y 1% Triton X-100 en 0.1mM PBS (pH7.4) durante 45 minutos. Después se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-TH (rabbit monoclonal anti-TH, Sigma-Aldrich) a una concentración de 1:1000 y anticuerpo anti-V-GAT (mouse monoclonal anti-V-GAT, Synaptic System, Germany) a la concentración de 1:1000. Tras tres lavados con 0.1% Triton X-100 en PBS, los cultivos se incubaron con los anticuerpos secundarios

conjugados con FITC y rodamina respectivamente en solución bloqueante durante cuatro horas a temperatura ambiente. Después se expuso los cultivos en una solución con DAPI (Molecular Probes, Invitrogen Corp.) a la concentración de 1:1000 en PBS, para marcar los núcleos. Por último fueron cubiertas usando kit de montaje, Slowfade antifade (Molecular Probes, invitrogen Corp.). Los controles en este caso, recibirán el mismo tratamiento de inmunofluorescencia, a excepción de los anticuerpos primarios

Tarea Experimental III

Estudio de la capacidad psicotogénica del agonista cannabinoide Δ^9 -THC.

1. Objetivos.

Los experimentos realizados en ratones buscaron los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la capacidad psicotogénica del Δ^9 -THC en ratones tras exposiciones agudas y crónicas de la droga, considerando el dimorfismo sexual.
- Evaluar la capacidad psicotogénica del Δ^9 -THC en tratamientos crónicos durante la adolescencia y/o la adultez, considerando el dimorfismo sexual.
- Valorar los efectos del tratamiento crónico de Δ^9 -THC en condiciones de psicosis inducida por aislamiento maternal, considerando el dimorfismo sexual.
- Discernir la implicación del receptor cannabinoide CB1 en la capacidad posible capacidad psicotogénica del Δ^9 -THC.
- Testear los posibles cambios inducidos tras el tratamiento agudo de Δ^9 -THC en las enzimas implicadas en el metabolismo de los cannabinoides y sobre el receptor cannabinoide CB1.

2. Animales de Experimentación.

Para los experimentos se usaron ratones machos y hembras Swiss provenientes del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. También se usaron ratones machos carentes del receptor

cannabinoide CB1 (ratones KO CB1), así como su correspondiente genotipo silvestre (ratones WT CB1), cedidos por la Dra. Olga Valverde (Universidad Pompeu de Fabra, Barcelona).

Todos los animales fueron tratados en todo momento de acuerdo a las normas de uso y cuidado de los animales de laboratorio de la Universidad de Sevilla. La temperatura y humedad se mantuvieron constantes ($22\pm 1^\circ\text{C}$ y 30-60% respectivamente) en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. El agua y la comida estuvieron disponibles *ad libitum*.

3. Protocolo de experimentación.

Para esta tarea experimental los ratones fueron divididos en diferentes grupos y recibieron diversos tratamientos. Una vez terminado los animales fueron evaluados con el test ya mencionado en la introducción, test de inhibición por prepulso o PPI (Pulse Prepulse Inhibition). Después del test de comportamiento los animales eran rápidamente sacrificados y sus cerebros almacenados para un posterior estudio molecular, donde se estudió los cambios transcripcionales de proteínas involucradas en el sistema endocannabinoide.

3.1. Tratamientos

Se hicieron varios grupos usando los distintos tipos de tratamiento. En algunos casos los animales recibían un solo tipo de tratamiento pero muchos de ellos recibían tratamientos combinados. Los diferentes tipos de tratamiento usados en esta tarea experimental fueron los siguientes.

3.1.1. Tratamientos simples

a) Tratamiento agudo.

Los ratones adultos (70-75 días de vida) fueron inyectados a dosis diferentes de Δ^9 -THC (0 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg) diluido en 10 % de etano y agua destilada, e introducidos en la cámara de

sobresalto para la realización del test de PPI 40 min después de la administración de la droga.

En este caso, los grupos fueron de 7 ratones Swiss machos por dosis y el grupo control correspondía al grupo que recibía la inyección con vehículo, alcohol.

b) Tratamiento agudo sobre ratones carente del receptor cannabinoide CB1.

Para entender las implicaciones del sistema cannabinoide en la alteración del normal filtrado sensorial de los ratones al someterlos a inyecciones de THC. Se estudiaron ratones WT frente a ratones KO del gen CB1. Para ello se sometieron a ambos grupos de animales, KO CB1 y WT CB1, al test de inhibición por prepulso sin ningún tipo de tratamiento. Y por otro lado un grupo de animales de ambos genotipos con la dosis que habíamos acordado como más efectiva en tratamiento agudo, 5mg/kg diluido en 10 % de etano y agua destilada, y un grupo control por genotipo, que recibieron únicamente el vehículo, alcohol. Estos animales eran inyectados intraperitonealmente e introducidos en la cámara de sobresalto 40 minutos después de esta inyección.

En este caso se utilizó un total de 5 ratones machos por grupo. Los grupos control eran en este caso el grupo de 0mg/kg de THC, es decir, alcohol. Así como de manera paralela de los grupos de distinto genotipo que recibían idéntico, los grupos WT eran el control del experimento.

c) Tratamiento crónico

Los ratones Swiss adultos (70 días de vida) fueron inyectados con diferentes dosis de Δ^9 -THC (0, 5, 10,15, 25mg/kg) diluido en 10 % de etano y agua destilada, intraperitonealmente, durante 5 días consecutivos, el día octavo eras inyectados nuevamente e introducidos

en la cámara de sobresalto para la realización del test de PPI, 40 min después de esta última administración de la droga

En este caso los grupos realizados fueron de 7 animales por tratamiento.

3.1.2. Tratamientos combinados:

a) Grupos de animales control

En este caso, un grupo de 9 ratones Swiss hembras y 9 machos, fueron metidos en la cámara de sobresalto, sin ningún tipo de tratamiento, a la edad de 78 días. Estos animales son el control principal para el resto de los grupos

b) Privación maternal

Como ya está reflejado en la introducción de este trabajo de tesis se usó un protocolo alternativo de inducción de psicosis, llamado de aislamiento materno o privación maternal. Para ello los animales eran separados de las madres en el día 9 de vida durante 24 horas, colocándolos en una jaula, llamada de aislamiento, donde se les alojaba solos y distantes de la jaula de la madre. El aislamiento se realizaba el día 9 ya que como ya se ha explicado ese día pertenece a una ventana temporal llamada " periodo de hiporespuesta al estrés", en el que existe una disminución de ACTH y respuesta a corticosterona, a diferentes estresores (Rosenfeld y cols., 1991). Y la aplicación de un estrés severo, como es en este caso la separación de la madre y por ende de la fuente de comida y calor (Levine, 1994), provoca un incremento de los niveles de corticosterona que persisten en el tiempo e incluso se prolonga hasta las edades adultas (Rots., y cols., 1996) que puede genera otras anormalidades en el animal adulto, como es la génesis de psicosis medible por test de inhibición por prepulso (Ellenbroek y cols., 1998)

Estos ratones se someten al test de PPI al alcanzar la adultez (78 días de vida). El número de animales en este caso eran de 8 ratones machos y 15 ratones hembras.

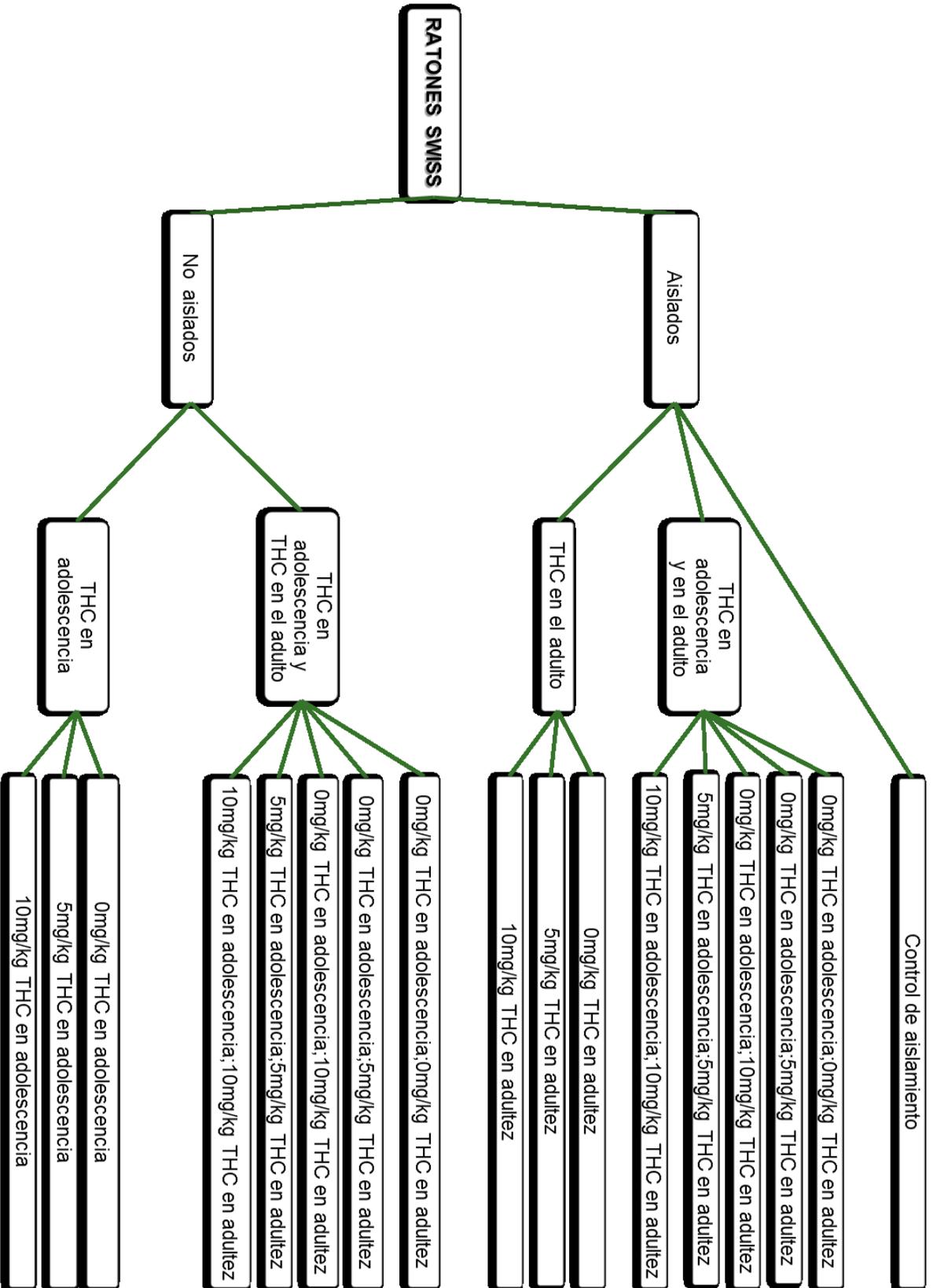
c) Tratamiento subcrónico en adolescencia

Durante la adolescencia se les suministro diferentes dosis de Δ^9 -THC (0, 5, 10 mg/kg) durante 4 días consecutivos, empezando en el día 28 de vida de los animales, día en el que comienzan en los ratones los cambios asociados a la maduración de los órganos sexuales y por tanto etapa de adolescencia temprana (Ellgren y cols., 2004). Y al alcanzar la adultez, el día 78 de vida del animal se realizó el test de PPI. El número de animales por grupo, en este caso, eran de un mínimo de 9 y un máximo de 16 animal por grupo y sexo.

d) Tratamiento crónico en adultez

Cuando los animales alcanzaban la edad adulta, comenzando el día 70 de vida, se les suministraba diferentes dosis de Δ^9 -THC (0, 5, 10mg/kg), durante 5 días consecutivos, y el octavo día. Coincidiendo con el último día de administración de la droga, día 78, se realizó el test de PPI a los 40 min de la inyección. El número de animales por grupo, en este caso, eran de un mínimo de 9 y un máximo de 16 animales por grupo y sexo.

Así pues además de los grupos con tratamientos simples (tratamiento agudo en Swiss y KO CB1, y tratamiento crónico), con los tratamientos de aislamiento materno, tratamiento subcrónico en la adolescencia y tratamiento crónico en la adultez se hicieron grupos combinando estos tres tratamientos. Como resultado, se hicieron un total de 17 grupos por sexo, 18 si contamos los grupos control y 19 si contamos con un grupo que se hizo de tratamiento agudo de 5mg/kg de Δ^9 -THC de 9 ratones hembras y 9 machos. Estos grupos están explicados gráficamente a continuación:



3.2. Test de inhibición por prepulso o PPI

Como se explicó en la introducción de este trabajo de tesis, el estudio de la esquizofrenia en modelos animales es una tarea complicada, debido al importante componente de alteración del pensamiento en el ser humano. Pero este test de comportamiento, pone de manifiesto un signo psicótico típico en enfermos esquizofrénicos que puede ser abordado a nivel experimental fácilmente. La PPI es un fenómeno donde la respuesta de sobresalto ante un estímulo brusco e inesperado se atenúa si el estímulo se precede de otro de menor intensidad (Graham, 1975; Braff y cols., 2001). Representa pues una respuesta de filtrado sensorial normal que se sabe alterada en enfermos esquizofrénicos, es decir, los pacientes con esquizofrenia no presentan atenuación de la respuesta por prepulso.

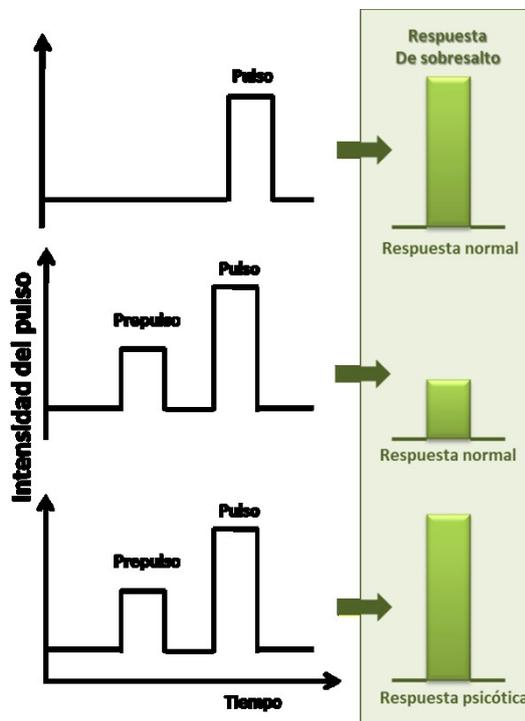


Figura 23. Representación esquemática de la función de la inhibición por prepulso o PPI. La presentación de un pre-estímulo de menor intensidad, es capaz de disminuir la amplitud de la respuesta a estímulos de gran intensidad en condiciones de normalidad si ambos estímulos son presentados lo suficientemente cercanos en el tiempo, mientras ante esquizofrenia esta función estaría defectuosa, y la respuesta sería igualmente amplia.

El enclave donde se realizan los diferentes ensayos consiste en una caja no restrictiva de Plexiglas de dimensiones 28.5 x 15 x 3.5 cm situada en el interior de una cámara de sobresalto por ruido. La caja restringe el movimiento horizontal del animal tan solo en una plataforma de 15 x 3.5 cm que está acoplada a un acelerómetro piezoeléctrico que detecta y traduce la señal de movimiento del animal en el interior del enclave al ordenador. Resaltar que el animal tiene restringido los movimientos verticales por un techo de manera que tiene, en todo momento, apoyadas las cuatro patas. El altavoz de alta frecuencia que produce los estímulos sonoros, está situado 15 cm por encima del enclave. Los niveles de sonido para todos los estímulos y para el ruido de fondo fueron debidamente calibrados con un sonómetro. Del mismo modo que se calibran habitualmente la sensibilidad del piezo eléctrico. Tosa los test se realizaron con la luz encendida y con un ruido de fondo de 65db.

La respuesta inicial o "Startle", que se corresponde con la excitabilidad o reactividad inicial del animal, se mide en milinewtons (mN) al comienzo del test.

El test completo consistía en una sesión de 20 minutos. Los primeros 5 minutos de habituación al enclave. Durante este tiempo el único sonido que podían escuchar los animales era el ruido de fondo de 65db. Pasados estos 5 minutos, se les presentaba a cada sujeto una serie de ensayos diferentes hasta un total de 51. Los diferentes ensayos y el total de veces que aparecen aleatoriamente durante cada sesión son los siguientes:

- 18 ensayos tipo pulso, solo con estímulos de 120 db de 30 ms de duración
- 5 ensayos de prepulso, solo con estímulos de 78db (13 db por encima del ruido de fondo)
- 5 ensayos de prepulso, solo con estímulos de 91 db (26 db por encima del ruido de fondo)

- 8 ensayos tipo pulso-prespulso en los que el pulso era precedido 100 ms antes por un preestímulo de 78 db de 20 ms de duración
- 8 ensayos de pulso-preparepulso con preestímulos de 91 db de 20 ms de duración que preceden 100 ms al pulso.
- 7 ensayos sin estímulo, en los que se toma medida por el piezo eléctrico, sin dar ningún estímulo sonoro adicional al ruido de fondo.

Los tres primeros ensayos eran de tipo pulso separados entre si 100ms en todas las sesiones y sirvieron para calcular la respuesta inicial de sobresalto, reactividad, o respues "startle". La amplitud startle es la resultante del cálculo de la media de estos tres primeros ensayos y sirve como índice de posible efecto sedativo o por el contrario de hiperactividad que puede producir algunas dosis de Δ^9 -THC y que pueden producir un error en los resultados.

El % PPI se calcula como:

$$\%PPI = \frac{\text{Amplitud de sobresalto al prepulso} - \text{pulso}}{\text{Amplitud de sobresalto al Pulso}} \times 100$$

3.3. Sacrificio y procesamiento de los cerebros.

Una vez terminado el test los animales fueron sacrificados inmediatamente por dislocación cervical y decapitación con guillotina. Los cerebros se extrajeron rápidamente, se congelaron mediante inversión en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su posterior utilización.

3.4. Protocolo de estudio molecular de cambios provocados por THC en el metabolismo de los endocannabinoides.

Además de estudiar la posible capacidad psicotogénica del Δ^9 -THC, era interesante estudiar qué cambios se habían producido a nivel molecular en el cerebro de los ratones de los diferentes grupos de investigación. Hasta la fecha solo se ha estudiado los grupos de animales que recibieron dosis agudas de Δ^9 -THC. En estos ratones se estudió por RT-Q-PCR (Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction), el receptor cannabinoide CB1, la enzima de síntesis de AEA, NAPE-PLD, y la enzima de degradación de AEA, FAAH. Estas proteínas se midieron en la corteza prefrontal y en el estriado.

Los cerebros de los ratones fueron diseccionados en frío, después de extraerlos del congelador donde estaban almacenados a -80°C . De ellos se extrajo con rapidez a tubos eppendorfs estériles, la corteza prefrontal por un lado y el estriado por otro. Para poder realizar esta prueba y por ser necesario un peso mínimo se mezcló las cortezas y los estriados de 2-3 animales por ensayo. Conservando siempre, las muestras en frío se procedió con el protocolo de RT-Q-PCR, el cual consta de cuatro fases: Extracción de RNA, Purificación, síntesis de cDNA.y finalmente PCR cuantitativa.

a) Extracción: El RNA de ambos tejidos se extrajo por medio del método de extracción fenólica con Trizol (Invitrogen Life Technologies) de Chomezynsky (Chomezynsky y Sacchi, 1987).

1. Añadir 300 μl de Trizol a una muestra de 50-100 mg de tejido), mientras permanece en hielo, y homogeneizar hasta que el tejido quede completamente uniforme.
2. Añadir 700 μl de Trizol a las muestras, cerrar el eppendorf y voltearlo manualmente dos veces. Dejarlo actuar 5 minutos.
3. Añadir 200 μl de cloroformo por ml de Trizol y agitar vigorosamente las muestras a mano durante 15 segundos. Dejar 2-3 minutos.

4. Centrifugar 15 minutos a 10000rpm, a 4°C.
5. Transferir la fase incolora de arriba a un tubo nuevo, previamente marcado. Precipitar el RNA con 500 μ l de isopropanol por ml de Trizol. Vortear manualmente el tubo una vez para mezclar. Dejarlo 10 minutos.
6. Centrifugar 10 minutos a 10000rpm, a 4°C
7. Descartar, con cuidado, el sobrenadante con una pipeta. Lavar el precipitado añadiendo 500 μ l de etanol 75% por 1 ml de Trizol y vortear hasta despegar el pellet. Centrifugar 5 minutos a 7500rpm, a 4°C. Repetir el lavado o hacer un solo lavado con 1 ml de etanol 75% por ml de Trizol.
8. Secar el precipitado al aire durante 5-10 minutos. Disolver en 50-100 μ l de agua libre de RNasas pipeteando e incubar 10 minutos a 55-60 °C.
9. Después se realiza la cuantificación de cada una de las muestras para saber la cantidad de ARN totales que tenemos en cada una. Para ello se preparó una dilución 1:50 por muestra y se midió la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro (nanodrop). Con las absorbancias de las muestras calculábamos su concentración en μ g/ μ l por la fórmula:

$$\text{Concentración de RNA} = \frac{(\text{absorbancia a } 260\text{nm}) \times \text{Dilución} \times 40}{1000}$$

10. Para comprobar la integridad del RNA, se sometía una porción de cada muestra (0.5 μ g de RNA por carril y muestra) a electroforesis horizontal en gel de Agarosa al 1% (100ml) en buffer TBE(Tris-borato 90mM, pH8.3 y EDTA 2.0mM) con 10 μ l de bromuro de etidio y cargando 0.5 μ g de RNA por carril.

b) Purificación:

1. Tomar el volumen de RNA que contiene 100 μ g, o todo si hay menos de 100 μ g, y llevar a 100 μ l con H₂O libre de RNasas.
2. Añadir 350 μ l de tampón RLT (con β -mercapto etanol) a los 100 μ l de muestra de RNA. Mezclar bien
3. Añadir 250 μ l de etanol 100%. Mezclar bien con la pipeta y transferir la muestra (700 μ l) a una columna de RNeasy
4. Centrifugar durante 15 segundos a 8000xg (11000 rpm en una centrífuga de mesa) y descartar el filtrado y el tubo de recolección
 - 4.1. Para el tratamiento con DNase I, pipetear 350 μ l del buffer RW1 en la columna y centrifugar 15 s. a 8000xg (11000 rpm en una centrífuga de mesa) para lavar. Descartar el filtrado y reutilizar el tubo de recolección
 - 4.2. Añadir 10 μ l de la solución stock de DNase I a 70 μ l de buffer RDD (por muestra). Mezclar suavemente por inversión
 - 4.3. Pipetear la mezcla de incubación de DNase I (80 μ l) directamente en la membrana de silica-gel de la columna e incubar durante 15 min. a 20-30°C. Nota: Asegurarse de depositar la mezcla de incubación con DNase I directamente sobre la membrana de silica-gel, de lo contrario la digestión será incompleta
 - 4.4. Pipetear 350 μ l de buffer RW1 en las columnas y centrifugar durante 15 s. a 8000xg (11000 rpm en una centrífuga de mesa). Descartar el filtrado y el tubo de recolección y continuar con el primer paso de lavado con buffer RPE
5. Descartar el filtrado y el tubo de recolección. Añadir 500 μ l de tampón RPE (con etanol)
6. Centrifugar durante 15 segundos a 8000xg (11000 rpm). Descartar el filtrado
7. Añadir 500 μ l de tampón RPE (con etanol)
8. Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad

9. Descartar el filtrado y el tubo. Tomar otro tubo de recolección nuevo y centrifugar de nuevo a máxima velocidad, durante 1 minuto (paso importante)

10. Transferir la columna a un tubo eppendorf libre de RNAsas (del Mini Kit). Añadir 30-50 μ l de agua libre de RNAsas. Dejar reposar la columna durante 1-3 minutos.

11. Centrifugar durante 1 minuto a 8000xg (11000 rpm en una centrífuga de mesa). Volver a cargar el eluido en la columna con la membrana y repetir la centrifugación.

c) Síntesis de DNAc (RT).

El DNAc se sintetizó a partir de ARN total obtenido de las muestras, por medio de transcripción reversa, utilizando hexámeros. Las moléculas de RNAm funcionan como molde y los hexámeros al azar actúan como primers. Además, se requiere la presencia de dNTP's que funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa, de lo que resulta una hebra de ADN complementario que posteriormente se utilizará para la PCR cuantificativa.

1. Protocolar los tubos de PCR (dos por cada muestra, una llevará enzima y el otro no)
2. Añadir la cantidad de agua-DEPC, determinada previamente, que le corresponde a cada uno (54 μ l-volumen RNA que continene 4 μ g para los que llevarán enzima y 6.75 μ l-volumen RNA que contiene 0.5 μ g para los que no llevarán enzima)
3. Añadir el random primer (hexámeros) y resuspender bien (4 μ l/tubo en los que llevarán enzima y 0.5 μ l/tubo en los que no llevarán enzima)
4. Añadir el volumen de RNA determinado previamente y resuspender bien.
5. Meter los tubos en el termociclador y correr el programa (ciclo de desnaturalización 72°C durante 3minutos))
6. Mientras tanto, preparar los dos mixes en dos eppendorfs estériles. La composición por cada muestra es:

	Con enzima	Control negativo
Buffer de reacción 5x	16 μ l	2 μ l
dNTPs (10 mM)	4 μ l	5 μ l
RNasín 40U/ μ l	1 μ l	0.125 μ l
Reverse Transcriptase	20U/ μ l 1 μ l	H2O 0.125 μ l

7. Una vez terminado el programa, se añade, sin sacar los tubos del termociclador, 22 μ l del mix a cada tubo de los que llevarán enzima y 2.75 μ l del mix a cada tubo de los que no llevarán enzima, mezclando bien con el contenido. Inmediatamente se corre el programa de síntesis .

8. Una vez terminado el programa de síntesis de cDNA se guardan los tubos a -20°C hasta que se vaya a hacer la PCR cuantitativa.

Programa RT:	Programa RT2:
1. 65°C , 5 min	1. 25°C , 10 min
2. 4°C , 5 min	2. 42°C , 1 hora
3. HOLD 4°C	3. 70°C , 30 min
4. HOLD 4°C	

d) PCR cuantitativa.

Por último, una alícuota de 1 μ l de cDNA se amplificó por qPCR utilizando el kit Roche. Utilizando en cada caso los primer correspondientes para cada proteína a cuantificar (NAPE-PLD, CB1 y FAAH). Cada muestra fue analizada por duplicado, y en paralelo se realizó una curva patrón con 6 puntos. En cada qPCR se incluyó un control sin transcripción inversa para eliminar la posibilidad de amplificación de DNA genómico o de ARN. La cuantificación relativa se obtuvo mediante el cálculo del ratio entre los valores obtenidos para cada gen de interés. El gen de control (también llamado normalizador o housekeeping) en este caso fue el gen del factor de transcripción Sp1. Los resultados se expresaron como el porcentaje frente al control en cada condición y área.

Tarea Experimental IV

Estudio de posible nicho neurogénico en tercer y cuarto ventrículo, bajo condiciones de hemiparkinsonismo inducido

1. Objetivos

Los experimentos realizados en ratas buscaron siguientes objetivos específicos:

- Búsquedas de células progenitoras en el entorno del tercer y cuarto ventrículo.
- Estudiar el posible aumento de proliferación inducido por modelo de hemiparkinsonismo de 6-OHDA
- Analizar el efecto de las inyección intraventricular del agonista cannabinoide Δ^9 -THC, en modelo de hemiparkinsonismo inducido.

2. Animales de experimentación

Se usaron Ratas Wistar adultas hembras (170-259 g) y Ratas Wistar jóvenes (40-60g) provenientes del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. Los animales fueron tratados en todo momento de acuerdo a las normas de uso y cuidado de los animales de laboratorio de la universidad de Sevilla. La temperatura y humedad en el laboratorio se mantuvieron constantes ($22\pm 1^\circ\text{C}$) y (30-60%, respectivamente), con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. El agua y la comida fueron disponibles *ad libitum*.

3. Procedimiento experimental

Para esta tarea experimental, se realizaron 2 tipos de operación estereotáxica. Por un lado se realizó inyecciones intranágrica de 6-OHDA, ya explicada en la tarea experimental I, para inducir hemiparkinsonismo a los animales. Y por otro lado se realizó una cirugía estereotáxica en la que se les implantaba 2 cánulas fijas a los animales, una en la sustancia negra y otra el uno de los ventrículos laterales. A este último grupo una vez estabilizados tras la operación, se les inyectaba por la cánula intranágrica el tóxico 6-OHDA, para inducir hemiparkinsonismo, y por la cánula intraventricular, el fitocannabinoide Δ^9 -THC antes y después de la inyección con 6-OHDA. Posteriormente el grupo de ratas con hemiparkinsonismo y sus controles,; los grupos de hemiparkinsonismo, con inyección intraventricular de Δ^9 -THC; y un grupo de ratas jóvenes fueron perfundidos, y extraídos sus cerebros, para estudiar por Inmunohistoquímica el mesencéfalo de los cerebros, usando marcadores de células progenitoras.

3.1. Cirugía estereotáxica

Se hicieron dos tipos diferentes de cirugía, por un lado se hizo la inyección intranágrica de 6-OHDA. Y por otro lado se implantó doble cánula fija en el cerebro de los animales.

3.1.1. Inyección intranágrica unilateral de 6-OHDA

Como ya se explicó en la Tarea Experimental I, consiste en la inyección de 6-OHDA en la sustancia negra de modo unilateral. 30 minutos antes de la operación se les inyecta desipramina, 10mg/Kg intraperitonealmente y penicilina (100000 UI) intramuscular (IM) como profilaxis antibiótica. Pasados los 30 minutos se anestesian los animales con ketamina (50mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) IP y son colocados en el aparato estereotáxico Kopf, mediante el uso de las barras interaurales y una barra de sujeción incisiva colocada a 3,3 mm bajo la línea interauricular. A continuación, con bisturí se realiza una

incisión longitudinal limpia en la cabeza, exponiendo la carota. Se localiza el Bregma que se usa para tomar las medidas iniciales con las que se calculará la localización de la sustancia negra mediante el uso del atlas estereotáxico Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005).

Las coordenadas utilizadas para la microinyección en la sustancia negra con respecto al bregma, en milímetros, son:

Antero-Posterior (AP)	Lateral (L)	Vertical (V)
-5.4	+2.2	-8.2
-5.2		

Una vez realizados los cálculos pertinentes, se practica un orificio en el cráneo de los animales por el que se introduce la aguja de inyección que inyectará el tóxico del mismo modo como se explica en la Tarea Experimental I. Para finalizar se cerraba la abertura con puntos de sutura, se identificó a los animales para su posterior utilización y se mantuvieron estables en el estabulario.

Las ratas control o con falsa lesión (ratas "sham"), fueron sometidas al mismo procedimiento quirúrgico, siguiendo el mismo protocolo, pero la solución inyectada no contenía 6-OHDA, sino que se les inyectó solo el vehículo de la solución (salino 0,9%, ácido ascórbico 0,2%, en agua destilada).

3.1.2. Implante de doble cánula

En este caso los animales eran anestesiados con Ketamina(50mg/kg) y Xilacina(10mg/kg) con inyección intraperitoneal y colocados en el aparato estereotáxico de Kopf, mediante el uso de las barras interaurales y una barra de sujeción incisiva colocada a 3,3mm bajo la línea interaural. A continuación, se procede a la desinfección superficial de la cabeza del animal con antiséptico de uso tópico y se realizó, con bisturí, una incisión longitudinal limpia en la cabeza desde la comisura anterior de los ojos hasta el inicio de la musculatura del cuello. Una vez despegado y separado el periostio lateralmente, se expuso

la calota para proceder a la localización del brazo móvil del estereotáxico hacia el bregma. El bregma supone el punto de unión de la sutura sagital con la sutura fronto-parietal del cráneo, se usa como punto de referencia a partir del que se calcula las coordenadas estereotáxicas, correspondientes al punto elegido del ventrículo lateral, según el atlas estereotáxico para ratas Wistar de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005).

En este caso, en el brazo móvil estaba dispuesta la cánula. Dicha cánula consta de cánula guía de 22 gauge y 12mm y cánula interna obturadora de 30 gauge y 14mm. De esta forma la cánula obturadora interna sobresale 2mm, de la misma manera que sobresaldrá posteriormente la aguja por la que se le inyectará las distintas sustancias, permitiendo así una mejor difusión y éxito al experimento.

Una vez localizado el bregma, las coordenadas para implantar la cánula intraventricular fueron:

Antero-Posterior (AP)	Lateral (L)	Vertical (V)
-0,8	+1,4	-3,4

Localizado el punto de inserción se perforaba el cráneo y se realizaba un pequeño orificio sin llegar a perfora cercano al punto de inserción de la cánula. La cánula se inserta en las coordenadas correspondientes y en el orificio anexo se colocó un microtornillo bien fijado con sigma-tote, creando así un soporte para la cánula. Una vez seco el pegamento se coloca en el brazo móvil la cánula intranigrica. Esta cánula se componía de una cánula guía de 22 gauge y 14mm y cánula interna obturadora de 30 gauge y 16 mm. Y las coordenadas para la inserción de dicha cánula en la sustancia negra fueron:

Antero-Posterior (AP)	Lateral (L)	Vertical (V)
-5.4	+2.2	-8.2

Del mismo modo que anteriormente se realiza el orificio de entrada en las coordenadas calculadas y un pequeño orificio no invasivo junto al primero. El orificio se insertaba la cánula y junto a esta se colocaba el tornillo, fijado con sigma-tote. Por último, con la ayuda de cemento de dentista, se hizo un bloque con las cánulas, los tornillo y un "gorro" de plástico, que servirá de protección para evitar que el animal rompa el implante. Una vez endurecido el cemento, se suturó la incisión por delante y por detrás del implante, se identificó a los animales para su posterior utilización y se mantuvieron estables en el estabulario.

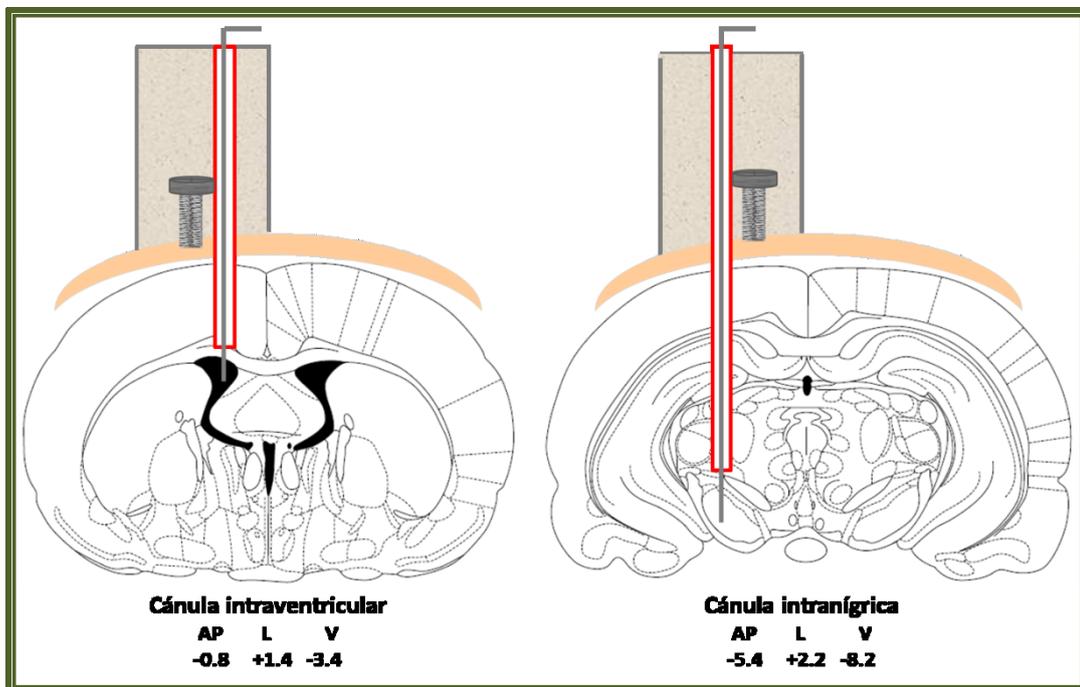
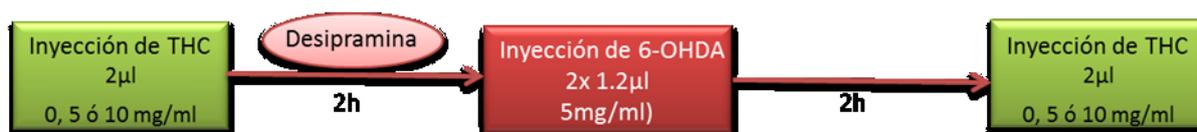


Figura 24. Esquema representativo de la colocación de la cánula en el estriado. Las coordenadas están descritas abajo (Paxinos y Watson, 2005).

3.1.3. Protocolo de inyección a través de las cánulas

4 días después de la operación a los animales se les inyecta a través de la cánula intranigral 6-OHDA o el vehículo y por la cánula intraventricular distintas dosis de Δ^9 -THC (0, 5, 10mg/ml).

Los animales recibían 2 μ l de la dosis correspondiente de Δ^9 -THC (0, 5, 10mg/ml) por la cánula colocada en el ventrículo. Tras 1h 30 minutos se les inyectaba intraperitonealmente desipramina, 10mg/Kg y a los 30 minutos se les inyectaba 6-OHDA o el vehículo en la cánula intranigral. 2 horas después de la inyección del tóxico se les inyectaba nuevamente el cannabinoide a la dosis correspondiente al grupo por la cánula ventricular.



Para ello se mantenía al animal inmovilizado manualmente, se le extraía la cánula y se le introducía una aguja de inyección de las mismas dimensiones que la obturadora (16mm para la sustancia negra, y 14mm para el ventrículo), y mediante una aguja Hamilton conectada a la aguja por un tubo de polietileno y una bomba inyectora, se le administraba el producto a velocidad constante.

3.2. Validación del estado parkinsoniano. Test de inducción de giro por amfetamina

El empleo del test de giro inducido por amfetamina, se usa para validar el grado de lesión provocado con la operación, como ya se explicó en la Tarea Experimental I.

Para la realización del test se les administró a las ratas una solución de clorhidrato de amfetamina (5mg/kg, sigma) en NaCl al 0,9% en el

intraperitonealmente (IP), 15 días tras la lesión estereotáxica o tras la inyección intracraneal por cánula fija. Entre 30 y 90 minutos después de la administración de la anfetamina se contabilizan los giros en el sentido de las agujas del reloj, es decir, rotaciones ipsilateral a la lesión y de 360°, dentro de un diámetro de 30 cm.

Un número de rotaciones superior a 420 giros/hora es indicativo de una lesión superior al 85% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. En este caso las ratas que se lesionó mediante la operación estereotáxica simple, sino presentaban un giro adecuado fueron sacrificadas y desechadas, pero las ratas con doble cánula que no giraron fueron sacrificadas con el resto por perfusión para observar si la ausencia de giro se debía a una mala colocación de la cánula o a causa inesperada.

3.3. Sacrificio de los animales por perfusión y procesamiento del tejido.

Todos los grupos de animales fueron sacrificados por perfusión. En el caso de las ratas jóvenes tras pasar 48 horas en el estabulario y en ratas operadas, 24 horas después del test de inducción de giro por anfetamina.

Para la realización de la técnica, los animales fueron anestesiados (hidrato de cloral) y perfundidos transcárdialmente. Para ello, una vez anestesiado el animal se colocó tendido boca arriba, sujetándole en el plano horizontal por las cuatro extremidades.

Se realizó un corte en la piel por encima del tórax con el bisturí, y se separó la piel que recubren el tórax y el abdomen. Sujetando con una pinza el extremo del esternón, se cortó el diafragma por su inserción en el reborde costal, con lo que se accedió a la cavidad torácica. Una vez expuesto el corazón, se inyectó en el ventrículo izquierdo una solución de heparina (50 μ molar), para impedir la formación de trombos. Con el uso de un dispositivo de canalización de vía, se pincha en el ventrículo izquierdo, para introducir a

través de éste una solución salina (PBS, pH 7,4) , después de abrir el circuito, practicando un corte en la aurícula derecha. Una vez sustituida la sangre del animal por PBS y con los tejidos blanqueados, se le inyectaba una solución tamponada de paraformaldehido (PFA) al 4% (pH 7,4, en tampón fosfato).

Cuando se observó la rigidez del animal, propia de esta técnica de fijación, se procedió al corte de la cabeza del mismo en guillotina y a la extracción del cerebro de la cavidad craneal

Los cerebros extraídos se mantuvieron sumergidos en la misma solución fijadora, PFA 4%, durante 24 h. Pasado este tiempo, los cerebros se pasaron a una solución de sacarosa al 30% en PBS, que deshidrata el tejido preparándolo así para el proceso de corte.

Una vez hundidos los cerebros en la solución e sacarosa (indicativo de la deshidratación), se procedió a su laminado en el criostato (Microm, Alemania).

Los cerebro desprovisto del cerebelo y la corteza prefrontal eran incluidos Tissue-tek® (Sakira, EE.UU.), para mantener la temperatura óptima del tejido . De los cerebros se practicaron cortes coronales de 20 μ m. Laminando por un lado las zonas correspondientes al tercer y cuarto ventrículo, y por otro lado se cortaba también la zona correspondiente a los ventrículos laterales que se usaron como control positivo, ya que es una zona ampliamente documentada de proliferación neuronal, con un nicho neurogénico amplio. Esto nos permitía además comprobar que la cánula estuvo implantada Las rodajas de 20 μ m de grosor, se conservan en PBS hasta comenzar la inmunofluorescencia 12h después.

3.4. Inmunofluorescencia.

Marcadores estudiados.

- Marcadores tempranos son el GFAP y Sox-2, para comprobar si la estirpe celular se origina en astrocitos o células tipo B (con radiaciones gliales o no), como sucede en la SVZ. El marcador GFAP o proteína fibrilar acida de glía es selectivo que marca tanto los precursores tipo

B como astrocitos en el tejido nervioso, cuya señal es por lo general baja a no ser que haya un insulto neurotóxico.

- El marcador neuronal temprano ,nestina, que indica si las células son células precursoras de neuronas o neuroblastos (señal fuerte). Estas células son las del tipo C, neuronas por lo general inmaduras, aunque también pueden ser del tipo A y B "dirigidas" a ser neuronas (señal más débil de nestina).

- También se valora la presencia de PSA-NCAM, que permite distinguir células en movimiento o migración, del tipo A. las células en movimiento expresan altos niveles de la forma polisialicada de la proteína NCAM, involucrada en fenómenos de adhesión celular.

- Finalmente, el marcador TH (tirosina-hidroxilasa) indica la presencia del fenotipo dopaminérgico. La tirosina hidroxilasa es una enzima de la ruta biosintética del neurotransmisor dopamina, así como de la adrenalina y la noradrenalina.

Para la inmunofluorescencia los cortes de 20 μm coronales se lavaron tres veces en PBS. Tras los lavados se sometieron a un pretratamiento de 30 minutos en PBS 50%, Metanol puro 50% y agua oxigenada 2%. Después otros tres lavados en Tritón X-100 al 0,1% en PBS (PBT-X). Y posteriormente, durante 60 minutos preincubación bloqueante en una solución con suero fetal descomplementado (10% FCS, Sigma) y seroalbúmina bovina (1mg/ml BSA, Sigma) en PBT-X, para bloquear los sitios inespecíficos de unión. Trascorrido este tiempo las secciones se incubaron durante 12h en anticuerpo policlonales de ratón, conejo o cabra, anti-nestina (1:100, Chemicon y Santa cruz), anti-sox-2 (1: 1000, Chemicon), anti-PSA-NCAM (1:500, Chemicon), anti-GFAP (1:100, Santa Cruz) y anti-TH (1:1000, Chemicon). Los anticuerpos se incubaron por separados o combinando dos (nestina-GFAP; nestina-sox-2; nestina-TH; PSA-NCAM-TH), e incluidos en solución bloqueante.

En el segundo día de protocolo, los cortes se lavaron en PBT-X tres veces, antes de incubar el anticuerpo secundario durante 3 horas a

temperatura ambiente y en oscuridad. Los anticuerpos secundarios usados fueron anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra conjugados con fluoresceína o Alexa 488 (FITC, 1:1000, Santa Cruz, señal verde) y rodamina o Alexa 456 (1:1000, Pierce, señal roja). Tras el tiempo de incubación los cortes se lavaron en PBS y montados con glicerol 50%, PBS 50%.

Las observación y fotografiado de los mismos se realizo en un microscopio de fluorescencia Zeiss, inmediatamente, o tras su conservación en frío y oscuridad.



RESULTADOS

Resultados: Tarea Experimental I

Efecto motor de inyecciones intraestriatales de $\Delta 9$ -THC y ligandos dopaminérgicos D3 en ratas hemiparkinsonianas.

Los animales eran sometidos a una operación estereotáxica por la que por un lado se les lesionaba la sustancia negra unilateralmente, y por otro lado se les implantaba una cánula al estriado ipsilateral. Una vez que los animales estaban recuperados de la operación, se les validaba el estado de parkinsonismo por test de comportamiento de inducción de giro por anfetamina. Y posteriormente se les estudió el cambio en dicho giro inducido por distintas sustancias. Para finalizar se corroboró que las cánulas estuvieran colocadas acertadamente, solo se han usado los animales en los que la cánula estriatal estaba perfectamente colocada.

Efectos de las inyecciones intraestriatales

Como se observa en la figura 25, solo el THC tuvo efecto sobre los giros inducidos por anfetamina. El ANOVA no indica significación por dosis, debido a que solo pocas dosis tuvieron efecto. En el caso del THC, la dosis de 5 mg/kg redujo el número de giros ($t=2,4$, $p<0.05$), indicando que el THC a dicha dosis aumenta la actividad estriatal, bien sobre la liberación de dopamina en el estriado dañado o por otro mecanismo. Dosis superiores no tienen efecto (acción bifásica de cannabinoides como THC). En el caso del PIPAT ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y el antagonista D3 GR103691 (nmol) no hay efectos motores, indicando que la manipulación directa de receptores D3 estriatales no modifica la actividad estriatal medida por los giros tras anfetamina.

Efectos del THC, PIPAT y GR103691

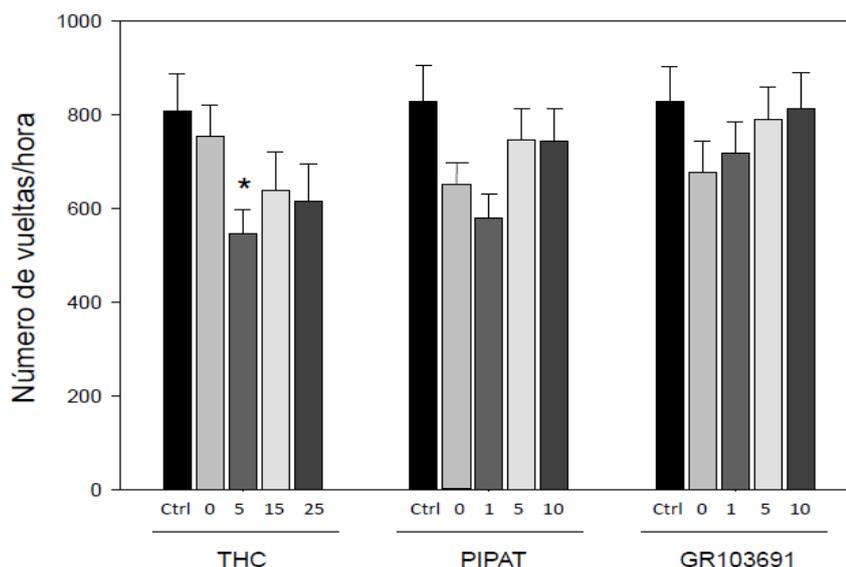


Figura 25. Test de inducción de giro por amfetamina realizado en modelo animal de lesión en sustancia negra unilateral con 6-OHDA. La figura muestra el número de giros que los animales ofrecían tras estimular el estriado ipsilateral a la lesión con varias dosis de THC, PIPAT o GR103691. * $p < 0.05$

Efectos combinados

Como se observa en la figura 26, se confirma que la dosis de 5mg/ml THC, pero no la de 15mg/ml THC, induce un decremento del giro inducido por amfetamina, respecto a vehículo THC ($t=2.6$, $p < 0.05$). Si se combina con 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ PIPAT la dosis de 5 THC, el decremento de giros es mayor ($t=2.4$, $p < 0.05$ versus 5THC) lo que sugiere que el agonismo D3 facilita la acción del THC. Este efecto es distinto al del PIPAT solo. Ello indica una interacción funcional entre los receptores de THC (CB1 principalmente) y el receptor D3, de modo semejante a la interacción descrita entre CB1 y D1 o CB1 y D3 tras rimonabant (Ramiro-Fuentes y Fernandez-Espejo, 2011). Si se administra GR103691 el efecto es contrario, aumenta el n° de giros ($t=2.5$, $p < 0.05$ versus 5THC), lo que indica que el bloqueo D3 produce un efecto opuesto al agonismo D3, confirmando la interacción CB1 y D3 a nivel del estriado.

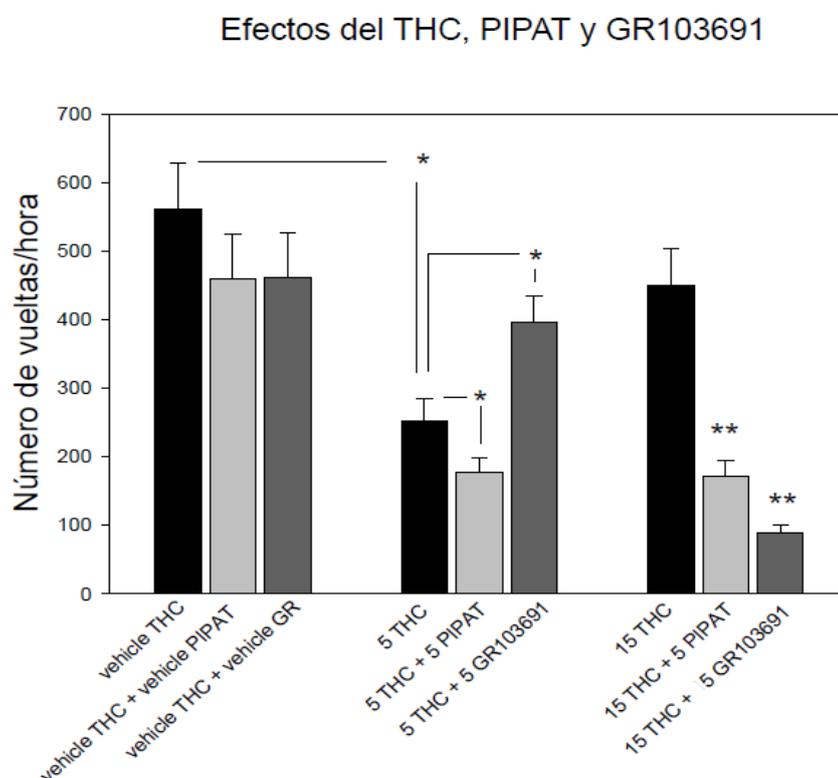


Figura 26 Test de inducción de giro por anfetamina realizado en modelo animal de lesión en sustancia negra unilateral con 6-OHDA. La figura muestra el número de giros que los animales ofrecían tras la estimulación sinérgica de THC con PIPAT o THC con GR103691. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Tras la dosis de 15 THC, que no tiene efecto por sí sola en el número de giros, se ve que tanto el $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ PIPAT combinado, como el 5nmol GR103691 combinado disminuyen el número de giros, facilitando la acción funcional y/o dopaminérgica del THC de modo significativo (5PIPAT, $t=3,8$, $p < 0.01$; 5GR103681, $t=4.4$, $p < 0.01$). Respecto al PIPAT confirma la interacción CB1/D3 pero el efecto del GR es difícil de explicar, quizás debido a un efecto bifásico a la combinación de altas dosis de THC y GR103691.

Tarea Experimental II

Efecto Bifásico del Δ^9 -THC en la supervivencia de neuronas de la sustancia negra en cultivos. Papel diferencial de los receptores CB1, PPAR- α y TRPV1.

Para esta tarea experimental se realizaron cultivos de neuronas de la sustancia negra de distintos tipos de ratón, entre los que se encontraban ratones C57Bl/6J, y ratones Knock-out de los receptores CB1, PPAR α , y TRPV1. Los cultivos fueron estudiados por fluorescencia para verificar que la población de neuronas se componía de las neuronas dopaminérgicas propias de este núcleo del cerebro. Los cultivos se expusieron al daño tóxico provocado por 6-OHDA, y se estudió la supervivencia de los mismos, mediante el método de lactato deshidrogenasa (LDH), cuando se le añadía además Δ^9 -THC, GW6471 o capsaicina.

1. Estudio de integridad y fenotipo neuronal de los cultivos.

Con el propósito de confirmar la presencia de las neuronas dopaminérgicas en los cultivos, así como su integridad, algunos de los cultivos fueron examinados por inmunofluorescencia utilizando los marcadores tiroxina-hidroxilasa (TH, enzima limitante de la síntesis de dopamina) para detectar los terminales dopaminérgicos y V-GAT (transportador vesicular de GABA localizado en las membranas de las vesículas sinápticas), para localizar terminales GABAérgicos. Los resultados a este respecto, nos confirmó la presencia de neuronas positivas para el marcador tirosina-hidroxilasa (TH), que además presentaban numerosos terminales GABAérgicos (V-GAT+), que establecían con las primeras contacto sináptico (Figura 27). Además aparecían otros tipos de neuronas no TH+ en el cultivo, en una cantidad aproximada del 30%.

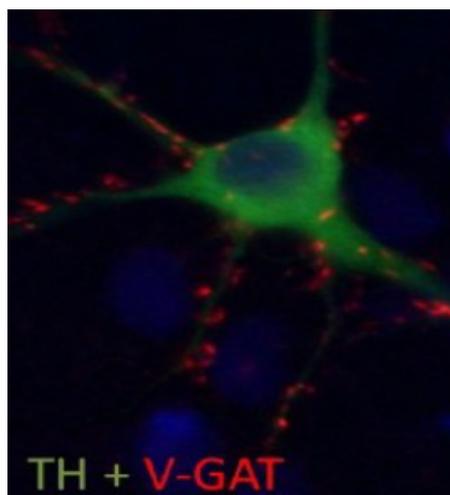


Figura 27. Análisis al microscopio de los cultivos realizados de sustancia negra. Fusión de imágenes de fluorescencia para los marcadores TH y V-GAT, donde se observa una neurona catecolaminérgica en cultivo, con conexiones sinápticas GABAérgicas. 60X.

2. Estudios de citotoxicidad en cultivos.

2.1. Efectos del Δ^9 -THC en la supervivencia de cultivos de sustancia negra de ratones C57BL/6 *per se* y/o tras tratamiento tóxico con 6-OHDA.

Los cultivos de sustancia negra de los ratones C57BL/6J se trataron, añadiendo a los mismos varias dosis de Δ^9 -THC (0, 30 y 300nM, y 1.5, 3 y 6 μ M) según grupo, y después 6-OHDA (0, 40 y 60 μ M), de la forma explicada en Materiales y Métodos. La muerte celular de los cultivos se estudió por ensayo de citotoxicidad LDH.

Los cultivos presentaban una muerte celular basal del 9 \pm 2%, y el Δ^9 -THC no modificaba el porcentaje de muerte celular observado a excepción de la dosis más altas, que tenía un efecto citotóxico sobre los cultivos. De tal forma que la dosis de 6 μ M generaba una muerte celular del 38 \pm 5%, que como se muestra en la figura 28, era significativa con un nivel de significación de $p < 0.05$ con respecto a la dosis de 0 μ M.

Pudo apreciarse también que normalmente el tratamiento con 6-OHDA provocaba un aumento de la muerte de los cultivos, mayor cuanto mayor era la dosis del toxico (Figura 28). En este caso el análisis de la ANOVA, dio también una $F_{2, 89}$ de 132 g.l. y un nivel de significación de 0,01. Y que esta muerte celular inducida por 6-OHDA era reducida significativamente con las dosis de 30 y 300nM de $\Delta 9$ -THC, con respecto a la dosis control (0nM $\Delta 9$ -THC).

Test LDH. Cultivos de ratones C57BL/6J

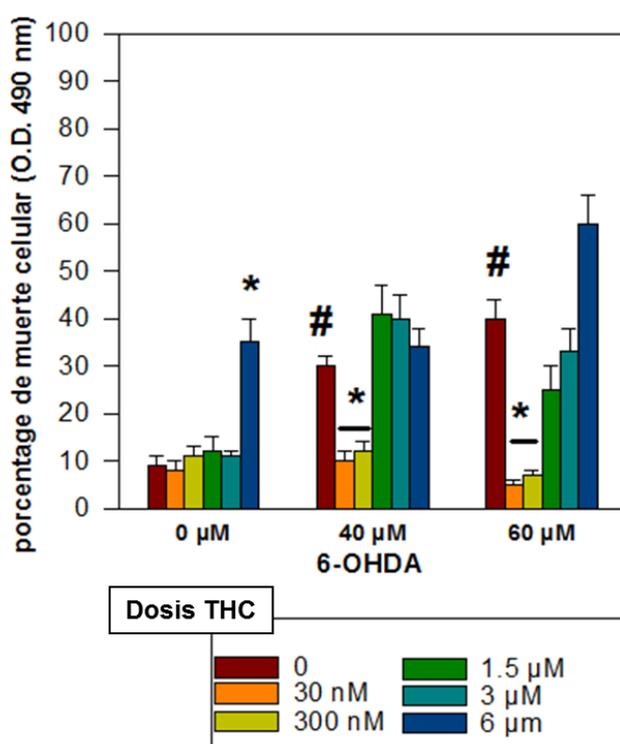


Figura 28. Test de citotoxicidad por LDH en cultivos de sustancia negra de ratones WT C57BL/6J, expuestos al agonista cannabinoide $\Delta 9$ -THC y al toxico 6-OHDA. Se muestran los porcentajes de muerte celular en los cultivos para todas las dosis que se usaron de 6-OHDA y $\Delta 9$ -THC. Media \pm EEM, * $p < 0.05$; # $p < 0.01$.

2.2. Estudio de neuroprotección inducida por Δ^9 -THC en cultivos de ratones carentes del receptor CB1, ante el daño oxidativo producido por 6-OHDA.

Los cultivos de sustancia negra de los ratones KO CB1R se trataron, añadiendo a los mismos varias dosis de Δ^9 -THC (0, 30 y 300nM, y 1.5, 3 y 6 μ M) según grupo, y después 6-OHDA (0, 40 y 60 μ M), de la forma explicada en Materiales y Métodos. La muerte celular de los cultivos se estudió por ensayo de citotoxicidad LDH.

Como se aprecia en la figura 29, los resultados para los ratones carentes del receptor CB1, presentaron una muerte celular similar a la observada en ratones C57BL/6J. Así podemos observar que la dosis de 6 μ M de Δ^9 -THC, se mostraban como citotóxica con respecto al control, con una significación de $p < 0,05$, y que la muerte celular inducida por 6-OHDA era igualmente reducida por las dosis de 30 y 300nM de Δ^9 -THC ($p < 0,05$ respecto al control).

Test LDH. Cultivos de ratones KO CB1R

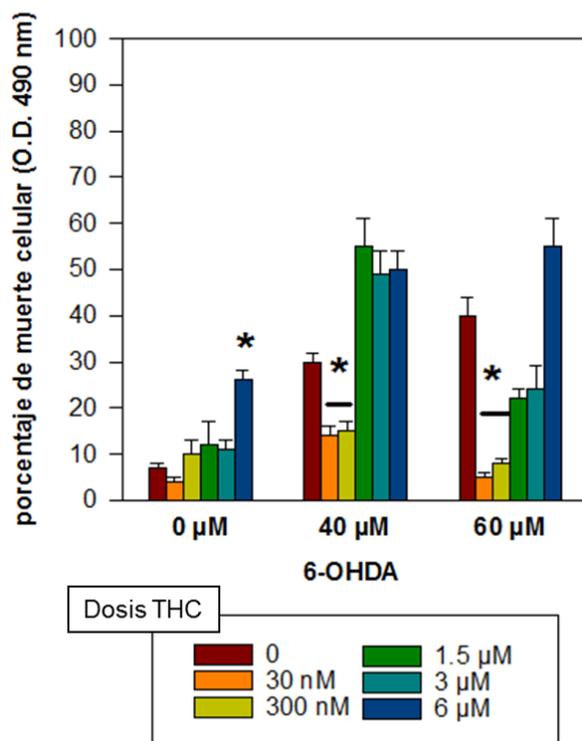


Figura 29. Test de citotoxicidad por LDH en cultivos de sustancia negra de ratones KO CB1R, expuestos al agonista cannabinoide Δ^9 -THC y al tóxico 6-OHDA. Se muestran los porcentajes de muerte celular en los cultivos para todas las dosis que se usaron de 6-OHDA y Δ^9 -THC. Media \pm EEM, * $p < 0.05$.

2.3. Estudio de neuroprotección inducida por Δ^9 -THC en cultivos de ratones carentes del receptor PPAR α o WT tratados con GW6471, ante el daño oxidativo producido por 6-OHDA THC

Se prepararon cultivos de sustancia negra de ratones carentes del receptor PPAR α que se trataron, añadiendo a los mismos varias dosis de Δ^9 -THC (0, 30 y 300nM, y 1.5, 3 y 6 μ M) según grupo, y después 6-OHDA (0, 40 y 60 μ M). Y cultivos de ratones C57BL/6J, que además del tratamiento anterior recibieron GW6471 (1 μ M), antagonista PPAR α , justo antes del Δ^9 -THC, de la

forma explicada Materiales y Métodos. La muerte celular de los cultivos se estudió por ensayo de citotoxicidad LDH.

Como se muestra en las figuras 30A, y 31A, la muerte celular basal y/o inducida por 6-OHDA no fue afectada por el tratamiento con GW6471, ya que como se observa en la figura había un aumento de muerte por efecto de dosis de 6-OHDA ($F_{2,32}=55$; $p<0.01$). Como tampoco se vio afectada en los cultivos de ratones KO PPAR α , donde también ocurría un aumento del porcentaje de muerte celular en los cultivos con el tóxico ($F_{2,29}=61$; $p<0.01$).

En cuanto a los efectos citotóxicos del Δ^9 -THC, el análisis de ANOVA de dos vías, no indicó diferencias de supervivencia en los cultivos con GW64716 con respecto a la dosis de Δ^9 -THC (figura 30B). Sin embargo en los cultivos de KO PPAR α , la dosis de 6 μ M, como también se vio en cultivos de ratones WT y de ratones KO CB1R, ofrecía resultados de citotoxicidad con respecto a los cultivos control (figura 31B), con un nivel de significación de $p<0.05$.

Por otro lado la inducción de neuroprotección que habíamos observado de las dosis de 30 y 300nM de Δ^9 -THC frente a la toxicidad producida por 6-OHDA, se veía anulada en ambos tipos de cultivo (cultivos de ratones WT con GW64716 y cultivos de ratones KO PPAR α). E incluso, como puede observarse en las figuras 30B y 31B, la dosis de 300nM se presentaba como citotóxica, para los dos tipos de cultivo, con un nivel de significación de $p<0.01$.

Test LDH. Cultivos tratados con GW64716

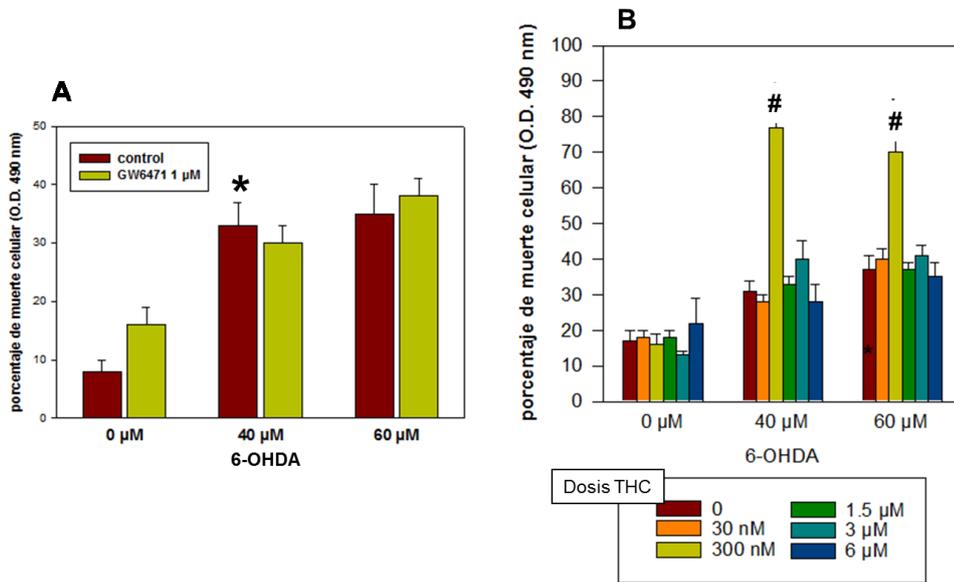


Figura 30 Test de citotoxicidad por LDH en cultivos de sustancia negra de ratones WT, con tratamiento de GW6471 1μM, antes de exponerlos al agonista cannabinoide Δ^9 -THC y al toxico 6-OHDA. A. Porcentajes de muerte celular en cultivos frente a dosis de 6-OHDA, en los que se compara el efecto de 6-OHDA en cultivos sin y con tratamiento de GW64716. B. Porcentajes de muerte celular en cultivos de ratones WT con tratamiento de GW6471, donde se muestran los resultados para todas las dosis que se usaron de 6-OHDA y Δ^9 -THC. Media \pm EEM, * $p < 0.05$; # $p < 0.01$.

Test LDH. Cultivos de ratones KO PPAR α

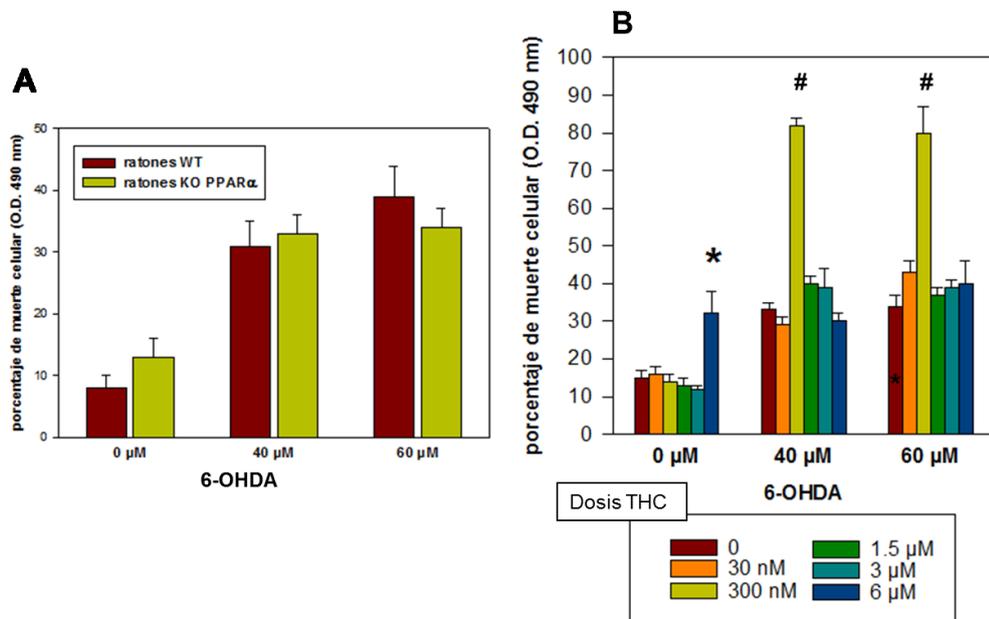


Figura 31. Test de citotoxicidad por LDH en cultivos de sustancia negra de ratones KO PPAR α expuestos a diversas dosis del agonista cannabinoide Δ^9 -THC, y del toxico 6-OHDA. A. Porcentajes de muerte celular en cultivos frente a dosis de 6-OHDA, en los que se compara, cultivos de ratones WT con ratones KO PPAR α . B. Porcentajes de muerte celular en cultivos de ratones KO PPAR α , donde se muestran los resultados para todas las dosis que se usaron de 6-OHDA y Δ^9 -THC. Media \pm EEM, * $p < 0.05$; # $p < 0.01$.

2.4. Estudio de neuroprotección inducida por Δ^9 -THC en cultivos de ratones carentes del receptor TRPV1 o WT tratados con capsaicina, ante el daño oxidativo producido por 6-OHDA THC

Se prepararon cultivos de sustancia negra de ratones carentes del receptor TRPV1 que se trataron, añadiendo a los mismos varias dosis de Δ^9 -THC (0, 30 y 300nM, y 1.5, 3 y 6 μ M) según grupo, y después 6-OHDA (0, 40 y 60 μ M). Y cultivos de ratones C57BL/6J, que además del tratamiento anterior recibieron capsaicina (10 μ M), agonista TRPV1, justo antes del Δ^9 -THC, de la forma explicada Materiales y Métodos. La muerte celular de los cultivos se estudió por ensayo de citotoxicidad LDH.

Como se observa en las figura 32A y 33A, tanto en los cultivos de ratones KO TRPV1, como en ratones WT tratados con capsaicina, la muerte basal de los cultivos y la inducida por 6-OHDA, se veía aumentada en comparación con los cultivos de ratones WT sin tratamiento adicional. En cuanto al efecto inducido por Δ^9 -THC, pudo apreciarse que la dosis de 6 μ M, ofrecía efectos citotóxicos, para los cultivos de ratones KO TRPV1, pero no para los cultivos de WT tratados con capsaicina (figuras 32B y 33B). Además las dosis que habían presentado neuroprotección ante 6-OHDA en tipos de cultivos explicados anteriormente, no mostraban ese efecto ni para cultivos de ratones KO TRPV12 ni para los cultivos de ratones WT con tratamiento de capsaicina. Además varias dosis de Δ^9 -THC (1.5, 3 y 6 μ M) aumentaban significativamente el porcentaje de muerte celular de los cultivos de ratones KO TRPV1, inducida por tratamiento de 6-OHDA 40 μ M. Los datos parecen indicar que la pérdida del receptor TRPV1 reduce la supervivencia celular *per se*, y que este receptor participa en la neuroprotección frente a 6-OHDA inducida por Δ^9 -THC.

Test LDH. Cultivos tratados con capsaicina

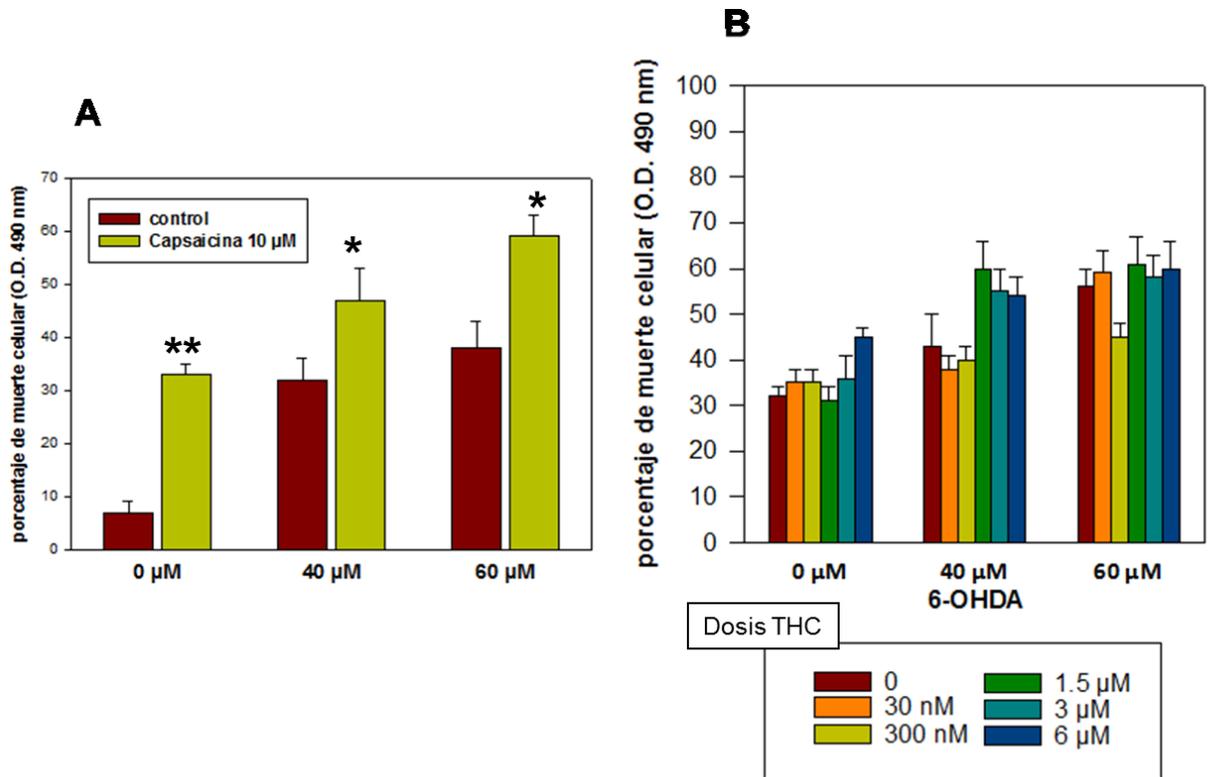


Figura 32. Test de citotoxicidad por LDH en cultivos de sustancia negra de ratones WT, con tratamiento de capsaicina 10 μ M, antes de exponerlos al agonista cannabinoide $\Delta 9$ -THC y al tóxico 6-OHDA. A. Porcentajes de muerte celular en cultivos frente a dosis de 6-OHDA, en los que se compara el efecto de 6-OHDA en cultivos sin y con tratamiento de capsaicina. B. Porcentajes de muerte celular en cultivos de ratones WT con tratamiento de capsaicina, donde se muestran los resultados para todas las dosis que se usaron de 6-OHDA y $\Delta 9$ -THC. Media \pm EEM, * $p < 0.05$

Test LDH. Cultivos de ratones KO TRPV1

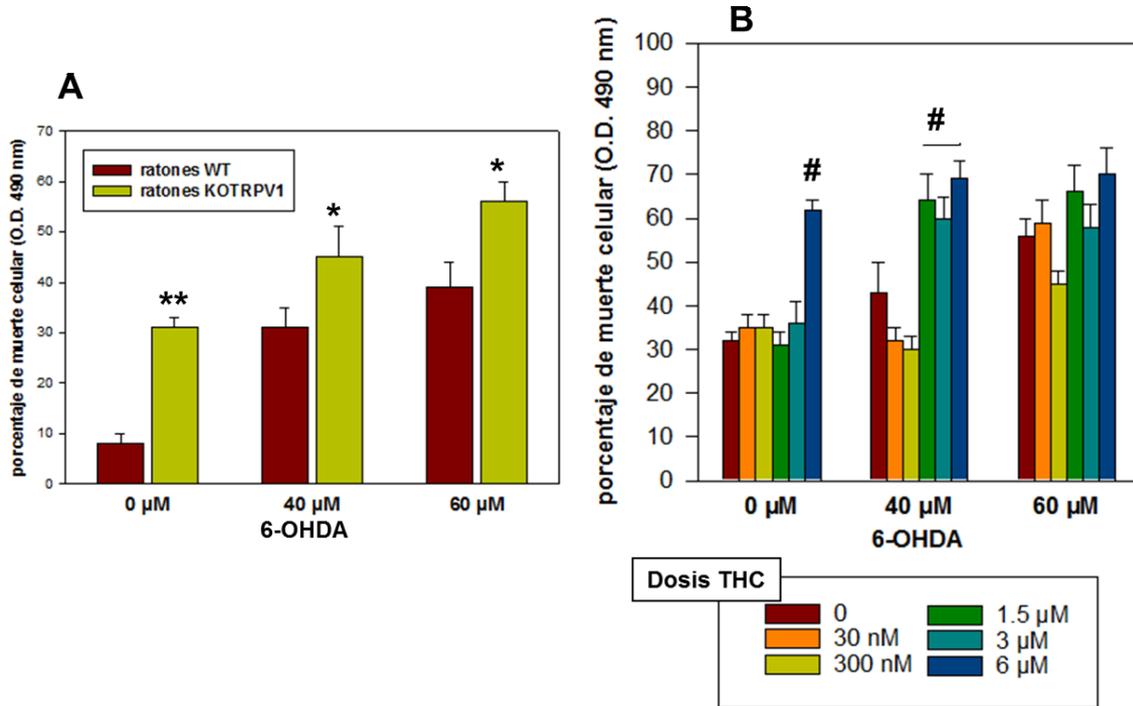


Figura 33. Test de citotoxicidad por LDH en cultivos de sustancia negra de ratones TRPV1 expuestos a diversas dosis del agonista cannabinoide Δ^9 -THC, y del toxico 6-OHDA. A. Porcentajes de muerte celular en cultivos frente a dosis de 6-OHDA, en los que se compara, cultivos de ratones WT con ratones TRPV1. B. Porcentajes de muerte celular en cultivos de ratones TRPV1, donde se muestran los resultados para todas las dosis que se usaron de 6-OHDA y Δ^9 -THC. Media \pm EEM, * $p < 0.05$; # $p < 0.01$.

Resultados: Tarea Experimental III

Estudio de la capacidad psicotogénica del agonista cannabinoide $\Delta 9$ -THC.

1. Tratamiento agudo en ratones Swiss adultos.

Como se explica en Materiales y Métodos los ratones Swiss adultos (70-75 días de vida) fueron inyectados a dosis diferentes de THC (0 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg) e introducidos en la cámara de sobresalto 40 min después de la administración de la droga. Una vez dentro de la cámara de sobresalto y después de 5 min de habituación, son estimulados con una aleatoria sucesión de estímulos acústicos durante 15 minutos.

Para este experimento se usó un total de 7 animales por grupo.

Como se puede observar en la Figura 34A, en la respuesta Startle basal del grupo correspondiente a los ratones inyectados con la dosis de 5mg/kg de THC, se produce una disminución significativa de la amplitud del sobresalto al compararla con el grupo control perteneciente a ratones Swiss sin tratamiento. Esto indica, que el THC a la dosis de 5mg/kg induce hipo-reactividad o sedación, y por tanto deberemos tenerlo en cuenta al examinar los %PPI, ya que la hiperreactividad produce errores en el test.

En la figura 34B, se observa que el THC provoca una disrupción del PPI dependiente de dosis. De tal manera que la dosis de 5mg/kg provoca una disrupción significativa del PPI, con un valor de significación de t de Student $p < 0,05$ para el prepulso de 73 db (%PPI13) con respecto al grupo control. Aunque debido al posible efecto sedativo del THC a dicha dosis (como parece indicar la disminución en la respuesta Startle), este dato no es fiable.

Las dosis de 5 y 10 mg/kg de THC provocan una disrupción significativa del PPI con un valor de t de Student de $p < 0,05$, para el prepulso de 86,6 db con

respecto al grupo control. Aunque no podamos tener en cuenta la dosis de 5mg/kg por falta de rigor, la dosis de 10mg/kg THC está exenta de efectos sedativos en la respuesta Startle. Y además podemos apreciar que para el prepulso de 86,6 db no hay disrupción del %PPI para la dosis control o alcohol, lo que confirma que el efecto observado para 10 mg/kg THC se debe a la acción del cannabinoide.

También se aprecia una disrupción significativa del PPI para el prepulso de 73db en el grupo de ratones inyectados con el vehículo, que es este caso es alcohol. Es por esta razón que el grupo inyectado con el vehículo se convierte en un grupo control importante a tener en cuenta para matizar los posibles cambios en el normal filtrado sensorial de los animales.

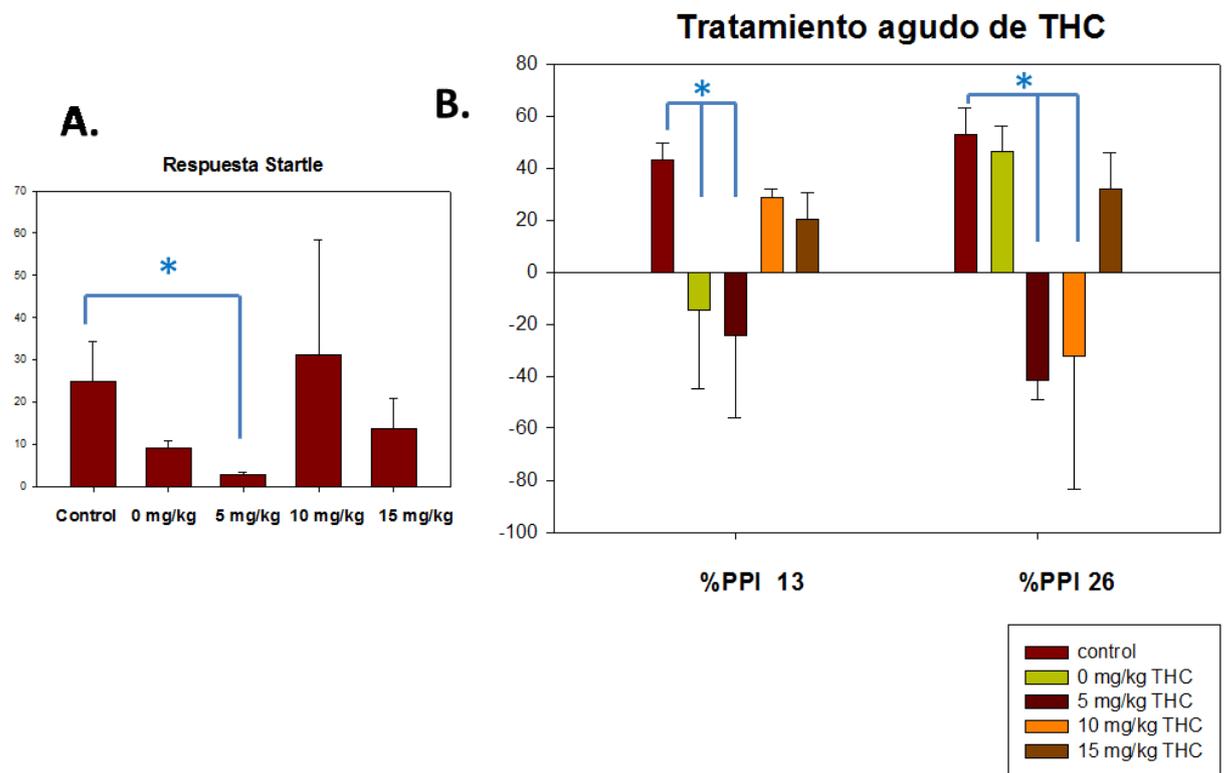


Figura 34. Efectos del THC agudo inyectado IP en ratones Swiss adultos. A. Representación gráfica de la actividad basal de los ratones o respuesta Startle. Donde se pueden observar los diferentes grupos con los que se ha trabajado. La amplitud de las barras es la intensidad del sobresalto en mN. * $p < 0,05$; B. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulsos (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). * $p < 0,05$. N=7

2. Tratamiento crónico en ratones Swiss adultos.

A los ratones adultos (70 días de vida) se les inyectó IP durante 5 días consecutivos y el octavo día diferentes dosis de THC y fueron introducidos en la cámara de sobresalto 40 min después de esta última administración de la droga, del modo que se explica en Materiales y Métodos.

Puede apreciarse en la figura 35 que excepto una evidente tendencia de sedación no significativa de todos los grupos con respecto al grupo control, hecho que se denota en la figura de la respuesta Startle, no hay ningún cambio significativo en los porcentajes de PPI para ninguna de las dosis de THC administradas. La dosis de 10 mg/Kg THC que se reveló psicoactiva en el grupo agudo, no provoca esa disrupción del %PPI en crónico, luego esto nos indica la existencia de habituación a la droga.

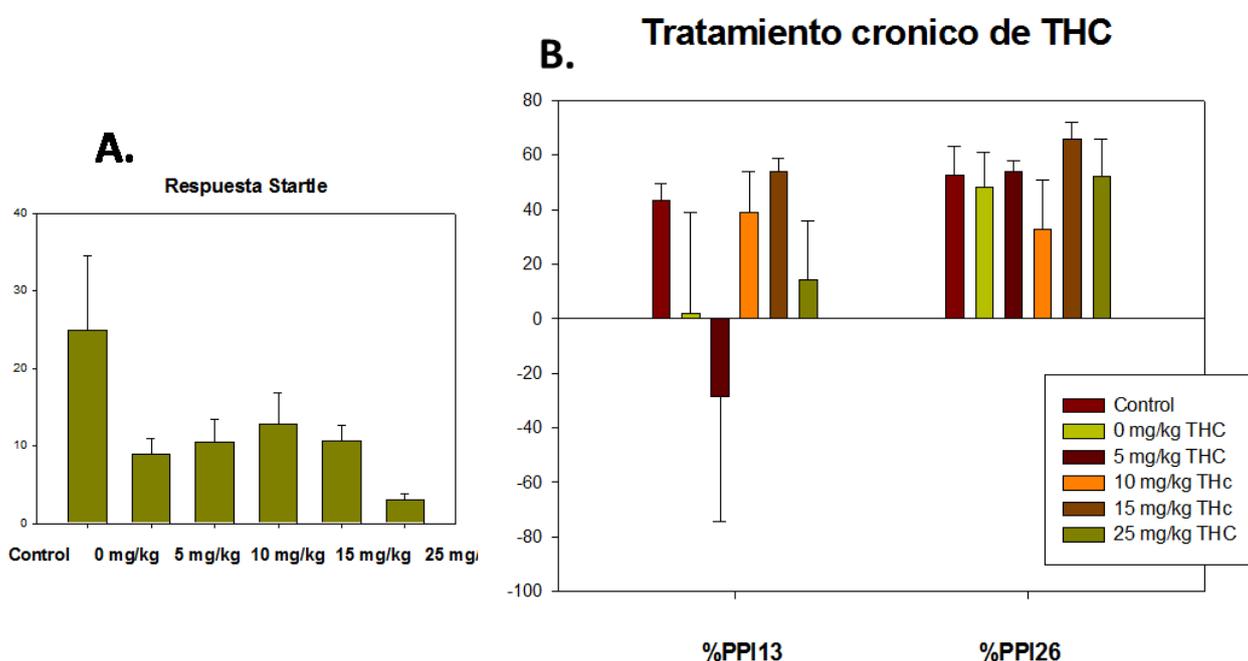


Figura 35. Efectos del THC crónico inyectado IP en ratones Swiss adultos. A. Representación gráfica de la actividad basal de los ratones o respuesta startle. Donde se pueden observar los diferentes grupos con los que se ha trabajado. La amplitud de las barras es la intensidad del sobresalto en mN; B. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26) . N=7

3. Aislamiento materno.

En el día 9 de la vida de los ratones son separados 24 horas de la madre. Estos ratones se someten al test de PPI al alcanzar la adultez (70 días de vida). En las figuras 36A y 36C puede apreciarse que no existen cambios significativos en la respuesta Startle basal para ninguno de los grupos de ratones, ni hembras ni machos ven afectadas su excitabilidad, por el aislamiento materno. Sin embargo, en la representación gráfica de las medias \pm EEM de los porcentajes de inhibición por prepulso para el prepulso de 86 db, se observa como tanto en el grupo de hembras (figura 36B) como en el grupo de machos (figura 36C), el aislamiento produce una disrupción significativa del PPI o lo que es lo mismo, un anormal filtrado sensorial de los estímulos acústicos. Esta significación tiene un valor de t de Student apareada de 2,7 y nivel de significación de $p < 0,02$, para los machos y un valor de t de Student apareada de 2,5 y nivel de significación de $p < 0,03$ en el caso de las hembras.

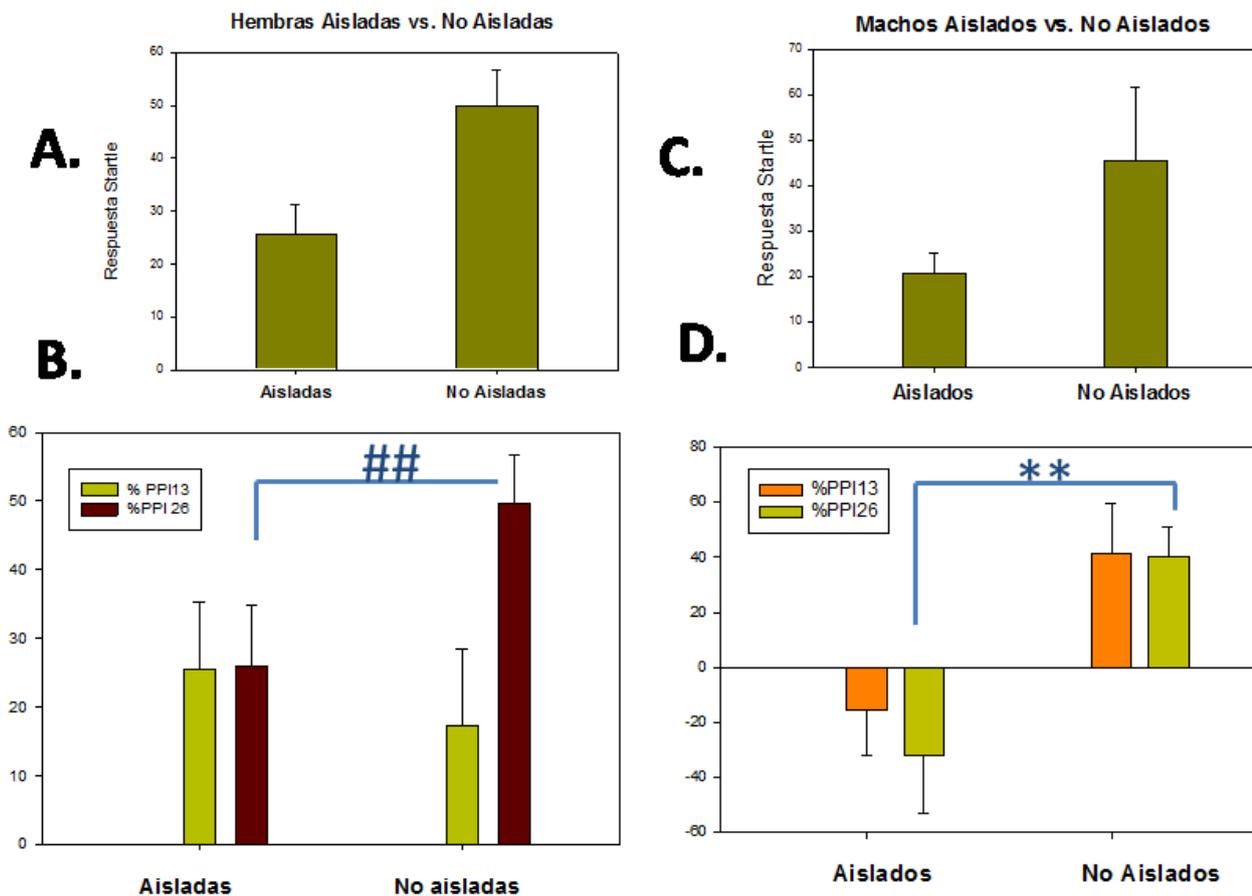


Figura 36. Efectos en ratones Swiss adultos del aislamiento materno en prenatales. A. y C. Representación gráfica de la actividad basal de los ratones o respuesta startle. Donde se pueden observar los diferentes grupos con los que se ha trabajado. La amplitud de las barras es la intensidad del sobresalto en mN; B. y D. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, ** $p < 0,02$ ## $p < 0,03$. Hembras N=15. Machos N=5

4. Tratamientos combinados de aislamiento y administración subcrónica de TH en adolescencia, y crónica en el animal adulto.

La mitad de los animales fueron separados de la madre durante 24 horas en una caja de aislamiento en el día 9 de vida. Durante la adolescencia se les suministro diferentes dosis de THC durante 4 días consecutivos, empezando en

el día 28 de vida de los animales. Y al alcanzar la adultez, comenzando el día 70 de vida del animal se les suministraba THC durante 5 días consecutivos, y el octavo día. Coincidiendo con el último día de administración de la droga, se realizó el test de PPI a los 40 min de la inyección o el día 78 de vida a aquellos animales que no tenían tratamiento en la etapa adulta.

4.1. Swiss hembras.

Hembras sin aislamiento materno

En esta primera sección, se muestran 10 de los grupos de hembras. Todos los grupos pertenecen a ratones que no se han sometido al aislamiento materno. Estos grupos son:

- ✱ Tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 0mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 5mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 10mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 5mg/kg THC en la adolescencia.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 10mg/kg THC en la adolescencia.
- ✱ Ratones control a los que no se les ha realizado ningún tipo de tratamiento.
- ✱ Ratones a los que se les ha suministrado una única dosis de 5mg/kg THC, 40 minutos antes del test de PPI.

Como se observa en la figura 37A, entre los grupos de hembras no aisladas, no existen diferencias significativas en cuanto a la reactividad (respuesta Startle) de los ratones, aunque si se aprecia una tendencia a la hiporreactividad en el grupo de ratones hembras inyectados con 5mg/kg THC

de modo agudo, como ya se observó en los estudios agudos preliminares, aunque en este caso sin significación estadística.

En cuanto al %PPI representado en la figura 37B, encontramos que para el prepulso de 73db no hay cambios destacados con respecto al grupo control.

En el caso del %PPI para el prepulso de 86db (%PPI26) se observa:

- ✓ Del mismo modo que los grupos agudos que se hicieron en los primeros estudios, existen una disrupción del %PPI en los grupos de hembras a las que se les inyectó 5 mg/kg THC de modo agudo. Esta disrupción es significativa estadísticamente, con una *t* de Student apareada de 3,99 y un nivel de significación de $p < 0,01$.
- ✓ Los tres grupos de animales a los que se les inyectó THC de modo subcrónico únicamente en la adolescencia, presentan alterado el normal filtrado sensorial. Esto es, aquellos animales que recibieron o bien alcohol o bien cualquiera de las dosis de THC usadas (5mg/kg y 10 mg/kg), presentan diferencias significativas respecto al control en el % PPI26. Estudiado mediante un análisis de la varianza, ANOVA que dio como resultado una *F* de 1,8 g.l. y un nivel de significación de $p < 0,05$. Aunque se aprecia una mayor tendencia en el grupo inyectado por 5mg/kg, la alteración en el %PPI, en estos grupos, podría deberse a la dosis de alcohol *per se*, ya que los tres grupos de inyectados en la adolescencia recibían una dosis de 0,1ml/kg de alcohol, porque este era el vehículo de la solución.
- ✓ Los grupos de animales inyectados con 0 mg/kg en adolescencia y 5mg/kg en la adultez y los inyectados con 5 mg/kg en la adolescencia y 5 mg/kg en la adultez, presentan también disrupción del %PPI26 ($F=1,8$; $p < 0,05$). Hay que destacar, que ni el grupo con alcohol en ambas etapas de la vida del animal, ni el grupo con alcohol en la adolescencia, y 10 mg/kg THC en el adulto, ni el grupo con 10 mg/kg THC en ambas etapas de la vida, presentan disrupción de su %PPI. Luego los animales no se ven afectados por el alcohol cuando se les vuelve a exponer a él en la adultez, como tampoco se ven afectados por la dosis de 10mg/kg en la adolescencia, si se les vuelve a exponer a dicha dosis en la adultez.

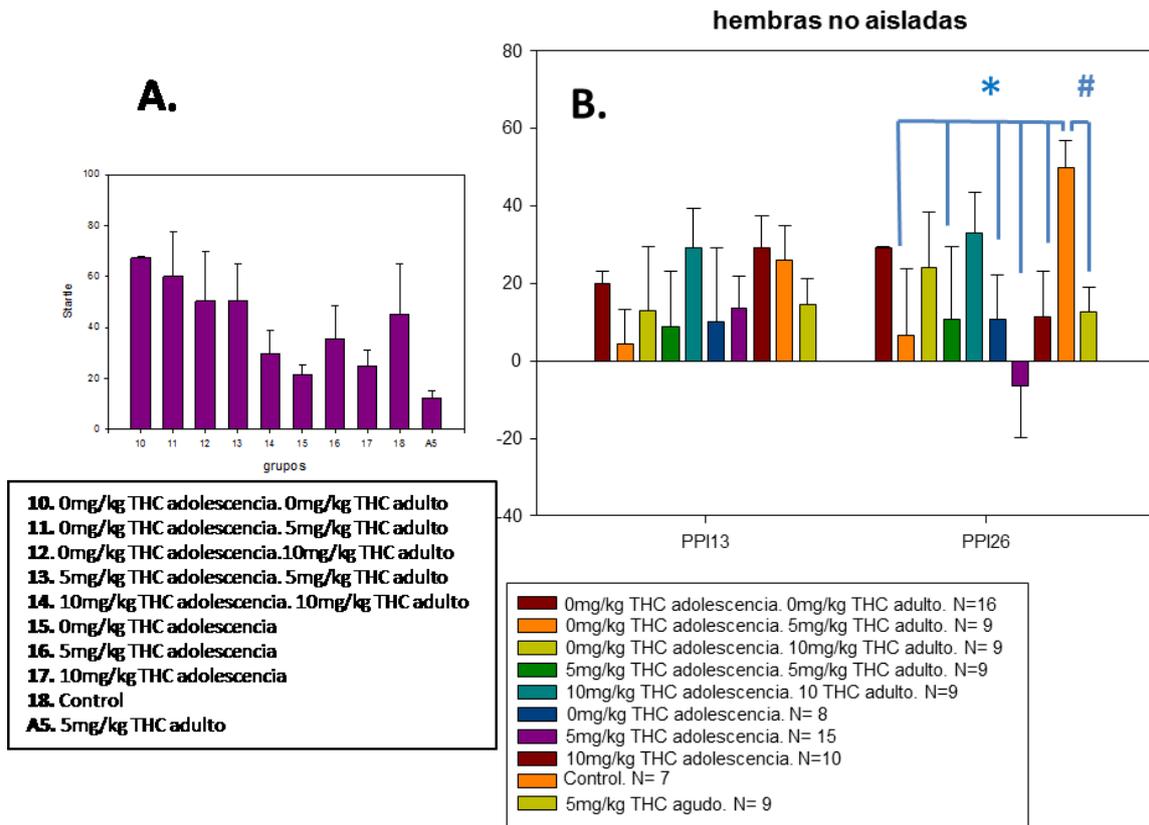


Figura 37. Efectos del THC subcrónico en adolescencia combinado con diferentes tratamientos crónicos de THC en la adultez inyectado IP en ratones hembras Swiss. A. Representación gráfica de la actividad basal de los ratones o respuesta Startle. Donde se pueden observar los diferentes grupos con los que se ha trabajado. La amplitud de las barras es la intensidad del sobresalto en mN; B. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, * $p < 0,05$. # $p < 0,01$.

Hembras con aislamiento materno

En este caso, las hembras fueron separadas de la madre durante 24 horas en una caja de aislamiento, en el día 9 de vida de los animales. Posteriormente se dividieron en 9 tipos de grupos que recibieron diferentes tratamientos. Estos grupos son:

- ✿ Animales que solo han experimentado aislamiento materno. Grupo control del efecto del efecto del aislamiento *per se*.
- ✿ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 0mg/kg THC en la adultez.

- ✱ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 5mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 10mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Aislamiento post-natal y tratamiento crónico con 0mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Aislamiento post-natal y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Aislamiento post-natal y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.

Como se observa en la figura 38A, entre los grupos de hembras no aisladas, no existen diferencias significativas en cuanto a la reactividad (respuesta Startle) de los ratones.

En cuanto al %PPI representado en la figura 38B, encontramos que para el prepulso de 73db no hay cambios destacados con respecto al grupo control. Si se observaron diferencias significativas entre el grupo control de aislamiento con los ratones que fueron aislados, y que recibieron alcohol en la adolescencia, y 10 mg/kg THC en la adultez. Así al compararla con una t de Student apareada, nos daba una significación de $p < 0,03$

Para el %PPI calculado con el prepulso de 86db (%PPI26) encontramos:

- ✓ Por un lado, como ya se ha quedado reflejado en la figura 38, grupo de animales que solo han sufrido aislamiento materno en el día 9 de vida, durante 24h, presenta disrupción del %PPI26 con una t de Student apareada de 2,5 y un nivel de significación de $p < 0,03$.
- ✓ Por otro lado encontramos que solo 2 grupos presentan alterado el normal filtrado sensorial al compararlo con el grupo control. Esto es destacable, si tenemos en cuenta que todos los grupos de esta sección fueron sometidos al aislamiento materno. Hecho que per se provoca disrupción del %PPI26. De esta manera, por ejemplo podemos mencionar que el grupo de animales aislados con tratamiento de alcohol en ambas etapas de la vida, no solo no

presentan diferencias con respecto al control, sino que parece recuperar por completo el nivel normal de inhibición sensorial. De hecho este grupo presenta también, como el grupo control, diferencias significativas, si comparamos con el grupo de animales aislados con un nivel de significación de $p < 0,05$ (datos no representados en la figura).

En el grupo que recibió también alcohol en la adultez parecen haber recuperado también un nivel de inhibición sensorial normal con respecto al grupo de control de aislamiento.

- ✓ Los grupos que mantenían anormal su %PPI26 fueron, por un lado el grupo de animales aislados y que recibieron alcohol en la adolescencia y 10mg/kg THC crónico en la adultez y por otro el grupo de animales aislados que recibieron 10 mg/kg THC crónico en la adultez. Ambos grupos con un análisis de la varianza ANOVA presentaba una F de 1,8 g.l. y un nivel de significación de $p < 0,02$.

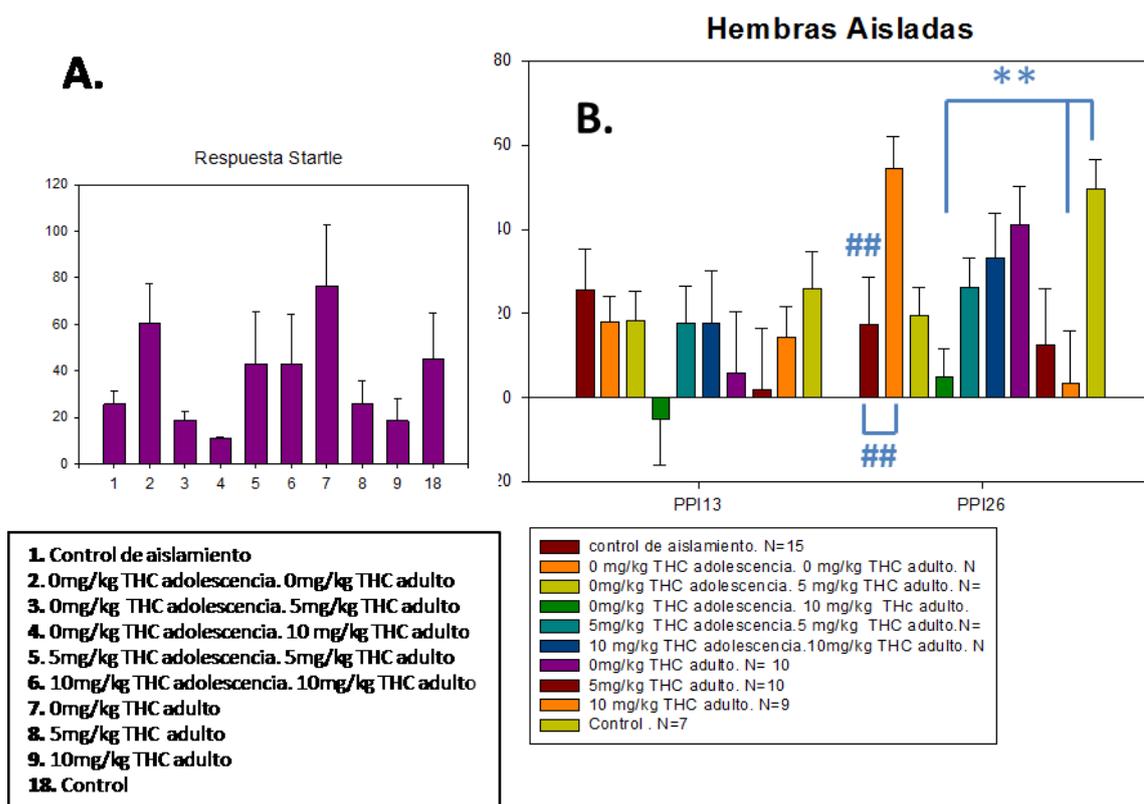


Figura 38. Efectos de la combinación del aislamiento, con los tratamientos subcrónico y crónicos de THC en adolescencia y adultez inyectado IP en ratones hembras Swiss . A. Representación gráfica de la actividad basal de los ratones o respuesta Startle. Donde se pueden observar los diferentes grupos con los que se ha trabajado. La amplitud de las barras es la intensidad del sobresalto en mN; B. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, ** $p < 0,02$. ## $p < 0,03$.

Cotejo de los grupos de hembras en su totalidad

Una vez estudiado las consecuencias de los diferentes tratamientos realizados a los animales Swiss hembras por separado, distinguiéndolos entre aisladas o no aisladas de la madre. Y teniendo en cuenta el hecho de que el aislamiento *per se* provoca una disfunción del normal filtrado sensorial. Es interesante comprobar si existían cambios entre los grupos emparentados, cuya única diferencia de tratamiento radicaba en si habían sido o no aislados en la etapa postnatal.

El estudio de t de Student apareadas dio resultados positivos a tal efecto. No observándose ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos emparentados.

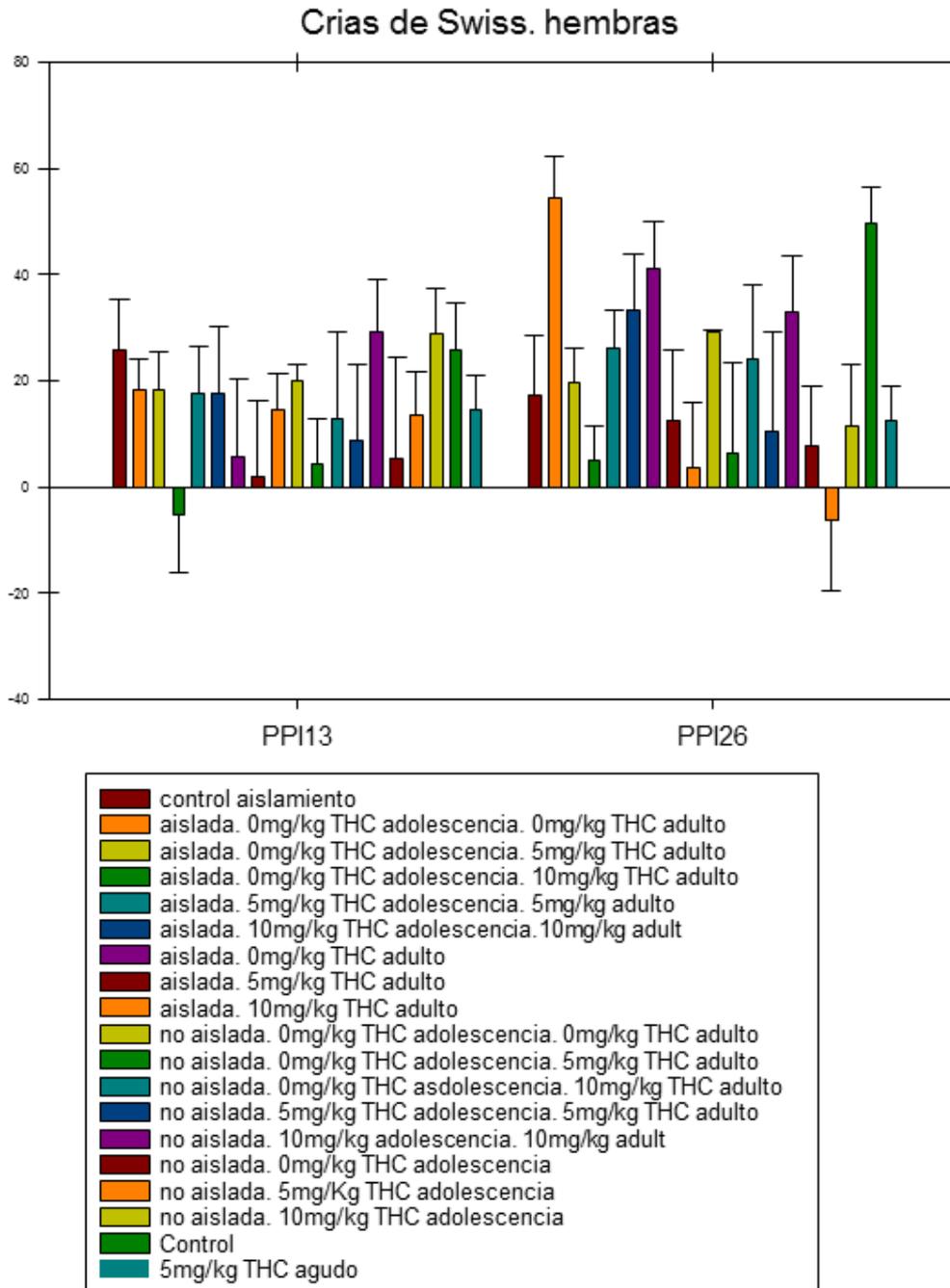


Figura 39. Cotejo de los resultados de test de PPI para todos los grupos de hembras. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, ** $p < 0,02$. ## $p < 0,03$.

4.2. Machos Swiss.

Machos sin aislamiento materno

En esta primera sección, se muestran 10 de los grupos de machos Swiss. Todos los grupos pertenecen a ratones que no se han sometido al aislamiento materno. Estos grupos son:

- ✱ Tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 0mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 5mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 10mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 5mg/kg THC en la adolescencia.
- ✱ Tratamiento subcrónico con 10mg/kg THC en la adolescencia.
- ✱ Ratones control a los que no se les ha realizado ningún tipo de tratamiento.
- ✱ Ratones a los que se les ha suministrado una única dosis de 5mg/kg THC , 40 minutos antes del test de PPI.

Como puede apreciarse en la figura 40A. en los machos Swiss sin aislamiento materno el grupo de animales que recibió alcohol tanto en la adolescencia como en la adultez presenta una marcada hiperreactividad con respecto al grupo control. El análisis de la varianza, ANOVA, dio como resultado una significación de $p < 0,01$ con $F = 3.1$ g.l.

En lo que respecta al %PPI representado en la figura 40B, observamos para el prepulso de 73 db (%PPI13) que:

- ✓ Como ya se documentó en experimentos preliminares, la dosis de 5mg/kg de THC, inyectada IP de modo agudo, provoca disrupción del porcentaje de inhibición por prepulso, con un valor de t de Student de 2 y un nivel de significación de $p < 0,05$. En este caso, eso sí, a

diferencia de lo que hemos ido documentando, para el prepulso de 73 db, y no cuando al pulso de 120 db le precede el estímulo de 86 db.

- ✓ También, como en las hembras, los animales del grupo con un tratamiento subcrónico de alcohol en la adolescencia, presentaban deteriorado el normal filtrado sensorial al compararlo con el grupo control. Con un valor de t de Student de 2.3 y una nivel de significación de $p < 0,03$. Aquí debemos resaltar que a diferencia de las hembras, los grupos que en la adolescencia recibieron cualquiera de las dosis de THC (5 ó 10mg/kg), no presentaban alteración del %PPI. E incluso el grupo con 5mg/kg THC en adolescencia presentaba una diferencia significativa con respecto al grupo que recibió el vehículo (y que en este caso presentaba disrupción del %PPI), con una t de Student apareada de 2,5 y un nivel de significación de $p < 0,03$ (datos no representados en la gráfica, donde solo se representan los cambios con respecto a los controles principales). Esto es importante porque ambos grupos recibieron la misma cantidad de alcohol que el grupo 15, ya que éste era en vehículo de la solución.

En cuanto al %PPI₂₆, volvemos a encontrar que la dosis de 5mg/kg toma el protagonismo en cuanto a la alteración de la inhibición por prepulso. Así el grupo de animales que recibió tratamiento subcrónico de 5mg/kg THC en adolescencia y crónico en la adultez, presentaban diferencias significativas respecto al control, con una t de Student apareada de 2,1 y un nivel de significación de $p < 0,05$. Llama la atención también ante el hecho de que, aunque no se muestre en la figura, existe diferencias significativas, entre las medias del %PPI₂₆ del grupo con 0mg/kg en la adolescencia y 5 mg/kg en el adulto (que presentaba un normal filtrado sensorial), respecto al grupo con 5mg/kg en adolescencia y 5mg/kg en el adulto, con un nivel de significación de $p < 0,05$. En este caso, el grupo que se mostraba con un comportamiento normal, tenía como tratamiento diferente con respecto al que no presentaba un normal %PPI que en la adolescencia solo había recibido el vehículo de la solución.

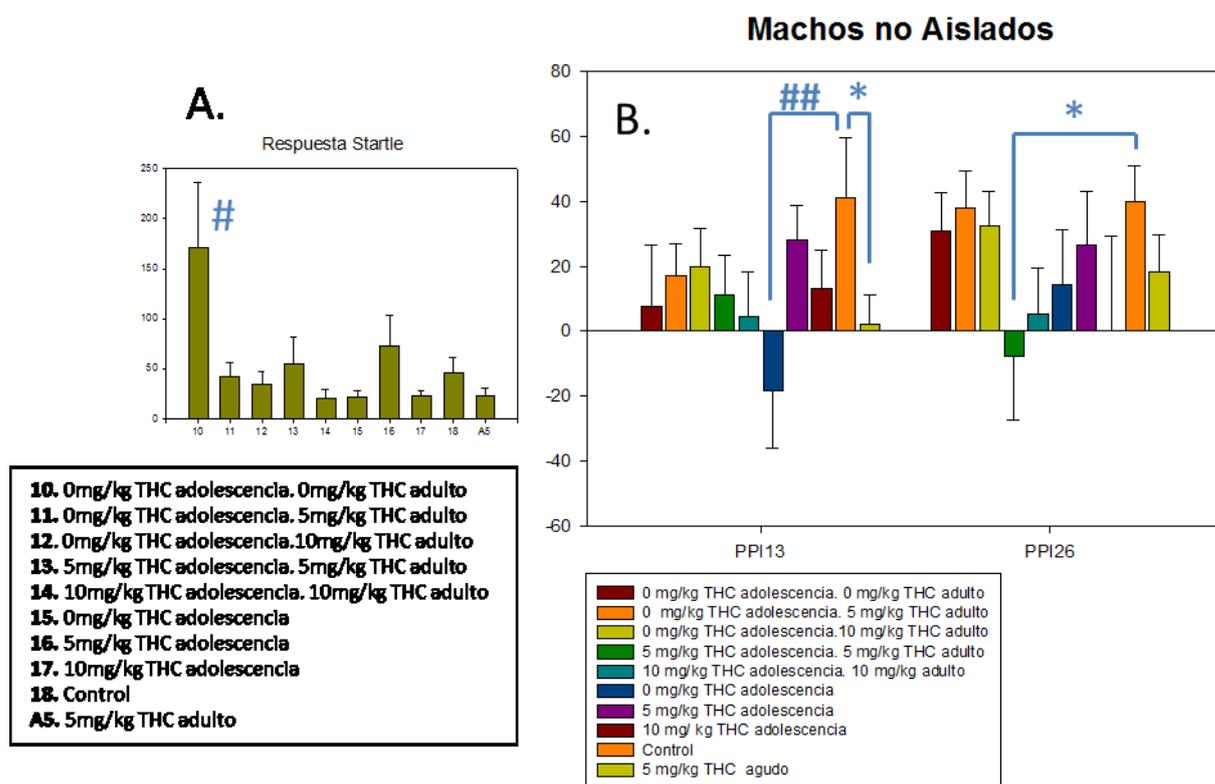


Figura 40. Efectos del THC subcrónico en adolescencia combinado con diferentes tratamientos crónicos de THC en la adultez inyectado IP en ratones machos Swiss . A. Representación gráfica de la actividad basal de los ratones o respuesta startle. Donde se pueden observar los diferentes grupos con los que se ha trabajado. La amplitud de las barras es la intensidad del sobresalto en mN; B. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, * $p < 0,05$. # $p < 0,01$. ## $p < 0,03$.

Machos con aislamiento materno

En este caso, los machos fueron separados de la madre durante 24 horas en una caja de aislamiento, en el día 9 de vida de los animales. Posteriormente se dividieron en 9 tipos de grupos que recibieron diferentes tratamientos. Estos grupos son:

- ✳ Animales que solo han experimentado aislamiento materno. Grupo control del efecto del efecto del aislamiento *per se*.
- ✳ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 0mg/kg THC en la adultez.
- ✳ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.

- ✳ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 0mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.
- ✳ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 5mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.
- ✳ Aislamiento post-natal y tratamiento subcrónico con 10mg/kg THC en la adolescencia y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.
- ✳ Aislamiento post-natal y tratamiento crónico con 0mg/kg THC en la adultez
- ✳ Aislamiento post-natal y tratamiento crónico con 5mg/kg THC en la adultez.
- ✳ Aislamiento post-natal y tratamiento crónico con 10mg/kg THC en la adultez.

Entre los grupos de animales que además de los tratamientos con THC sufrieron el aislamiento materno, no se observan (figura 41A) diferencias en cuanto a su respuesta Startle, o de sobresalto.

Por otro lado, como se puede apreciar en la figura 41B aunque haya una tendencia de perturbación en los animales del grupo control de aislamiento, así como en el grupo que recibía la dosis de 5 mg/kg THC en ambas etapas de su vida, estas tendencias no tienen significación estadística con respecto al grupo control.

Observando las medias del %PPI₂₆, apreciamos que el control de aislamiento difiere significativamente en un estudio de ANOVA de $F= 2,3$ g.l. y un nivel de significación de $p<0,02$, con los grupos que recibieron vehículo en la adolescencia y cualquier tratamiento en el adulto, y con los grupos que recibieron 10mg/kg THC en ambas etapas de la vida y con el grupo que recibió vehículo en su etapa adulta. Es decir que aunque todos estos grupos, sufrieron el mismo aislamiento materno que experimentó el grupo de control de aislamiento, presentaban un filtrado sensorial parecido o semejante al normal. Podríamos llamar la atención ante el hecho de que los grupos que recibieron la dosis de 5mg/kg THC en ambas etapas de la vida o dicha dosis pero solo en la adultez, no presentaban alterado su %PPI respecto al grupo control y estos al igual que el

resto, que si presenta alterado su %PPI, fueron aislados de su madre en el día 9 postnatal.

Por otro lado como ya se vio en la figura 41D (gráfica de aislados solo) para una t de Student apareada de 2,7 y un nivel de significación de $p < 0,02$ el grupo control de aislamiento difiere del control en su %PPI26.

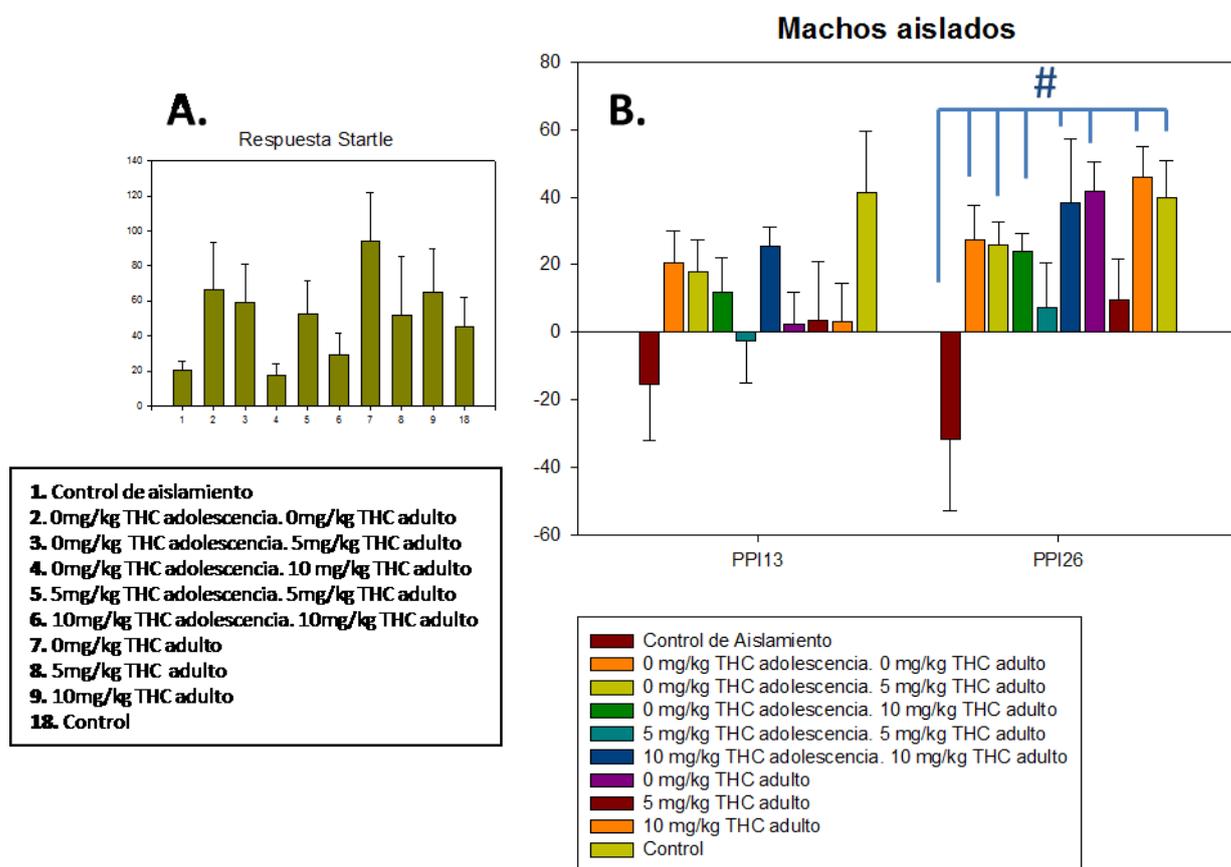


Figura 41. Efectos de la combinación del aislamiento, con los tratamientos subcrónicos y crónicos de THC en adolescencia y adultez inyectado IP en ratones machos Swiss. A. Representación gráfica de la actividad basal de los ratones o respuesta startle. Donde se pueden observar los diferentes grupos con los que se ha trabajado. La amplitud de las barras es la intensidad del sobresalto en mN; B. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, ** $p < 0,02$. ## $p < 0,03$

Cotejo de los grupos de machos en su totalidad

Como también se hizo en los grupos de hembras se estudiaron los grupos emparentados cuyas únicas diferencias eran si habían o no sufrido aislamiento

materno y del mismo modo que hembras, tampoco se encontraron diferencias significativas al aplicar el test de t de Student a cada par de grupos.

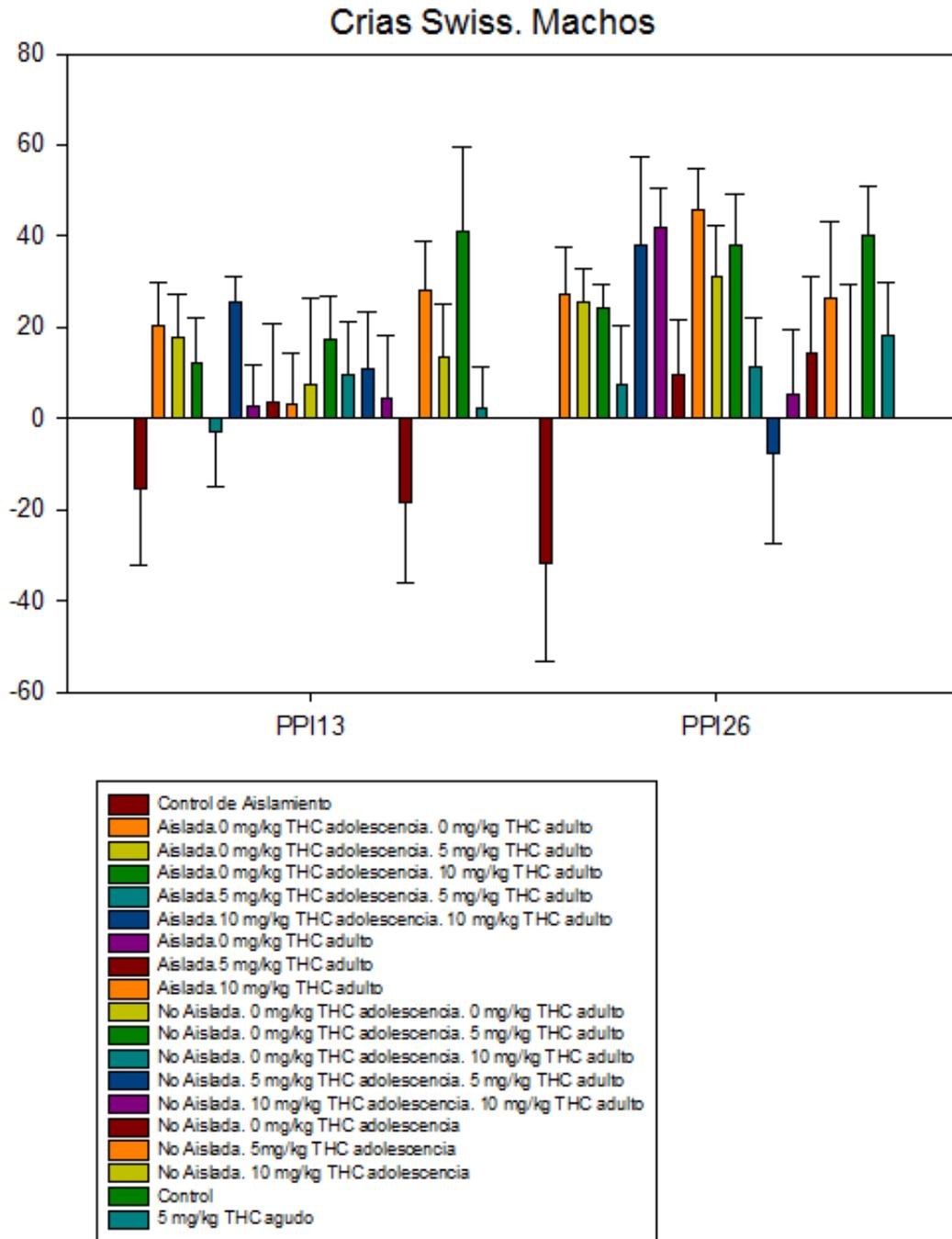


Figura 42. Cotejo de los resultados de test de PPI para todos los grupos de hembras. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, ** $p < 0,02$. ## $p < 0,03$.

5. Ratones KO CB1

Para entender las implicaciones del sistema cannabinoide en la alteración del normal filtrado sensorial de los ratones al someterlos a inyecciones de THC. Se estudiaron ratones WT frente a ratones KO del gen CB1.

Como se observa en la figura 44 el hecho de que le falte el receptor de cannabinoide CB1 es suficiente para presentar un %PPI13, alterado, con respecto a los ratones WT, con un valor de t de Student apareada de 1,7 y un nivel de significación de $p < 0.05$. La respuesta Startle (Figura 43) en cambio es prácticamente idéntica en ambos grupos.

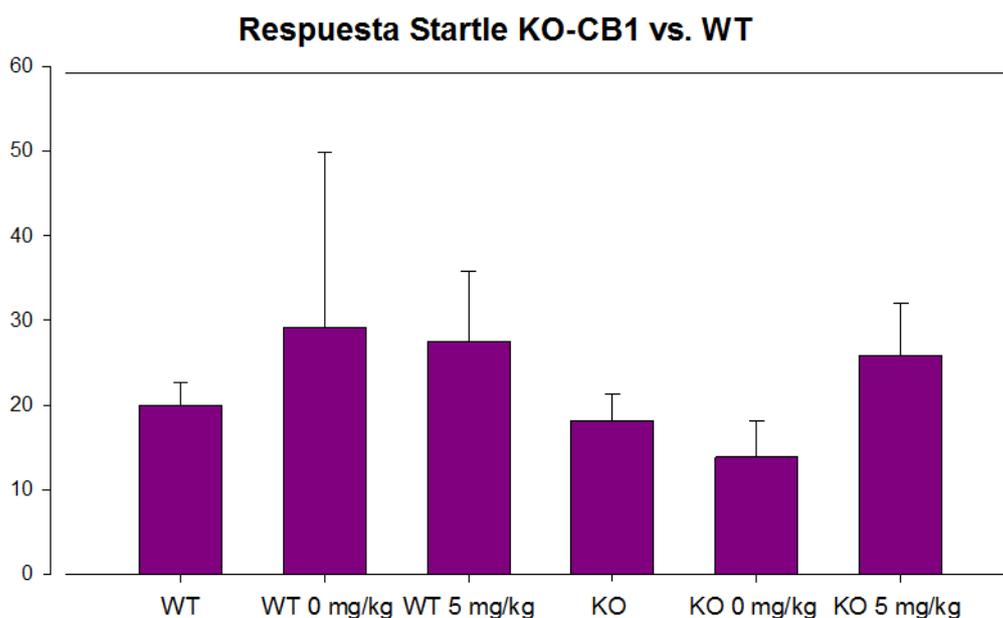


Figura 43. Representación de la respuesta Startle o respuesta de sobresalto medida en mNewton, en la que están incluidos los grupos de animales KO-CB1 con inyecciones agudas de THC, y los grupos control, frente a los ratones WT.

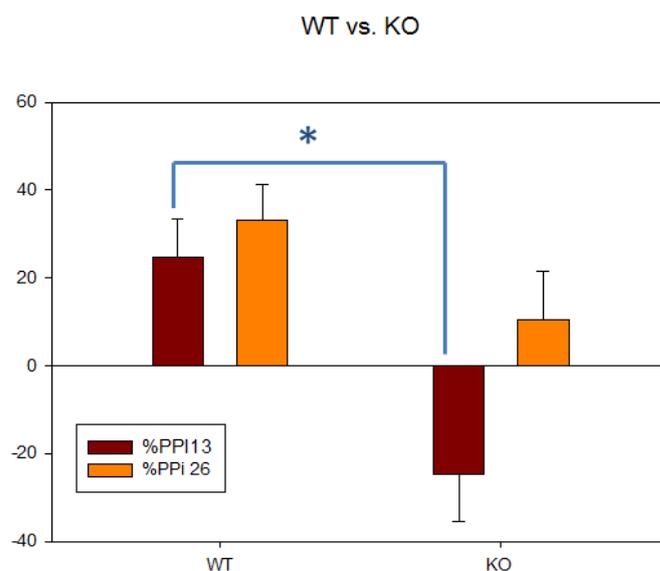


Figura 44. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI). Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, * $p < 0,05$. WT con N=22. KO con N=20.

En el estudio de cómo afecta el tratamiento crónico de THC sobre los ratones machos KO CB1, podemos observar en la figura 45, en cuanto al %PPI13:

- ✓ Por un lado la dosis de alcohol, perjudica notablemente el ya de por sí alterado, filtrado sensorial de estos ratones KO CB1. Esto es así con una t de Student apareada igual a 4,1 y un nivel de significación de $p < 0,01$.
- ✓ Sorprendentemente los animales KO CB1 que recibieron la dosis de 5 mg/kg de THC presentaban un %PPI típico de ratón sano, en lo que al filtrado sensorial se refiere.

En cuanto al % PPI26 nuevamente, podemos ver como el alcohol parece agravar la sintomatología alterada *per se* en ratones KO CB1, presentando una media \pm EMM de %PPI26 muy negativo con respecto al grupo sin tratamiento, con un valor de t de Student de 4,6 y nivel de significación de $p < 0,01$.

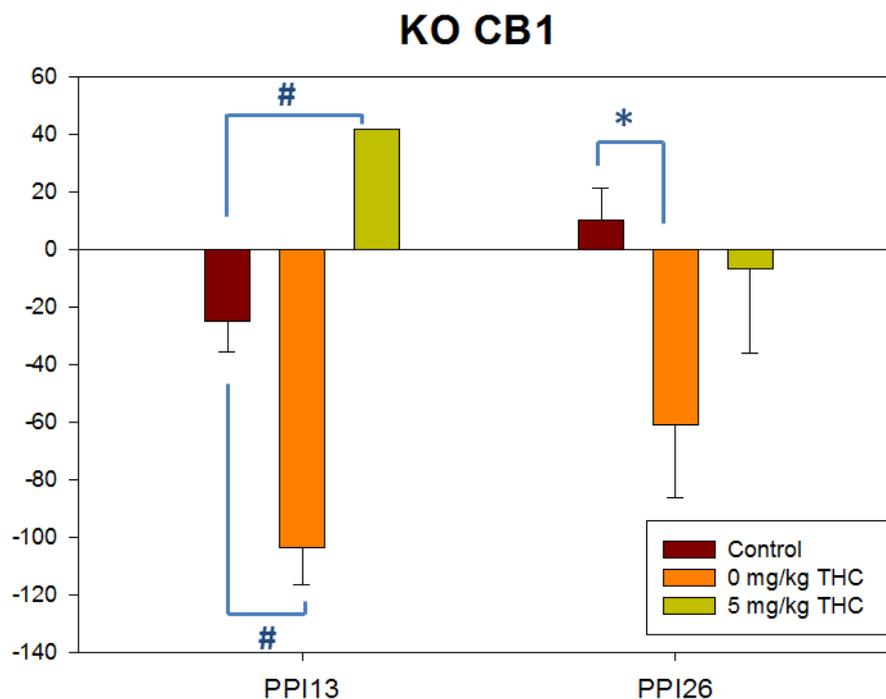


Figura 45. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para las diferentes dosis de THC usadas sobre ratones machos KO CB1. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, * $p < 0,05$. # $p < 0,01$. 0mg/kg N=5. 5mg/kg N=6.

Para terminar comparando cada tipo de tratamiento entre los distintos tipos de animales, mediante un análisis de t de Student apareadas, pudimos comprobar que si bien no existían diferencias significativas entre los %PPI de los animales KO CB1 frente a los WT, con respecto a la dosis de 5 mg/kg de THC (figura 46A) y existía significación con una $t = 6,4$ y $p < 0,01$, en los %PPI para el prepulso de 73 db entre aquellos que fueron tratados con alcohol (figura 47B).

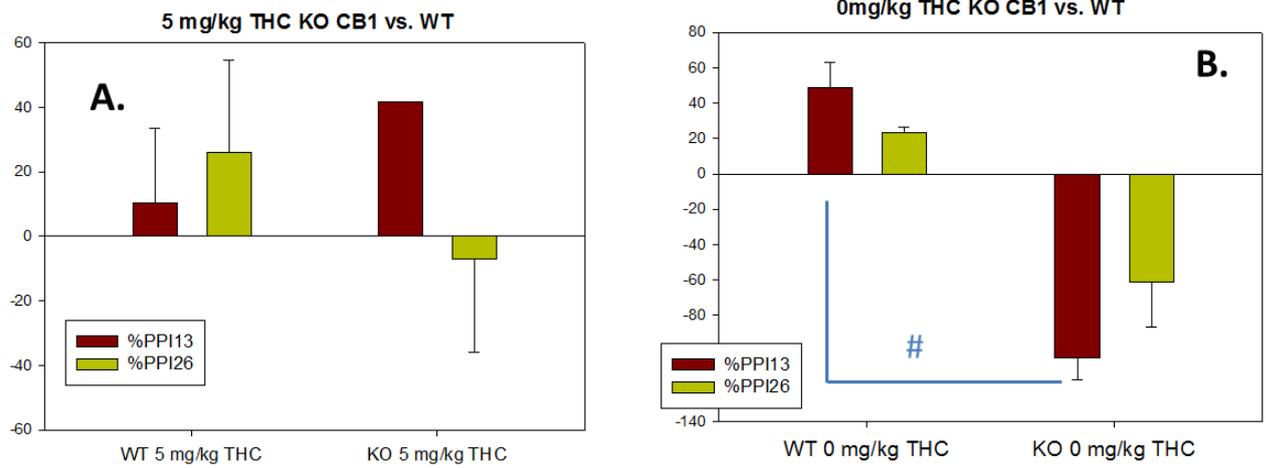


Figura 46. A. Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para una dosis IP de alcohol sobre ratones machos KO CB1 comparandolas con los resultados sobre los ratones WT. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Representación gráfica de las medias \pm EEM del porcentaje de inhibición por prepulso (PPI) para una dosis IP de 5 mg/kg THC sobre ratones machos KO CB1 comparandolas con los resultados sobre los ratones WT. Por cada grupo de animales hay dos %PPI uno para el prepulso de 73 db (%PPI13) y otro para el prepulso de 86 db (%PPI26). Media \pm EEM, # $p < 0,01$. 0mg/kg N=5. 5mg/kg N= 6.

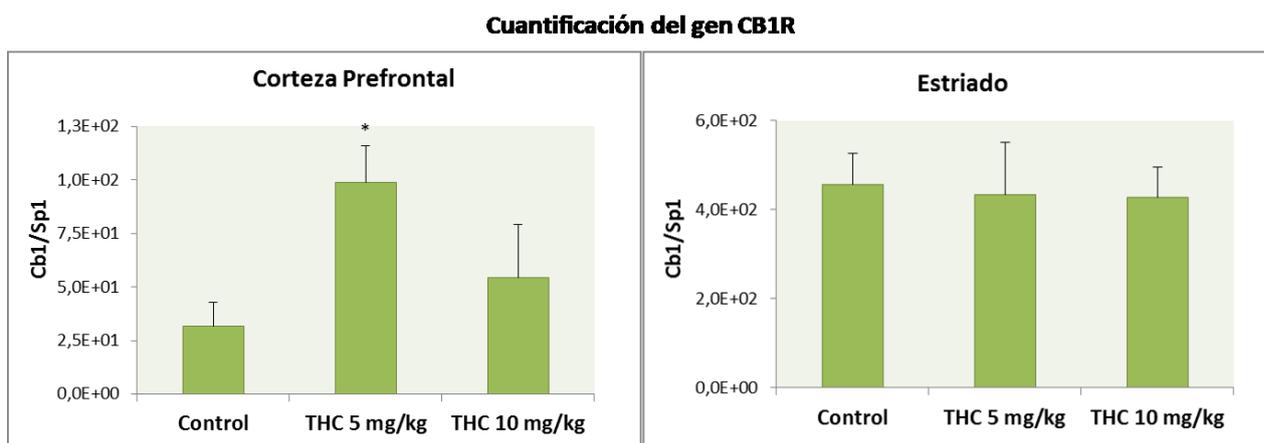
Protocolo de estudio molecular de cambios provocados por THC en el metabolismo de los endocannabinoides.

Además de estudiar la posible capacidad psicotogénica del Δ 9-THC mediante test de PPI se estudió qué cambios se habían producido a nivel molecular en el cerebro de los ratones Swiss con tratamiento agudo de la droga. En estos ratones se estudió por RT-Q-PCR ("Reverse transcription Quantification polymerase chain reaction"), el receptor cannabinoide CB1, la enzima de síntesis de AEA, NAPE-PLD, y la enzima de degradación de AEA, FAAH. Los cDNA de estas proteínas se midieron en la corteza prefrontal y en el estriado.

Los cerebros de los ratones fueron diseccionados en frío. De ellos se extrajo, la corteza prefrontal por un lado y el estriado por otro. Conservando siempre, las muestras en frío se procedió con el protocolo de RT-PCR, el cual consta de cuatro fases: Extracción de RNA, Purificación, síntesis de cDNA y finalmente PCR cuantitativa.

Efectos génicos de THC sobre CB1R, NAPE-PLD y FAAH

La cuantificación del gen de CB1R en corteza prefrontal y en el estriado indica que el THC a dosis de 5 aumenta la expresión de CB1R en corteza prefrontal pero no en estriado. Y la que una dosis superior, de 10 mg/kg THC,



no es efectiva (figura 47).

Figura 47. Cuantificación de la expresión del gen CB1R en la corteza prefrontal y en el estriado de ratones tratados con Δ^9 -THC de forma aguda. Para los cálculos se usó como gen interno o normalizador el Sp1. Media \pm EEM, * $p < 0,05$ vs Control

La cuantificación del gen de NAPE-PLD en corteza prefrontal y en el estriado indica que el THC a dosis de 10 disminuye la expresión de NAPE-PLD en el estriado pero no en corteza prefrontal. La dosis de 5 mg/kg THC no es efectiva (figura 48).

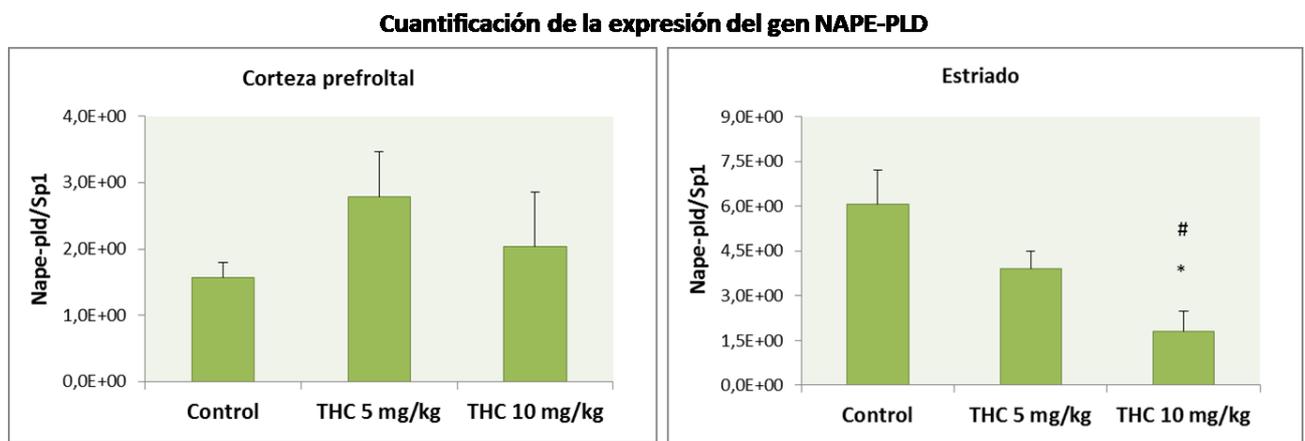


Figura 48. Cuantificación de la expresión del gen NAPE-PLD, en la corteza prefrontal y en el estriado de ratones tratados con Δ^9 -THC de forma aguda. Para los cálculos se usó como gen interno o normalizador el Sp1. Media \pm EEM, * $p < 0,05$ vs Control; # $p < 0,05$ vs THC 5mg/kg

La cuantificación del gen de FAAH en corteza prefrontal y estriado indica que el THC a dosis de 5 aumenta la expresión de FAAH en corteza prefrontal y estriado. La dosis de 10 mg/kg THC no es efectiva, sugiriendo un efecto bifásico propio de los cannabinoides (figura 49).

Cuantificación de la expresión del gen FAAH

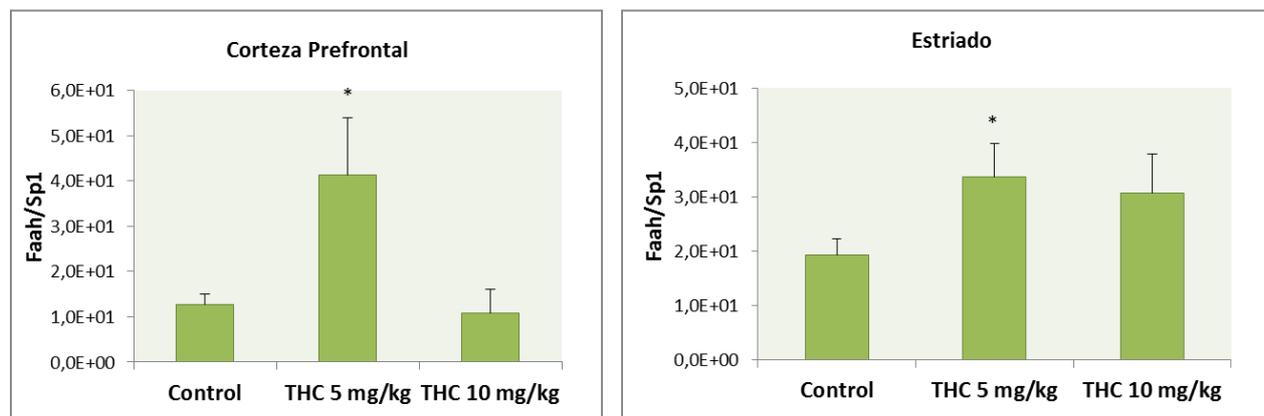


Figura 49 Cuantificación de la expresión del gen CB1R en la corteza prefrontal y en el estriado de ratones tratados con $\Delta 9$ -THC de forma aguda. Para los cálculos se usó como gen interno o normalizador el Sp1. Media \pm EEM, * $p < 0,05$ vs Control

En resumen, los datos indican que el THC a dosis de 5 pero no superiores es capaz de modificar la expresión de CB1R en corteza prefrontal, lo que podría relacionarse con los efectos psicóticos agudos de dicha dosis en concreto a demostrado en el test de comportamiento. Los cambios en las enzimas NAPE-PLD y FAAH sugieren que el THC modifica la vía de síntesis y degradación de cannabinoides endógenos como anandamida. La dosis de 5 THC tiene efecto sobre todo a nivel de la degradación por FAAH, lo que también se podría relacionar con los efectos psicóticos agudos del THC a 5 mg/kg o su acción antipsicótica sobre los ratones KO de CB1R.

Resultados: Tarea Experimental IV

Estudio de posible nicho neurogénico en tercer y cuarto ventrículo, bajo condiciones de hemiparkinsonismo inducido

Como se explica en materiales y métodos, todos los grupos de animales, de los diferentes tratamientos fueron perfundidos con PFA 4%, antes de extraer sus cerebros. De estos cerebros, usando un criostato, se laminó una porción final del diencefalo y el mesencefalo en cortes coronales de 20 μm . Los cortes se trataron por inmunofluorescencia, usando marcadores conocidos de células progenitoras (nestina, GFAP), marcador de células en movimiento (PSA-NCAM) y el marcador propio de neuronas catecolaminérgicas, tirosina-hidroxilasa (TH). En cada tanda de inmunofluorescencia se utilizó mínimo un animal de cada grupo, adjudicándole un número, para hacer todo el proceso mediante experimentación de doble-ciego. Los diferentes cortes de cada animal se dividieron al azar entre pocillos, realizando un tipo de marcaje en cada pocillo. Se realizaron tanto marcajes simples como dobles.

En el cerebro de rata adulto existen cuatro cavidades anatómicas denominadas ventrículos cerebrales, que se encuentran interconectados entre sí, y constituyen el sistema ventricular donde se forma y circula el líquido cefalorraquídeo (LCR). Los espacios ventriculares estudiados en esta tesis son el tercer ventrículo, perteneciente al diencefalo y el acueducto de Silvio, que es el conducto comunicante entre el tercer ventrículo y el cuarto, y se encuentra en el mesencefalo. De este sistema ventricular, el tercer ventrículo varía además estructuralmente en el eje antero-posterior. Los ventrículos están delimitado por un epitelio simple formado por dos tipos de células, a veces tres: células ependimales cúbicas con cilios hacia el lumen del ventrículo, llamadas ependimocitos; un tipo de célula ependimal, llamado ependimocitos especiales, que podemos encontrar en el Receso Colicular (RC) y el Órgano

Subcomisural (SCO); y tanicitos, sin cilios pero con largos procesos embebidos en el parénquima y abundantes microvilli hacia el lumen. Estas últimas, presentan una morfología que mantiene las características que se encuentran en la glía radial embrionaria, aunque su papel en el adulto es aún desconocido.

1. Estudio de centros neurogénicos en ratas Prepúberes.

Para este grupo se usaron ratas Wistar de 70 g a las que se les extrajo el cerebro, previa perfusión, sin ningún tipo de tratamiento in vivo. Se hizo un estudio seriado de las diversas zonas potencialmente neurogénicas desde la última porción del tercer ventrículo hasta el acueducto de Silvio, con el fin de identificar, y detectar los posibles cambios que pudieran acontecer tras los tratamientos realizados y con respecto a la edad del animal.

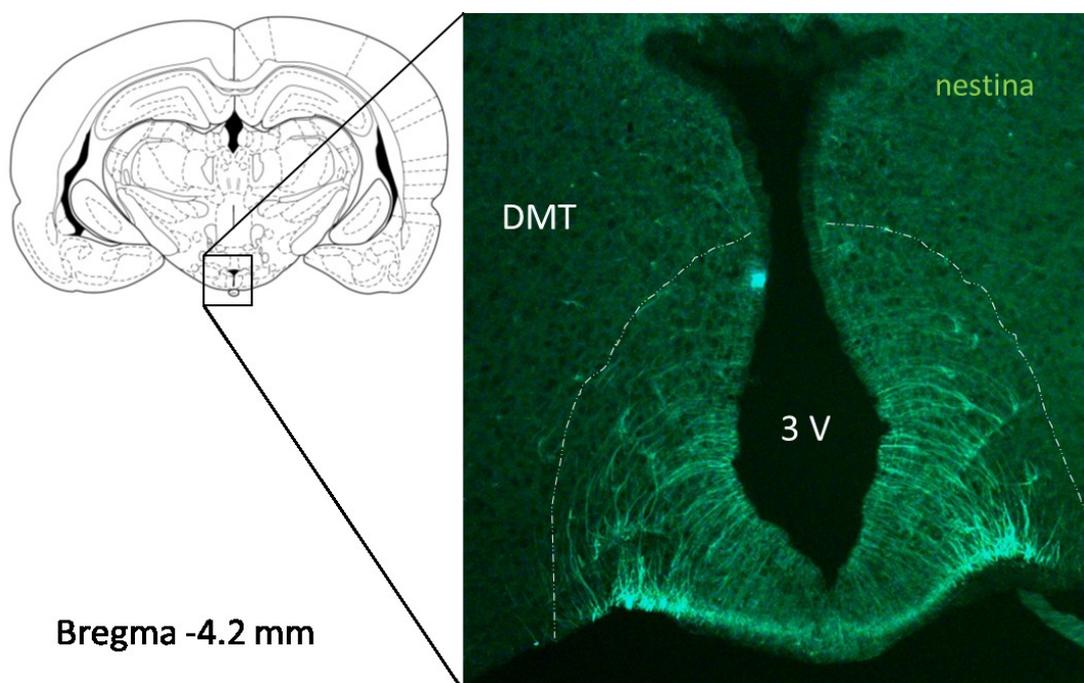


Figura 50. Núcleo arcuato. Inmunofluorescencia en 3er ventrículo para nestina a -4.2 mm en el eje AP con respecto a bregma, según el atlas de Paxinos y Watson (2005). Puede apreciarse abundantes células ependimales del tercer ventrículo inmunopositiva para nestina. También se observan los procesos celulares de dichas células nestina+ que recorren el núcleo arcuato. DTM (núcleo tuberomamilar). 20x

En primer lugar en la coordenada -4.2 mm con respecto a Bregma en el eje antero-posterior (AP) se identificó el núcleo Arcuato, un núcleo hipotalámico, en el que existen células inmunopositivas para nestina en la capa endodimal del tercer ventrículo (figura 50). Estas células presentan largos procesos que se extienden por toda la parte medial posterior y lateral de este núcleo hipotalámico. Estas células tienen apariencia de tanicitos, con cierta similitud a glía radial embrionaria.

El núcleo arcuato o núcleo infundibular, se sabe está compuesto por varias poblaciones importantes de neuronas. Incluye: Neuronas neuroendocrinas

Neuronas neuroendocrinas. Hay dos tipos. Las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares, que regulan la liberación de prolactina, y de hormona liberadora de gonadotropina; Y El núcleo de neuronas neuroendocrinas que generan la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH).

Neuronas de proyección central. Hay tres tipos. Un grupo de neuronas que liberan neuropéptido Y, proteína relacionada con agouti y GABA ; un grupo que coexpresan proopiomelanocortina (POMC) y transcrito regulado por cocaína y amfetamina (CART), importantes en la regulación del apetito y de la conducta sexual.; y un grupo de neuronas que sintetizan somatostatina.

Neuronas que sintetizan grelina Son importantes en la regulación del apetito y en el metabolismo basal, así como en la distribución corporal de la grasa.

Esta variedad de tipos de neuronas, y la importancia de la región, puede que sea la causante de la gran actividad proliferativa que se observa en este núcleo hipotalámico. Ya que, este pequeño núcleo cerebral interviene en conductas emocionales y tiene una importante actividad endócrina que regula la ingesta de comida, entre otras.

A nivel de -4.5 mm de distancia respecto a Bregma, En la zona periventricular hipotalámica, se observan células, así como los largos procesos celulares de las mismas, inmunopositivas para nestina (Figura 51A). En esta zona el revestimiento ventricular se le conoce con el nombre de Órgano Subcomisural (SCO), y es uno de los siete órganos circunventriculares, muy importantes para el mantenimiento del líquido cefalorraquídeo, la homeostasis y protección del encéfalo. El SCO es una glándula del cerebro localizada en la región dorsal del tercer ventrículo, bajo la comisura posterior y la entrada del acueducto de Silvio.

Puede apreciarse que las células inmunopositivas para nestina, presentan largos procesos que se dirigen hacia el parénquima de los núcleos adyacentes. Estas células son por tanto tanicitos, que en este caso podrían actuar como células progenitoras. Dichas células podrían actuar renovando los núcleos anexos, o los componentes periventriculares, como la capa endotelial. De hecho el mantenimiento de dicha estructura es vital para la supervivencia del organismo, por lo que sería lógico pensar que en esta región se da proliferación para el reemplazamiento de los componentes del SCO.

Se pueden apreciar también las redes dopaminérgicas TH⁺ (Figura 51B), que corresponden con la parte posterior del núcleo talámico paraventricular (PVP), comisura posterior (tracto mesencefálico), y al núcleo precomisural (PrC). Estas neuronas dopaminérgicas constituyen la red dopaminérgica periventricular/periacueductal del tronco del encéfalo, que se extienden desde porciones más rostrales, a nivel de la sustancia gris periacueductal y núcleo rojo, hasta porciones más craneales del tronco del encéfalo, como la mostrada.

En ningún caso se ha encontrado colocalización de las señales nestina y TH, como se puede ver en la superposición de las imágenes o Merge (Figura 51C) para los marcadores de dichas señales.

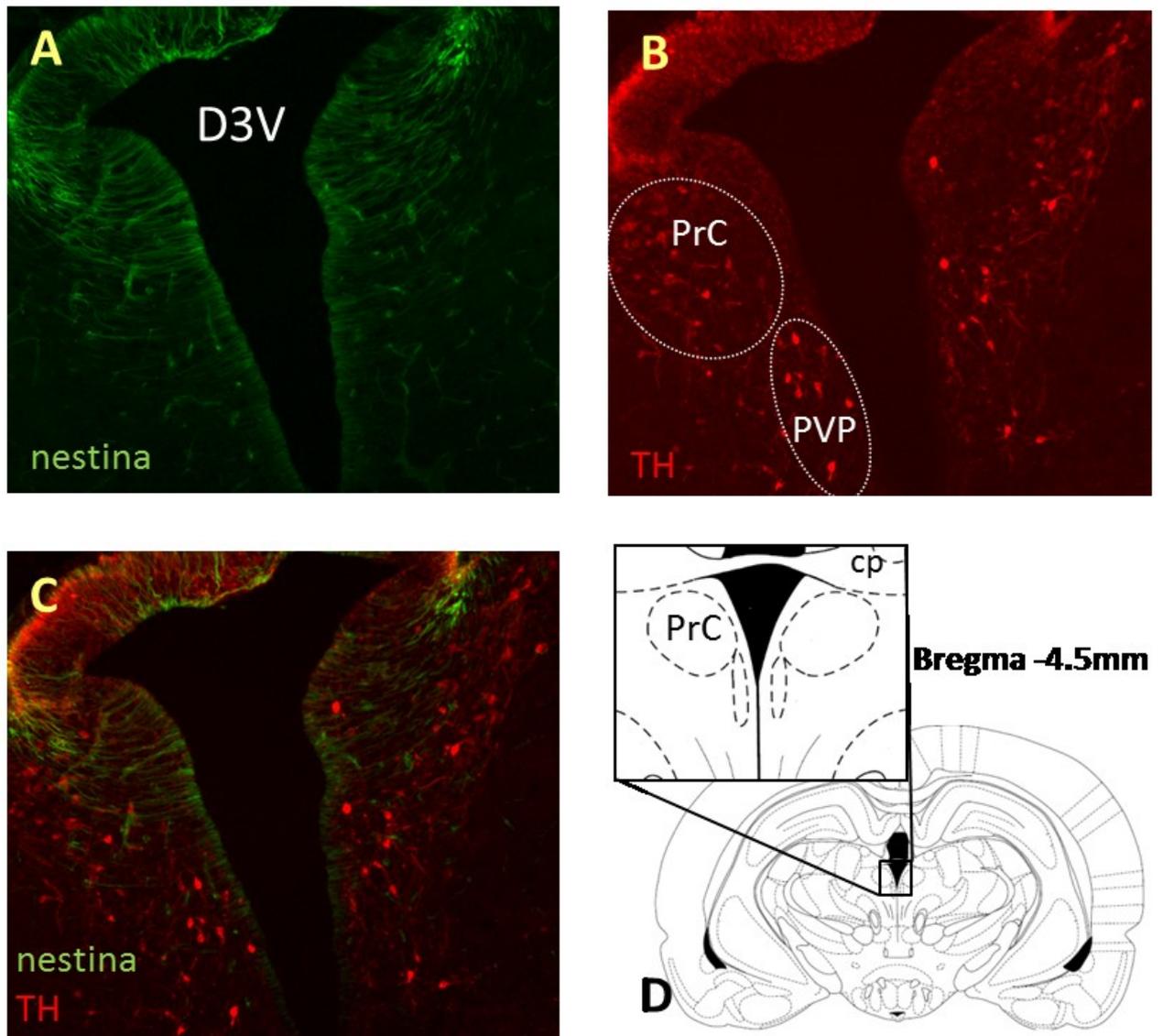


Figura 51. Órgano Subcomisural. Las imágenes A, B y C corresponden a las fotografías del órgano SCO tomadas con el microscopio de fluorescencia a un aumento de 20x. A. células inmunopositivas para nestina (verde). B. Células inmunopositivas para TH (rojo). C. Superposición o merge de las imágenes anteriores (A y B). D. Ilustración atlas Paxinos y Watson (2005) que se corresponde con el corte de cerebro del que están tomadas dichas imágenes, referente a la lámina que dista 4.5 mm del bregma en el eje antero -posterior. D3V (tercer ventrículo dorsal), pc (comisura posterior), PrC (núcleo precomisural), PVP (parte posterior del núcleo talámico paraventricular).

En este mismo corte coronal, pero más ventralmente encontramos una zona inmunopositiva para PSA-NCAM (Figura 52) a ambos lados del núcleo rostral lineal que podrían ser células progenitoras tipo A, neuroblastos. Su origen y destino no está claro. Podría coincidir con el tracto mamilotegmental. Éste va desde el hipotálamo hasta el tegmento mesencefálico.

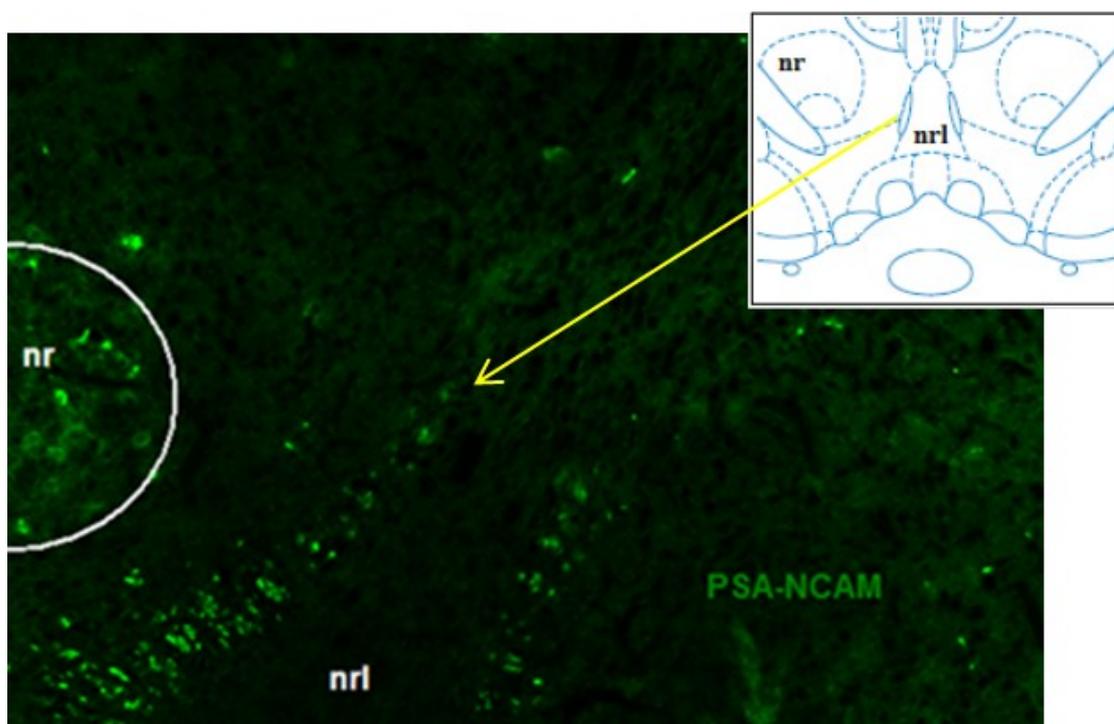


Figura 52. Células PSA-NCAM+ a ambos lados del núcleo rostral lineal que podrían ser del tipo A, o sea neuroblastos. Su origen y destino no está claro, aunque podría ser el tracto mamilotegmental desde el hipotálamo hasta el tegmento mesencefálico (x20). (nr) núcleo rojo. Aparece señal positiva en el núcleo rojo del mesencéfalo, pero no es significativa ya que este núcleo siempre da señal, para todos los anticuerpos usados.

Ya en el mesencéfalo pero coincidiendo aun con el SCO se han encontrado células y procesos celulares inmunopositivos para nestina, en la zona superior de la transición tercer ventrículo-acueducto de Silvio (Figura 53). Dicha transición ventrículo-acueducto y ultima porción del SCO, se localiza a -4.8mm en relación a Bregma en el eje AP. Partiendo desde este órgano circunventricular y dirigiéndose hacia el hipocampo se puede apreciar los procesos celulares nestina+ (Figura 53B). Estas fibras nestina+ son los procesos celulares de las células que forman la capa endimaria de esta glándula. Por la citoarquitectura de estas células probablemente se correspondan con tanicitos. Ya que los tanicitos extienden largos procesos para la migración de células de reciente creación o bien pudiera ser la propia de la glía radial embrionaria que aún podría permanecer como tal en las crías de rata de esta temprana edad.

Este mismo tipo señal nestina⁺ en los endimocitos modificados del sistema ventricular se continúa en el eje antero-posterior, y se ha observado también más caudal, a una distancia de -5.2 mm de Bregma (figura 54). En posición dorsal al acueducto de Silvio, se han podido detectar células inmunopositivas para nestina. Esta zona se corresponde con el Receso Colicular (RC).

En ambos cortes coronales (figuras 53 y 54), tanto a la altura del SCO, como a la del RC se han observado células inmunopositivas TH en el Área Gris Periacueductal (PAG) adyacente, aunque la señal nestina⁺ no colocaliza con la señal TH. Estas células TH⁺ son la extensión más posterior de la red dopaminérgica periventricular del tronco del encéfalo. Esta red en la PAG fue estudiada en nuestro laboratorio y está compuesta por neuronas grandes multipolares y pequeñas periacueductales (Flores y col., 2006). Las neuronas pequeñas se sitúan en la pared del acueducto o, en menor número, en el espesor de la PAG.

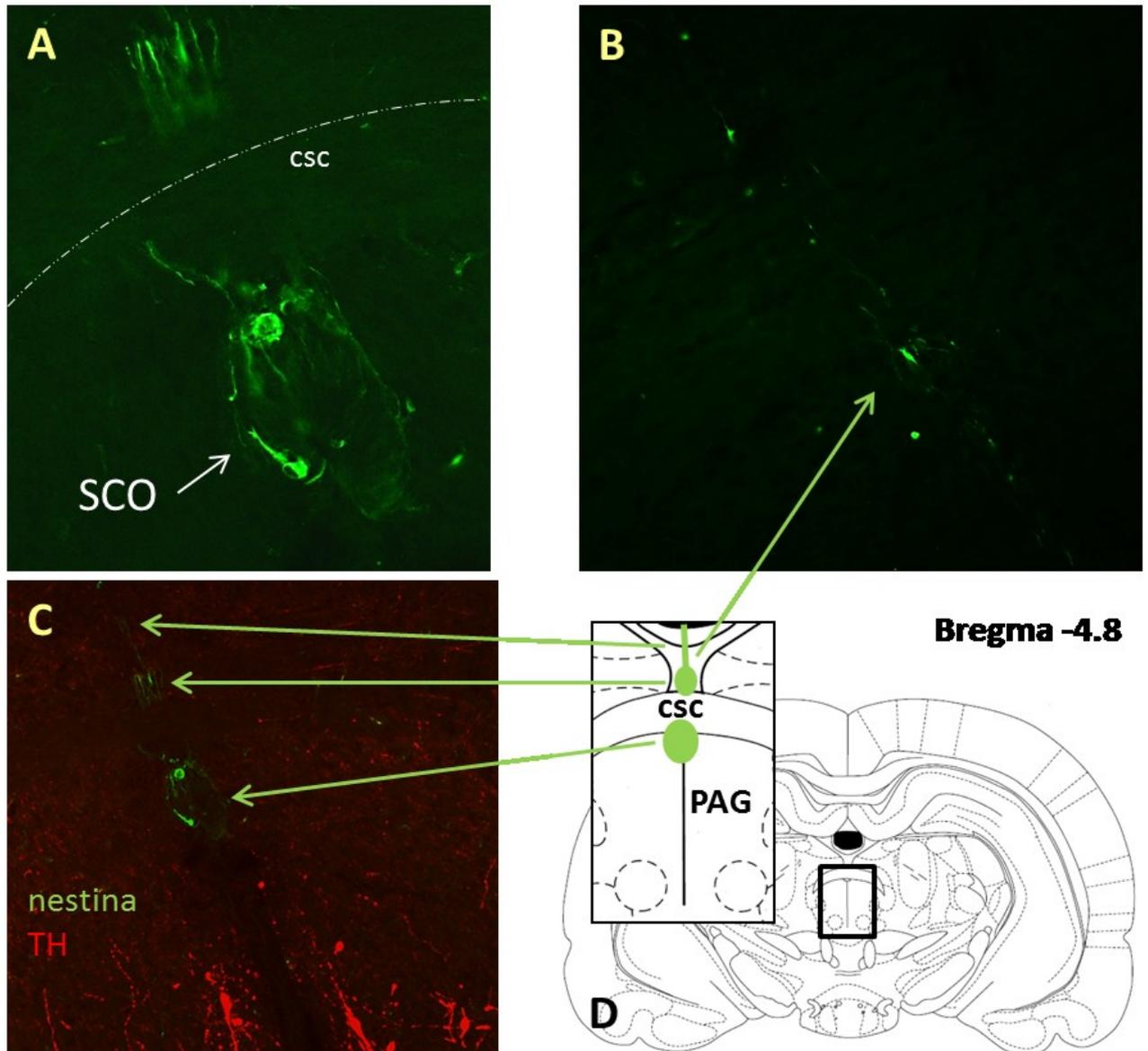


Figura 53. Órgano Subcomisural. A. Células inmunopositivas para nestina en el SCO con procesos que cruzan la comisura del colículo superior 40x. B. Ruta de células nestina+ que parten del SCO hacia el tercer ventrículo dorsal 20X. C. Superposición o merge de inmunofluorescencia nestina (verde) y TH (rojo) donde se puede apreciar el SCO nestina+, la ruta craneal nestina+ y células periacueductales TH+ pequeñas y multipolares 20X. D. Lamina del Atlas estereotáxico Paxinos y Watson 5^º edición donde se muestra la zona correspondiente a las fotografías. (csc) comisura del colículo superior. (PAG) Área Gris periacueductal posterior. (SCO) órgano subcomisural.

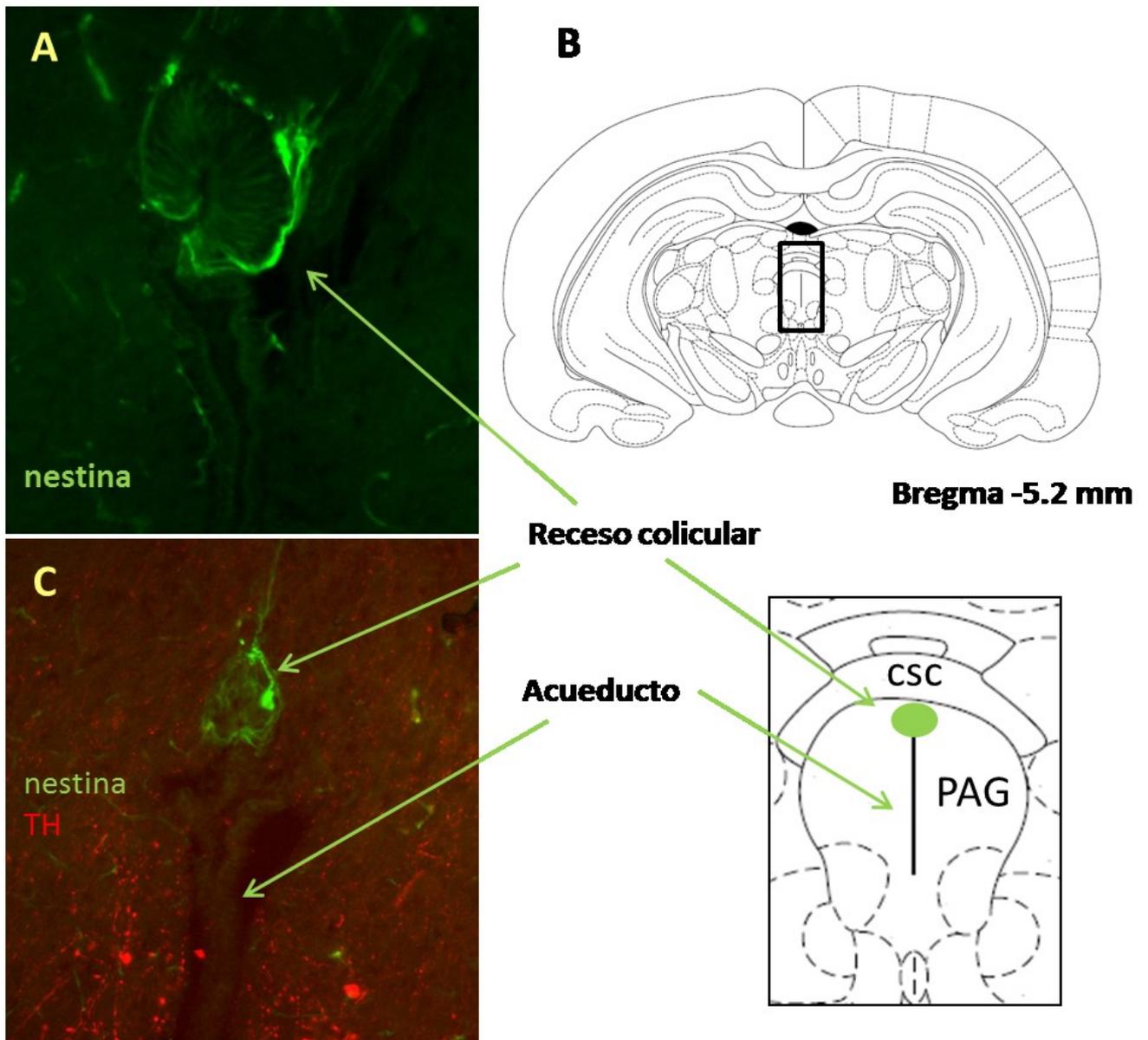


Figura 54. Receso Colicular. A. Receso Colicular con algunas células inmunopositivas para nestina.40X B. lamina del Atlas estereotáxico Paxinos y Watson, con la zona del acueducto de Silvio recuadrada y ampliada (coordinada con respecto a bregma -5.2mm AP). C. Superposición o merge de inmunofluorescencia nestina (verde) y TH (rojo) donde se aprecia el Receso colicular nestina+, un proceso celular ramificado hacia el hipocampo nestina+ y células periacueductales TH+20X. (csc) comisura del colículo superior. (PAG) Área Gris Periacueductal posterior. (SCO) Órgano Subcomisural.

En esta misma zona mesencefálica, pero coincidiendo con el núcleo rostral lineal (Área Tegmental Ventral) se aprecian células inmunopositivas PSA-NCAM cuya señal colocalizan con la señal TH, indicando la presencia de neuronas TH+ migrando de reciente generación (figura 55). Estas pueden provenir de las células endodimales y tanicitos que se encuentran en las paredes de acueducto. Puede distinguirse algunas células con núcleo picnótico, lo que sugiere que

algunas de estas nuevas células sufren muerte celular por apoptosis, como ya está descrito para el centro neurogénico situado en la Zona Subventricular (SVZ).

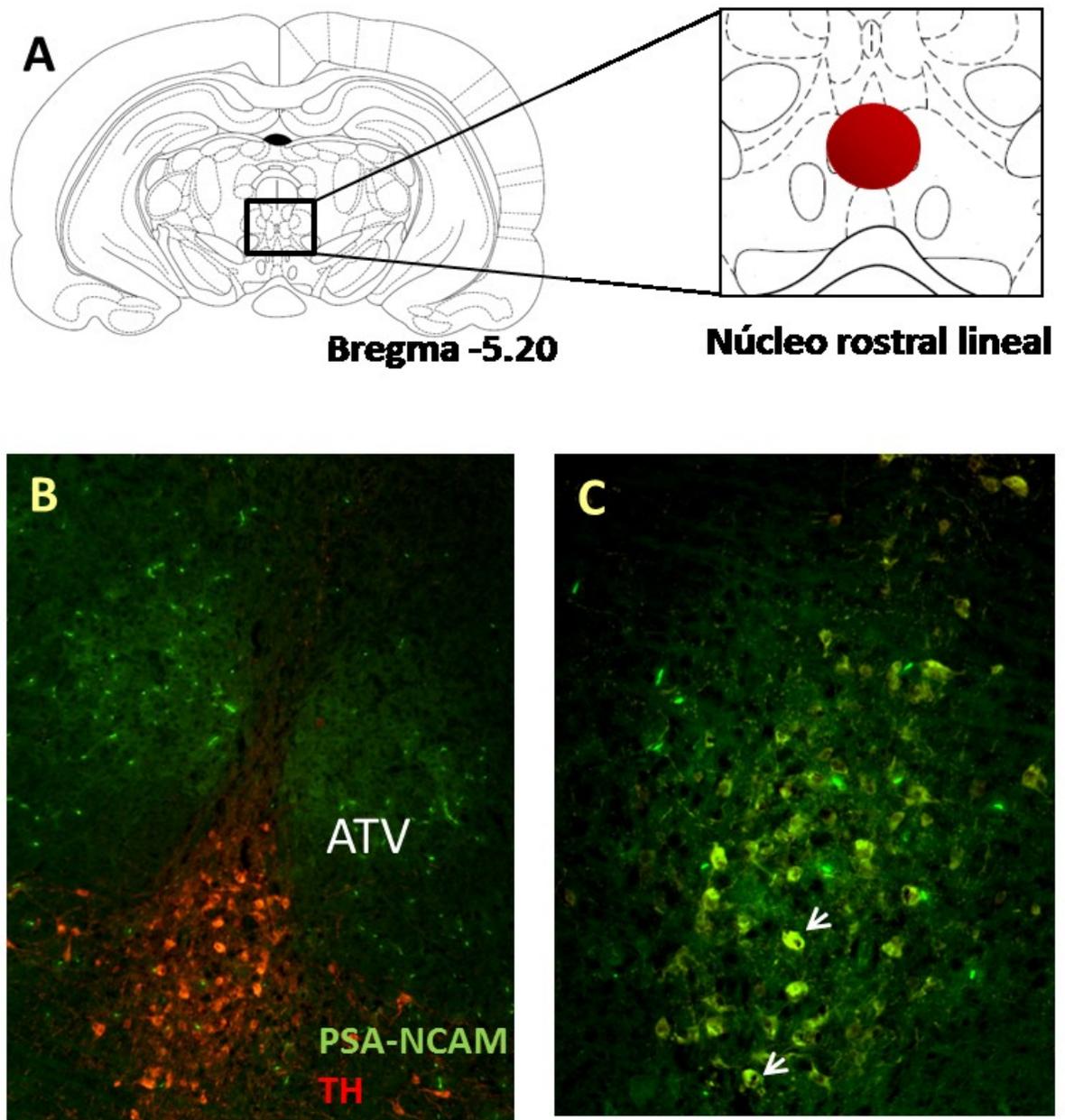


Figura 55. Área Tegmental Ventral. A. Esquema de corte coronal extraído del Atlas estereotáxico Paxinos y Watson 5ª edición, donde se representa la zona de estudio de las imágenes B y C. B. Superposición o merge de inmunofluorescencia PSA-NCAM (verde) y TH (rojo) donde puede apreciarse las neuronas donde colocaliza la señal PSA-NCAM y TH, en un tono anaranjado. 20x. B. detalle de la zona inmunopositiva para ambos marcadores. Las flechas blancas señalan células con posible núcleo picnótico, 40x. ATV (Área Tegmental Ventral).

2. Ratas hemiparkinsonianas adultas.

Como está descrito en Materiales y Métodos, las ratas Wistar adultas (150 - 200 g) se sometieron a cirugía estereotáxica, en la que se le lesionaba la sustancia negra izquierda, aplicando el modelo de hemiparkinsonismo de 6-OHDA. Una vez operadas, y tras 14 días, Tenía lugar el Test de giro inducido por amfetamina, para corroborar que estuviesen bien lesionadas. Si efectuaban más de 420 giros/hora, a partir de 30 min después de la inyección, lo animales se perfundían con PFA 4% y se extraía su cerebro para el posterior tratamiento de los cortes coronales. En todas las tandas de experimentos se preparaban también animales "Sham", esto es, animales control, que pasaban por el mismo proceso que los animales con hemiparkinsonismo, pero que en lugar de recibir inyección intracraneal de 6-OHDA, recibían solo el vehículo de la misma (salino 0,9% + ácido ascórbico 0,2%.)

De los animales adultos, es importante decir en este punto, que las ratas Sham no presentaron ningún tipo de señal al realizar la técnica de inmunofluorescencia con ninguno de los tipos de anticuerpos usados, a excepción de la señal TH que se localizaba en las áreas comunes en todos los casos, y de una irrisoria señal positiva de nestina en los ependimocitos ventriculares. Sin embargo en ratas con hemiparkinsonismo estable validado por el test de amfetamina, se pudo detectar un número muy reducido de células inmunopositivas entre las células de la capa ependimal del tercer ventrículo. Pero solo se encontraron del orden de 1-4 en cada corte coronal, por lo que no se han presentado los datos. A niveles más caudales, ya en el mesencéfalo se detectaron células inmunopositivas para nestina entre las células ependimales del acueducto de Silvio pero igual que en las ratas Sham estas se encontraban en un número muy reducido. En las zonas adyacentes al acueducto de Silvio, en lo que se llamada Zona Gris Periacueductal (PAG) había células y fibras dopaminérgicas TH+ (Figura 56) cuya señal colocalizaba con la señal PSA-

NCAM+, indicando un posible origen neuroblástico reciente. Entre estas células TH+, y al parecer, recientemente generadas se encontraron tanto de tipo multipolar grandes, como periacueductales pequeñas.

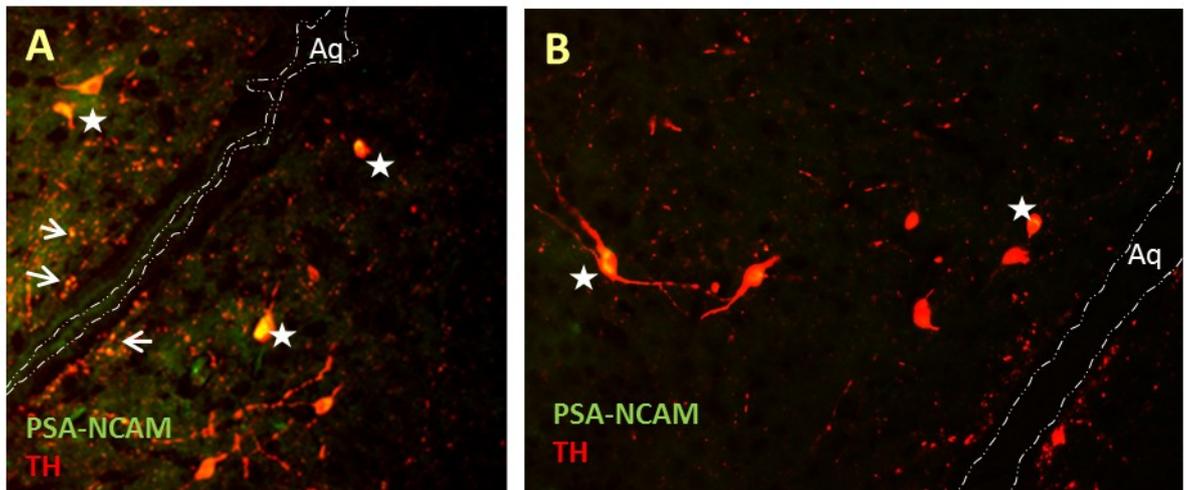


Figura 56. Zona Gris Periacueductal. A y B Superposición o merge de TH (rojo) y PSA-NCAM (verde), donde se puede apreciar el acueducto de Silvio, remarcado con una línea discontinua blanca. En la PAG existen dos tipos de células donde colocaliza ambas señales: células multipolares grandes (estrella blanca) y periacueductales pequeñas (flecha blanca) más próximas a la capa ependimal del acueducto. 20X. (Aq) acueducto de Silvio.

Un poco más caudal, en las ratas con hemiparkinsonismo estable sigue apareciendo señal nestina+ en ependimocitos del acueducto. Esta señal se da en mayor número que el observado en el 3er ventrículo o que en ratas Sham (Figura 57). Estas células son ependimocitos, con forma cubica que no parecen presentar procesos celulares. Hay una rica red TH+ adyacente a los ependimocitos que en ningún caso colocaliza con la señal nestina. Las neuronas TH+ podrían ser dopaminérgicas y además de sus funciones catecolaminérgicas podrían ejercer una función trófica sobre la pared ventricular, a través de receptores D1. Algunas de las mismas podrían ser de generación reciente desde las posibles progenitoras ependimales.

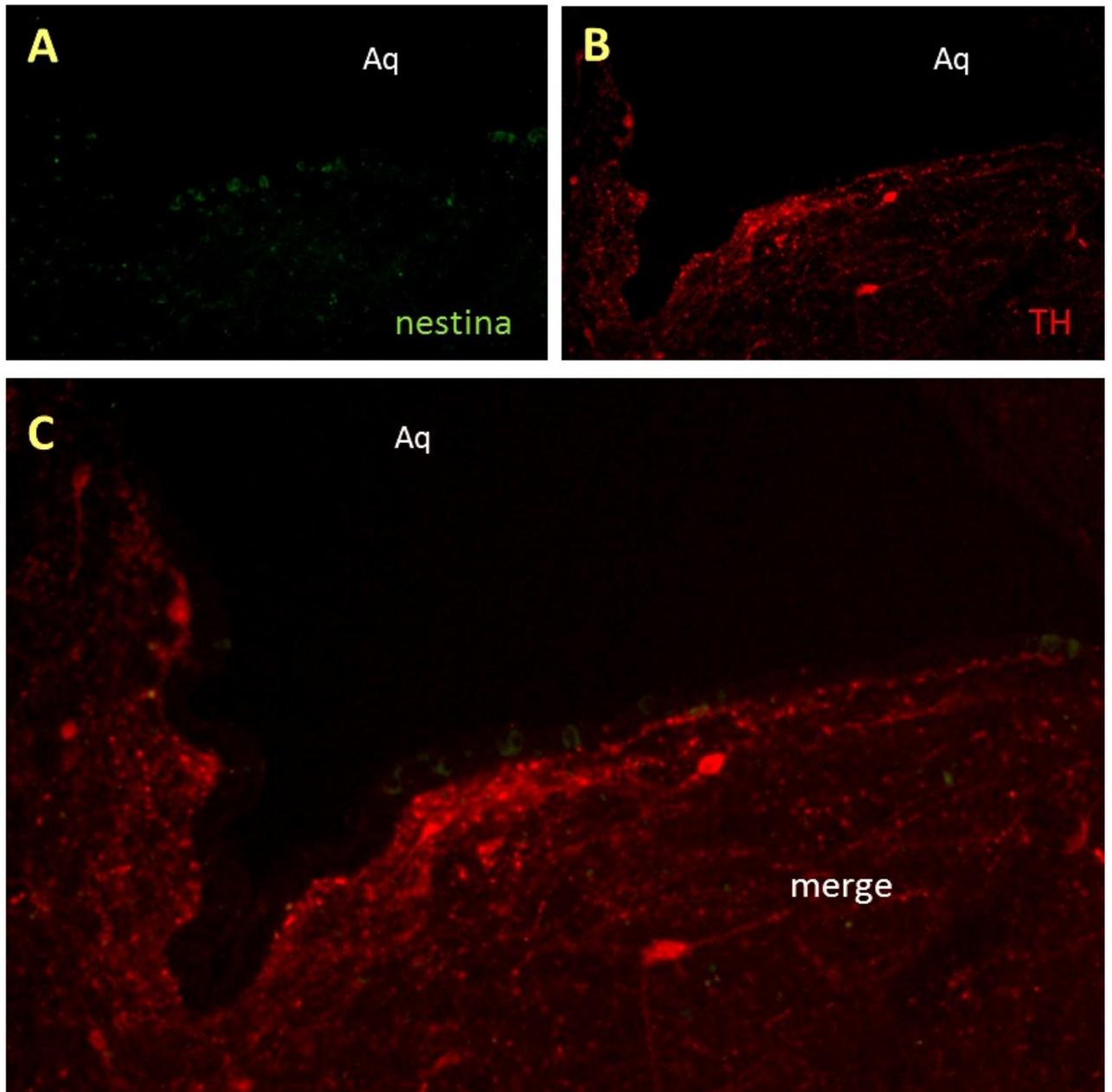


Figura 57. Acueducto de Silvio. Se detecta un mayor número de células nestina+ en la pared del acueducto en ratas hemiparkinsonianas. A. Inmunofluorescencia para nestina (verde) de la zona ventral del acueducto donde puede apreciarse algunos ependimocitos nestina+ en la pared del acueducto de Silvio, entre las células ependimales. B. Inmunofluorescencia para TH (rojo) de la zona ventral del acueducto, en la que se aprecia una red TH+ en las zonas subependimales. C. Superposición o merge de las imágenes A y B. D. Inmunofluorescencia para nestina (verde) de la zona dorsal del acueducto donde también se aprecian también algunas células nestina+. (Aq) acueducto de Silvio. (20x).

Por último en la zona más caudal, se ha podido detectar con claridad señal GFAP+ alrededor del acueducto de Silvio (Figura 58). Esta señal también se

observaba en zonas anteriores alrededor del tercer ventrículo y acueducto de Silvio pero no apreciable en las fotografías. Este marcador es el propio de células progenitoras tipo B, y de astrocitos. Los procesos celulares GFAP+ que se observan, se encuentran en el parénquima adyacente a la capa endimaria del ventrículo, y en algunos casos estos procesos parecen invadir dicha capa endimaria estando en contacto con el líquido cefalorraquídeo.

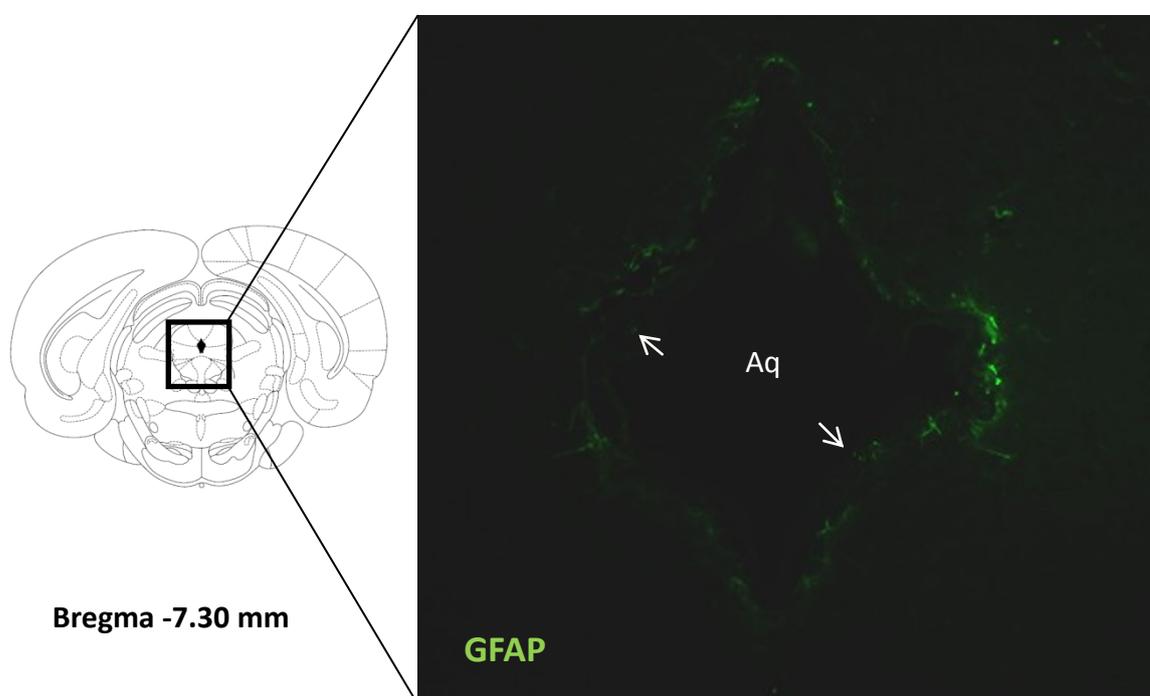


Figura 58. Acueducto de Silvio. Inmunofluorescencia GFAP (verde). Se puede apreciar los procesos celulares de células situadas en el parénquima adyacente a la capa endimial. La imagen se corresponde con la porción remarcada en la lámina extraída del Atlas estereotáxico Paxinos y Watson (2005) donde se muestra la zona de observación con la coordenada estereotáxica AP al Bregma. Las flechas blancas señalan puntos donde los procesos celulares atraviesan la capa de endimocitos hasta el ventrículo. (Aq) acueducto de Silvio. 20X.

3. Ratas hemiparkinsonianas adultas con tratamiento cannabinoide.

Las ratas Wistar fueron sometidas a una operación estereotáxica en la que se les colocaba dos cánulas permanentes en el cerebro, una en el ventrículo

lateral izquierdo (coordenadas AP -0.8, L +1.4, V-3.4 Paxinos y Watson) y otra cánula en la sustancia negra izquierda (coordenadas AP -3.4, L +2.2, V -8.2 Paxinos y Watson). 4 días después de la operación, se realizaron las inyecciones del toxico y el cannabinoide a través de las cánulas, tal y como se explica en Materiales y Métodos (Figura 59).

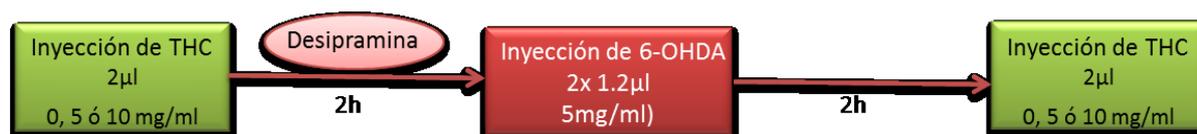


Figura 59. Protocolo de tratamiento con THC y 6-OHDA.

Catorce días después se hicieron los test de amfetamina para comprobar el estado hemiparkinsoniano propio del modelo de experimentación. Los animales se perfundieron con PFA 4% a los 2 días del test. Se extrajeron los cerebros, y fueron laminados en corte coronales de 20 μm , para realizar inmunofluorescencia con los diferentes anticuerpos. En estos grupos también se aplicó el doble-ciego, y la norma de realizar la inmunofluorescencia con al menos un animal de cada grupo a la vez para evitar en la medida de lo posible artefactos o falsos negativos por fallos humanos en el manejo de los anticuerpos.

3.1. Ratas con doble cánula Sham para el parkinsonismo y control para el tratamiento cannabinoide (0 mg/ml THC).

No se han encontrado células inmunopositivas para ninguno de los marcadores usados a excepción del marcador de células catecolaminérgicas,

tirosina-hidroxilasa en las localizaciones habituales. Y una señal muy reducida de algunas células nestina + en las paredes de los ventrículos.

3.2. Ratas con doble cánula Sham para el parkinsonismo y dosis de 5 mg/ml THC intraventricular.

No se han encontrado células inmunopositivas para ninguno de los marcadores usados a excepción del marcador de células catecolaminérgicas, tirosina-hidroxilasa en las localizaciones habituales. Y una señal muy reducida de algunas células nestina + en las paredes de los ventrículos.

3.3. Ratas con doble cánula Sham para el parkinsonismo y dosis de 10 mg/ml THC intraventricular.

No se han encontrado células inmunopositivas para ninguno de los marcadores usados a excepción del marcador de células catecolaminérgicas, tirosina-hidroxilasa en las localizaciones habituales, y una señal muy reducida de algunas células nestina + en las paredes de los ventrículos.

3.4. Ratas hemiparkinsonianas y control para el tratamiento cannabinoide (0 mg/ml THC)

Entre los animales hemiparkinsonianos que fueron inyectados intracranealmente con 2 μ l de alcohol puro, 2 horas antes y después de la lesión con 6-OHDA, pudieron apreciarse cambios con respecto a los animales que solo fueron lesionados en la sustancia negra. En primer lugar ya al principio de la zona de estudio de esta tesis, en la última porción del tercer ventrículo aparece nuevamente abundante señal nestina+ en el Núcleo Arcuato. Del mismo modo

que se observó en crías de Wistar sin tratar existen neuronas nestina positivas en la pared endodimensional (figura 60), con largos procesos también nestina+ que recorren el Núcleo Arcuato y en algunos casos llegan hasta la eminencia media.

Teniendo en cuenta que los animales fueron sacrificados 17 días después de la operación, como en el caso de las ratas hemiparkinsonianas, debemos suponer que o bien el hecho de inyectarle directamente en el ventrículo alcohol o bien el hecho de tener durante los 17 días las cánulas implantadas en ambas regiones cerebrales han provocado la alta activación que observamos en el núcleo arcuato.

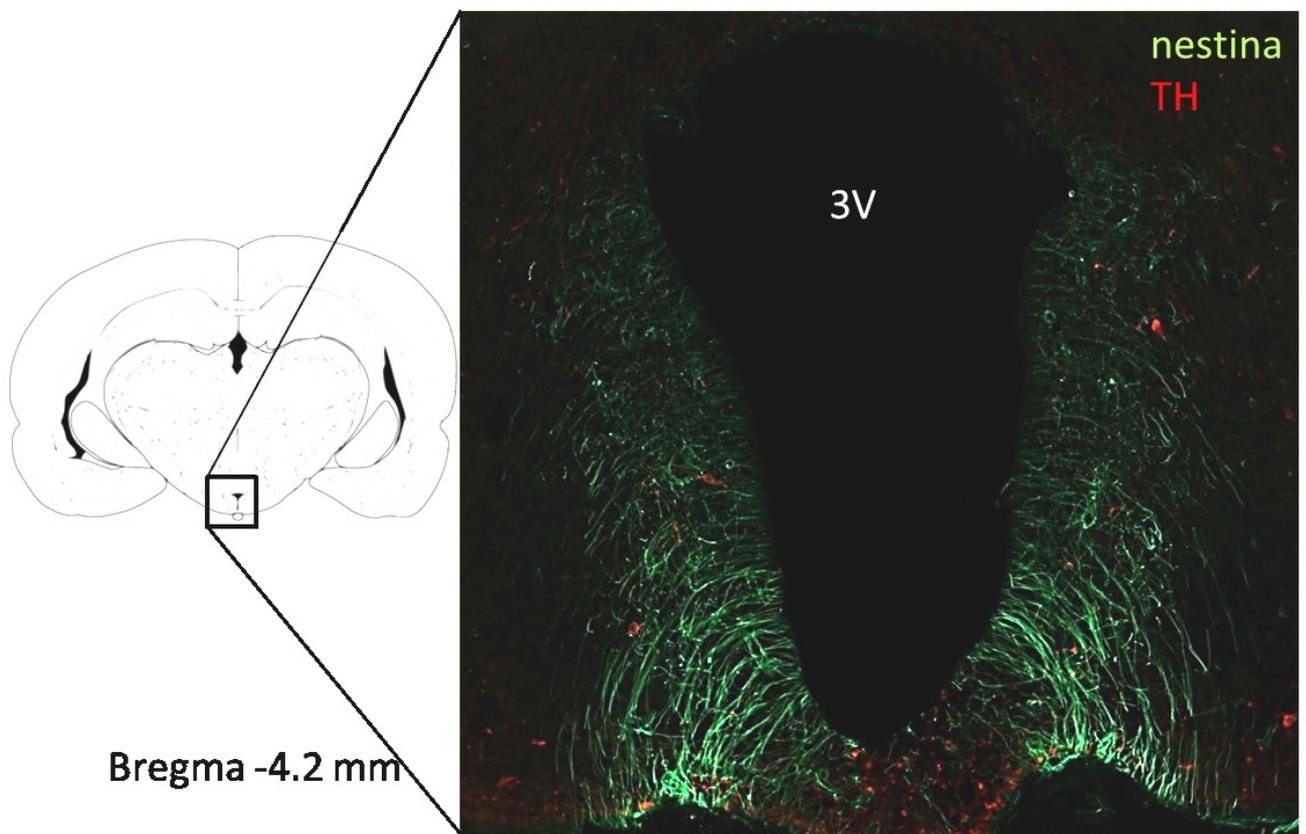


Figura 60. Núcleo Arcuato. Superposición o merge de nestina (verde) y TH (rojo), del 3er ventrículo al nivel representado en la lámina del Paxinos y Watson (2005) a - 4.2 mm de la referencia estereotáxica craneal Bregma en el eje AP. Puede apreciarse numerosos procesos celulares nestina+ que parten desde la capa endodimensional del ventrículo. Se aprecian también las neuronas TH+ propias de la zona, que en ningún caso colocaliza con la señal de nestina. 20X. (3V) tercer ventrículo.

Es interesante, denotar aquí que el Núcleo Arcuato presentaba en las crías de Wistar abundantes neuronas nestina positivas en toda la pared del tercer ventrículo, y exhibían también procesos neurales positivos para nestina, que recorrían todo el núcleo hipotalámico. Esta señal parecía haberse perdido en los animales adultos, ya que en el caso que existieran células nestina+ estas no fueron suficientes para ser documentadas.

Ya que el modelo habitual de hemiparkinsonismo, no provocó la reactivación, hemos de suponer que la reactivación de las células con característica de progenitoras en este núcleo se ha producido o bien por el efecto sinérgico del hemiparkinsonismo y el posible daño que el alcohol haya podido provocar; o bien el efecto sinérgico del hemiparkinsonismo más el daño mecánico que las cánulas ejercen en las regiones de inserción; o, claro está, al efecto de los tres sucesos combinados, porque lo que es obvio es que no se debe solo al hemiparkinsonismo (los animales de este con hemiparkinsonismo estable lo corroboran), ni se debe a la simple inserción de las cánulas (todos los animales de esta sección las llevan, y ninguno de los grupos Sham presentaban nestina en el tercer ventrículo), ni tampoco es la inyección intraventricular con alcohol ya que se hizo otro grupo al que se le inyectó también alcohol puro, y no produjo este efecto.

Continuando en el eje AP observamos que nuevamente aparecen células nestina positivas entre las células que conforman el Órgano Subcomisural (Figura 61 y 62). En la zona más dorsal del tercer ventrículo, en el corte coronal situado a - 6.68 mm de Bregma en el eje AP, aparecían nuevamente que expresaban microfilamentos de nestina entre las células que forman el SCO. Estas células, son tanicitos ya que presentan largos procesos, que al igual que en el caso de las crías Wistar se dirigen hacia el hipocampo, introduciéndose en el parénquima de la comisura posterior. En el mismo corte coronal se apreciaban también gran cantidad de endimocitos cuboides nestina +, al igual que en las hemiparkinsonianas. Del mismo modo que ya pudimos observar en estas últimas hay numerosas neuronas TH+ en la PAG. Las neuronas TH+ que se encuentran en

la PAG presentan dos morfologías y localizaciones diferentes. Unas pequeñas llamadas periacueductales, que se localizan inmediatamente por debajo de la capa ependimal. Éstas presentan procesos largos que rodean a la capa ependimal paralelas al ventrículo. Y otra llamadas multipolares, más grandes y alejadas del ventrículo.

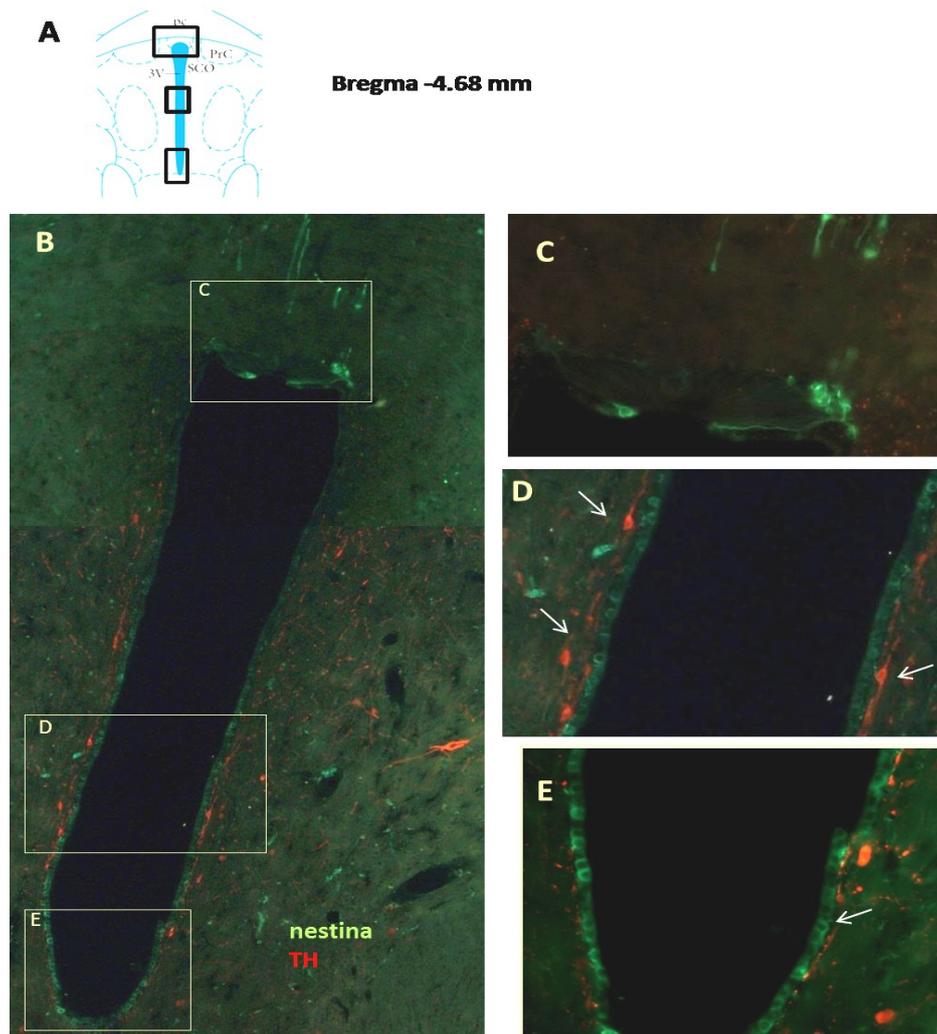


Figura 61. Tercer ventrículo de ratas Wistar hemiparkinsonianas, control del tratamiento cannabinoide. A. Esquema extraído del Atlas estereotáxico Paxinos y Watson (2005), que representa la zona de estudio con la coordenada AP en relación a Bregma. B. Superposición o merge del Tercer ventrículo para nestina (verde) y TH (rojo), 20X. No se aprecien colocalización de la señales. C. Órgano Subcomisural con señal nestina + de los tanicitos que conforman esta glándula, pueden apreciarse también los procesos de estas células nestina +, 40X. D. Sección del tercer ventrículo. Se observan algunos ependimocitos nestina positivos, y células pequeñas periventriculares TH+ (flecha blanca), con largos procesos paralelos al ventrículo 40X. E. Sección ventral del Tercer ventrículo. Se observan mayoría de células nestina + en la capa ependimal, y Células TH+ en el parénquima adyacente con procesos paralelos al ventrículo. 40X. (PrC) Núcleo Precomisural. (3V) tercer ventrículo. (SCO) Órgano Subcomisural. (pc) comisura posterior.

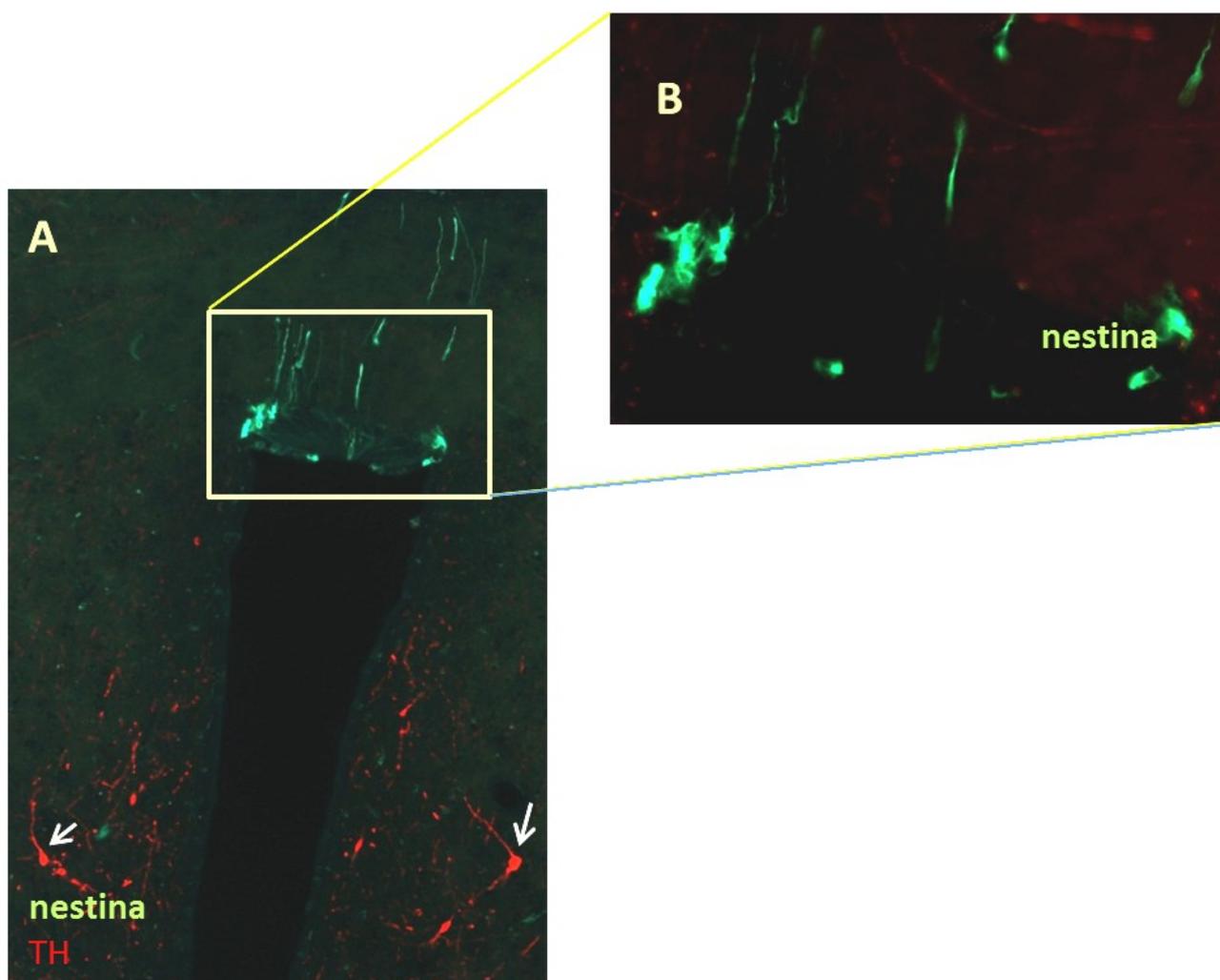
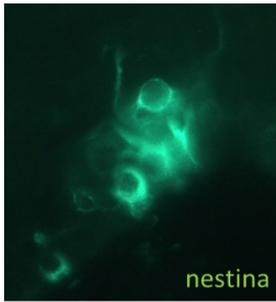


Figura 62. Órgano Subcomisural. A. Superposición o merge de nestina (verde) y TH (rojo) de la última porción del tercer ventrículo, se aprecia los tanicitos nestina+ del SCO, con largos procesos celulares nestina + que se dirigen hacia el hipocampo. También en la PAG pueden apreciarse neuronas multipolares grandes inmunopositivas para TH+.20X. B. Órgano Subcomisural. Se pueden ver las células nestina +, con sus largos procesos celulares dirigidos hacia el hipocampo. 40X.

En localizaciones más caudales, ya en el mesencéfalo, se observa una gran activación de células ependimales, que presentaban microfilamentos de tipo nestina (Figura 63). En las células ependimales que forman el acueducto de Silvio puede apreciarse que hay dos tipos de señal positiva para nestina:

Por un lado podemos observar que entre los ependimocitos cuboides típicos hay mucho nestina positivos bordeando el acueducto. Alguno de ellos además han desarrollado pequeños procesos celulares que penetran en el parénquima adyacente dirigidos hacia la red TH+ anexa al acueducto.



Y por otro lado existe otra población diferente de nestina positivas localizadas en la zona dorsal del acueducto. A esta zona se le conoce con el nombre de Receso Colicular (CR). Las neuronas que se encuentran en esta región tienen un aspecto más redondeado, y podemos encontrarlas tanto en la capa endotelial como en el parénquima adyacente, pudiendo ser estas últimas neuronas generadas recientemente en disposición de migrar hacia su órgano diana. En estos animales a los que se les implanto la doble cánula y que fueron inyectados intracranalmente con el tóxico 6-OHDA en la Sustancia Negra por un lado, y alcohol en los ventrículos por otro, han sido los primeros en los que hemos podido observar células nestina + esta localización tan caudal del CR. Además la citoarquitectura de las mismas (véase fotografía de la izquierda) también difiere de lo que hemos apreciado hasta ahora.

Por otro lado, en cuanto a la señal TH, esta sigue el patrón habitual para esta región del cerebro, con células periacueductales pequeñas, con procesos que bordean la capa endotelial desde el parénquima; y una red TH+ localizada en el parénquima en la zona ventral del acueducto y que se dirige hacia el ATV.

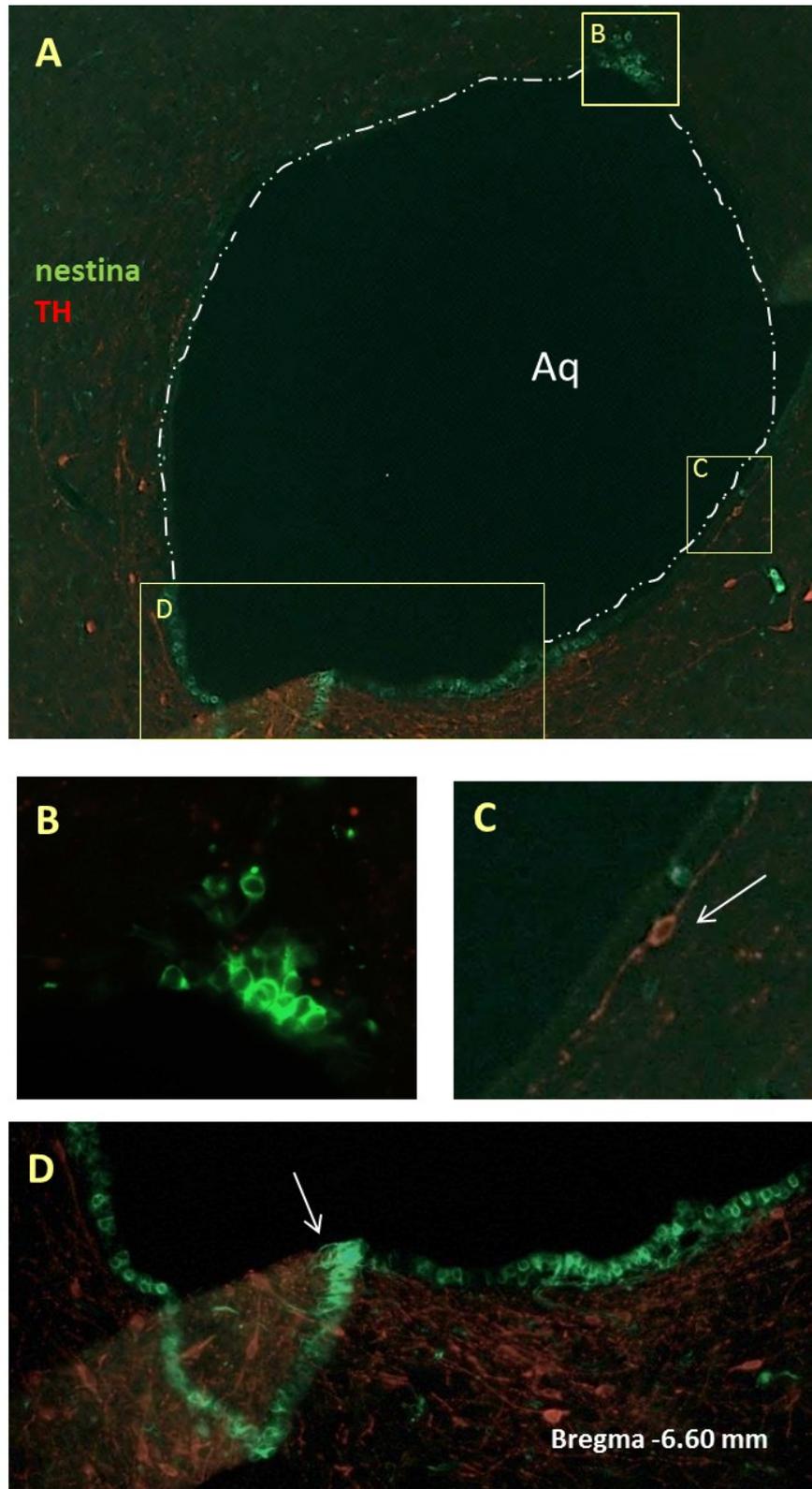


Figura 63. Acueducto de Silvio. Superposición o merge de nestina (verde) y TH (rojo), del acueducto de Silvio en el corte coronal alejado 6.60 mm de Bregma, en ratas con doble cánula hemiparkinsonianas, con tratamiento de 2 μ l de 0 mg/Kg THC en los ventrículos, 2 horas antes y después de la lesión. A. acueducto de Silvio 20X. B. Detalle de la zona dorsal del acueducto de Silvio que se corresponde con el Receso Colicular, con varias células nestina+. 40X. C. detalle de una porción lateral del acueducto donde se puede ver una célula periacueductal TH+ (flecha blanca), con los procesos celulares TH+ abrazando la capa endotelial. 40X. D. porción ventral del acueducto de Silvio, donde se observan múltiples endotelimocitos nestina positivos, en

algunos casos con procesos nestina+ introduciéndose en el parénquima anexo hacia la red TH+ adyacente. 40X.

Hacia el final de la zona de estudio en el eje AP, además de la señal nestina+ en muchos de los endimocitos del acueducto de Silvio se ha visto una modificación de estos endimocitos que desarrollan en algunos casos pequeños procesos (Figura 64). Estas neuronas podrían tratarse de endimocitos progenitores que modifican su morfología hacia tanicitos, para poder dirigir mediante los procesos celulares las células de nueva generación.

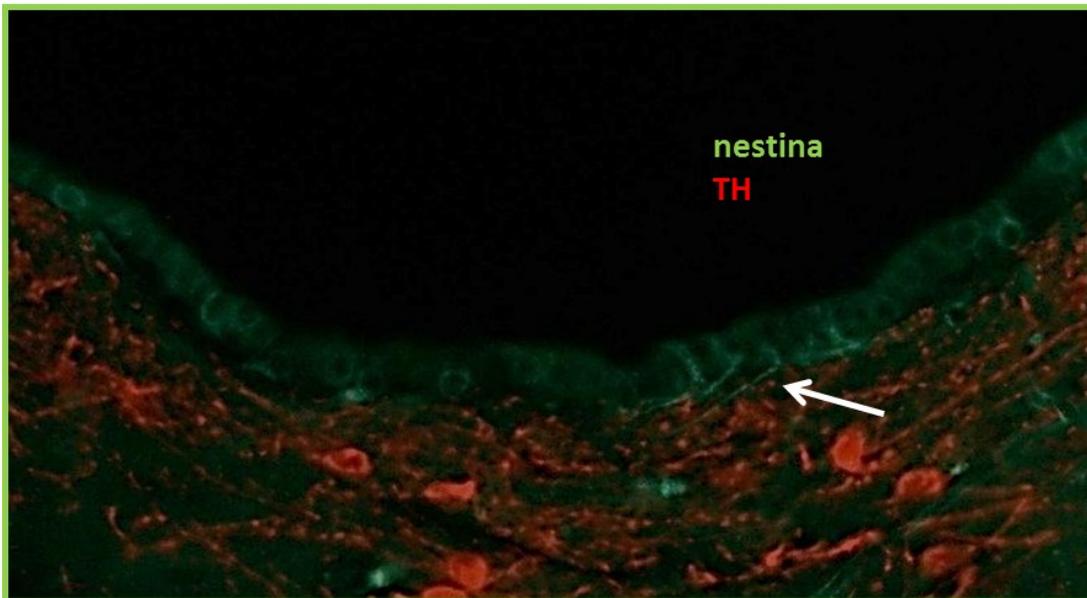
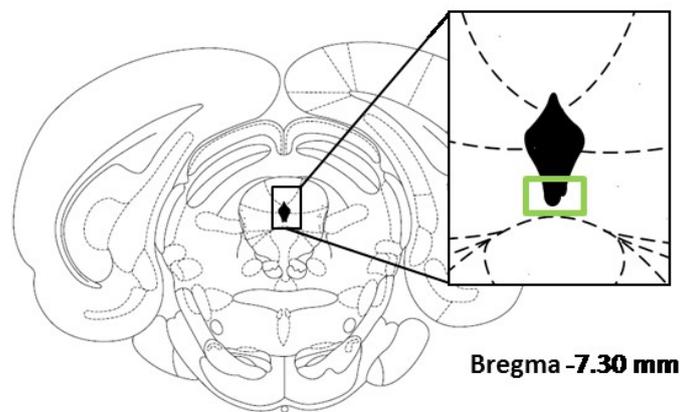


Figura 64. Acueducto de Silvio. Superposición o merge de nestina (verde) TH (rojo), del acueducto de Silvio en el corte coronal alejado 7.30 mm de Bregma, en ratas con doble cánula hemiparkinsonianas, con tratamiento de 2 μ l de 0 mg/ml THC en los ventrículos, 2 horas antes y después de la lesión. La lámina extraída del atlas estereotáxico Paxinos y Watson (2005) representa la porción que podemos ver en la fotografía. Esta porción representa la porción ventral de la capa endimaria, Y puede verse endimocitos nestina cuboides típicos y algunos con pequeños procesos celulares dirigidos hacia la red TH+ adyacente (flecha blanca). 40X.

3.5. Ratas hemiparkinsonianas y dosis de 5mg/ml THC intraventricular

Entre los animales hemiparkinsonianos que fueron inyectados intracranealmente con 5 mg/ml, 2 horas antes y después de la lesión con 6-OHDA, se observaron también cambios con respecto a los animales que solo fueron lesionados en la sustancia negra. En primer lugar en la última porción del tercer ventrículo aparece nuevamente numerosas neuronas nestina+ entre las células que conforman el SCO (figura 65), aunque en este caso, no encontramos en ninguno de los cortes de los diferentes animales de este grupo, una vía craneal nestina+ de los procesos de estas células, tan claramente como ocurriría en el caso de las crías de rata o en los animales tratados solo con el vehículo de la solución THC, es decir, alcohol.

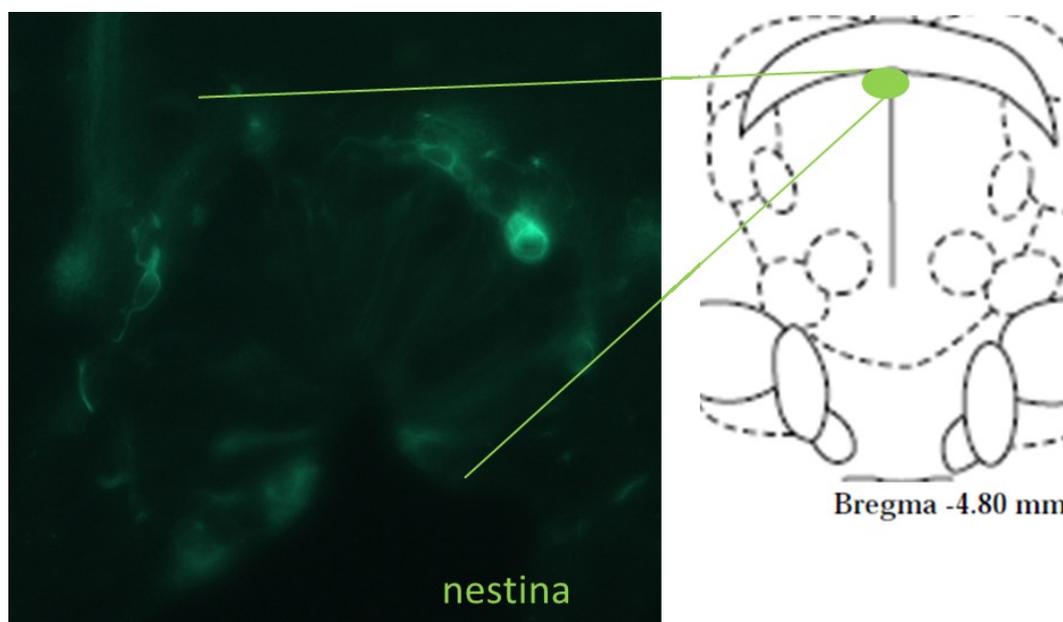


Figura 65. Organismo subcomisural. Células nestina positivas conformando el OSC en la última porción del tercer ventrículo en su unión con el acueducto mesencefálico. 40X

En este grupo de animales, si pudimos volver a observar el receso colicular del acueducto de Silvio con un significativo número de células con microfilamentos de nestina. De hecho en estos animales se apreciaba a diferentes alturas en el eje AP, que entre las neuronas nestina positivas localizadas en el Receso Colicular (RC), existían algunas neuronas en el parénquima adyacente. Estas neuronas, pueden ser células de reciente generación en movimiento hacia su localización diana (Figura 66).

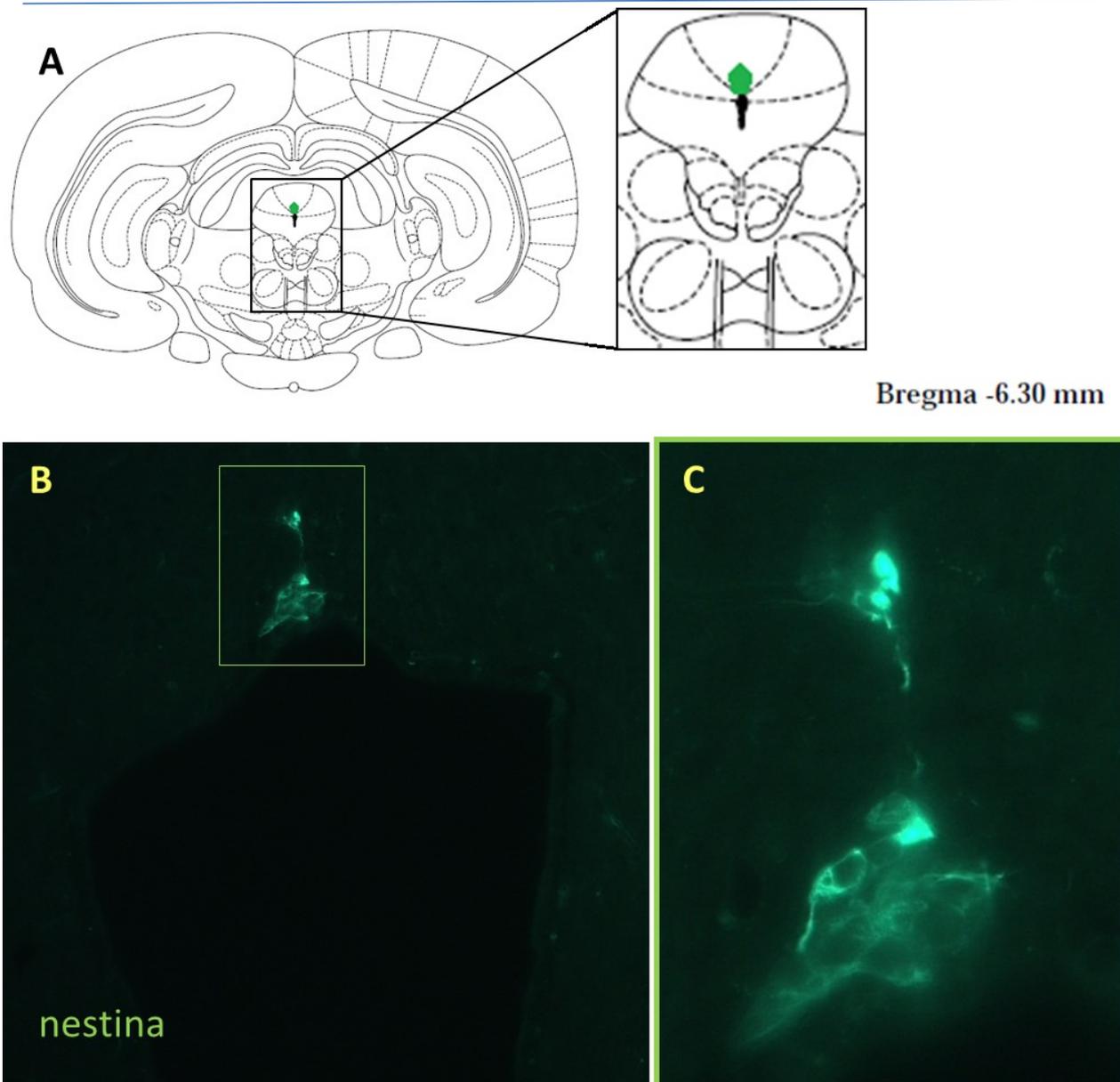


Figura 66. Receso colicular en el acueducto de Silvio. A. Lamina extraída del Atlas estereotaxico Paxinos y Watson (2005), que representa la zona de estudio. B. imagen del acueducto de silvio con inmunofluorescencia nestina 20X. C. detalle del recuadro remarcado en la imagen B, donde puede apreciarse a mayor aumento el Receso colicular marcado positivamente para nestina, con neuronas en el parenquima adyacente que parecen de reciente generaci3n dirigiendose hacia la zona dorsal.

Este patr3n de c3lulas con microfilamentos de nestina, que parecen escapar del grupo ubicado en el RC, se repetía a diferentes coordenadas en el eje AP en toda la longitud del ventrículo mesencefálico o acueducto de Silvio, e incluso en alguna ocasi3n pudimos ver un grupo de neuronas nestina + que se encontraban en el par3nquima adyacente al acueducto, pero en localizaciones laterales con respecto al ventrículo (figura 67), en lugar de la típica localizaci3n

dorsal. En este caso se apreciaban células redondeadas, con somas pequeños y pequeños procesos que si bien no nos podemos aventurar a decir que estén en movimiento, si podemos apreciar que se localizan en el lado más cercano al punto de inserción de la cánula. Entonces, estas células, podrían ser neuronas progenitoras activas o células generadas recientemente que aún no han sufrido la diferenciación a neuronas maduras. Y esta proliferación emergente podría haberse provocado por el daño mecánico que este cuerpo extraño, producía en el cerebro del animal.

Cambiando de anticuerpo, mediante el uso del Anticuerpo PSA-NCAM, un marcador para células en movimientos, se pudo comprobar la existencia de células TH+ en movimiento. En estos animales que llevaban la doble cánula implantada y que además del hemiparkinsonismo, habían experimentado las inyecciones ventriculares de THC (5mg/ml en alcohol), podemos ver que en el parénquima adyacente al acueducto de Silvio, algunas de las neuronas TH+ periventriculares coexpresan PSA-NCAM. Esta colocación de los marcadores TH y PSA-NCAM significa que dichas neuronas dopaminérgicas eran de reciente generación y se encontraban en movimiento dirigiéndose hacia su destino diana. Este tipo de señal ya fue visible en los animales con hemiparkinsonismo, provocado por operación estereotáxica simple, pero no, en los animales con doble cánula hemiparkinsonianos y control para el tratamiento cannabinoide.

Parece pues que, de alguna manera la inyección de alcohol en hemiparkinsonianas ya sea por efecto de la cánula, el efecto del alcohol, o por la combinación de ambos, activaba los hipotéticos centros neurogénicos pero las células progenitoras no efectuaban la debida mitosis asimétrica para generar células que pudiesen diferenciarse a algún componente del sistema nervioso, y solo generarían más células progenitoras. Y a la luz de estos resultados podríamos concluir que la inyección del cannabinoide a una concentración de 5 mg/kg, o bien

revierte el daño que el alcohol pudiese generar o bien provoca la diferenciación de los neuroblastos a células maduras del sistema nervioso.

Además de la expresión de PSA-NCAM en Las neuronas dopaminérgicas, se aprecia señal PSA-NCAM en algunas células en el parénquima adyacente al acueducto, que no expresan TH. Estas pueden ser o bien otro tipo de célula, o bien células de reciente generación que aún no han adquirido la señales propias de células diferenciadas.

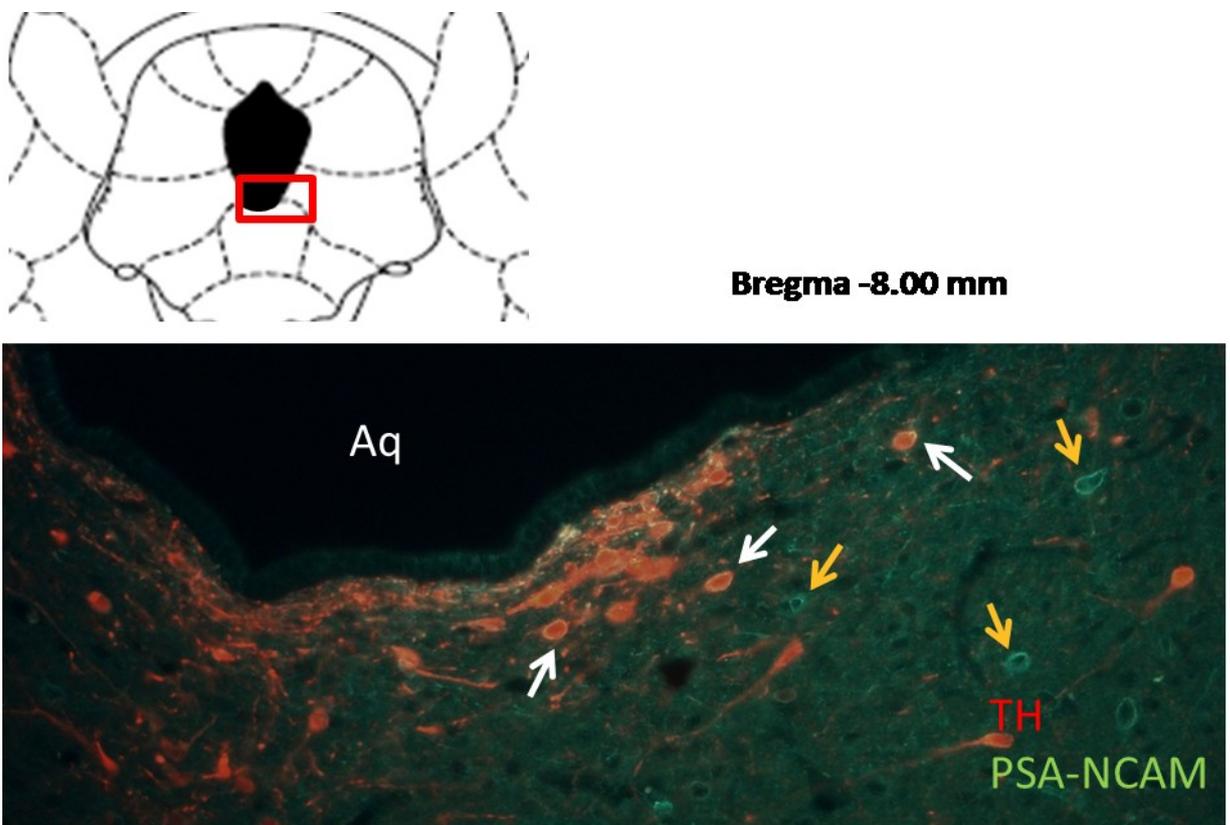


Figura 67. Acueducto de Silvio. Zona ventral del acueducto de Silvio, representado en el esquema extraído del atlas estereotáxico Watson y Paxinos (2005). La imagen es una superposición o merge de PSA-NCAM (verde) y TH (rojo). Puede apreciarse que existen algunas neuronas donde colocaliza la señal (flechas blancas). También se observan algunas células que solo muestran expresión de PSA-NCAM (flechas amarillas). 20X

Fue interesante observar la zona dorsal del acueducto de Silvio bajo la doble inmunofluorescencia realizada con PSA-NCAM y TH, ya que podía apreciarse en esta localización que ya no existía colocalización de ambos marcadores. De hecho no suele aparecer señal TH+ en esta zona dorsal del

acuoducto. Aun así en esta región se observaron también células que debían de estar en movimiento alrededor del acuoducto, hacia los laterales y a direcciones más dorsales (figura 68). También llamaba favorablemente la atención comprobar que en la zona donde se localiza el receso colicular, que en este grupo de animales sabemos activo, no aparecía señal PSA-NCAM. Luego podemos pensar que las células nestina+ que hemos observado en toda la longitud del CR, son células progenitoras, que pueden generar neuroblastos que migren y se diferencian hacia algún tipo celular que en algunos casos pueden ser dopaminérgicas. El éxito de la sucesión de acontecimientos, que lleve a células inmaduras a madurar favorablemente hacia células funcionales en una región concreta del cerebro, queda aún en el desconocimiento.

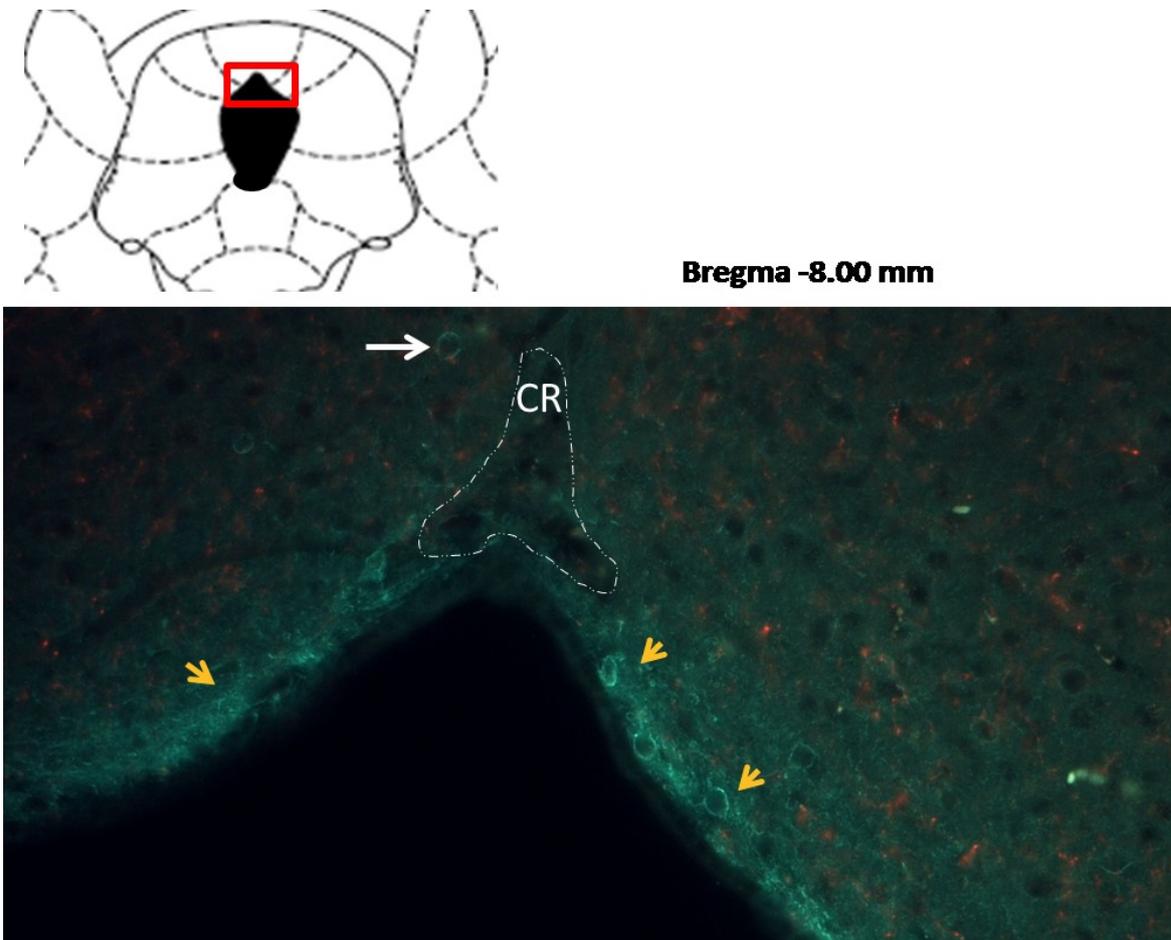


Figura 68. Acuoducto de Silvio. Zona dorsal del acuoducto de Silvio, representado en el esquema extraído del atlas estereotáxico Paxinos y Watson, por un recuadro rojo. La imagen es una superposición o merge de PSA-NCAM (verde) y TH (rojo). Se ha remarcado en línea discontinua blanca el receso colicular (CR). Puede apreciarse que existen algunas PSA-NCAM que parecen migrar hacia la zona dorsal (flechas blancas) y otras PSA-NCAM que parecen migrar alrededor del acuoducto (flechas amarillas). 20X

En ninguno de los casos pudimos observar marcaje positivo de nestina, ni de PSA-CAM, ni GFAP, en las Sustancia Negra ni en localizaciones cercanas (figura 69).

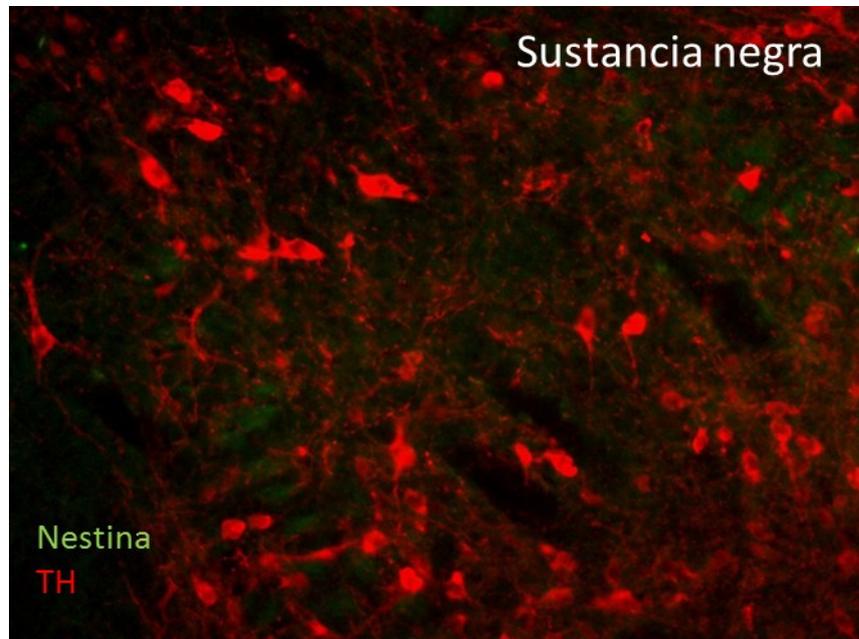


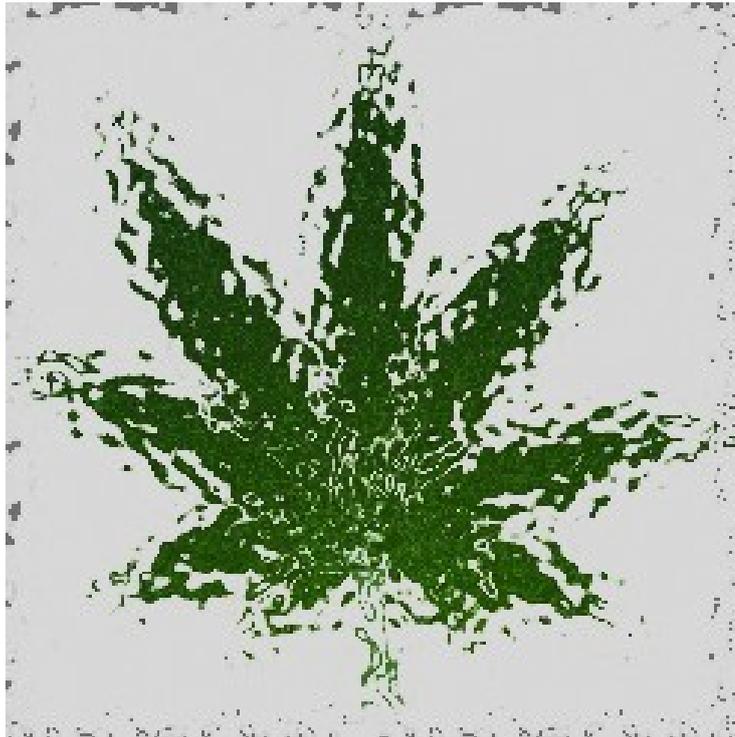
Figura 69. Sustancia Negra. Superposición o merge de nestina (verde), y TH(rojo), donde se observan las típicas neuronas dopaminérgicas de este núcleo del cerebro. 20X.

3.6. Ratas hemiparkinsonianas y dosis de 10 mg/ml THC intraventricular.

Entre los animales con doble cánula, a los que se le inyectó intracranalmente 6-OHDA en la sustancia negra, según el modelo de hemiparkinsonismo y 2 μ l de THC a una concentración de 10 mg/ml en el ventrículo lateral izquierdo 2 horas antes y después de la inyección del tóxico, no se han encontrado resultados relevantes. Aunque, si bien es verdad, que los animales se sacrificaron sin conseguir que presentaron en el test de amfetamina un giro adecuado propio de un hemiparkinsonismo estable, en ninguno de los animales que componían este grupo de experimentación.

Debido a que ninguno de los animales superó en el test de amfetamina los 420giros/hora mínimos requeridos para un apropiado patrón de giro, los animales se sacrificaron para aclarar si el problema radicaba en una inadecuada implantación de las cánulas. Y tras comprobar que la inserción de éstas era correcta se les realizó la inmunofluorescencia con los diferentes anticuerpos para comprobar si la falta de evidencias de lesión nigrica se debía a una muy incrementada proliferación celular que compensara los efectos nocivos del tóxico.

Por un lado podemos corroborar que esta hipótesis no era cierta, ya que no pudimos encontrar de hecho señales significativas para ninguno de los marcadores usados a excepción de la señal de tirosina-hidroxilasa en las localizaciones habituales, y una irrisoria señal nestina + entre los endimocitos ventriculares. Por otro lado, la falta de giro pudiera deberse a hipersensibilización del receptor dopaminérgico D2 en el estriado ipsilateral a la sustancia negra dañada. Aunque esto es un fenómeno habitual de compensación que suele ocurrir en cierto grado en este modelo de parkinsonismo animal, es anormal que ocurra tan exagerado en un tiempo tan reducido (ninguno de los animales superó los 50 giros/hora, después de 14 días tras la operación). También podría deberse al efecto reductor que el cannabinoide tiene *per se*. Y teniendo en cuenta que la lesión que se intenta producir en este modelo es de origen oxidativo, esta hipótesis sería adecuada. Pero para ello debemos suponer que el cannabinoide una vez inyectado en el ventrículo lateral viaja por el LCR y penetra por el acueducto de Silvio hacia el parénquima, llegando a la SN.



DISCUSIÓN

Efecto motor de inyecciones intraestriatales de Δ^9 -THC y ligandos dopaminérgicos D3 en ratas hemiparkinsonianas.

Los estudios de la presente tesis doctoral con inyecciones intracerebrales con THC demuestran que este cannabinoide es capaz de disminuir la tasa de giro inducida por amfetamina, en ratas hemiparkinsonianas. Por tanto, el THC aumenta el tono funcional del estriado dañado, donde es inyectado, probablemente aumentando la liberación de dopamina de las terminales del mismo. Este efecto debe estar mediado por su acción sobre receptores CB1, y además se sabe que la lesión con la neurotoxina 6-OHDA es capaz de regular al alza dichos receptores en el estriado (Romero y cols, 2000). Estos receptores se localizan de modo presináptico en las terminales dopaminérgicas nigroestriadas o postsináptico en las propias neuronas estriatales que expresan D1R o D2R. Considerando que la acción CB1 agonista es capaz de inhibir la liberación de dopamina (Sañudo-Peña y cols., 1999), es más probable que los efectos motores sean debidos a la acción sobre las neuronas de la vía directa principalmente, que expresan D1. El efecto motor del THC en ratas normales es bifásico, pues a bajas dosis incrementa la actividad motora, y a dosis más altas induce inmovilidad e incluso catalepsia (Fride y cols., 1994; Rodríguez de Fonseca y Navarro, 1998). Algo similar sucede en ratas parkinsonianas, con un claro efecto bifásico, pues dosis más altas no son efectivas o inducen hipomotilidad. Se sabe que la acción hipercinética de los cannabinoides se acompaña de un incremento del consumo cerebral de 2-deoxi-glucosa, mientras que sucede lo contrario a altas dosis inductoras de catalepsia (Margulies y Hammer, 1991).

Se ha observado que la acción directa sobre receptores D3 no tiene efecto sobre el giro de ratas hemiparkinsonianas. Estos receptores son expresados en el estriado principalmente por neuronas de la vía directa con D1R, aunque en poca cuantía. La lesión dopaminérgica con 6-OHDA aumenta la funcionalidad de D1R y regula al alza a los receptores D2, pero parece ser que

no hay un mayor efecto mediado por D3R, según nuestros datos. La hipersensibilidad dopaminérgica tras 6-OHDA parece ser debida a una regulación al alza de receptores D_2 , y aumento de la actividad de las vías de transducción acopladas a los receptores D_1 sin regulación al alza de receptores (Schwartzing y Huston, 1996). Este fenómeno se desarrolla progresivamente tras la degeneración dopaminérgica estriatal (Morelli y Di Chiara, 1987), y parece ser un mecanismo compensador que participaría en la recuperación parcial del tono dopaminérgico, y que podría explicar el retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad de Parkinson en el ser humano (Schwartzing y Huston, 1996).

Sin embargo los datos permiten afirmar que el THC actúa en cierto modo a través de receptores D_3 , pues el el agonista D_3R PIPAT aumenta el efecto del THC, pero el antagonista D_3R GR103691 es capaz de disminuir el efecto motor del THC. Parece ser que el THC tiene un cierto efecto agonista sobre D_3R que debe ser pequeño, considerando la baja expresión estriatal de D_3R , y que pocas dosis son efectivas en dicha interacción. Además el efecto es bifásico, algo común en las interacciones cannabinoideas. Los CB_1R y D_3R son co-expresados por las terminales aferentes dopaminérgicas del estriado dorsal y ventral, donde modulan la liberación de dopamina de modo conjunto. Al igual que CB_1R , el receptor D_3 es un autorreceptor que regula la síntesis y la liberación de dopamina, a través de mecanismos como la inhibición de la formación de AMPc, la reducción de corrientes de Ca^{2+} que fluyen a través de canales activados por voltaje y la potenciación de corrientes saliente de K^+ , efectos todos mediados por proteínas *Gai/Gao* (Mestikawy y cols., 1986; Akaoka y cols., 1992). A nivel funcional se sabe que existe interacción entre el sistema cannabinoide CB_1 , y los receptores D_3 . Los ratones mutantes carentes de D_3R tienen niveles de cannabinoideas alterados en hipocampo, núcleo accumbens, amígdala y estriado dorsal (Micale y cols., 2009). Los datos permiten afirmar que existe una interrelación funcional, a nivel estriatal, entre los receptores cannabinoideas CB_1 , y los receptores D_3 .

Efecto Bifásico del Δ^9 -THC en la supervivencia de neuronas de la sustancia negra en cultivos. Papel diferencial de los receptores CB₁, PPAR- α y TRPV1.

Los datos del presente trabajo indican que el cannabinoide delta-9-tetrahidrocannabinol tiene efectos bifásicos sobre la supervivencia de neuronas nigricas, confirmando datos anteriores (Mechoulam y cols., 2002; Downer y cols., 2007; Pope y cols., 2010) que muestran que el THC posee efectos tanto neurotóxicos como neuroprotectores. Se observa que el THC per se es citotóxico a una alta dosis (6 μ M), efecto que debe incluir tanto a las neuronas dopaminérgicas como no dopaminérgicas nigricas. Las neuronas dopaminérgicas se sometieron a estrés oxidativo con 6-OHDA, y el THC ejerció neuroprotección a bajas dosis (30 y 300 nM), y la dosis alta de 6 μ M era citotóxico. Considerando que la toxina 6-OHDA es tóxica en roedores porque induce la generación de especies reactivas de oxígeno o ROS (Ben-Sachar y cols., 1991; Cadet y cols., 1989; Cohen y cols., 1976; Schwarting and Huston, 1996), los efectos neuroprotectores del THC podrían estar mediados por su conocida eficacia antioxidativa.

Respecto a la citotoxicidad, el THC se ha mostrado citóxico contra diversos tipos celulares. Esta acción depende del tipo celular, y el THC ejerce efectos apoptóticos y necróticos (de Petrocellis y cols., 1998; Galve-Roperth y cols., 2002; Powles y cols., 2005). El trabajo revela que el THC es tóxico para neuronas nigricas a 6 μ M. En línea con lo propuesto por Powles y cols (2005), el receptor CB₁ parece no estar involucrado en dichos efectos, porque la citotoxicidad del THC permanecía en cultivos de neuronas sin CB₁R. Además los receptores PPAR- α y TRPV1 tampoco están involucrados porque la citotoxicidad permanecía en cultivos tratados con antagonistas o de ratones carentes de los receptores. Se observó también que la falta de TRPV1, pero no CB₁R o PPAR- α , aumentaba la muerte basal celular en los cultivos, confirmando la importancia de

los receptores vanilloides tipo 1 en la respuesta normal al estrés celular (Beltowski y cols., 2002).

Respecto a los efectos neuroprotectores contra la 6-OHDA, el THC también actúa como protector sobre diversas líneas celulares (Hampson y cols., 1998; Marsicano y cols., 2002; Gilbert y cols., 2006; Zani y cols., 2007), a través de la reducción del estrés oxidativo (Marsicano et al., 2002), un efecto no mediado por CB₁R (Lastres-Becker y cols., 2005). Esta falta de participación de CB₁R en los efectos neuroprotectores del THC fue confirmada en este estudio, porque dichos efectos permanecían en cultivos de neuronas de ratones carentes de CB₁R. La reducción del estrés oxidativo ha sido explicada por diversos mecanismos como acción antioxidativa per se (Lastres-Becker y cols., 2005), inhibición de la liberación de NO (Molina-Holgado y cols., 2003), inhibición del influjo de calcio y de la liberación de glutamato (Mackie and Hille, 1992; Shen y cols., 1996), antagonismo del receptor de interleucina-1 endógena (Molina-Holgado y cols., 2003) o de la producción de "brain derived growth factor" (BDNF) (Khaspekov y cols., 2004).

Diversos autores han propuesto que otros receptores han de estar involucrados en los efectos neuroprotectores de THC (Zani y cols., 2007), porque otros cannabinoides actúan por medio de los receptores TRPV1 o los PPARs "peroxisome proliferator-activated receptors" (O'Sullivan y cols., 2005; O'Sullivan, 2007; Alexander y Kendall, 2007; O'Sullivan y Kendall, 2009). El receptor vanilloide TRPV1 está involucrado en la protección de neuronas de dopamina, porque la activación de TRPV1 induce la muerte de neuronas mesencefálicas en cultivo e in vivo (Kim y cols., 2005, 2007; Marinelli y cols., 2006). Los datos de la presente tesis apoyan que TRPV1 está involucrado en los efectos inducidos por THC pues los efectos neuroprotectores del THC se abolían en ratones carentes de TRPV1 o en líneas celulares tratadas con el antagonista capsaicina.

El THC es también un ligando de PPAR- γ (O'Sullivan y cols., 2005; O'Sullivan, 2007; Alexander y Kendall, 2007; O'Sullivan y Kendall, 2009), y se ha propuesto que activa PPAR- α (Sun y cols., 2007). Los PPARs, incluyendo PPAR- α y PPAR- γ , juegan un papel importante en los procesos antioxidantes y antiinflamatorios (Beltowski y cols., 2002). Estos efectos neuroprotectores se asocian a un menor estrés oxidativo cerebral dependiente del incremento de numerosas enzimas antioxidantes, menor actividad de la NO sintetasa (Chen y cols., 2007), y regulación de los astrocitos y células gliales (Xu y cols., 2005, 2006). Los ligandos PPAR- α como los fibratos tienen potencial terapéutico en desórdenes neurológicos como la esclerosis múltiple (Racke y cols., 2006), Parkinsonismo (Galan-Rodriguez y cols., 2009), o encefalitis autoinmune (Diab y cols., 2004). Los datos del presente trabajo indican que el THC también actúa por medio de PPAR- α , en contra de otros trabajos (Sun y cols., 2007), porque la neuroprotección inducida por THC en los cultivos celulares se abolió tras el tratamiento con el antagonista PPAR- α selectivo GW6471 y en ratos carentes de PPAR- α .

Estudio de la capacidad psicotogénica del THC

El THC se ha relacionado con al génesis de esquizofrenia. Aunque la asociación entre cannabis y psicosis es aún un motivo de controversia, hay algunos autores que postulan la capacidad psicotogénica del cannabis y/o la capacidad del mismo como factor de riesgo por si solo o ante vulnerabilidad genética. En concordancia con ello, es un hecho conocido, que las intoxicaciones agudas por cannabis en personas sanas puede generar un cuadro psicótico, de naturaleza temporal, que cesa tras la metabolización y eliminación del principal componente psicoactivo del cannabis, Δ^9 -THC del organismo (D'Souza y cols., 2005). Además el tratamiento crónico con Δ^9 -THC produce cambios permanentes en la actividad del sistema endocannabinoide (di Marzo y cols., 2000). Los datos de la presente tesis indican que el tratamiento agudo, no

crónico, con THC es capaz de alterar la normal respuesta en el PPI, tanto a la dosis de 5 como de 10 mg/kg. Esto concuerda con el hecho que las intoxicaciones agudas con cannabis pueden generar un cuadro psicótico. El consumo crónico, sin embargo, daría lugar a fenómenos de tolerancia con normalización de la respuesta en el PPI. El aislamiento durante la infancia es también un estímulo poderoso para producir disrupción del PPI, como se ha observado en esta tesis en ratones machos y hembras.

El estudio con aislamiento combinado con tratamiento subcrónico de THC en la adolescencia y/o etapa adulta en los ratones ha dado resultados variables según el protocolo y el sexo de los animales. En hembras, no aisladas, el tratamiento adulto con el vehículo empleado para disolver el THC, o sea el alcohol, pero no el THC, induce alteración del filtrado sensorial en los animales que recibieron THC en la adolescencia, lo cual los hace más vulnerables al alcohol probablemente. También hay alteraciones del normal filtrado sensorial en los animales que reciben THC en el adulto (5 mg/kg). En las hembras aisladas, todos los tratamientos revierten la alteración del PPI inducida por el aislamiento excepto la dosis más alta de THC (10 mg/kg) dada en la etapa adulta. En los machos, sin aislamiento, ocurre igual que las hembras, el alcohol altera el PPI así como lo hace la dosis de 5 mg/kg THC en la adultez. Sin embargo, todos los tratamientos inducen hiporreactividad, lo que invalida los datos del PPI. En los machos aislados todos los tratamientos normalizan el PPI alterado por el aislamiento, sin alterarse la respuesta reactiva de sobresalto. Parece ser que tanto el THC subcrónico como el vehículo alcohol tienen efectos protectores contra la disrupción del filtrado sensorial en ratones macho aislados.

El rol del sistema cannabinoide en la génesis de esquizofrenia se puso de manifiesto en el estudio de ratones carentes de CB1R. Estos ratones presentaban un PPI alterado, además de cambios hiperreactivos. Curiosamente, el tratamiento con 5 mg/kg THC normaliza el PPI alterado en los ratones KO de CB1R. El THC modifica al sistema endocannabinoide, porque los receptores CB1

se regulan al alza en corteza prefrontal tras 5 mg/kg de THC. Además, la cuantificación mediante PCR de NAPE-PLD en corteza prefrontal y en el estriado indica que el THC a dosis de 10mg/kg disminuye la expresión del mismo en el estriado pero no en corteza prefrontal. También la enzima FAAH aumenta su expresión, medida por PCR, en corteza prefrontal y estriado dorsal tras 5 mg/kg de THC. Los datos indican que el THC a dosis de 5 pero no superiores es capaz de modificar la expresión de CB1R en corteza prefrontal, lo que podría relacionarse con los efectos psicóticos agudos de dicha dosis en concreto demostrado en el test de comportamiento. Los cambios en las enzimas NAPE-PLD y FAAH sugieren que el THC modifica la vía de síntesis y degradación de cannabinoides endógenos como anandamida. La dosis de 5 THC tiene efecto sobre todo a nivel de la degradación por FAAH, lo que también se podría relacionar con los efectos psicóticos agudos del THC a 5 mg/kg o su acción antipsicótica sobre los ratones KO de CB1R. Respecto al papel de las enzimas, la AEA se sintetiza gracias a la fosfolipasa D o NAPE-PLD (Okamoto y cols., 2007). Esta enzima hidroliza N-ArPE dando como resultado AEA y ácido fosfatídico. La anandamida se metaboliza por hidrólisis producida por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Cravatt y cols., 1996),

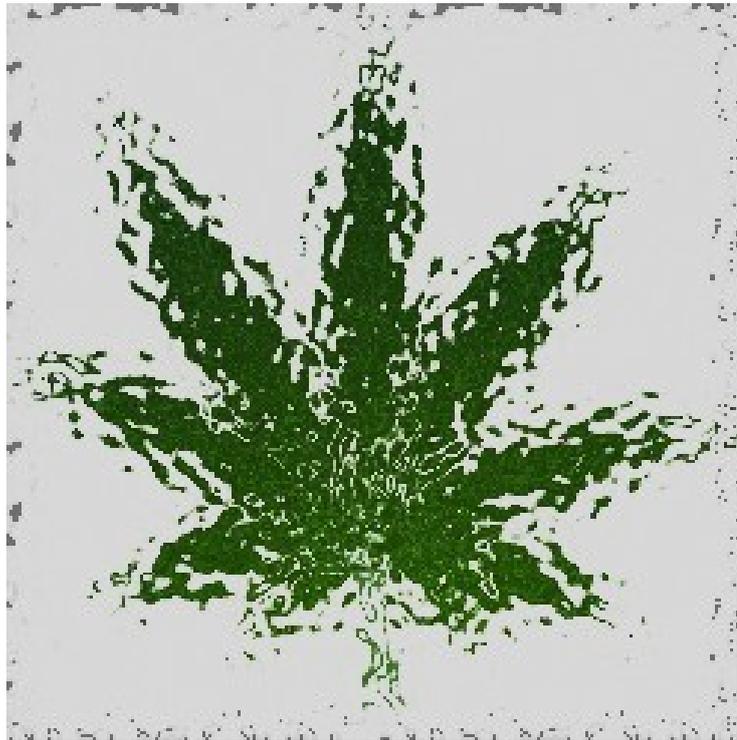
Estudio de posible nicho neurogénico en tercer y cuarto ventrículo, bajo condiciones de hemiparkinsonismo inducido

El desarrollo de las células progenitoras en el cerebro adulto es un balance regulado entre proliferación, diferenciación y supervivencia/muerte, controlado por señales extracelulares. Aunque el mecanismo implicado aún no está claro, las investigaciones recientes sugieren que parte de este control viene dado por el sistema endocannabinoide. En este contexto hay propuestas ya algunas vías que podrían estar implicadas en el control que ejerce los

cannabinoides en el destino celular, como la vía Rap/B-Raf/ERK y PI3K/Ark (Galve-Roperh y cols., 2006). También se postula que el control de la proliferación por cannabinoides puede venir mediante la regulación de la óxido nítrico sintasa (Kim y cols., 2006), ya que como se sabe los cannabinoides pueden regular la actividad de esta enzima y hay bibliografía reciente que propone al óxido nítrico entre los partícipes del control neurogénico (Matarreona y cols., 2005). Además se ha propuesto la regulación cruzada con rutas de señalización de los factores de crecimiento. En esta línea se propuso que el factor de crecimiento de fibroblastos puede inducir la síntesis de 2-AG (Willian y cols., 2003). También el sistema cannabinoide podría estar implicado en la neurogénesis a través de su función como neuromodulador (Lie y cols., 2004) de otros neurotransmisores como la dopamina, la cual parece ser que tiene un papel en la regulación de la neurogénesis (Baker y cols., 2004).

Antes del estudio de la implicación del sistema cannabinoide en la neurogénesis en las áreas el tercer ventrículo hasta el acueducto de Silvio, se estudiaron estos centros por cortes coronales. Se observaron centros germinativos aparentemente "quiescentes" en diversas zonas en ratas prepúberes. Así, a nivel de tercer ventrículo, se observó el núcleo arcuato del hipotálamo con abundantes tanicitos, parecidos a glía radial, y el órgano subcomisural alrededor de la zona dorsal del tercer ventrículo, con abundantes tanicitos positivos a nestina. A este nivel también se observó el comienzo de la red dopaminérgica periventricular-periacueductal, que ha sido descrita por nuestro equipo en su zona periacueductal (Flores y cols., 2008). A nivel mesencefálico se observó el final del órgano subcomisural con tanicitos, y el receso colicular más caudal, con endimocitos modificados, semejantes a glía radial. Los procesos radiales se dirigen hacia el hipocampo, y podrían tener un papel neurogénico. También se observan endimocitos cuboides en la pared del acueducto de Silvio, positivos a nestina.

En las ratas adultas todas estas zonas desaparecen, excepto la escasa presencia de endimocitos en la pared del acueducto. Hay también células GFAP+ cerca de la pared, alrededor del acueducto, probablemente en proliferación. Algunas coexpresan la enzima tirosina-hidroxilasa. Podrían ser células dopaminérgicas periacueductales procedentes de la pared acueductal, pero no se puede afirmar categóricamente. El tratamiento con THC en ratas parkinsonianas no modifica dichas señales. Sin embargo, mediante el uso de PSA-NCAM, un marcador para células en movimiento, se pudo comprobar la existencia de células TH+ aparentemente en movimiento. En estos animales tratados con THC (5mg/ml en alcohol) se observó que en el parénquima adyacente al acueducto de Silvio algunas de las neuronas TH+ periventriculares coexpresan PSA-NCAM. Esta colocalización de los marcadores TH y PSA-NCAM significa que dichas neuronas dopaminérgicas eran de reciente generación y se encontraban en movimiento dirigiéndose hacia su destino diana. Esto indica que el THC puede tener un cierto rol neurogénico estimulando nuevas neuronas en la zona periacueductal, aunque los datos no son concluyentes. Finalmente, la infusión de vehículo alcohólico sí indujo la reaparición de la señal positiva a nestina en áreas observadas en ratas prepúberes: núcleo arcuato, órgano subcomisural, receso colicular y pared acueductal. El alcohol podría tener un papel neurogénico, sorprendentemente, o bien estimular las áreas "quiescentes" observadas en ratas prepúberes.

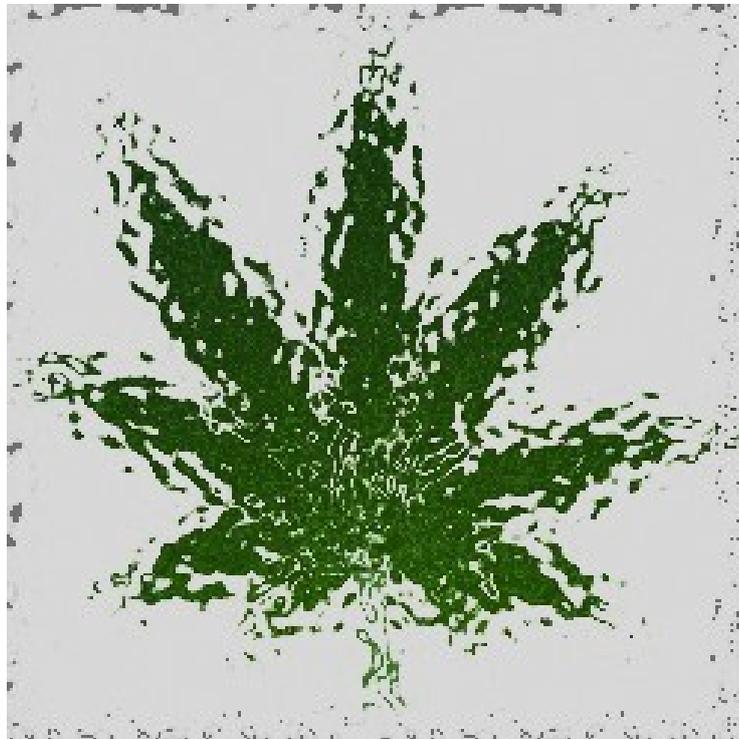


CONCLUSIONES

- 1) El Δ^9 -tetrahidrocannabinol aumenta el tono funcional del estriado dañado, donde es inyectado, probablemente aumentando la liberación de dopamina de las terminales del mismo.
- 2) La estimulación directa de receptores D3 estriatales no tiene efecto motor en ratas parkinsonianas.
- 3) El THC actúa en cierto modo a través de receptores D3, existiendo interacción entre CB1R y D3R, pues el agonista D3R PIPAT aumenta el efecto motor del THC, pero el antagonista D3R GR103691 es capaz de disminuir el efecto motor del THC.
- 4) El THC tiene efectos bifásicos sobre la supervivencia de neuronas nigricas, pues ejerce efectos tanto neurotóxicos como neuroprotectores.
- 5) En los efectos neuroprotectores del THC participan los receptores vanilloides TRPV1 y PPAR- α , pero no los receptores CB1.
- 6) El tratamiento agudo, no crónico, con THC es capaz de alterar la normal respuesta en el PPI en ratones, indicativo de "respuesta psicótica". El aislamiento durante la infancia es también un estímulo poderoso para producir disrupción del PPI,
- 7) El estudio con aislamiento combinado con tratamiento subcrónico de THC en la adolescencia y/o etapa adulta en los ratones ha dado resultados variables según el protocolo y el sexo de los animales.
- 8) En hembras, no aisladas, el tratamiento adulto con el vehículo empleado para disolver el THC, o sea el alcohol, pero no el THC, induce alteración del filtrado sensorial en los animales que recibieron THC en la adolescencia, lo cual los hace más vulnerables al alcohol probablemente. También hay alteraciones del normal filtrado sensorial en los animales que reciben THC en el adulto (5 mg/kg).

- 9) En las hembras aisladas, todos los tratamientos revierten la alteración del PPI inducida por el aislamiento excepto la dosis más alta de THC (10 mg/kg) dada en la etapa adulta.
- 10) En los machos, sin aislamiento, todos los tratamientos inducen hiporreactividad, lo que invalida los datos del PPI.
- 11) En los machos aislados todos los tratamientos normalizan el PPI alterado por el aislamiento, sin alterarse la respuesta reactiva de sobresalto. .
- 12) Los ratones carentes de CB1R presentan un PPI alterado, además de cambios hiperreactivos.
- 13) El THC modifica al sistema endocannabinoide porque los receptores CB1 se regulan al alza en corteza prefrontal, disminuye los niveles de cDNA de NAPE-PLD en corteza prefrontal y en el estriado, y regula al alza la expresión génica de la enzima FAAH en corteza prefrontal y estriado dorsal.
- 14) Se observaron centros germinativos aparentemente "quiescentes" en diversas zonas en ratas prepúberes: núcleo arcuato del hipotálamo, órgano subcomisural alrededor de la zona dorsal del tercer ventrículo, el receso colicular, y ependimocitos cuboides en la pared del acueducto de Silvio, positivos a nestina.
- 15) En las ratas adultas todas estas zonas desaparecen, excepto la escasa presencia de ependimocitos en la pared del acueducto.
- 16) El tratamiento con THC en ratas parkinsonianas no modifica dichas señales, excepto la presencia en el parénquima adyacente al acueducto de Silvio de algunas neuronas TH+ periventriculares coexpresando PSA-NCAM.
- 17) La infusión de vehículo alcohólico sí indujo la reaparición de la señal nestina+ en áreas observadas en ratas prepúberes: núcleo arcuato,

órgano subcomisural, receso colicular y pared acueductal. El alcohol podría tener un papel neurogénico, sorprendentemente, o bien estimular las áreas "quiescentes" observadas en ratas prepúberes.



BIBLIOGRAFÍA

- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I (2005). The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J*, 19, 1704–1706.
- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I (2005). The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *Faseb J*, 19:1704–1706
- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006). The endocannabinoid system promotes gliogenesis by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci* 26:1551–61.
- Akaoka H, Charléty P, Saunier CF, Buda M, Chouvet G (1992). Inhibition of nigral dopamine neurons by systemic and local apomorphine: possible contribution of dendritic autoreceptors. *Neuroscience*; 49(4):879–891.
- Aldridge JW, Berridge KC (1998). Coding of serial order by neostriatal neurons: a "natural action" approach to movement sequence. *J Neurosci*, 18:2777–87
- Alexander GE, Crutcher MD. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neuronal substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*, 13:266–271
- Alexander SPW, Kendall DA (2007) The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *Br J Pharmacol* 152: 602–623.
- Alger BE (2002). Retrograde signalling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology* 68: 247–286.
- Altman J (1983). in *Developmental Neurobiology* (ed. Himwich, W. A.) 197– 237 (C. C. Thomas, Springfield, 1970; Bayer, S. A. 3H-Thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res*, 50:329– 340
- Altman J, Das GD (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol*, 126:337 – 390
- Altman J, Gopal DD (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207:953– 956

- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebom F (1990). Proliferation “hot spot” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron*, 5:101–109
- Alvarez-Buylla A, Ling C-Y, Yu WS (1994). Contribution of neurons born during embryonic, juvenile and adult life to the brain of adult canaries. Regional specificity and delayed birth of neurons in the song-control nuclei. *J Comp Neurol*, 347:233–248
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Mateo A, Merchant-Larios H (1998). Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J Neurosci*, 18:1020–1037
- Alvarez-Buylla A, Lois C (1995). Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells*, 13:263–272
- Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. Apr; 2(4):287–93
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F (2000). Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during & after song learning. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85:8722– 8726
- Andreasen NC, Olsen S (1982). Negative vs positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch Gen Psychiatry*, 39:789–794.
- Arevalo-Martin A, Garcia-Ovejero D, Rubio-Araiz A, Gomez O, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E (2007) Cannabinoids modulate Olig2 and polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the subventricular zone of post-natal rats through cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. *Eur J Neurosci*; 26:1548–1559
- Ashton JC (2007). Cannabinoids for the treatment of inflammation. *Curr Opin Investig Drugs*; 8:373–384.
- Ashton JC, Rahman RM, Nair SM, Sutherland BA, Glass M, Appleton (2007). Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain. *Neurosci Lett*; 412(2):144–7
- Bab I, Zimmer A (2008). Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br J Pharmacol*, 153:182–188.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 27:1–4.

- Ballmaier M, Bortolato M, Rizzetti C, Zolo M, Gessa G, Heinz A, Spano P (2007). Cannabinoid receptor antagonists counteract sensorimotor gating deficits in the phencyclidine model of psychosis. *Neurpsychopharmacology*, 32: 2098–107.
- Bandell M., Story G.M., Hwang S.W., Viswanath V., Eid S.R., Petrus M.J., Earley T.J., Patapoutian A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 41:849–857
- Barann M, Molderings G, Brüss M, Bönisch H, Urban BW, Göthert M (2002). Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol*, 137:589–596.
- Bayewitch M, Rhee M-H, Avidor-Reiss T, Breuer A, Mechoulam R, and Vogel Z(1996) (Δ^9 -tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 271:9902–9905.
- Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyaman D, Offertálet L, Mo FM, Liu J, Konus G (2005), evidence for novel cannabinoide receptors. *Pharmacol therap*, 106:133–145
- Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R (2009). PPAR- γ Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. *PPAR Res*; 2009:830501.
- Beltowski J, Wójcicka G, Mydlarczyk M, Jamroz A (2002). The effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) agonist, fenofibrate, on lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and plasma paraoxonase 1(PON1) activity. *J Physiol Pharmacol*, 53(3):463–75.
- Benito C, Nuñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J (2003). Cannabinoid CB₂ receptor and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci*, 23:11136–41.
- Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee M-H, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R (1998) An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*, 353:23–31.
- Ben-Sharchar D, Eshel G, Finberg JPM, Youdim MBH (1991) The iron chelator desferrioxamine (Desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons. *J Neurochem* 56: 1441–1444.

- Berciani G, Orlandi V, Kotzalidis GD, Pancheri P (2002). Cannabis and schizophrenia: impact on onset course, psychopathology and outcomes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 252:86-92
- Berger J, Moller DE (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53: 409-35.
- Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T (2007). Harwaring the brain : endocannabinoids shape neural connectivity. *Science*, 316:1212-6
- Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernández ML, Romero J, Cebeira M, De Miguel R, Ramos JA y Fernandez-Ruiz JJ (1998a). Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development*; 125, 3179-3188.
- Berrendero F, Romero J, Garcia_Gil L, Suarez I, De la Cruz P, Ramos JA y Fernandez-Ruiz JJ (1998b). Changer in cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several brain región of aged rats. *Biochim Biophys Acta*; 1407, 205-214
- Berrendero F, Sepe N, Ramos, JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz JJ (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse*, 33:181-91
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ, Di Marzo V (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids. Implications for their biosynthesis and biological function, *Biochem Biophys Res Comm*; 256: 377-380
- Bobes J, Calafat A, ed. (2000). Monografía Cannabis. Adicciones 12; supl.2.
- Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR (1998). Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses, *J Pharmacol Exp Ther*; 287,884-888.
- Bonini, JA, Borowsky BE, Adham N, Boyle N, Thompson TO (2002). Methods of identifying compounds that bind to SNORF25 receptors. U.S. *Patent*; 6,468,756.
- Bornheim LM, Kim KY, Chen B, Correia MA (1995). Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism. *Biochem.Pharmacol*, 50(5): 677-86.

- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rianldi-Carmona M, Le-Fur G, Casellas P (1995). Activation of mitogenactivated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1, *Biochem J*, 312, 637-641
- Boucher AA, Arnold JC, Duffy L, Schofield PR, Micheau J, Karl T (2007). Heterozygous neuregulin 1 mice are more sensitive to the behavioural effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacol*, 192:325-336
- Bradshaw HB, Walker JM (2005). The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. *Br J Pharmacol*, 144:459-465.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR (2001). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology*; 156:234-258
- Brown AJ (2007). Novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*; 152(5): 567-575
- Buhler B, Hambrecht M, Loffler W, van der Heiden W, Hafner H (2002). Precipitation and determination of the onset and course of schizophrenia by substance abuse a retrospective and prospective study of 232 population based first illness episodes. *Schizophr Res*, 54: 243-51
- Burd GD, Nottebohm F (1985). Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J Comp Neurol*, 240:143-152
- Burstein S, Budrow J, Debatis M, Hunter S A, Subramanian A (1994), Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid, *Biochem Pharmacol*; 48: 1253-1264.
- Busch-Petersen J, Hill WA, Fan P, Khanolkar A, Xie X-Q, Tius MA, Makriyannis A (1996). Unsaturated side chain 11-hydroxyhexahydrocannabinol analogs. *J Med Chem*; 39:3790-3796
- Cadogan AK, Alexander SP, Boyd EA y Kendall DA (1997). Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J Neurochem*; 69:1131-1137.
- Cameron HA, Wooley CS, McEwen BS, Gould E (1993). Differentiation of newly born neuron and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56:337-344

- Caterina MJ, Julius D (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*; 24:487–517
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*; 389:816–824
- Caulfield MP, Brown DA (1992). Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108–15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol*; 106: 231–232.
- Cavanaugh EJ, Simkin D, Kim D (2008). Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca²⁺ reveals different functional channel states. *Neuroscience*; 154:1467–1476.
- Chambers AP, Vemuri VK, Peng Y, Wood JT, Olszewska T, Pittman QJ, Makriyannis A (2007), Sharkey KA. A neutral CB1 receptor antagonist reduces weight gain in rat. *Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 293:R2185–R2193
- Cheer JF, Kendall DA, Mason R y Marsden CA (2003). Differential cannabinoid-induced electrophysiological effects in rat ventral tegmentum. *Neuropharmacology*; 44, 633–641.
- Chevalere V, Takahashi KA, Castillo PE (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*; 29:37–76.
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, Van der Kooy D (1999). Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*; 19:4462–4471
- Childers SR, Deadwyler SA (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*; 52, 819–827.
- Childers SR, Pacheco MA, Bennett BA, Edwards TA, Hampson RE, Mu J, Deadwyler SA (1993). Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms, *Biochem Soc Symp*; 59, 27–50.
- Chouaf-Lakhdar L, Fèvre-Montange M, Brisson C, Strazielle N, Gamrani H, Didier-Bazès M (2003). Proliferative activity and nestin expression in periventricular cells of the adult rat brain. *Neuroreport*; 14(4): 633–636

- Chu ZL, Carroll C, Alfonso J, Gutierrez V, He H and Lucman A (2008). A role for intestinal endocrine cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic peptide release. *Endocrinology* 149 pp. 2038–2047.
- Cinar R, Szücs M (2009). CB1 receptor-independent actions of SR141716 on G-protein signaling: coapplication with the μ -opioid agonist Tyr-D-AlaGly-(NMe)Phe-Gly-ol unmasks novel, pertussis toxin-insensitive opioid signaling in μ -opioid receptor-Chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther*; 330:567–574.
- Cohen E, Meininger V (1987). Ultrastructural analysis of primary cilium in the embryonic nervous tissue of mouse. *Int J Dev Neurosci*; 5:43–51
- Cohen G, Heikkilä RE, Allis B, Cabbat F, Demblec D, MacNamee D y cols (1976) Destruction of sympathetic nerve terminals by 6-hydroxydopamine: protection by 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourea, diethyldithiocarbamate, methimazole, cysteamine, ethanol and n-butanol. *J Pharmacol Exp Therap* 199: 336–352.
- Condie R, Herring A, Koh WS, Lee M, Kaminski NE (1996). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expressions in the murine T-cell line, EL4.IL-2. *J Biol Chem*. 271:13175–13183.
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin S-Y, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung E-LM, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GSG, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang D-S (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432:723–730
- Coulombe PA, Kopan R, Fuchs E (1989). Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. *J Cell Biol*, 109:2295–2312
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*; 384: 83–87,
- Cravatt BF, Lichtman AH (2004). The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol* 61 (1): 149–160.
- Crippa JA, Zuardi AW, Hallak JE (2010). Therapeutic use of the cannabinoids in psychiatry. *Rev Bras Psiquiatr*; 32 Suppl 1.S56–66

- D'Souza DC, Abi-Saab WM, Madonick S, Forselius-Bielen K, Doersch A, Braley G, Gueorquieva R, Cooper TB, Krystal JH (2005). $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: implications for cognition, psychosis, and addiction. *Biol Psychiatry*; 57:594-608.
- Davis WM, Moreton JE, King WT, Pace HB (1972). Marihuana on locomotor activity: biphasic effect and tolerance development. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*; 3:29-35.
- Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S (1995). Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther*; 273, 734-743.
- Dean B, Sundram S, Bradbury R, Scarr E, Copolov DL (2001). Studies on 3H-CP-55949 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience*; 103:9-15
- Demuth DG, Molleman (2006). Cannabinoid signaling. *Life Sci*; 78:549-6.
- De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M y cols (1998) The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(14): 8375-8380.
- Després J-P, Lemieux I, Alméras N (2006). Contribution of CB1 blockade to the management of high-risk abdominal obesity. *Int J Obes*; 30:S44-S52.
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS Y Howlett AC(1988). Determination and characterization of cannabinoid receptor in the rat brain. *Mol Pharmacol*; 34:605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*; 258:1946-1949.
- Dewey W L (1986). Cannabinoide pharmacology. *Pharmacol Rev*; 38(2):151-78.
- Dewey WL (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 38, 151-178. Levenes C, Daniel H, Soubrie P, Crepel F (1998). Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *Journal of Physiology*; 510:867-879.

- Di Marzo V (2008). Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*; 160:1-24.
- Di Marzo V, Berrendero F, Bisogno T, Gonzalez S, Cavaliere P, Romero J, Cebeira M, Ramos JA, Fernández-Ruiz (2000). Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *J Neurochem*; 74:1627-1635
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Brandi I, Jefferson RG, Winckler RL, Davis JB, Dasse O, Mahadevan A, Razdan RK, y cols. (2001) Highly selective CB1 cannabinoid receptor ligands and novel CB1/VR1 vanilloid receptor "hybrid" ligands. *Biochem Biophys Res Commun*; 281:444-451.
- Di Marzo V, Bisogno T, Melck D, Ross R, Brockie H, Stevenson L, Pertwee R, De Petrocellis L (1998). Interactions between synthetic vanilloides and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Letts*; 436:449-454
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*; 372:686-691.
- Di Marzo V, Hill Mp, Bisogno T, Crossman AR y Brotchie JM (2000). Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with reduction in the movement of an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J*; 14:1432-1438.
- Di Marzo V, Matias I (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci*; 8:585-589
- Diab A, Hussain RZ, Lovett-Racke AE, Chavis JA, Drew PD, Racke MK (2004) Ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ and the retinoid X receptor exert additive anti-inflammatory effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 148: 116-126.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:14895-14900
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*; 97:1-20

- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*; 17:5046–5061
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:11619–11624
- Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. Oct; 13(5):543–50.
- Downer EJ, Gowran A, Campbell VA (2007) A comparison of the apoptotic effect of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in the neonatal and adult rat cerebral cortex. *Brain Res* 1175:39–47.
- Drmotá E, Greasley P, Groblewski T (2004). Screening assays for cannabinoid–ligand type modulators. Assignee: AstraZeneca. Patent WO2004074844.
- Durán M, Capellà D (2003). “Efectos antieméticos de los cannabinoides”. En: Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides. Editado por la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid, pp. 93–102.
- Egashira N, Mishima K, Katsurabayashi S, Yoshitake T, Matsumoto Y, Ishida J, Yamaguchi M, Iwasaki K y Fujiwara, M (2002). Involvement of 5-hydroxytryptamine neuronal system in THC-induced impairment of spatial memory. *Eur J Pharmacol*; 445, 221–229.
- Eichele K, Ramer R, Hinz B (2009). R(+)-Methanandamide-induced apoptosis of human cervical carcinoma cells involves a cyclooxygenase-2-dependent pathway. *Pharm Res* 26:346–355.
- Eldeeb K, Alexander S, Pritchard D, Kendall D (2009). LPI-evoked increases in intracellular calcium increases in microglial cells in culture. 19th Annual Symposium on the Cannabinoids, Burlington, Vermont, International Cannabinoid Research Society; p. 21
- Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PTJM, Cools AR (1998). The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res*, 30:251–604
- Ellgren M, Hurd YL, Franck J (2004) Amphetamine effects on dopamine levels and behavior following cannabinoid exposure during adolescence. *Eur J Pharmacol*; 23;497(2):205–

- Esposito G, Izzo AA, Di Rosa M, Iuvone T (2001). Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells, *J Neurochem*;78, 835–841.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, Cullinan GJ, Hunden DC, Johnson DW, Chaney MO, y cols. (1998) LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther*; 284:291–297.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, and Mitchell RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*; 48:443–450.
- Fernández-Espejo E (2004). Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. *Mol Neurobiol*; 29:15–30.
- Fernández-Espejo E, Caraballo I, Rodríguez de Fonseca F, El Banoua F, Ferrer B, Flores JA y Galán-Rodríguez B (2005). Cannabinoid Cb1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental Parkinsonism. *Neurobiol Disease*. 18:591–601.
- Fernández-Ruiz J, Berrendero F, Hernández ML y Ramos JA (2000). The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci*; 23, 14–20.
- Fernández-Ruiz J, Hernández M, Ramos JA (2010). Cannabinoid-dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther*; 16(3):e72–91
- Fernández-Ruiz J, Hernández M, Ramos JA (2010). Cannabinoid-Dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS Disorders. *CNS Neurosci Ther*; 16:e72–e91
- Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzman M (2007). Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci*; 28:39–45
- Fernández-Ruiz JJ, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Ramos JA (1992). In *Biochemistry and Physiology of Drug Abuse*, ed Watson RR (CRC, Boca Raton, FL), pp119–163.
- Fitton AG y Pertwee RG (1982) Change in the body temperature and oxygen consumption rate of conscious mice produced by intrahypothalamic and intracerebroventricular injections of THC. *Br J Pharmacol* 75, 409–414.

- Flament-Durand J, Brion JP (1985). Tanycytes: morphology and functions: a review. *Int Rev Cytol*; 96:121-155
- Flores JA, El Banoua F, Galan-Rodriguez B, Fernandez-Espejo E Flores (2004). Opiate anti-nociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D1 (not D2) dopamine receptors. *Brain*; 110(1-2):205-14.
- Fong TM, Shearman LP, Stribling DS, Shu J, Lao J, Huang CR-R, Xiao JC, Shen C-P, Tyszkiewicz J, Strack AM, DeMaula C, Hubert M-F, Galijatovic-Idrizbegovic A, Owen R, Huber AC, Lanning CL (2009). Pharmacological efficacy and safety profile of taranabant in preclinical species. *Drug Dev Res*; 70:349-362
- Fowler C J (2005). Pharmacological properties and therapeutic possibilities for drugs acting upon endocannabinoid receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 4(6):685-96.
- Francesca G Klinger, Natalia Battista, Massimo De Felici, and Mauro Maccarrone (2006). Stage-variations of anandamide hydrolase activity in the mouse uterus during the natural oestrus cycle. *J Exp Clin Assist Reprod*. Published online 2006 March 30.
- Frederiksen K, McKay RDG (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci*; 8:1144-1151
- Fredriksson R, Hoeglund PJ, Gloriam DEI, Lagerstroem MC, Schioeth HB (2003). Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS*; 54:381-388
- Fride E, Barg J, Levy R, Saya D, Heldman E, Mechoulam R, Vogel Z (1994) Low doses of anandamide inhibit pharmacological effects of 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther*; 272: 699-707.
- Fuchs E, Segre JA (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell*; 100:143-155
- Gage FH, Kempermann G, Palmer T, Peterson DA, Ray J (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol*; 36:249-266
- Gage FH, Ray J, Fisher LJ (1995). Isolation, characterization & use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci*; 18:159-192
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboulla M, Shire D, Le-Fur G y Casellas P (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid

- receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations, *Eur J Biochem* ; 232,54-61.
- Galan-Rodríguez B, Suárez J, Gonzalez-Aparicio R, Bermudez-Silva FJ, Maldonado R, Robledo P y cols. (2009) Oleoylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology* 56: 653-664.
- Galve-Roperh I, Rueda D, Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M (2002) Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 62(6): 1385-1392.
- Galve-Roperh I, Aduado T, Palazuelos J, Guzman M (2007). The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist*, 13(2):109-114
- Galve-Roperh I, Palazuelos J, Aguado T, Guzman M (2009). The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implication in psychiatric disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*; 259: 371-382
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of American Chemical Society*, 86:1646-47.
- Gammon CM, Freeman GM Jr, Wie W, Petersen SL, Wetsel WC (2005). Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone secretion by cannabinoids. *Endocrinology* 146(10): 4491-9.
- García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol*, 36:234-248.
- Gerard CM, Mollereau C, Vassart G y Parmentier M (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J*; 279 (Pt 1), 129-134.
- Gerdeman G, Lovinger DM (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol*; 85:468-471.
- Gerdeman G, Lovinger DM (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol*; 85, 468-471.

- Gervois P, Fruchart JC, Staels B (2007). Drug insight: mechanism of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*; 3:145–56.
- Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, Kloterkötter J, Piomelli D (2004). Cerebrospinal anandamida levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology*; 29:2108–2114.
- Giuliano M, Pellerito O, Portanova P, Calvaruso G, Santulli A, De Blasio A, Vento R, Tesoriere G (2009). Apoptosis induced in HepG2 cells by the synthetic cannabinoid WIN: involvement of the transcription factor PPAR γ . *Biochimie*; 91:457–465.
- Glass M, Brotchie JM, Maneuf YP (1997). Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. *European Journal of Neuroscience*; 9:199–203.
- Glass M, Felder CC (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *Journal of Neuroscience*; 17:5327–33
- Goldman SA, Nottebohm F (1983). Neuronal production, migration & differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci*; 80:2390–2394
- Gómez del Pulgar MT, Velasco G y Guzman M (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akr. *Biochem J*; 347:369–73
- Goncalves MB, Suetterlin P, Yip P, Molina-Holgado F, Walker DJ, Oudin MJ, Zentar MP, Pollard S, Yanez-Munoz RJ, Williams G, Walsh FS, Pangalos MN, Doherty P (2008) A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. *Mol Cell Neurosci*; 38:526–536
- Goncalves MB, Suetterlin P, Yip P, Molina-holgado F, Walker DJ, Oudin MJ, Zentar MP, Pollard S, Yanez-Muñoz RJ, Williams G (2008). A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in age-dependent manner. *Moll Cell Neurosci*; 38; 526–536
- Gong Jp, Onaiva ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006). Cannabinoid CB2 receptor: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*; 1071:10–23

- Gorriti MA, Rodriguez de Fonseca, Navarro M, Palomo T (1999). Chronic (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats. *Eur J Pharmacol*; 365:133-142
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*; 17:2492-2498
- Graham FK (1975). The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 12: 238-248
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M (1994). The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*; 265:1826-31.
- Gueudet C, Santucci V, Rinaldi-Carmona M, Soubrie P, Le Fur G (1995). The cannabinoid receptor antagonist SR141716A affects A9 dopamine neuronal activity in the rats. *Neuroreport*; 6:1421-1425.
- Guindon J y Hohmann AG (2008). A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *Br J Pharmacol*; 153:1341-3.
- Gustafson RA, Kim I, Stout PR, Klette KL, George MP, Moolchan ET, Levine B, Huestis MA (2004). Urinary pharmacokinetics of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol after controlled oral THC administration. *J Anal Toxicol*; 28, 160-167.
- Guzman M, Sanchez C, Galve-Roperh I (2001), Control of the cell survival/death decision by cannabinoids, *J Mol Med*; 78, 613-625.
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, Mackie K, Ledent C, Mody I y Freund TF (2000). Cannabinoid inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*; 12, 3239-3249.
- Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Lenoudakis DL, Bickler PE (1998). Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem*; 70: 671-676.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(14):8268-8273.

- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, and Mechoulam R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98:3662–3665
- Harkany T, Guzman M, Galves-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K (2007). The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci*; 28: 83-92
- Hejazi N, Zhou C, Oz M, Sun H, Ye JH, Zhang L (2006). Δ9-Tetrahydrocannabinol and endogenous cannabinoid anandamide directly potentiate the function of glycine receptors. *Mol Pharmacol*; 69:991–997.
- Hendrickson ML, Rao AJ, Demerdash ONA, Kalil RE (2011). Expression of nestin by neural cells in the adult rat and human brain. *Plos One*; 6(4): e18535
- Henquet C, Krabbendam L, Spauwen J, Kaplan C, Lieb R Wittchen HU, Van OsJ (2005). Prospective cohort study of cannabis use, predisposition for psychosis and psychotic symptoms in young people. *Brit Med*; 330:7481:11
- Herkenham M, Lynn AB, De Costa BR, Richfield EK (1991b). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*; 547:267–274.
- Herkenham M, Lynn AB, De Costa BR y Richfield EK (1991a). Neuronal localization of cannabinoid receptor in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 547,267-274
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK (1991). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*; 547:267–264
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR y Rice KC (1990) . Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87, 1932–1936.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR y Richfield EK (1991b). Characterization and localization of cannabinoid receptor in the rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*; 11, 563–583.
- Hernández ML, Berrendero F, Suarez I, Garcia-Gil L, Cebeira M, Mackie K, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J (2000). Cannabinoid CB1 receptor colocaliza with tyrosine hydroxylase in cultured fetal mesencephalic neurons and their activation increases the levels of this enzyme. *Brain Res*; 857: 56-65.

- Herring AC, Kaplan BLF y Kaminski NE (2001). Modulation of CREB and NF- κ B signal transduction by cannabiniol in activated thymocytes. *Cell Sig*; 13:241–250.
- Hillard CJ, Bloom AS (1982). Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced changes in β -adrenergic receptor binding in mouse cerebral cortex. *Brain Res*; 235:370–377.
- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, Dicamelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, and Campbell WB (1999) Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol Exp Ther*; 289:1427–1433
- Hillars CJ y Jarrahan A (2003). Cellular accumulation of anandamida: concensus and controversy. *Br J Pharmacol*; 140:802–8.
- Hinman A, Chuang H, Bautista DM, Julius D (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103:19564–19568.
- His W (1889). Die neuroblasten und deren entstehung im embryonalen mark. *Abh Kgl Sachs Ges Wissensch Math Phys Kl*; 15:311– 372
- Hockfield S, McKay RDG (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*; 5:3310–3328
- Hoffman AF, Riegel AC, Lupica CR (2003). Functional tolerance and blockade of long-term depression at synapses in the nucleus accumbens after chronic cannabinoid exposure. *The Journal of Neuroscience* 23: 4815–4820.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casella P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*; 54:161–202
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R y Pertwee RG (2002). International Union of Parmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*; 54, 161–202
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. WA (2002). International Union of Pharmacology XXVII. Classification of cannabinoid receptor. *Pharmacol Rev*; 54:161–202

- Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev*; 11:774–785
- Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC (1996). Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*; 72:355–363
- Hurst D, Umejiego U, Lynch D, Seltzman H, Hyatt S, Roche M, McAllister S, Fleischer D, Kapur A, Abood M, Shi S, Jones J, Lewis D, Reggio P (2006). Biarylpyrazole inverse agonists at the cannabinoid CB1 receptor: importance of the C-3 carboxamide oxygen/lysine3.28(192) interaction. *J Med Chem*; 49:5969–5987.
- Huwiler A y Pfeilschifter J (2008). New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochem Pharmacol*; 75: 1893–900
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U(2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA*;97:6155–6160
- Ihrig RA, Álvarez-Buylla A (2011). Lake-Front property: a unique germinal niche bt lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*; 70:674–686
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME y Kunos G (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves, *Br J Pharmacol*; 118, 2023–2028.
- Iwamura H, Suzuki H, Ueda Y, Kaya T, Inaba T (2001). In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*; 296:420–425.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*; 96:25– 34
- Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, Riddick M, Dowell S, Staton PC, Green P, Shabon U, Bao W, Aiyar N, Yue TL, Brown AJ, Morrison AD and Douglas SA (2007). The novel endocannabinoid receptor GRP55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediated their vasodilator effects. *Br J Pharmacol*; 152, 825–831.

- Jones R (2006). Discovery of agonists of the glucose dependent insulinotropic receptor, GPR119, a pancreatic beta-cell oGPCR, for the treatment of NIDDM. *Drugs Future* 31 (Suppl A). Abstract L48
- Jordt S-E, Bautista DM, Chuang H, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibers through the TRP channel ANKTM1. *Nature*; 427:260–265.
- Julian, M.D., Martin, A.B., Cuellar, B., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Moratalla R, García-Segura, LM (2003). Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience*; 119:309–18
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*; 2001;413:203–210
- Kaminski NE (1998). Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptor. *J Neuroimmunol*; 83:124–132.
- Kaplan M, Bell D (1984). Mitotic neuroblasts in the 9 day old and 11 month old rodent hippocampus. *J Neurosci*; 4:1429–1441
- Kapur A, Zhao PW, Sharir H, Bai YS, Caron MG, Barak LS, Abood ME (2009). Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem*; 284:29817–29827.
- Kathmann M, Bauer U, Schlicker E y Gothert M (1999). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and Kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 359, 466–470.
- Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C, Schlicker E (2006). Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*; 372:354–361.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K y Freund TF (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptor regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons; *J Neurosci* 19, 4544–4548.
- Kempermann G, Kronenberg G (2003). Depressed new neurons adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry*; 54:499–503

- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14: 186–191
- Kendle KS, Sheth K, Gardner CO, Prescott CA (2002). Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychol Med*; 32:1187–1194
- Kessler II (1972). Epidemiologic studies of Parkinson's disease. 3. A community-based survey. *Am J Epidemiol*; 96:242–254
- Khanolkar AD, Abadji V, Lin S, Hill WAG, Taha G, Abouzid K, Meng Z, Fan P, and Makriyannis A (1996) Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. *J Med Chem*; 39:4515–4519.
- Khaspekov LG, Brenz Verca MS, Frumkina LE, Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2004) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 19(7): 1691–1698.
- Kim D, Thayer SA (2001), Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*; 15(21):RC146
- Kim SR, Lee DY, Chung ES y cols (2005) Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro. *J Neurosci* 25(3): 662–671.
- Kim SR, Chung YC, Chung ES Oh UT, Kim SU, Jin BK (2007) Roles of transient receptor potential vanilloid subtype 1 and cannabinoid type 1 receptors in the brain: neuroprotection versus neurotoxicity. *Mol Neurobiol* 35: 245–254.
- Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA (2005). Involvement of protein kinase A in cannabinoid receptor-mediated protection from oxidative neuronal injury. *J Pharmacol Exp Ther*; 313(1): 88–94.
- Kim SR, Bok E, Chung YC, Chung ES, Jim BK (2008). Interactions between CB1 receptors and TRPV1 channels mediated by 12-HPETE are cytotoxic to mesencephalic dopaminergic neurons. *Br J Pharmacol*; 155:253–264.
- Kin SH, Won SJ, Mao XO, Ledent C, Jin K, Greenberg DA (2006). Role of neuronal nitric oxide synthase in cannabinoid-induced neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*; 319:150–4.

- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H (2003). The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol*; 74(4):486-96.
- Kloet ER, Rosenfeld P, van Eekelen JAM, Sutanto W, Levine S (1988). Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res*, 73:101-20.
- Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G (1974). Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marijuana use. *N Engl J Med*, 290:872-874
- Korzhevskii DE, Lensman MV, Gilyarov AV, Kirik OV, Vlasov TD (2008). Induction of nestin synthesis in rat brain cells by ischemic damage. *Neurosci and Behavioral Physiol*, 38: 139-143
- Ladent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W y Parmentier M(1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced additive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*; 283, 401-404.
- Lan R, Gatley J, Lu Q, Fan P, Fernando SR, Volkow ND, Pertwee R, and Makriyannis A (1999a) Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci* 1:E4.
- Lastres-Becker I, Cebeira M, de Ceballos M, Zeng B-Y, Jenner P, Ramos JA y Fernandez-Ruiz (2001). Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's disease and MPTP treatment marmosets. *Eur J Neurosci*; 14:1827-1831
- Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 19(1-2):96-107.
- Lauckner B, Boscaro M, Rutter GA, Grossman AB y Korbonitis M (2006). Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab*, 17:205-15.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen H-Y, Lu H-C, Hille B, Mackie K (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105:2699-2704
- Lawrence DK, Gill EW (1975). The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol Pharmacol*, 11(5):595-602.

- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci*; 97:13883–13888
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*; 60:585– 595
- Levine S (1994). The ontogeny of the hypothalamic pituitary adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann NY Acad Sci*; 746:275–88
- Levitt PR, Cooper ML, Rakic P (1981). Coexistence of neuronal and glial precursor cells in the cerebral ventricular zone of the fetal monkey: an ultrastructural immunoperoxidase analysis. *J Neurosci*; 1: 27– 39
- Lie DC, Song HS, Colamarino A, Ming G, Gage FH (2004). Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 44:399–21.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*; 28:713– 726
- Lin SY, Khanolkar AD, Fan P, Goutopoulos A, Qin C, Papahadjis D, and Makriyannis A (1998) Novel analogues of arachidonylethanolamide (anandamide): affinities for the CB1 and CB2 cannabinoid receptors and metabolic stability. *J Med Chem*; 41:5353–5361.
- Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Herkers S, Grace AA (2008). Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends in Neurosci*; 31: 234–42
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*; 264:1145–1148
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla (1996). A Chain migration of neuronal precursors. *Science*; 271:978–981
- Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agró A (2000). Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for protective role of cannabinoid receptors. *J Bio. Chem.* 275: 31938–31945

- Mackie K (2006). Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int Obesity*; 30:S19-S23.
- Madani N, Tabeze JP, Ramos N, ades J, Hammon M, Sarfati Y (2008). The CNR1 gene as a pharmacogenetic factor for antipsychotics rather than a susceptibility gene for schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*; 18: 34-40.
- Mailleux P y Vanderhaeghe JJ (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*; 48, 655-668.
- Maneuf YP, Crossman AR, Brotchie JM (1996). Modulation of GABAergic transmission in globus pallidus by the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. *Synapse*; 22:382-385.
- Margulies JE, Hammer RP (1991). Δ^9 -tetrahydrocannabinol alters cerebral metabolism in a biphasic, dose-dependent manner in rat brain. *Eur J Pharmacol*; 202: 373-378.
- Marinelli S, Di Marzo V, Florenzano F, Fezza F, Viscomi MT, van der Stelt M y cols (2006) N-Arachidonoyl-Dopamine Tunes Synaptic Transmission onto Dopaminergic Neurons by Activating both Cannabinoid and Vanilloid Receptors. *Neuropsychopharmacology* 32: 298-308.
- Marinelli S, Di Marzo V, Florenzano F (2007). N-arachidonoyl-dopamine tunes synaptic transmission onto dopaminergic neurons by activating both cannabinoid and vanilloid receptors. *Neuropsychopharmacology*; 32:298-308
- Marredona ER, Murillo-Carrero M, Moreno-Lopez B, Estrada C (2005). Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Research Rev*; 49:355-366
- Marshall JF Gotthelf T (1979). Sensory inattention in rats with 6-hydroxydopamine-induced degeneration of ascending dopaminergic neurons: apomorphine-induced reversal of deficits. *Exp Neurol*; 65(2):398-411
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*; 302:84-8.
- Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C (2002). Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem*; 80(3): 448-56.

- Martin BR, Compton DR, Thomas BF, Prescott WR, Little PJ, Razdan RK, Johnson MR, Melvin LS, Mechoulam R, Ward SJ (1991). Behavioral biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav*; 40:471-478.
- Mato S, del Olmo E, Pazos A (2003). Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *Eur J Neurosci*; 17: 1747-54.
- Mato S, Rodriguez-Puertas R, Meana JJ, Pazos A (2003). Recientes avances en la farmacología del sistema endocannabinoide. Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoide. Editado por la agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid, pp 43-58
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC y Bonner TI. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*; 346,561-564.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-564
- Matsunaga T, Iwawaki Y, Watanabe K, Yamamoto I, Kageyama T, Yoshimura H (1995). Metabolism of THC by cytochrome P450 isozymes purified from hepatic microsomes of monkeys. *Life Sci*; 56, 2089-95.
- McLaughlin PJ, Delavan CE, Carmicom S, Robinson JK, Brener J (2000). Fine motor control in rat is disrupted by $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav*; 66:803-809.
- McKay R (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science*; 276 , 66-71
- McKay RDG (1989). The origins of cellular diversity in the mammalian central nervous system. *Cell*; 58: 815-821
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, y cols. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*; 50:83-90.
- Mechoulam R, Devane WA, Glaser R (1992). Cannabinoid geometry and biological activity. En *Marihuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*, Bartke A, Murphy LL

- y Eds., Biochemistry and physiology substance abuse, vol IV, CRC Press, Boca Ratón, FL. 1-34.
- Mechoulam R, Spatz M, Shohami E (2002). Endocannabinoids and neuroprotection. *Sci STKE* 129:RE5.
- Mestikawy S, Glowinski J, Hamon M (1986). Presynaptic dopamine autoreceptors control tyrosine hydroxylase activation in depolarized striatal dopaminergic terminals. *J Neurochem*, 46(1):12-22.
- Mestre L, Docagne F, Correa F, Loria F, Hernangómez M, Borrell J, Guaza CA (2009). Cannabinoid agonist interferes with the progression of a chronic model of multiple sclerosis by downregulating adhesion molecules. *Mol. Cell. Neurosci*; 40:258-266.
- Mezey E, Toth ZE, Corthight DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000). Distribution of mRNA for vanilloide receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 97:3655:3660
- Micale V, Cristino L, Tamburella A, Petrosino S, Leggio GM, Drago F, Di Marzo V (2009). Altered responses of dopamine D₃ receptor null mice to excitotoxic or anxiogenic stimuli. Possible involvement of the endocannabinoid and endovanilloid systems. *Neurobiol Dis* 36(1):70-80.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006). International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 58 (4): 726-41.
- Miller A, Sañudo-Peña MC, Walker JM (1998). Ipsilaterateral turning behavior induced by unilateral microinjections of a cannabinoid into the rat subthalámico nucleus. *Brain Res*; 793:7-11
- Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness V S Jr (1988). Mitotic cycling of radial glial cells of the fetal murine cerebral wall: a combined autoradiographic and immunohistochemical study. *Dev Brain Res*, 38: 183- 190
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival.

involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci*; 22: 9742–53.

Molina-Holgado F, Lledo A, Guaza C (1997). Anandamide suppresses nitric oxide and TNF- α responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport*; 8:1929–1933.

Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, Garcia-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arevalo-Martin A, Gomez-Torres O, Molina-Holgado E (2007) CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci*; 25:629–634

Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD y cols (2003) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci* 23(16): 6470–6474.

Molina-Holgado F, Pinteaux E, Heenan L, Moore JD, Rothwell NJ, Gibson RM (2005) Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Mol Cell Neurosci* 28(1): 189–194.

Montell C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Science*, STKE 272: 1–24

Moranta D, Esteban S, Garcia-Sevilla JA (2007). Acute, chronic and withdrawal effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on the sequential activation of MAPK7Raf-MEK-ERK signaling in the rat cerebral frontal cortex: short-term regulation by intrinsic and extrinsic pathways. *J Neurosci Res*, 85:656–67

Moreno S, Farioli-Vecchioli, Cerù MP (2004). Immunolocalization of Peroxisome Proliferator-Activated receptors and Retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*; 123: 131–145.

Morelli M, Di Chiara G (1987). Agonist-induced homologous and heterologous sensitization to D-1 and D-2-dependent contraversive turning. *Eur J Pharmacol*, 141: 101–107.

Morgan C, Kirkbride J, Leff J, Craig T, Hutchinson G, McKenzie K, Morgan K, Dazzan P, Doody GA, Jones P, Murray R, Fearon P (2007). Parental separation loss and psychosis in different ethnic group: a case control study *Psychol. Med*, 37:495–50.

Morgan CJ y Curran HV (2008). Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis. *The British journal of psychiatry*, 192(4):306–7

- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*; 13:1071–1082
- Moss DE, McMaster SB, Rogers J (1981). Tetrahydrocannabinoid potentiates reserpine-induced hypokinesia. *Pharmacol Biochem Behav*; 15: 779–783
- Mukhopadhyay S, Shim JY, Assi AA, Norford D y Howlett AC (2002). CB1 cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling. *Chemistry and Physics of Lipids*; 121: 91–109
- Murillo-Rodríguez E (2008). The role of the CB1 receptor in the regulation of sleep. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 32:1420–1427.
- Nagata K., Duggan A., Kumar G., Garcia-Anoveros J. (2005). Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci*; 2005 Apr 20;25(16):4052–61.
- Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M y Schlicker E (2000). Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 361, 19–24.
- Navarro M, Fernández-Ruiz JJ, de Miguel R, Hernandez ML, Cebeira M, Ramos JA (1993). Motor disturbances induced by an acute dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol: possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations. *Pharmacol Biochem Behav*; 45:291–298.
- Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N (2007). Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2. Evidence for species dependence. *J Biol Chem*; 282:15894–15902.
- Nutt JG (2000). Response to L-dopa in PD: the long and the short of ill. *Neurology*; 54:1884–1885
- Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*; 362:928–934
- Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*; 362:928–934.

- Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T (2009). 2-Arachidonoyl-snglycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem*; 145:13–20.
- Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T (2009). 2-Arachidonoyl-snglycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem*; 145:13–20.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi, PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinsholo BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasentfitz L, Uhl GR (2006a). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann NY Acad Sci*, 1074: 514–36
- Onaivi ES, Ishiguro H, Sejal P, Meozzi PA, Myers L, Tagliaferro P, Hope B, Leonard CM, Uhl GR, Brusco A, Gardner E (2006b). Methods to study the behavioral effects and expression of Cb2 cannabinoid receptor and its gene transcripts in the chronic mild stress model of depression. *Methods Mol Med*, 123:291–8
- Ooms F, Wouters J, Oscari O, Happaerts T, Bouchard G, Carrupt P-A, Testa B, Lambert M (2002). Exploration of the pharmacophore of 3-alkyl-5-arylimidazolidinediones as new CB1 cannabinoid receptor ligands and potential antagonists: synthesis, lipophilicity, affinity, and molecular modeling. *J Med Chem*, 45:1748–1756
- O'Sullivan SE (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 152(5): 576–582.
- O'Sullivan SE, Kendall DA (2010) Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory responses. *Immunobiology* 215(8):611–616.
- O'Sullivan SE, Bennett AJ, Kendall DA, Randall, MD (2006). Cannabinoid ligands as activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). 16th Annual Symposium on the Cannabinoids; Burlington, Vermont. International Cannabinoid Research Society p. 59
- O'Sullivan SE, Tarling EJ, Bennett AJ, Kendall DA, Randall MD (2005). Novel time-dependent vascular actions of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biochem. Biophys Res Commun*; 337:824–831.

- O'Sullivan SE, Tarling EJ, Bennett AJ, Kendall DA, Randall MD (2005). Novel time-dependent vascular actions of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biochem. Biophys Res Commun*; 337:824–831.
- Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Yeda T (2007). Biosynthetic pathways of peroxisome proliferator-activated receptor. *Br J Pharmacol*; 4: 1842–57
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C (2006). Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab Mar*; 3(3):167–75.
- Palazuelos J T, Egia A, Mechoulam R, Guzman M, Galve-Roperh I (2006) Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J* 20:2405–2407
- Palmer TD, Makakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH (1999). Fibroblast growth factor 2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*; 19: 8487–8497.
- Parkinson J (1817). An essay on the shaking palsy. Londres
- Parolaro D, Realini N, Vigano D, Guidali C, Rubino T (2010). The endocannabinoid system and psychiatric disorders. *Exp Neurol*. 224(1):2–14.
- Paxinos G, Watson C (2005) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Elsevier: Amsterdam.
- Peñafiel A, Gutierrez A, Martin R, Perez-Canellas MM, De la Calle A (1996). A tangential neuronal migration in the olfactory bulbs of adult lizards. *Neuroreport*; 7: 1257–1260
- Perez-Reyes, M, White W R, McDonald S A, Hicks R E, Jeffcoat A R, Cook CE, (1991). The pharmacologic effects of daily marijuana smoking in humans, *Pharmacol Biochem Behav*; 40, 691–694.
- Pertwee RG (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci*; 76:1307–1324.
- Pertwee RG (2010). Receptor and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonist and antagonists. *Curr Med Chem*; 17(14): 1360–1381
- Pertwee RG, (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptor. *Life Sci*; 76:1307–1324

- Perwee RG (2005). Pharmacological actions of cannabinoids. In: Pertwee RG, editor. Cannabinoids. Handbook of experimental Pharmacology. Vol.168. Heidelberg: Springer-Verlag. P. 1-51
- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF y Cabral GA (1998). Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in the rat brain. *J Neurosci Res* ; 51, 391-402.
- Piomelli D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.
- Piper AS, Yeats JC, Bevan S, Docherty RJ (1999). A study of the voltage-dependence of capsaicin-sensitive membrane currents in rat sensory neurons before and after acute desensitization. *J Physiol*; 518:721-733. [
- Pixley S KR, De Vellis J (1984). Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Dev Brain Res*, 15: 201-209
- Poling JS, Rogawski MA, Salem N, Vicini S (1996). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K⁺ channels. *Neuropharmacology* 35:983-991
- Pope C, Mechoulam R, Parsons L (2010) Endocannabinoid signaling in neurotoxicity and neuroprotection. *Neurotoxicology* 31(5):562-71.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berma MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Ferder CC (2002). Characterization of novel endocannabinoids, virodhamine with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 301(3):1020-4.
- Powles T, te Poele R, Shamash J, Chaplin T, Propper D, Joel S y cols (2005) Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood* 105(3): 1214-1221.
- Prescott ED, Julius D (2003). A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, 300:1284-1288
- Racke MK, Gocke AR, Muir M, Diab A, Drew PD, Lovett-Racke AE (2006) Nuclear receptors and autoimmune disease: the potential of PPAR agonists to treat multiple sclerosis. *J Nutr* 136(3): 700-703.

- Rakic P (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145:61–84
- Rakic P (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 227:1054–1056
- Ramiro-Fuentes S, Fernandez-Espejo E (2011) Sensitization to cocaine is inhibited after intra-accumbal GR103691 or rimonabant, but it is enhanced after co-infusion indicating functional interaction between accumbens D(3) and CB1 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*; (4): 949–59.
- Ramón y Cajal S (1833). ¿neuronismo o reticularismo? las pruebas objetivas de la unidad anatómica de las células nerviosas
- Ramón y Cajal S (1911). *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés* (Maloine, Paris.).
- Ramos Atance JA, Fernandez-Ruiz J, Gúzmán Pastor M (2009) editores. Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoides. Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC). M-13638-2009
- Ramos, JA y Fernández-Ruiz, JJ (2003). Estado actual de los conocimientos sobre el sistema cannabinoide endógeno. En Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides. Editado por la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid, pp. 9–28.
- Ramsey, I.S., M. Dellinger, and D.E. Clapham. ((2006)). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68: 619–647.
- Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP (2006). Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry*, 11:514–522
- Reynolds B, Weiss S (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*; 255:1707–1710
- Reynolds BA, Weiss S (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*; 255:1707–1710
- Rhee M-H, Vogel Z, Barg J, Bayewitch M, Levy R, Hanus L, Breuer A, and Mechoulam R (1997) Cannabinol derivatives: binding to cannabinoid receptors and inhibition of adenylyl cyclase. *J Med Chem* 40:3228–3233.

- Rice D, Barone JrS (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal model. *Environ health perspect*; 108 (Suppl 3): 511-533
- Riedel G, Davies SN (2005). Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb Exp Pharmacol*, 168:445-477.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, He'aulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Ne'liat G, Caput D, Ferrara P, Soubrie' P, Breli'e`re JC, and Le Fur G (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*; 350:240-244.
- Robbe D, Alonso G, Chaumont S, Bockaert J, Manzoni OJ (2002). Role of p/q- Ca²⁺ channels in metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent presynaptic long-term depression at nucleus accumbens synapses. *J Neurosci*; 22:4346-4356.
- Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden, Heuvel JP, Kaminski NE (2006). Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activatedreceptor γ independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol. Pharmacol* 70:101-111.
- Rodríguez de Fonseca F, Carrera MRA, Navarro M, Koob GF, Weiss F (1997). Activation of corticotropin releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science*, 276:2050-2054.
- Rodríguez de Fonseca F, Gorriti MA, Fernández-Ruiz JJ, Palomo T, Ramos JA (1994). Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol Biochem Behav*, 47:33-40
- Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Martín-Calderón JL, Gorriti MA, Navarro M (1998). Role of de endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol Disease*; 5: 483-501.
- Romero J, Berrendero F, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernández-Ruiz JJ (2000). Unilateral 6-hydroxydopamine lesión of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *life Sci*; 66:485-494.
- Romero J, de Miguel R, García-Palomero E, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA (1995). Time-course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand on extrapyramidal function. *Brain Res*; 694:223-232

- Romero J, García-Palomero E, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA (1996). Involvement of GABA-B receptors in the motor inhibition produced by agonists of brain cannabinoid receptor. *Behav Pharmacol*; 7:299–302.
- Rosenfeld P, Gutierrez YA, Martin AM, Mallett HA, Alleva E, Levine S (1991). Maternal regulation of the adenocortical response in preweanling rats. *Physiol Behav*; 50:661–71.
- Ross HR, Napier I, Connor M (2008). Inhibition of recombinant human T-type calcium channels by Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *J Biol Chem*; 283:16124–16134
- Ross RA, Brockie HC, Stevenson LA, Murphy VL, Templeton F, Makriyannis A, and Pertwee RG (1999a) Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656 and AM630. *Br J Pharmacol*; 126:665–672.
- Rots NY, de Jong J, Workel JO, Levine S, Cools AR, De Kloet ER. (1996). Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J Neuroendocrinol*; 8:501–6.
- Rubio T, Vigano D, Realini N, Guifali C, Braidali C, Braida D, Capurro V, Castiglioni C, Cherubio F, Romualdi P, Candeletti S, Sala M, Parolaro D (2008). Chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional Profile in adult rats: Behavioral and Biochemical correlates. *Neuropsychopharmacol*; 1–12
- Rueda D, Navarro B, Martínez-Serrano A, Guzmán M, Galve-Roperh I (2002). The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap 1/B-Raf/ERK pathway. *J Biol Chem*; 277:46645–50.
- Ruiu S, Pinna GA, Marchese G, Mussinu J–M, Saba P, Tambaro S, Casti P, Vargiu R, Pani L (2003). Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*; 306:363–370.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota , Greasley PJ (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*; 152:1092–1101.
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T y Greasley PJ (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*; 152, 1092–1101.

- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152:1092–1101
- Sachs C, Jonsson G (1975). Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol*, 24: 1-8
- Sagredo O, García-Arencibia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, y Fernández-Ruiz J (2007). Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol*, 36(1): 82-91.
- Sagredo O, Garcia-arencibia M, Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J (2007). Cannabinoid and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol*, 36(1): 82-91
- SAMHSA (2004). Substance Abuse and mental health service administration. Results from the 2003 National Survey on drug use and health. National findings, office of applied studies, NSDUH series H-25; Rockville, MD.
- Sanchez C, Galve-Roperh I, canova C, Brachet P, Guzmán M (1998). $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett*, 436: 6 -10
- Sanchez C, Rueda D, Segui B, Galve-Roperh I, Levade T y Guzman M (2001). The CB1 cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan, *Mol Pharmacol*; 59, 955-959.
- Sañudo-Peña MC, Walker JM (1997). Role of the subthalamic nucleus in cannabinoid actions in the sustancia nigra of the rat. *J Neurophysiol*. 77:1635-1638
- Sañudo-Peña MC, Tsou K, Walker JM (1999). Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci*, 65: 703-713.
- Sañudo-Peña MC, Romero J, Seale GE, Fernandez-Ruiz JJ, Walker JM (2000). Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol*, 391: 269-274
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HHQ, George SR, O'Dowd BF (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 64:193-198

- Scharcz G, Karajgi B, McCarthy R (2009). Synthetic delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol) can improve the symptoms of schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*; 29(3):255-8.
- Scharff C, Kirn JR, Grossman M, Macklis JD, Nottebohm F(1988). Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behavior in adult songbirds. *Neuron*, 25:481-492
- Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16(14): 4322-4334.
- Schlicker E y Kathmann M (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*; 22, 565-572
- Schlicker E, Timm J, Zentner J y Gothert M (19997). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn-Schiedebergs Arch Pharmacol*; 356, 583-589.
- Schmechel DE, Rakic PA (1979). Golgi study of radial glia cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol*; 156:115 -152
- Schumacher M.A., Moff I, Sudanagunta S.P., Levine J.D. (2000). Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. Loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes. *J Biol Chem*; 275:2756-2762
- Schwartzing RK, Huston JP (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioural brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*; 50: 275-331
- Schweitzer P (2000). Cannabinoids decrease the K⁺ M-current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci*; 20, 51-58.
- Segovia G, Mora F, Crossman AR, Brotchie JM (2003). Effects of CB1 cannabinoid receptor modulating compounds on the hyperkinesia induce by high-dose levodopa in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Mov Disord*; 18(2): 138-149.
- Shapira AHV, Cooper JM, Dexter D (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*; 1:1269

- Shi C, Szczesniak A, Mao L, Jollimore C, Coca-Prado M, Hung O, Kelly ME (2003). A3 adenosine and CB1 receptors activate a PKC-sensitive Clcurrent in human nonpigmented ciliary epithelial cells via a G beta gamma-coupled MAPK signaling pathway. *Br J Pharmacol*; 139, 475-486.
- Shire D, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Oustric D, Pesse`gue B, Bonnin-Cabanne O, Le Fur G, Caput D, and Ferrara P (1996a) Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta*; 1307:132-136.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D y Ferrara P (1995). An amino-terminal variant of the central cannabionoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem*; 270, 3726-3731.
- Showalter VM, Compton DR, Martin BR, and Abood ME (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther*; 278:989-999
- Sigiura T, Waku K (2002). Cannabinoid receptor and their endogenous ligands. *Biochem J*; 132:7-12.
- Sink KS, McLaughlin PJ, Wood JAT, Brown C, Fan P, Vemuri VK, Pang Y, Olzewska T, Thakur GA, Makriyannis A, Parker LA, Salamone JD (2008). The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food-reinforced behavior but does not induce signs of nausea in rats. *Neuropsychopharmacology*; 33:946-955.
- Sink KS, Vemuri VK, Wood J, Makriyannis A, Salamone JD (2009). Oral bioavailability of the novel cannabinoid CB1 antagonist AM6527: effects on food-reinforced behavior and comparisons with AM4113. *Pharmacol Biochem Behav*; 91:303-306.
- Sofic E, Riederer P, Heinsen H, Beckman H, Reynolds GP, Herbenstreit G, Youdim MB (1988). Increased iron (III) and total iron content in postmortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Trans*; 74:199:205.
- Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D (2008). The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol*, 154:369-383.
- Sotelo JR, Trujillo-Cenóz O (1958). Electron microscope study on the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. *Z Zellforsch*; 49: 1- 12

- Srivastava MD, Srivastava BI y Brouhard B (1998). Delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology*; 40:179-185
- Stefano GB (2000). Endocannabinoid immune and vascular signaling. *Acta Pharmacol Sin*; 21:1071-1081.
- Stella N (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*; 48:267-277.
- Stensaas LJ, Stensaas SS (1968). An electron microscope study of cells in the matrix and intermediate laminae of the cerebral hemisphere of the 45mm rabbit embryo. *Z Zellforsch*; 91:341-365
- Story G.M., Peier A.M., Reeve A.J., Eid S.R., Mosbacher J., Hricik T.R., Earley T.J., Hergarden A.C., Anderson D.A., Hwang S.W., McIntyre P., Jegla T., Bevan S., Patapoutian A(2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*; 112:819-829
- Sun Y, Alexander SPH, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA, Bennett AJ (2007). Cannabinoid activation of PPAR α a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol*; 152:734-743.
- Sweatt JD (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*; 76, 1-10.
- Tanda G, Pontieri FE, Di-Chiara G (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, 276, 2048-2050.
- Tersigni TJ, Rosenberg HC (1996). Local pressure application of cannabinoid agonists increases spontaneous activity of rat substantia nigra pars reticulata neurons without affecting response to iontophoretically-applied GABA. *Brain Res*; 733:184-192.
- The Boulder Committee (1970). Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat. Rec*. 166: 257-262
- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*; 150:613-623

- Thomas A, Stevenson LA, Wease KN, Price MR, Baillie G, Ross RA, Pertwee RG (2005). Evidence that the plant cannabinoid $\Delta 9$ -tetrahydrocannabivarin is a cannabinoid CB1 and CB2 receptor antagonist. *Br J Pharmacol*; 146:917–926.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21:531–543
- Trendelenburg AU, Cox SL, Schelb V, Klebroff W, Khairallah L y Starke K (2000). Modulation of (3)H-norradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and beta-adrenoceptors in mouse tissues. *Br J Pharmacol* 130, 321–330.
- Trice J E, Stanfield BB (1986). Evidence for the generation in the adult rat dentate gyrus of neurons that extend axonal projections. *Ann. Neurol*; 20: 392
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Pena MC, Mackie K y Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptor in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid Cb1 receptor in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83:393–411.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie, K., Walker, J.M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB-1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83:393–411.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K (1997). Cannabinoids inhibits N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons, *J Neurophysiol* 78, 43–50.
- Tzavara ET, Perry KW, Rodriguez DE, Bymaster FP y Nomikos GG(2001). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A increases norepinephrine outflow in the rat anterior hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 426, 3–4.
- Uchigasshima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M (2007). Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci*; 27:3663–3676
- Ugur T, Bartels M, Kis B, Scherbaum N (2008). Psychosis following anti-obesity treatment with rimonabant. *Obes Facts*; 1(2):103–5.

- Ujike H, Takaki M, Nakata K, Tanaka Y, Takeda T y Kodama M (2002). CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 7:515-8
- Valverde O, Karsak M, Zimmer A (2005). Analysis of the endocannabinoid system by using CB1 cannabinoid receptor knownout mice. In: Pertwee RG, editor. Handbook of experimental pharmacology-168 cannabinoid. Heidelberg (Germany): Springer-Verlag;117-145
- van der Stelt M, Di Marzo V (2003). The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol*; 7:480(1-3):133-50.
- van der Stelt M, Di Marzo V (2005). Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*, 7:37-50.
- Van der Stelt M, Veldhuis WB, Bär PR, Veldink GA, Vliegthart JF, Nicolay K (2001). Neuroprotection by Δ^9 -tetrahydrocannabinol, the main active compound of marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *J Neurosci*; 21:6475-6479
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marmett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310:329-32
- Vaysse PJ-J, Gardner EL, Zukin RS (1987). Modulation of rat brain opioid receptors by cannabinoids. *J Pharmac Exp Ther* 241:534-539.
- Velasco G, Carracedo A, Blázquez C, Lorente M, Aguado T, Haro A (2007). Cannabinoids and gliomas. *Mol Neurobiol*, 36:60-7.
- Velasco G, Carracedo A, Blázquez C, Lorente M, Aguado T, Haro A, Sánchez C, Galve-Roperh I, Guzmán M (2007). Cannabinoids and gliomas. *Mol Neurobiol*, 36:60-67.
- Viveros MP, Llorente R, Moreno E, Marco EM (2005). Behavioral and neuroendocrine effects of cannabinoid in critical developmental periods. *Behav Pharmacol*; 16:353-362
- Viveros MP, Marco EM, File SE (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav*, 81:331-342

- Voigt T (1989). Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol*; 289: 74–88
- Wallmichrath I, Szabo B (2002). Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience*; 113(3):671–82.
- Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CG, van der Kooy D (1996). Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci*; 19: 387–393
- Wenger T, Moldrich G (2002). The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66:301–307
- Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge S A, Mackie K, Greasley PJ, Ross RA y Rogers MJ (2009). The putative cannabinoid receptor GRP55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 106:16511–16516
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*, 18: 779– 791
- Wickens AP, Pertwee RG (1993). Δ^9 -tetrahydrocannabinol and anandamide enhance the ability of muscimol to induced catalepsy in the globus pallidus of rats. *Eur J Pharmacol*; 250:205–208.
- Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C (2004). Neurogenesis in the ependymal layer of adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol*, 192:251–264
- Xu J, Chavis JA, Racke MK, Drew PD (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor- α and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of astrocytes. *J Neuroimmunol* 176(1–2): 95–105.
- Xu J, Racke MK, Drew PD (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist fenofibrate regulates IL-12 family cytokine expression in the CNS: relevance to multiple sclerosis. *J Neurochem* 103(5): 1801–1810.
- Yin H, Chu A, Li W, Wang B, Shelton F, Otero F, Nguyen DG, Caldwell JS, Chen YA (2009). Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using β -arrestin PathHunter™ assay. *J Biol Chem*; 284:12328–12338

- Yin H, Chu A, Li W, Wang B, Shelton F, Otero F, Nguyen DG, Caldwell JS, Chen YA (2009). Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using β -arrestin PathHunter™ assay. *J Biol Chem* 284:12328–12338
- Yu S, Reddy JK (2007). Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta* 1771 (8): 936–51.
- Zani A, Braidà D, Capurro V, Sala M (2007) Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and AM 404 protect against cerebral ischaemia in gerbils through a mechanism involving cannabinoid and opioid receptors. *Br J Pharmacol* 152(8): 1301–1311.
- Zavitsanou K, Garrick T, huang XF (2006). Selective antagonist 3H-SR141716A binding cannabinoid CB1 receptor is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 28:355–360.
- Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RK, Jallo JI, Tuma RF (2007). Cannabinoid CB2 receptor activation decreases cerebral infarction in a mouse focal ischemia/reperfusion model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(7):1387–96
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *PNAS*; 24:7925–7930
- Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E y Karniol IG (1982). Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta-9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology*. 76:245–250.
- Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Moreira FA, Guimarães FS (2006). Cannabidiol, a cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res*; 39(4): 421–9
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*; 400:452–457