

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Fisiología



## TESIS DOCTORAL

Fisiopatología del modelo de Theiler: acciones terapéuticas del cannabidiol  
y efectos protectores en progenitores de oligodendrocitos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miriam Mecha Rodríguez

Directora

Carmen Guaza Rodríguez

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Fisiología**



**FISIOPATOLOGÍA DEL MODELO DE THEILER:  
ACCIONES TERAPÉUTICAS DEL CANNABIDIOL Y  
EFECTOS PROTECTORES EN PROGENITORES DE  
OLIGODENDROCITOS**

**Tesis Doctoral**

**Miriam Mecha Rodríguez**

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Fisiología**



**Fisiopatología del modelo de Theiler: acciones  
terapéuticas del cannabidiol y efectos  
protectores en progenitores de  
oligodendrocitos**

**Tesis Doctoral**

**Miriam Mecha Rodríguez**

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Fisiología**



**Fisiopatología del modelo de Theiler: acciones  
terapéuticas del cannabidiol y efectos  
protectores en progenitores de  
oligodendrocitos**

Memoria presentada por

**Miriam Mecha Rodríguez**

Para optar al grado de Doctora

**VºBº de la Directora:**

**Dra. Carmen Guaza Rodríguez**

**Instituto Cajal (CSIC)**

*A mis mentoras, Carmen y María José, por ayudarme a descubrir una irremediable pasión  
por la ciencia.*

*A mis padres, Teresa y Antonio, por guiarme con su luz desde el asfalto y desde el cielo.*

*A todos los que me llevan a más real distancia que ningún dios ni hombre.*

*Yo no soy yo.  
Soy todos estos  
que van a mi lado sin yo verlos;  
que, a veces, voy a ver,  
y que, a veces, olvido.  
Los que callan, serenos, cuando hablo,  
los que perdonan, dulces, cuando odio,  
los que pasean por donde no estoy,  
los que quedarán en pie cuando yo muera.*

(adaptación de un poema de la obra `Eternidades`, de Juan Ramón Jiménez, 1918)

## CONTENIDO

---

INTRODUCCIÓN .....	3
1.- LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	4
1.1.- Etiología y clasificación.....	4
1.2.- Patogenia de la Esclerosis Múltiple. ....	7
1.3.- Tratamiento de la Esclerosis Múltiple y estrategias terapéuticas.....	13
2.- MODELOS EXPERIMENTALES EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE. ....	17
2.1.- Encefalitis Autoinmune Experimental .....	17
2.2.- Enfermedad desmielinizante inducida por el virus de Theiler (TMEV-IDD). ....	18
3.- CANNABINOIDES Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	20
3.1.- Receptores cannabinoides: distribución y funciones fisiológicas. ....	22
3.2.- Mecanismos de transducción de señales. ....	23
3.3.- Ligandos cannabinoides.....	24
3.4.- El cannabidiol como posible agente terapéutico.....	26
OBJETIVOS .....	29
MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	32
1.- MATERIAL.....	33
1.1- Animales. ....	33
1.2.- Reactivos.....	33
1.3.- Compuestos.....	36
1.4.- Instrumentos.....	38
1.5.- Oligonucleotidos.....	39
2.- MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	41
2.1.- Animales. ....	41
2.2.- Cultivos primarios de oligodendrocitos. ....	44
2.4.- Estudios de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR). ....	49
2.5.- Microscopía óptica y confocal. ....	51
2.6.- Análisis estadístico.....	51
RESULTADOS.....	52
1.- Fisiopatogénesis de la encefalomiелitis murina por infección con el virus de Theiler como modelo experimental de Esclerosis Múltiple. ....	53
1.1- Caracterización de la evolución histopatológica (activación microglial, grado de afectación axonal y desmielinización). ....	55
1.2- Curso temporal de la expresión génica de marcadores de progenitores de oligodendrocitos en médula espinal cervical.....	62
1.3- La zona subventricular como nicho neurogénico: proliferación celular, migración y diferenciación a oligodendrocitos en áreas lesionadas.....	64

2.- Efecto del tratamiento con CBD en la fase crónica (terapéutica) y aguda en el modelo TMEV-IDD. ....	72
2.1- Tratamiento en fase terapéutica. ....	74
2.2- Tratamiento en fase inductora. ....	78
3.- Estudio del efecto del cannabidiol en cultivos primarios de progenitores de oligodendrocitos. ....	85
3.1- Efecto del cannabidiol sobre la viabilidad y la proliferación celular en situación basal. ....	86
3.2- Efecto del cannabidiol en condiciones de estrés oxidativo e inflamación. ....	88
3.3- Efectos del cannabidiol en flujos de calcio. ....	93
3.4- Efecto del cannabidiol en condiciones de estrés de retículo endoplásmico. ....	96
DISCUSIÓN .....	101
CONCLUSIONES .....	121
REFERENCIAS .....	123
EPÍLOGO .....	141
ANEXOS .....	144

## INTRODUCCIÓN

---

## 1.- LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

---

El nombre de Esclerosis Múltiple (EM) hace referencia a la definición patológica de la enfermedad, ya que *esclerosis múltiple* o *esclerosis en placas* (del griego *skleros* – duro – más el sufijo *-osis* – de enfermedad) apunta hacia la presencia de cicatrices glióticas en las áreas en las que se ha eliminado la mielina del SNC, así como al carácter parcheado y múltiple de las lesiones. Aunque ya han pasado más de 100 años desde que Charcot, Carswell, Cruveilhier y otros describieran las características clínicas y patológicas de la EM, esta enfermedad se ha posicionado como la patología inflamatoria desmielinizante y degenerativa más común del Sistema Nervioso Central (SNC), y el desorden neurológico más frecuente en adultos jóvenes después de los accidentes de tráfico (Noseworthy y cols., 2000).

La EM cursa con sintomatología variable, entre la que destaca: espasticidad, debilidad muscular, temblor, dolor, ataxia, parálisis, fatiga, pérdida progresiva de sensibilidad, alteración visual, dificultad respiratoria, dificultad de habla, incontinencia urinaria, disfunción sexual y depresión. Dicha sintomatología puede explicarse en parte por la aparición progresiva y continuada de placas escleróticas que aparecen mayoritariamente en el nervio óptico, tronco cerebral, cerebelo y médula espinal, y tanto los síntomas como la severidad y el curso de la enfermedad varían dependiendo tanto del lugar en el que se encuentren las placas como del grado de desmielinización y de neurodegeneración. Además, la evidencia sugiere que el inicio de la sintomatología sucede tiempo después del comienzo de la enfermedad, y cuando aparecen los síntomas ya existen signos de atrofia a nivel de SNC.

---

### 1.1.- ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN.

---

Si bien hace 170 años desde que se describiese por primera vez la EM, 60 años desde que se conociese su posible origen autoinmune y 30 desde que se dispone de tratamientos que intentan limitar o frenar el daño neurodegenerativo que cursa en la enfermedad, la causa de la EM sigue siendo desconocida y el trabajo epidemiológico reciente se ha centrado en dos puntos importantes: los factores genéticos y los factores ambientales.

### 1.1.1.- FACTORES GENÉTICOS.

---

Se ha confirmado la existencia de factores genéticos que predisponen a padecer la enfermedad mediante estudios familiares, ya que entre un 12% y un 19% de los individuos con EM tienen familiares afectados, sobre todo en primer grado, y los gemelos monozigóticos tienen una mayor correlación que los dizigóticos (26% frente a un 2,3%) (Willer y cols., 2003).

Además, la susceptibilidad a padecer EM está fuertemente asociada al Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) en el cromosoma 6, concretamente en el gen DRB1 del CMH tipo II (Hafter y cols., 2007) y a distintos haplotipos de CPH tipo I, que confieren desde un riesgo moderado a alto de padecer la enfermedad, hasta un efecto protector (Cree y cols., 2010). Además, la EM muestra una mayor frecuencia en mujeres, con una relación mujer/hombre de 1,4/1.

Estos datos, junto con estudios de asociación con el genoma que han identificado numerosos alelos de riesgo independientes de CPH, apuntan hacia una influencia poligénica en la susceptibilidad a padecer EM.

### 1.1.2.- FACTORES AMBIENTALES.

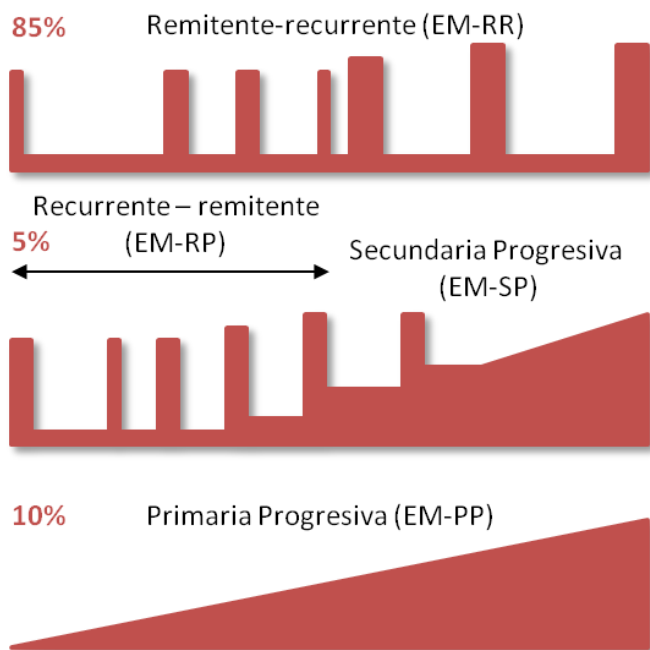
---

Ya que los factores genéticos sólo explican parcialmente la susceptibilidad a padecer EM, es plausible que estén influyendo otros factores de riesgo. Así, la existencia de factores ambientales como la carencia en vitamina D, la deficiente exposición a la luz solar, infecciones con el virus de Epstein-Barr (VEB) y otros han abierto un nuevo campo de estudio en la etiología de la EM que se detalla a continuación (ver revisión en Ontaneda y cols., 2011).

- Vitamina D y exposición solar : se ha relacionado un incremento en la frecuencia de la EM con su supuesta distribución latitudinal y un déficit de vitamina D, debido a una menor radiación solar en las áreas con mayor frecuencia de la enfermedad. Dicha hipótesis se apoya con datos que indican que en la EM son comunes los bajos niveles de vitamina D, y dichos niveles se correlacionan inversamente con la tasa de remisión y de incapacidad; además, hay estudios preliminares que apuntan hacia los efectos beneficiosos de la suplementación con vitamina D en la dieta. Experimentalmente, se ha visto que la administración de vitamina D previene el desarrollo de la enfermedad en el modelo de EM de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE).

- Virus de Epstein-Barr: aunque se han barajado muchos virus potenciales que desencadenarían la patología de la EM, entre los que se encontrarían el virus del moquillo canino, el del sarampión, el de la varicela zóster, o el virus del herpes 6, se está prestando especial atención al VEB, ya que la EM y la mononucleosis tienen una distribución geográfica similar y numerosos estudios han mostrado un aumento de prevalencia en EM en pacientes que previamente habían padecido mononucleosis, sobre todo en la niñez. De esta manera, el riesgo de padecer EM es unas 10 veces mayor en individuos que experimentan una infección no diagnosticada por el VEB en la infancia temprana, y de 20 veces entre personas que desarrollan mononucleosis infecciosa más tardíamente (Willer y cols., 2005).

Con todo ello, se deduce que en el desarrollo de la EM son importantes los factores genéticos, pero no todas las personas genéticamente susceptibles acaban desarrollando la enfermedad y por lo tanto la búsqueda y el análisis de posibles factores ambientales que inicien la EM suponen un avance muy importante en el estudio etiológico de esta enfermedad.



**Figura 1. Clasificación de la Esclerosis Múltiple y del avance neurológico en función del tiempo.** EM: Esclerosis Múltiple; RR: remitente recurrente; SP: secundaria progresiva; PP: primaria progresiva; RP: recurrente progresiva

Por otro lado, la clasificación de la EM y el avance del deterioro neurológico en función del tiempo se realiza de acuerdo con la sintomatología en dos categorías distintas: remitente-recurrente (EM-RR) y crónica progresiva (EM-CP), esta última subdividida

en primaria-progresiva (EM-PP), secundaria-progresiva (EM-SP) y recurrente-progresiva (EM-RP). De esta manera, un 85% de los pacientes padece en su inicio la forma RR, y de éstos casi el 50% desarrolla una fase SP, mientras que el 10% de los pacientes padece la forma PP y alrededor del 5% la RP. Además, en el 70% de los casos la enfermedad se inicia entre los 20 y 40 años de vida, y rara vez se presenta en individuos menores de 15 años.

---

## 1.2.- PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

---

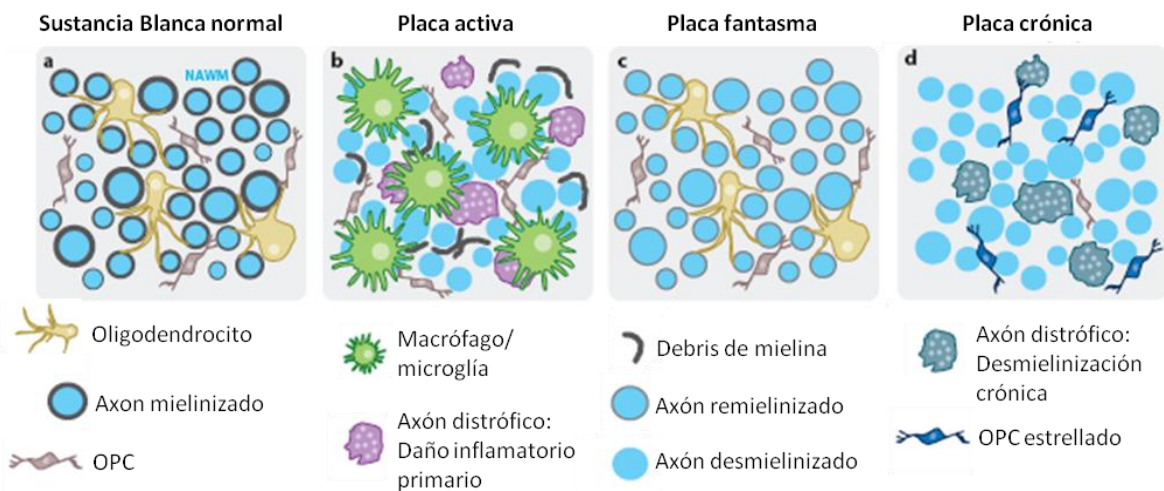
La principal característica patológica de la EM es la placa de desmielinización, que consiste en un área muy bien delimitada localizada en sustancia blanca, rosada y con mayor consistencia, que contrasta con la sustancia blanca preservada. Microscópicamente, la placa tiene cuatro alteraciones típicas que serían: la pérdida de mielina, la pérdida axonal, la formación de cicatrices astrocitarias y la presencia de infiltrados inflamatorios perivasculares. De esta manera, se definen cuatro tipos de placas en la EM en función de su morfología (Lucchinetti y cols., 2000): placas agudas, placas crónicas activas, placas crónicas inactivas y placas corticales, cuya distinción se basa en el daño del tejido nervioso y en la presencia de los infiltrados inflamatorios.

*-Placas agudas:* se definen como tal por la presencia de infiltrados inflamatorios perivasculares. Aunque en general tienen una extensión pequeña y se suelen localizar alrededor de un vaso sanguíneo, en este tipo de placas existe una pérdida de mielina pero todavía se pueden observar algunos axones mielinizados. Su principal característica es la pérdida de la citoarquitectura de la barrera hematoencefálica, y la presencia de infiltrados de manera predominante en el espacio perivascular. Este tipo de placa suele ser la menos frecuente, debido a que probablemente el infiltrado inflamatorio es un fenómeno de corta duración (alrededor de un mes) y que aparece frecuentemente en fases iniciales de la EM, por lo que su observación en estudios histopatológicos *post-mortem* es difícil ya que la mayoría de los pacientes fallecen cuando se encuentra en la fase crónica progresiva de la enfermedad.

*-Placas crónicas activas:* caracterizadas por tener en el borde de la placa un límite bien delimitado de desmielinización activa, contienen mielina vesiculizada y macrófagos fagocíticos, que apuntan hacia un crecimiento de la placa hacia la periferia. Los infiltrados inflamatorios perivasculares son escasos, y si bien la desmielinización es

completa salvo en el borde y el tamaño de la placa suele ser mayor que el de la placa aguda, puede observarse una pérdida axonal importante.

-*Placas crónicas inactivas*: suelen ser placas extensas que confluyen con varias placas vecinas, y se caracterizan por una desmielinización completa con bajo número de oligodendrocitos y escasa densidad de axones. En su mayor parte, la placa suele estar ocupada por astrocitos, por lo que a veces a este tipo de placa se le denomina placa gliótica, y su borde está bien delimitado y carece de desmielinización activa. Hay cierto porcentaje de placas en fase crónica que han remielinado, por lo que son difíciles de observar y se denominan *placas fantasma*. Dichas placas fantasma carecen de infiltrados, la mayoría de los axones tienen vainas de mielina aunque más finas y con menor distancia internodo, y no existe gliosis.



**Figura 2. Clasificación de los tipos de placa presentes en EM en función del daño del tejido nervioso, y de la presencia de infiltrados inflamatorios.**

-*Placas corticales*: a diferencia de los otros tres tipos de placas, las placas corticales se localizan en la sustancia gris de corteza, ganglios basales, tronco y médula espinal. Esta peculiaridad hace que su composición en cuanto a infiltrados inflamatorios, desmielinización y pérdida axonal sea diferente; así, en lesiones corticales es raro encontrar infiltrados inflamatorios perivasculares pero es frecuente observar áreas de activación microglial sin componente inflamatorio hematógeno. Además, y aunque la desmielinización es clara, el hecho de que en sustancia gris haya menor densidad de mielina hace que se trate de un fenómeno menos aparente que impide observar el límite

claro de la placa. Por último, y además de la pérdida axonal, puede observarse una pérdida de sinapsis, de dendritas y una pérdida de neuronas discreta que no suele superar el 10%.

Con todo ello, se han podido definir las características neuropatológicas de la EM entre las que encontramos inflamación, desmielinización/remielinización y pérdida axonal, que se desarrollan a continuación.

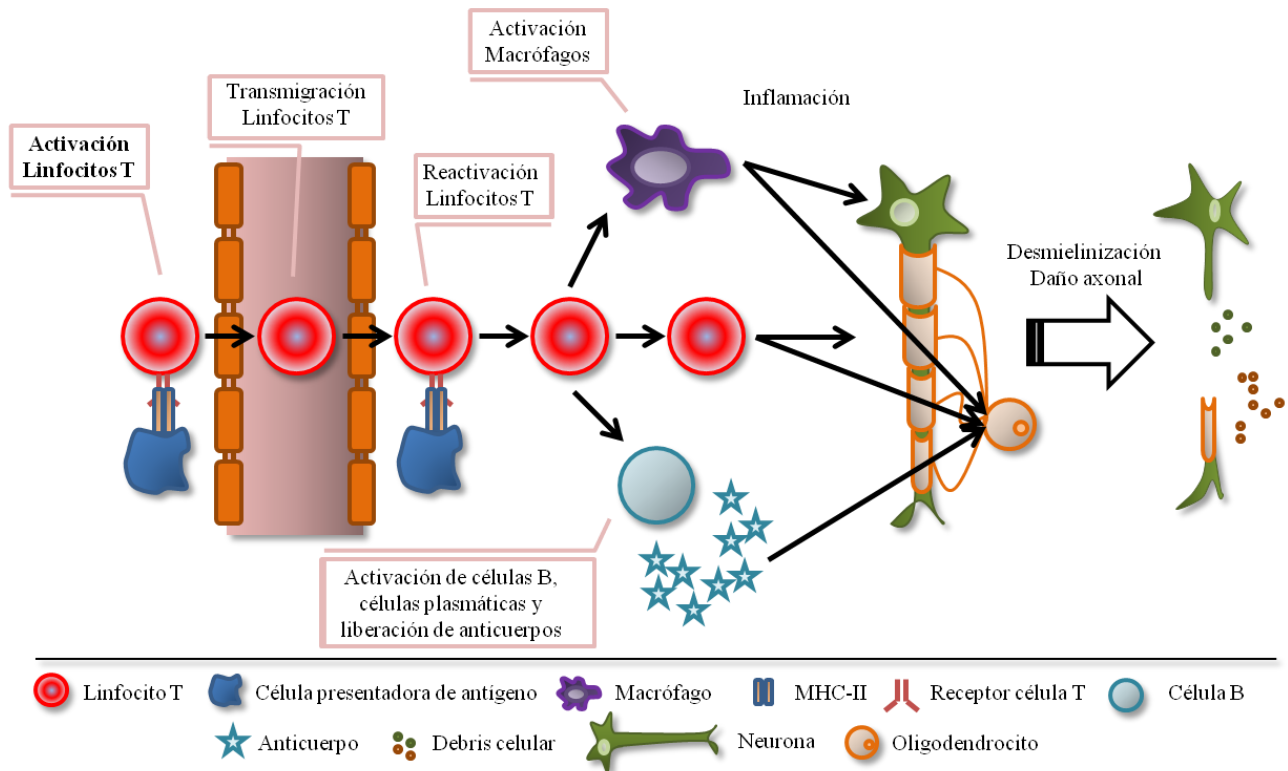
### 1.2.1- INFLAMACIÓN EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

---

Se postula que la inflamación en la EM podría comenzar con un incremento en la migración de linfocitos autorreactivos T CD4<sup>+</sup> a través de la barrera hematoencefálica, seguido por un proceso inflamatorio dominado por infiltrados perivasculares CD8<sup>+</sup> que serían en parte los responsables de las placas localizadas alrededor de los ventrículos laterales, cuerpo calloso, corteza, sustancia blanca subcortical, nervios ópticos, tronco cerebral y médula espinal. Así, las células T CD4<sup>+</sup> activadas inducirían un aumento en la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio cerebral y favorecerían el paso de linfocitos al SNC; una vez dentro del parénquima cerebral, se produciría un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  o IL-12) que favorecerían la amplificación de la respuesta inmune, así como citoquinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) (Traugott y Lebon, 1988b; Hulsof y cols., 2002).

La inducción de respuestas autoinmunes contra componentes de la mielina en el SNC por parte de células T autorreactivas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en patologías de etiología infecciosa podría producirse a través de mecanismos como: a) *mimetismo molecular*: implicaría la activación cruzada de las células T autorreactivas por epítomos codificados por el agente infeccioso, y que presentarían cierta homología en secuencia o estructura con epítomos de mielina (Fujinami y Oldstone, 1985); b) *expansión de epítomos*, donde la activación de las células T autorreactivas frente a antígenos de mielina se promovería tras la destrucción tisular como consecuencia de la respuesta inmune específica del agente infeccioso (Miller y Karpus, 1994); y c) *superantígenos virales*: según esta teoría, se produciría una activación no específica de células T autorreactivas por moléculas inmunoestimuladoras producidas por bacterias y virus que no se unen al complejo trimolecular receptor T-antígeno-MHC-II (Scherer y cols., 1993). Una vez activadas, las células T específicas para mielina cruzarían la barrera hematoencefálica, proliferarían y

secretarían las citoquinas proinflamatorias que a su vez estimularían a las células de microglía, los macrófagos y los astrocitos, reclutarían células B y en último término producirían un daño directo sobre la mielina, los oligodendrocitos y los axones.



**Figura 3. Esquema explicativo del inicio de la inflamación en la EM.** Se hipotetiza que la EM podría comenzar con una activación de linfocitos T en periferia, su trans migración a través de la BHE y reactivación en el parénquima nervioso, y la activación de células inmunes en SNC que mediarían el daño sobre las neuronas y los oligodendrocitos provocando daño axonal y desmielinización.

### 1.2.2- DESMIELINIZACIÓN/REMIELINIZACIÓN EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

Una de las principales causas de la sintomatología de la EM es debida al daño oligodendroglial y a la pérdida de la mielina que recubre los axones. De esta manera, la desmielinización observada en EM suele ser extensa y prácticamente completa en las placas crónicas, mientras que en lesiones agudas la mielina aparece desestructurada y vesiculizada. En general, hay una elevada correspondencia entre la desmielinización activa y la presencia de macrófagos con restos de mielina en el interior (fagocitada en placas agudas y crónicas activas), mientras que en dichas áreas activas no hay presencia de linfocitos T o B, indicando que la desmielinización crónica implica otros procesos patogénicos distintos a la respuesta inmune adaptativa (Henderson y cols., 2009). Histológicamente, el grado de desmielinización puede ponerse de manifiesto mediante la tinción de Luxol-fast blue o microscopía electrónica, o mediante inmunohistoquímica

con anticuerpos específicos para proteínas de mielina como el MBP (del inglés *myelin basic protein*), MOG (del inglés *myelin oligodendrocyte glycoprotein*), CNPasa y RIP.

En respuesta al daño tisular en el SNC inducido en la EM, las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs, del inglés *oligodendrocyte progenitor cells*) migran y se diferencian a oligodendrocitos premielinizantes que extienden sus procesos sobre los axones desmielinizados. La demostración neuropatológica de la remielinización en lesiones de EM fue demostrada a nivel ultraestructural en 1965 (Perier y Gregoire, 1965), observándose como la presencia de vainas de mielina más delgadas y cortas entre nodos, que producirían una tinción más pálida a microscopía electrónica (placas fantasmas). Además del papel de la remielinización en la recuperación de la conducción saltatoria de los impulsos nerviosos, que ha sido demostrada en modelos experimentales, hay estudios que han mostrado que la remielinización es capaz de prevenir la degeneración axonal (Perier y Gregoire, 1965; Blakemore, 2008). Dicha remielinización puede ser muy extensa en un porcentaje significativo de pacientes y parece ser robusta en algunas lesiones, particularmente en las primeras etapas de la enfermedad. A largo plazo y con la cronicidad de la enfermedad, tanto inhibidores locales de diferenciación de los OPCs como factores axonales que impedirían el proceso de recubrimiento, o incluso un defecto en el reclutamiento de OPCs hacia el área desmielinizada, provocarían que en etapas tardías de la enfermedad la remielinización sea escasa (Goldschmidt y cols., 2009). Si bien la remielinización se produce en un 20% de los pacientes con EM, en la mayoría de los casos es menos exitosa y se alterna con ciclos de desmielinización y remielinización que aparentemente agotan la capacidad reparadora del SNC.

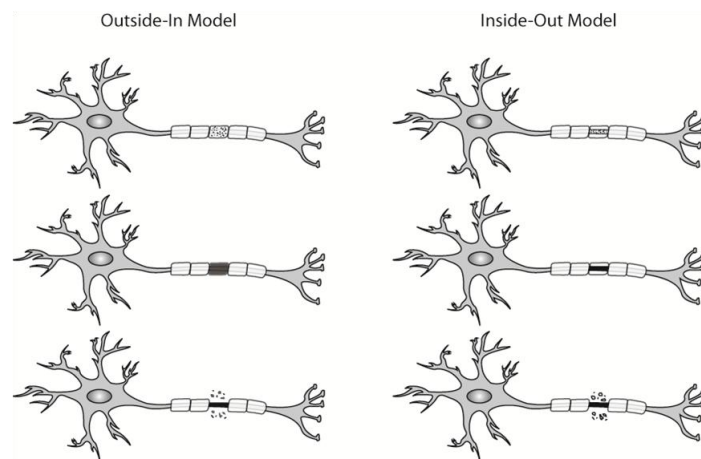
### 1.2.3.- DAÑO AXONAL EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

---

La extensión del daño axonal en pacientes con EM puede variar entre el 20 y el 90%, encontrándose tanto dentro de las placas como en la zona adyacente, en sustancia blanca de apariencia normal alejándose de la lesión e incluso en tractos distales a la lesión como consecuencia de la degeneración Walleriana (Ferguson y cols., 1997; Ludwin, 2006). Si bien el daño axonal es un fenómeno precoz y variable entre placas y sujetos, en las placas agudas puede observarse la existencia de axones con alteraciones morfológicas (arrosamientos) que sugieren fallo de transporte axonal, y axones transectados con bulbos terminales que pueden observarse mediante tinciones de

inmunohistoquímica para la proteína precursora de amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*).

Dentro de los mecanismos potencialmente implicados en el daño axonal, destacan los relacionados con el estado de inflamación en las fases tempranas de la patología (Bjartmar y Trapp, 2003), así como aquellos mediadores implicados en el daño al oligodendrocito y a la mielina. No obstante, existe controversia acerca de si el daño axonal es una consecuencia de la desmielinización, o la causa de la misma. Dicha controversia se basa en un modelo propuesto por Tsunoda y Fujinami en 2002, según el cual el daño axonal se podría iniciar en el interior de axón y extenderse hacia el oligodendrocito (modelo “inside-out”), o bien iniciarse en el oligodendrocito y extenderse hacia el interior del axón (modelo “outside-in”). Lo más probable es que el daño axonal en la EM constituya un proceso multifactorial (Dutta y Trapp, 2007), con mecanismos compensatorios que contribuirían a mantener la función motora a pesar del daño axonal durante los primeros estadios de la enfermedad, de tal manera que los daños neurológicos permanentes observados en las fases más avanzadas tendrían lugar tras el agotamiento de dichos mecanismos compensatorios (Trapp y cols., 2001; Bjartmar y Trapp, 2001).



**Figura 4. Modelos propuestos para explicar el daño axonal y la desmielinización presentes en la EM (según Tsunoda y Fujinami, 2002).** Según el modelo “outside-in”, el daño axonal se iniciaría en el interior del axón y se extendería hacia el oligodendrocito; según el modelo “inside-out”, el daño se iniciaría en el oligodendrocito y se extendería hacia el interior del axón.

---

### 1.3.- TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS.

---

El tratamiento de la EM varía dependiendo de las características individuales de la enfermedad. Durante la última década la terapéutica ha sufrido una transformación importante, ya que mientras que anteriormente los tratamientos eran principalmente sintomáticos, actualmente se ha demostrado que varios agentes terapéuticos son parcialmente efectivos para modificar el desarrollo de la enfermedad. Así, ciertos agentes inmunomoduladores, que incluyen: interferón  $\beta$  (IFN $\beta$ ) 1b subcutáneo, IFN $\beta$  1a intramuscular, IFN $\beta$  1a subcutáneo y el acetato de glatiramer (AG) son ahora fármacos de primera línea en el tratamiento de la EMRR, y junto a la Mitoxantrona, el Natalizumab y el Fingolimod constituyen terapias que no curan la enfermedad, pero previenen la aparición de nuevos brotes y quizá pueden retrasar la aparición de la discapacidad. En el caso de la EM progresiva, el tratamiento es más difícil que el dirigido contra las formas remitentes-recurrentes ya que en estas formas progresivas de la enfermedad existe menos inflamación y más degeneración, lo que hace que el efecto de los fármacos anteriormente mencionados pueda ser marginal y se recurra a la utilización del quimioterápico Mitoxantrona, de anticuerpos monoclonales (en fase clínica II) o al trasplante de médula ósea para frenar el desarrollo de la enfermedad.

Como consecuencia del incremento de estudios sobre la EM en la última década, han surgido nuevas estrategias terapéuticas basadas en el freno o la limitación de los acontecimientos moleculares patológicos responsables de la sintomatología, que actuarían a nivel de la remielinización, la neuroprotección, la inmunomodulación y la limitación de la trans migración leucocitaria.

---

#### 1.3.1.- REMIELINIZACIÓN.

---

La disfunción neurológica observada en la EM ha sido tradicionalmente atribuida a la desmielinización y la muerte del oligodendrocito, provocando de manera secundaria que los axones desmielinizados se vuelvan más vulnerables al daño durante la fase aguda, y al daño y a la atrofia durante la fase crónica, y ello desencadene la cronicidad en la enfermedad. Mientras que las causas de dicha atrofia axonal siguen siendo desconocidas, la desmielinización podría predisponer a los axones a un daño secundario por múltiples mecanismos de citotoxicidad, incluyendo disfunción de los canales iónicos y daño mitocondrial, o fallo de soporte neurotrófico para los oligodendrocitos mielinizantes, lo cual implicaría que una de las principales funciones de la mielina

también sería la de proteger a los axones de un daño secundario (Rodríguez, 2003; Waxman, 2006). Si bien la pérdida de mielina que recubre los axones ha sido la principal característica que ha definido la EM desde que la enfermedad se empezó a estudiar hace más de 100 años, no fue hasta la década de los 60 cuando se observó que este fenómeno se acompaña de un proceso espontáneo de remielinización (Bunge y cols., 1961; Prineas y cols., 1969), que se produciría en dos grandes fases: la primera consistiría en la colonización de las lesiones por los OPCs, y la segunda en la diferenciación de dichos progenitores a oligodendrocitos mielinizantes que contacten los axones desmielinizados para generar vainas de mielina funcionales. Hay que tener en cuenta que tanto los oligodendrocitos como sus progenitores son altamente vulnerables al daño oxidativo debido a su elevada tasa metabólica, elevado contenido en hierro y bajas concentraciones de enzimas antioxidantes; además, son altamente susceptibles a la toxicidad por glutamato, por exposición a citoquinas inflamatorias, al daño mitocondrial y a la toxicidad por una elevada concentración de calcio entre otros [para revisión ver Bradl, 2010)].

Por tanto, los mecanismos de reparación de la mielina que impliquen la inhibición o disminución del daño al oligodendrocito, la terapia celular como el trasplante de células formadoras de mielina, o la activación endógena de la remielinización (Stangel y Hartung, 2002) se perfilan actualmente como importantes armas terapéuticas para combatir la EM.

### 1.3.2.- NEUROPROTECCIÓN.

---

Entre los posibles mecanismos neurotóxicos implicados directamente en la EM y en otras enfermedades neurodegenerativas, destacan aquellos mediados por excitotoxicidad a través de exceso de glutamato, toxicidad mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> y por mediadores inflamatorios como el TNF $\alpha$ , las citoquinas o el óxido nítrico, un aumento en la entrada de Ca<sup>2+</sup>, el daño oxidativo o el daño mitocondrial. Teniendo en cuenta estos mecanismos, que estarían directamente implicados en la muerte de neuronas y oligodendrocitos y en último término en la desmielinización de los axones, aquellos agentes inhibidores del receptor de glutamato, inhibidores de la óxido nítrico sintasa (iNOS, del inglés *inducible Nitric Oxide Syntase*) y del óxido nítrico, antioxidantes, inhibidores de canales de Ca<sup>2+</sup>, antiapoptóticos, así como factores de crecimiento y factores neurotróficos se plantean como posibles candidatos neuroprotectores en EM (Karussis y cols., 2006).

Además, las terapias antiinflamatorias de primera línea que se aplican como tratamiento en los pacientes con EM también presentan cierto carácter neuroprotector. Concretamente, el IFN $\beta$  (además de sus acciones inmunomoduladoras) inhibe la proliferación de astrocitos, la activación microglial y la producción de factores neurotóxicos por células inflamatorias, mientras que el AG induce un perfil de respuesta inmunitaria que conlleva la producción de factores de crecimiento y por tanto a la neuroprotección, por lo que estos tratamientos protegen indirectamente a la neurona y a los axones, y pueden prevenir la neurodegeneración que caracteriza a esta enfermedad.

### 1.3.3.- INMUNOMODULACIÓN Y LIMITACIÓN DE LA TRANSMIGRACIÓN LEUCOCITARIA.

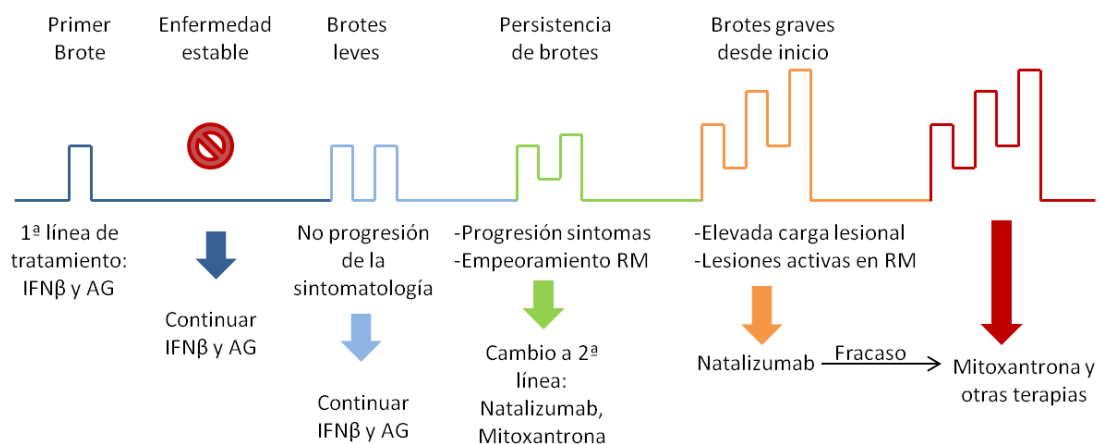
---

Como se ha mencionado anteriormente, dos de los tratamientos que se utilizan en pacientes con EM, el IFN $\beta$  y el AG, tienen un mecanismo de actuación que se basa principalmente en la regulación de la respuesta inmune. Las acciones del IFN $\beta$  se centran en la disminución de la proliferación de linfocitos T, la reducción de la producción de TNF $\alpha$ , la inhibición de la presentación antigénica, y la reducción del tráfico leucocitario a través de la barrera hematoencefálica (BHE) entre otros (Noseworthy y cols., 2000). Con respecto al AG, se trata de una mezcla de polipéptidos sintéticos cuyo papel inmunomodulador se basa en: a) la competición con la proteína básica de mielina MBP por la unión con la molécula CPH II; b) la competición entre los complejos GA-CPH y MBP-CMH por su unión al receptor de la célula T; c) la producción de citoquinas que favorecen la respuesta inmunológica hacia un fenotipo Th2 (Arnon y Sela, 2003). Sin embargo, y a pesar de que ambos fármacos reducen el número de recaídas y son beneficiosos para los pacientes, se ha visto que el tratamiento a largo plazo puede producir que los pacientes generen anticuerpos frente a IFN $\beta$  y GA, lo cual ha llevado a la utilización de otros agentes inmunosupresores como la Mitoxantrona, la Azatioprina o la Ciclofosfamida.

De manera complementaria, la limitación de la entrada de leucocitos al parénquima nervioso parece un mecanismo de actuación imprescindible para frenar el desarrollo de la EM. La secuencia de pasos para que dicha entrada pueda producirse implica el rodamiento, la adhesión firme y la transmigración por acción conjunta de moléculas de adhesión presentes en el endotelio cerebral (ICAM-1 y VCAM-1) y de quimioquinas (CCL2, CCL5) implicadas en la atracción de los leucocitos al foco inflamatorio. En esta

línea, se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas basadas en la limitación de la trans migración leucocitaria, como se recoge en la revisión de (Rychly y Nebe, 2006).

A raíz de impresiones de pacientes con EM que experimentaban cierta mejoría tras el consumo habitual de marihuana (Pertwee, 2002), se han desarrollado estudios con modelos animales de EM que han mostrado una reducción de la sintomatología motora debida, entre otros efectos, a la regulación de la respuesta inflamatoria (Arévalo-Martín y cols., 2003; Croxford y Miller, 2003) apuntando hacia un papel inmunomodulador (ver revisión en Walter y Stella, 2004) y de limitación de la trans migración leucocitaria (Arévalo-Martín y cols., 2003) por parte de los cannabinoides. Además, existen importantes revisiones en la literatura sobre el papel neuroprotector de los cannabinoides (Hampson y cols., 2000; Grundy y cols., 2001; Mechoulamn y cols., 2002; Jackson y cols., 2005; Sarne y Mechoulam, 2005; Van der Stelt y Di Marzo, 2005), así como estudios en los que se analiza sus papel neuroprotector en modelos de EM (Molina-Holgado y cols., 2002b; Croxford y Miller, 2003; Pryce y cols., 2003; Docagne y cols., 2007; Loría y cols., 2007; Loría y cols., 2010). Por otro lado, se ha observado que la administración de agonistas de receptores cannabinoides en el modelo TMEV-IDD de EM induce un incremento en el número de axones remielinizados (Arévalo-Martín y cols., 2003). Todo ello hace que los cannabinoides sean unos buenos candidatos a tener en cuenta en las estrategias terapéuticas de la EM.



**Figura 5. Ejemplo de procedimiento para el tratamiento de la EM en sus distintas variantes.**

## 2.- MODELOS EXPERIMENTALES EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

---

Si bien se considera que la EM es una enfermedad de naturaleza autoinmune, existe la posibilidad de que pueda ser causada por un virus u otro agente infeccioso. Así, en la actualidad se definen dos modelos animales que se utilizan para estudiar la EM y que abarcarían las dos posibles etiologías de la enfermedad: (1) los modelos “inmunes”, que se basan en la reacción autoinmune frente a la mielina que se desarrolla tras la inmunización con fragmentos de proteínas de mielina, o mediante transferencia pasiva con células T autorreactivas frente a epítomos de mielina, y cuyo principal exponente es el modelo de la EAE en sus distintas variantes, y (2) los modelos “virales” que implican la inoculación de un virus tipo coronavirus o enterovirus entre otros, y cuyo mejor representante es la enfermedad desmielinizante inducida por la infección con el virus de la encefalomyelitis murina de Theiler (TMEV-IDD, del inglés *Theiler's murine encephalomyelitis virus – Induced demyelinating disease*). Gracias a ambos tipos de modelos se ha podido estudiar a con una mayor profundidad los mecanismos potencialmente implicados en la patofisiología de la EM, así como analizar los éxitos y fracasos terapéuticos para poder desarrollar tratamientos más directos y positivos para la EM.

---

### 2.1.- ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL .

---

La EAE es un modelo muy bien establecido y ampliamente utilizado de EM, que puede resultar en una patología tanto progresiva como recurrente-remitente. Puede utilizarse en varios organismos, desde ratones hasta monos, a través de la inmunización con péptidos de mielina entre los que destacan secuencias concretas de la proteína básica de mielina (MBP), de la proteína proteolipídica (PLP, del inglés *proteolipid protein*) y de la glicoproteína de mielina oligodendrocitaria (MOG), o bien mediante la inyección de células T encefalitogénicas específicas de antígenos del SNC generadas en otro animal. La inmunización con péptidos de mielina desencadenaría una respuesta inmunitaria que da lugar a la aparición de células T autorreactivas activadas que proliferan en órganos linfoides secundarios; posteriormente se produciría una extravasación de linfocitos T a través de la BHE hacia SNC, así como de monocitos/macrófagos periféricos atraídos por quimioquinas y citoquinas liberadas por las células T específicas de mielina, y finalmente se desencadenaría la desmielinización de los tractos axonales (Berard y cols, 2010).

Se hipotetiza que las lesiones en el SNC de pacientes con EM se inducen por respuestas autoinmunes contra las vainas de mielina, como también ocurre en la EAE. De esta manera, según esta teoría la principal diana en la EM sería la mielina propiamente dicha (mielinopatía) o los oligodendrocitos (oligodendroglíopatía). La degeneración axonal, que está demostrada tanto en EM como en EAE, se produciría de manera secundaria tras la destrucción de la mielina, apoyando el modelo “outside-in” previamente descrito.

---

## 2.2.- ENFERMEDAD DESMIELINIZANTE INDUCIDA POR EL VIRUS DE THEILER (TMEV-IDD).

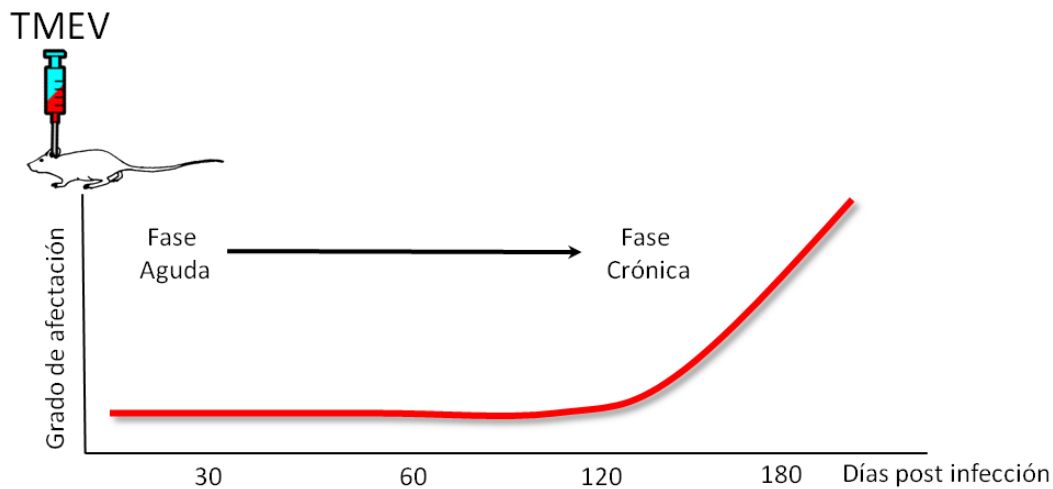
---

Como se ha mencionado anteriormente, los factores ambientales (particularmente las infecciones virales) han sido frecuentemente asociados con la inducción o exacerbación de la EM. Los virus, incluyendo el retrovirus endógeno humano, el VEB, y el herpesvirus humano 6 han sido asociados con la patogénesis de la EM. Basándose en dichas asociaciones, se han desarrollado modelos animales que implican la inoculación de determinadas cepas de virus, entre las que destaca la infección con el virus de Theiler como modelo más utilizado, el virus de la hepatitis murina, el virus del moquillo canino o el virus del bosque de Selmiki.

El estudio de la enfermedad desmielinizante inducida por la infección con el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler ha permitido el estudio de aspectos de la EM que no habrían sido posibles en otros modelos. Fue en 1937 cuando se descubrió que el virus de Theiler era el responsable de trastornos entéricos y neurológicos en cepas susceptibles de ratón como la SJL/J (Theiler, 1937), y en 1975 se propuso que la sintomatología desmielinizante asociada a la infección con el virus podría constituir un modelo experimental de estudio de la EM en su variante primaria progresiva (Lipton, 1975). Así, este modelo reproduce muchas de las características neuropatológicas de la EM como son la inflamación desmielinizante (Traugott y Lebon, 1988; Pope y cols., 1996; Begolka y cols., 1998), el daño axonal e incluso la remielinización (McGavern y cols., 1999; Tsunoda y Fujinami, 2002).

El virus de TMEV es un picornavirus entérico (del género cardiovirus) formado por una única cadena de RNA de polaridad positiva; se subdivide en dos grupos en función de su neurovirulencia, de tal manera que se definirían las cepas *extremadamente virulentas* o GDVII, que incluirían las cepas GDVII y FA que inducirían una encefalomiелitis aguda que en la mayoría de los casos resulta letal, y las *menos virulentas* o TO (del

inglés *Theiler's Original*), que incluirían las cepas BeAn y Daniel (DA) y son las utilizadas para inducir el modelo de EM.



**Figura 6. Ejemplo de grado de afectación motora a lo largo del tiempo en ratones susceptibles SJL/6 infectados intracerebralmente con la cepa DA atenuada del virus de Theiler.**

Las cepas BeAn y DA provocan una enfermedad bifásica: durante la fase aguda (una semana después de la infección) el virus infecta neuronas y los ratones acaban desarrollando una polioencefalomielitis aguda a nivel patológico, si bien la mayoría de los animales carecen de sintomatología. A continuación, la eliminación del virus o la persistencia en SNC depende de la cepa de ratón en la que se inocule; así, cepas resistentes como BALB/c o C57BL/6 no desarrollan una patología crónica debido a la erradicación del virus en SNC. En contraste, cuando el virus se inocula intracerebralmente en cepas susceptibles como SJL/J, los ratones desarrollan una enfermedad crónica inflamatoria y desmielinizante con signos clínicos a los 30-50 días post-infección en el caso de la cepa BeAn, y 140-180 días post-infección en la cepa DA dependiendo de la dosis y de la edad del animal (para revisión, ver Sato, 2010). Si bien el virus de TMEV inicialmente se replica en el hipocampo, estriado, corteza y médula espinal, y aunque acaba siendo parcialmente eliminado por el sistema inmune, las células T activadas por la infección con el virus se vuelven progresivamente autorreactivas contra epítomos de mielina, resultando en una autoinmunidad posterior por expansión de epítomos (Miller y cols., 1997). Para que la fase crónica desmielinizante pueda producirse en los ratones susceptibles, el virus tiene que ser inoculado en una ventana de tiempo determinada, concretamente entre las cuatro y seis semanas de edad de los animales, lo cual estaría en consonancia con la hipótesis relativa

a que el origen de la EM podría deberse a una infección viral durante la infancia y adolescencia temprana. El virus persiste en los ratones susceptibles en las células de la estirpe monocito/macrófago/microglía, en astrocitos y oligodendrocitos, y da lugar a la sintomatología de la fase crónica causada por la desmielinización de sustancia blanca en médula espinal, que se caracteriza histológicamente por la aparición de vacuolas, pérdida de mielina y la presencia de infiltrados linfocitarios, macrófagos y células plasmáticas en médula espinal. Esta fase crónica produce unos signos clínicos que reproducen ciertas características de la EM primaria progresiva en términos de deterioro neurológico como son fallos de coordinación motora, espasticidad, debilidad en las extremidades, incontinencia urinaria y finalmente parálisis de las patas traseras (Mc Gavern y cols., 1999).

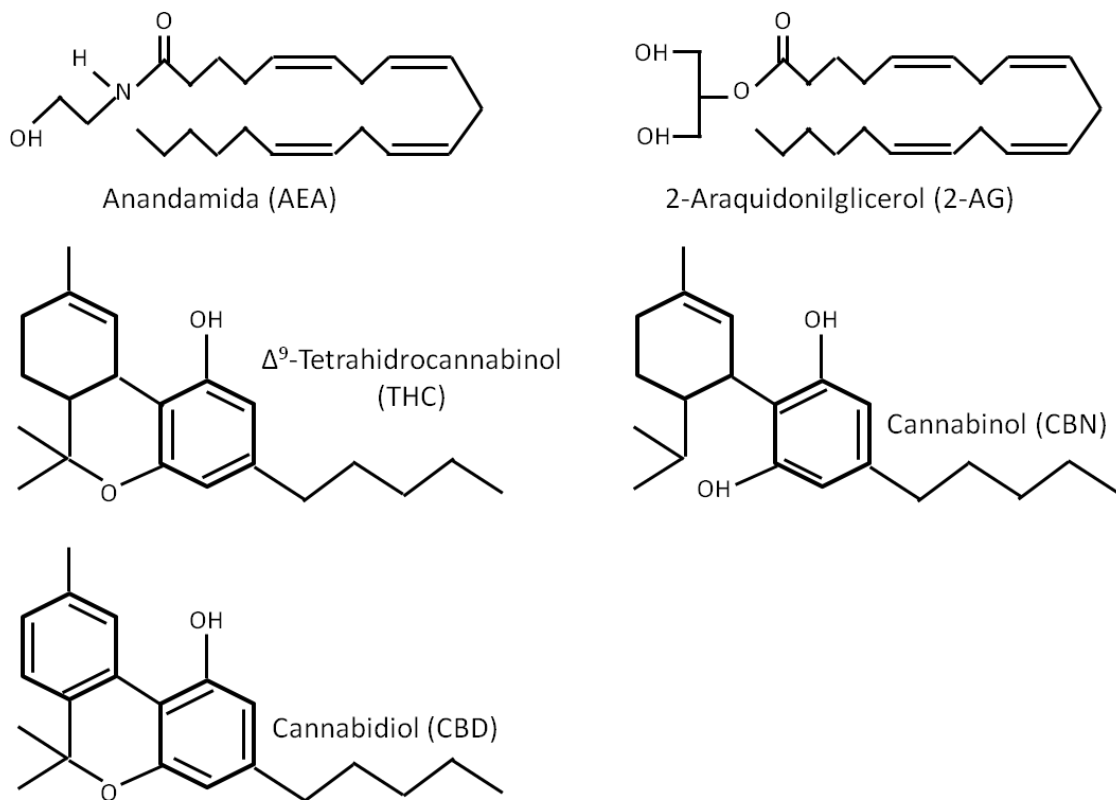
### 3.- CANNABINOIDES Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

---

Como ya se ha mencionado, existen en la literatura importantes revisiones sobre el papel protector e inmunomodulador de los cannabinoides, perfilándolos como unos buenos candidatos a tener en cuenta en las estrategias terapéuticas de la EM. Las primeras evidencias del uso medicinal del cannabis (*Cannabis sativa*) se remontan al reinado del emperador Sheng-Nung en China (año 2737 a.C.), quien recoge en sus manuscritos de farmacopea la utilidad de la planta para tratar calambres, dolor reumático o menstrual. También en el antiguo Egipto hay testimonio en numerosos papiros de la administración de preparados de cannabis para el tratamiento de diversas dolencias. Sin embargo, en Europa hay que adelantarse en el tiempo hasta el siglo XIX para encontrar el cannabis como una medicina común y de uso legal para el tratamiento del dolor, convulsiones, espasmos y emesis.

El retroceso en este uso terapéutico se produce en el año 1925, cuando la Convención de Génova incluye el cannabis y el hachís en la lista de drogas ilícitas y peligrosas. Actualmente, se están realizando numerosos avances en el uso terapéutico legal de esta planta, como demuestra la comercialización del fármaco Sativex ® (con mezcla de dos cannabinoides distintos como se detallará más adelante) para distintos tratamientos en humanos.

*Cannabis sativa* contiene más de 421 compuestos químicos, de los cuales más de 80 están agrupados bajo el término de “cannabinoides” por su estructura carbocíclica de 21 carbonos. En los últimos 20 años se ha podido descubrir y caracterizar un sistema de señalización endógena (o sistema endocannabinoide), caracterización que se ha realizado principalmente gracias al aislamiento y determinación de la estructura del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) por Gaoni y Mechoulam en 1965 (Gaoni y Mechoulam, 1965), y al descubrimiento del receptor específico de este cannabinoide – el receptor CB1 – por Devane y cols en 1988 (Devane y cols., 1988). Estos hallazgos y todos los que les han ido sucediendo han permitido caracterizar los componentes del sistema endocannabinoide, cuyos elementos están compuestos por los ligandos endógenos, sus receptores, los componentes responsables de la síntesis e inactivación de los mismos y por mecanismos específicos de la recaptura.



**Figura 7. Formulación química de los principales endocannabinoides (AEA y 2-AG) y fitocannabinoides (THC, CBN y CBD).**

---

### 3.1.- RECEPTORES CANNABINOIDES: DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONES FISIOLÓGICAS.

---

En un principio se pensó que los cannabinoides ejercían sus efectos a través de interacciones inespecíficas con lípidos de membrana debido a la naturaleza liposoluble de sus ligandos naturales. Fueron trabajos como el de Howlett en 1984, en el que mostró que la inhibición de la actividad adenil ciclasa por el ligando  $\Delta^9$ -THC se producía a través de proteínas  $G_{i/o}$  (Howlett, 1984), y el anteriormente mencionado de Devane y cols (Devane y cols., 1988) entre otros, los que permitieron demostrar la existencia de receptores cannabinoides de membrana. Así, hasta la fecha han sido clonados dos receptores cannabinoides, CB1 y CB2, que comparten un 44% de homología de secuencia y pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  con siete dominios transmembrana.

a) *Receptor CB1*: es el más abundante en cerebro de mamífero, distribuyéndose principalmente en SNC y órganos y tejidos periféricos como células inmunes, glándulas adrenal y pituitaria, corazón, pulmón y partes del tracto gastrointestinal, urinario o reproductivo (Howlett y cols., 2002), así como adipocitos (Cota y cols., 2003), hígado (Osei-Hyiaman y cols., 2005) y células parietales de estómago (Pazos y cols., 2008).

Dentro de SNC, la mayor densidad de receptor CB1 en la rata se encuentra en ganglios basales, hipocampo y cerebelo, asociado a capacidad cognitiva, memoria y coordinación motora (Herkenham y cols., 1991; Tsou y cols., 1998). En humanos, esta distribución se mantiene pero se encuentra con mayores niveles de expresión en corteza límbica respecto a regiones motoras y sensoriales, apuntando a un importante papel de CB1 en el procesamiento de la información motivacional y cognitiva (Glass y cols., 1997).

En neuronas, la distribución de CB1 puede encontrarse tanto a nivel presináptico en dendritas y somas, como a nivel postsináptico en axones y terminales nerviosos, donde puede mediar la inhibición de la liberación de neurotransmisores (Howlett y cols., 2002). En células gliales, dicho receptor se expresa tanto en progenitores neurales (Aguado y cols., 2005) como en astrocitos (Stella, 2004) y en oligodendrocitos (Molina-Holgado y cols., 2002b); en el caso de las células microgliales, CB1 sólo ha sido descrito en estudios *in vitro* (Sinha y cols., 1998; Cabral y cols., 2001; Facchinetti y cols., 2003; Carrier y cols., 2004).

b) *Receptor CB2*: se localiza principalmente a nivel periférico en células del sistema inmune y hematopoyético, de tal manera que los niveles más altos de ARNm de este receptor pueden encontrarse (de mayor a menor nivel) en linfocitos B, natural killer, monocitos, neutrófilos, linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 (Galiegue y cols., 1995). Trabajos en la última década han mostrado expresión de CB2 a nivel de SNC (Gong y cols., 2006; Onaivi y cols., 2006), concretamente a nivel neuronal inducido por procesos patológicos (Wotherspoon y cols., 2005) y en progenitores neurales (Palazuelos y cols., 2006), así como *in vitro* en células gliales y astrocitos (Sheng y cols., 2005), oligodendrocitos (Molina-Holgado y cols., 2002b), células microgliales perivasculares (Nunez y cols., 2004) y activadas (Benito y cols., 2003; Maresz y cols., 2005; Nunez y cols., 2008).

c) *Otros receptores cannabinoides*: trabajos realizados en los últimos años apuntan hacia la existencia de receptores cannabinoides adicionales, distintos a los receptores CB1 y CB2 que podrían mediar efectos específicos a nivel de transmisión sináptica, sistema vascular y sistema inmune, como son el receptor GPR55 (del inglés *G protein-coupled receptor 55*) (Ryberg y cols., 2007; Lauckner y cols., 2008) y el receptor “abnormal-cannabidiol” (Offertaler y cols., 2003). Además, los cannabinoides pueden unirse a receptores específicos de otros sistemas de señalización como son el receptor vanilloide de tipo 1 (TPRV1, del inglés *transient receptor potential cation channel*) (Ross, 2003; Jordt y cols., 2004), receptores activados por proliferadores de peroxisomas o PPARs, (Sun y Bennett, 2007) y otros.

---

### 3.2.- MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.

---

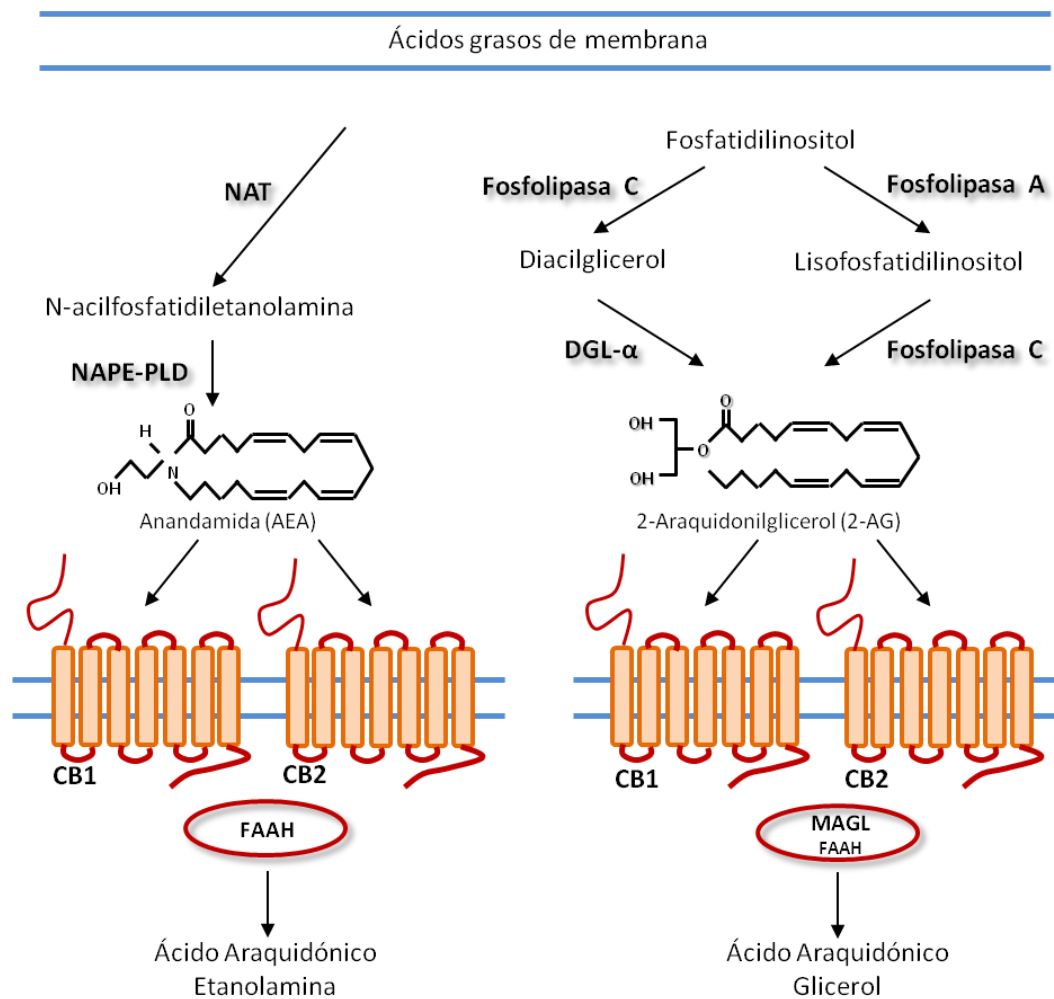
Tanto el receptor CB1 como el CB2 está acoplado a un sistema de traducción similar, donde la unión con el agonista induce la activación de proteínas G heterodiméricas de tres de las cuatro familias de proteínas G, principalmente del tipo proteínas  $G_{i/o}$ . Así, las señales de transducción asociadas a la activación de ambos receptores implican, entre otros, la inhibición de la producción de AMP cíclico mediante la inhibición de la enzima adelinato ciclasa (Kim y Thayler, 2001), la regulación de flujos de  $Ca^{2+}$  (Wilson y Nicoll, 2001; Guo e Ikeda, 2004), la activación de canales rectificadores de  $K^+$  (Mackie y cols., 1995) y de los canales dependientes de voltaje de tipo A (Deadwyler y cols., 1995). Además, se ha observado que ambos receptores pueden regular la

producción de ceramida, la activación de MAPK y la estimulación de la sintasa del óxido nítrico (Howlett y cols., 2002; Lambert y Fowler, 2005).

### 3.3.- LIGANDOS CANNABINOIDES.

#### a) Endocannabinoides

Entre los componentes endógenos que son capaces de unirse a los receptores cannabinoides y activarlos funcionalmente se encuentran aquellos derivados del ácido araquidónico, siendo los más importantes la N-araquidonil-etanolamida o anandamida (AEA, metabolizado principalmente por la enzima FAAH del inglés *fatty acid amide hydrolase*), el 2-araquidonilglicerol (2-AG, principalmente degradado por la enzima MAGL), y otros compuestos como el 2-araquidonil gliceril-éter (Noladin éter), el N-araquidonil-dopamina (NADA), o la O-araquidoniletanolamina (Virodhamina).



**Figura 8.** Esquema de las principales vías de síntesis y degradación de los endocannabinoides AEA y 2-AG a partir de ácidos grasos de membrana.

Existen otros derivados de ácidos grasos endógenos que también se consideran endocannabinoides por su capacidad de potenciar la actividad de AEA y 2-AG a través del mecanismo llamado “encourage effect”, como son: palmitoiletanolamida (PEA), estearoiletanolamida (SEA), oleoiletanolamida (OEA), araquidonilglicina, 2-lineloilglicerol, 2-palmitoilglicerol y oleamida (Hanus, 2007). Además, están los cannabinoides sintéticos que pueden actuar sobre los receptores cannabinoides, como el HU-210 y el WIN55,212-2.

#### b) Fitocannabinoides

A pesar de la evidencia emergente que apunta hacia las posibles propiedades terapéuticas de los más de 80 cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* (denominados fitocannabinoides), su introducción en la práctica clínica todavía está sujeta a controversia debido a los efectos psicotrópicos que ejercen muchos de ellos. Así, y si bien ha sido prestada especial atención al  $\Delta^9$ -THC, que tiene capacidad de unirse específicamente a los receptores CB1 y CB2 pero posee una elevada actividad psicotrópica, destacan también todos aquellos fitocannabinoides que poseen pocas o ninguna propiedades psicoactivas como el cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG), y cannabidivarina (CBDV) entre otros. Estos últimos ejercen múltiples acciones a través de mecanismos que sólo pueden ser relacionados parcialmente con la modulación del sistema endocannabinoide (Mechoulam y cols., 2007; Pertwee, 2008), y que también incluirían acciones sobre: canales TRP, receptores PPAR $\gamma$ , GPR55, abnormal-CBD, 5-HT1A, receptor de glicina  $\alpha 1$  y  $\alpha 1\beta$ , enzimas LOX y COX-2, y homeostasis del Ca $^{2+}$  (para revisión, ver Izzo y cols., 2009)

En este escenario el CBD (que constituye el 40% del extracto de la planta) podría presentarse como el mejor candidato para el uso clínico de los fitocannabinoides, ya que este compuesto carece de acciones psicoactivas y cognitivas y posee una excelente tolerancia en humanos (Mechoulam y cols., 2002). Debido a esta baja toxicidad, se han realizado numerosos ensayos clínicos para valorar la eficacia del CBD en distintas patologías. Así, la mayoría de estas pruebas han sido realizadas con Sativex<sup>®</sup>, la única preparación comercial disponible que contiene  $\Delta^9$ -THC y CBD en distintas proporciones que establecen las cuatro formulaciones distintas del fármaco; además, este preparado puede ser administrado mediante un espray oromucosal, por tabletas

sublinguales e inhalado (no fumado). Cabe destacar que en 2005 el Sativex ® en su administración por spray oromucosal fue legalizado para el tratamiento de algunos de los síntomas de la EM (Perras, 2005), y que desde 2010 su uso está permitido en nuestro país.

---

#### 3.4.- EL CANNABIDIOL COMO POSIBLE AGENTE TERAPÉUTICO.

---

El CBD es un compuesto natural de la marihuana aislado en los años 30 y 40, cuya estructura y configuración no fue descubierta hasta los años 60 por Mechoulam y colaboradores (Mechoulam y cols., 1970), si bien todavía se conoce muy poco sobre su farmacología molecular y sus posibles vías de señalización. Sin embargo, los efectos del CBD en analgesia, antiinflamación, así como su capacidad como antioxidante, neuroprotector y anti/pro apoptótico, apuntan hacia numerosos efectos farmacológicos positivos entre los que encontraríamos su potencial terapéutico para el tratamiento de la inflamación, diabetes, cáncer o enfermedades neurodegenerativas (Zuardi, 2008; Iuvone y cols., 2009).

Todas estas acciones pueden explicarse parcialmente por su estructura química: el CBD tiene propiedades antioxidantes intrínsecas al tratarse de un resorcinol (Mechoulam y cols, 1970; Hampson y cols., 1998; Hampson y cols., 2000; Mechoulam y cols., 2000), y es capaz de (1) prevenir *in vitro* el daño oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno al mismo nivel que el ascorbato (vitamina C) o el tocoferol (vitamina E) (Hampson y cols, 1998), (2) reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación lipídica (Borrelli y cols., 2009) e incluso (3) actuar eficazmente como agente neuroprotector en condiciones de isquemia (Hampson y cols., 2000; Durst y cols., 2007), sugiriendo un potencial importante para el tratamiento de patologías con componente oxidativo como la isquemia cerebral.

Por ello, la plétora de efectos farmacológicos del CBD tanto a nivel central como a nivel periférico ha llevado a desarrollar numerosos estudios para identificar otros mecanismos a través de los cuales el CBD puede estar desarrollando su actividad. Así, se ha visto que el CBD posee una baja afinidad por los receptores CB1 y CB2 pero puede actuar como agonista inverso a concentraciones nanomolares (Mechoulam y cols., 2007; Thomas y cols., 2007). Además, este fitocannabinoide incrementa los niveles de AEA a través de la inhibición de su recaptura y la regulación de la expresión y actividad de la enzima FAAH, así como la estimulación del receptor TRPV1 (Bisogno y cols., 2001);

por otro lado, puede unirse al receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> y de esta manera atenuar el infarto celular de tipo isquémico (Mishima y cols., 2005), también puede tener efecto ansiolítico (Campos y Guimares, 2008), e incluso modular alostéricamente a los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  (Kathmann y cols., 2006) entre otros.

Todos estos trabajos respaldan el amplio espectro de efectos biológicos del CBD tanto *in vivo* como *in vitro*, y así las acciones de este compuesto pueden resumirse hasta la fecha en los siguientes puntos destacados:

a) Efecto antiproliferativo, descrito en leucemia, cáncer de pulmón y glioma (Vaccani y cols., 2005; Ligresti y cols., 2006), así como la propiedad de inducir la regresión tumoral y la inhibición de la invasión celular del glioma en ratas (McKallip y cols., 2006), apunta hacia un papel importante del CBD en el control del desarrollo y progresión tumorales.

b) Efecto proapoptótico en células del sistema inmune (McKallip y cols., 2006), así como modulación de la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), de interleuquina 1 (IL-1) y de interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) en células mononucleares (Formukong y cols., 1988; Warzl y cols., 1991), y supresión de la producción de quimioquinas en células B humanas (Srivastava y cols., 1998). Este efecto antiinflamatorio no sólo parece estar limitado a procesos periféricos, sino que el CBD también parece prevenir la neuroinflamación (Walter y cols., 2003; Martín-Moreno y cols., 2010), que junto al efecto neuroprotector frente a toxicidad por glutamato (Hampson y cols., 1998; El-Remessy y cols., 2008) lo perfilarían como un importante agente neuroprotector.

Las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras del CBD han llevado a la elaboración de estudios en los que se valoraba este efecto en distintos modelos de neurotoxicidad y neurodegeneración. De esta manera, se ha visto que el CBD es capaz de controlar la toxicidad inducida por  $\beta$ -amiloide en modelos de Alzheimer (Esposito y cols., 2006a; Esposito y cols., 2006b; Esposito y cols., 2007), prevenir el daño neuronal inducido por 6-hidroxidopamina en modelos de Parkinson (Lastres-Becker y cols., 2005) e incluso disminuir el daño axonal y actuar como inmunomodulador en modelos de EM (Kozela y cols., 2011). Más allá, y como se ha mencionado anteriormente, el uso del fármaco Sativex<sup>®</sup> en pacientes con EM para tratar parte de la sintomatología de la enfermedad como la espasticidad y el dolor neuropático, junto a todas las acciones anteriormente descritas, sugieren que el CBD es

un buen candidato para la prevención y el tratamiento de las principales enfermedades neurodegenerativas a través de la protección de células neurales y no neurales de distintos insultos dañinos como el  $\beta$ -amiloide, la 6-hidroxiopamina o el glutamato, que son considerados como uno de los principales culpables de desórdenes como el Alzheimer o el Parkinson. Los efectos protectores del CBD han sido demostrados en distintos modelos animales de neurodegeneración, y estos datos junto a la seguridad y baja toxicidad del compuesto en distintos ensayos clínicos confirman su potencial farmacológico para el tratamiento de la sintomatología clínica y la progresión de una gran variedad de patologías.

Desafortunadamente, y a pesar del prometedor valor terapéutico del CBD, los mecanismos por los que lleva a cabo sus funciones todavía necesitan ser investigados a fondo ya que se trata de un compuesto único que aúna distintos tipos de propiedades (antiglutamatergico, antiinflamatorio, antioxidante) que además engloban un amplio espectro de mecanismos neurotóxicos que aparecen en las enfermedades neurodegenerativas (excitotoxicidad, inflamación, daño inflamatorio, etc.) por lo que, junto a la ausencia de efectos secundarios incluida la psicoactividad, sugiere que el estudio de los mecanismos de acción de este fitocannabinoide puede tener una gran importancia para abrir nuevos horizontes en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EM .

## OBJETIVOS

---

La gran mayoría de los estudios que se han realizado hasta el momento con el modelo TMEV-IDD se han centrado en el análisis de los procesos de inflamación, daño axonal y desmielinización a nivel de médula espinal, y dicho análisis sólo explica parcialmente la patología observada en pacientes con EM donde se ha visto implicación de distintas áreas cerebrales. Por ello, nuestro primer objetivo general consistió en el estudio de la histopatología a nivel cerebral en animales infectados con el virus de Theiler a distintos tiempos post-infección, y en dos estructuras directamente relacionadas con la sintomatología motora como son el tronco cerebral y la corteza motora. Además, dicho análisis se complementó con el estudio de aspectos relacionados con la remielinización que sucede parcialmente en el modelo mediante la contribución de los OPCs presentes en el parénquima nervioso y en la zona subventricular:

1.- Fisiopatogénesis de la Encefalomiелitis Murina por Infección con el Virus de Theiler como modelo experimental de Esclerosis Múltiple.

1.1- Caracterización de la evolución histopatológica (activación microglial, grado de afectación axonal y desmielinización) en tronco cerebral y corteza motora.

1.2 – Curso temporal de la expresión génica de marcadores de progenitores de oligodendrocitos en médula espinal cervical.

1.3 – La Zona Subventricular como nicho neurogénico: proliferación celular, migración y diferenciación a oligodendrocitos en áreas lesionadas.

Además, trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado el efecto terapéutico de los cannabinoides y endocannabinoides en el modelo de TMEV-IDD, principalmente a través de acciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Hasta la fecha, no se había valorado en dicho modelo el posible efecto beneficioso del tratamiento *in vivo* con el fitocannabinoide CBD, por lo que el segundo objetivo general consistió en el estudio de los efectos inmunomoduladores del CBD, aplicado en dos fases de la infección con el virus de Theiler:

2.- Efecto del tratamiento con cannabidiol en la fase crónica (terapéutica) y en la fase inductora en el modelo TMEV-IDD.

2.1 – Tratamiento en fase terapéutica: función motora, citoquinas proinflamatorias y activación microglial.

2.2 – Tratamiento en fase inductora: quimioquinas, infiltrados inflamatorios y activación microglial. Implicaciones en el desarrollo de la enfermedad a tiempos crónicos (función motora y citoquinas proinflamatorias).

Por último, una de las principales estrategias terapéuticas en EM consiste en la repoblación de las áreas desmielinizadas con progenitores de oligodendrocitos que se diferencien a oligodendrocitos maduros remielinizantes. Sin embargo, dichos progenitores son altamente vulnerables a estímulos citotóxicos y alteraciones de la homeostasis, por lo que se definió como tercer objetivo general el estudio del efecto del CBD en cultivos primarios de progenitores de oligodendrocitos, y su posible acción protectora frente a distintos tipos de estrés:

3.- Estudio del efecto del CBD en cultivos primarios de progenitores de oligodendrocitos.

3.1 – Viabilidad celular y proliferación en situación basal.

3.2 – Estrés oxidativo e inflamación.

3.3 – Flujos de Calcio

3.4 – Estrés de Retículo Endoplásmico

## MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

---

## 1.- MATERIAL

---

### 1.1- ANIMALES.

---

- Ratones hembra *Mus musculus* susceptibles de la cepa SJL/J (Jackson Laboratories, EE.UU.), de 4 a 6 semanas de edad.
- Ratas Wistar postnatales de 0 a 2 días de edad criadas en el animalario (procedentes de Harlan Industries Inc., EE.UU)

### 1.2.- REACTIVOS.

---

#### 1.2.1.- PARA CULTIVOS CELULARES.

---

- Dulbecco's modified Eagle's Media (DMEM, Lonza Ibérica S.A. Barcelona, España)
- DMEM/F12 (Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)
- Tampón fosfato salino (PBS, Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)
- Suero fetal bovino (FBS, Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)
- Suero de caballo (HS, Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)
- Penicilina/estreptomicina (Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)
- Albúmina de suero bovino (BSA, Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)
- Apo-transferrina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Insulina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Putrescina dihidroclorida(Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Progesterona (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Selenito sódico (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- D-Biotina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Hydrocortisona (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España,)
- PDGF-AA humana (Peprotech, Londres, Reino Unido)
- FGF básica (Peprotech, Londres, Reino Unido)
- Poly-D-Lisina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Azul de Tripano (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

#### 1.2.2.- PARA INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA.

---

- Peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

- Suero normal de cabra (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.)
- Suero normal de caballo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.)
- Suero normal de conejo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.)
- Complejo avidina-biotina peroxidasa (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.)
- 3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloruro (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Alcohol etílico (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Xileno (Merck, Darmstadt, Alemania)
- DePeX® (AMS Biotechnoogy, Oxon, Reino Unido)

#### 1.2.3.-PARA EL PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.

---

- Paraformaldehído (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Sacarosa (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Tissue-Teck ® (Sakura, Zoeterwoude, Holanda)

#### 1.2.4.-PARA LA MUERTE CELULAR.

---

- Kit de detección de citotoxicidad (Roche Diagnostics, S.L., Mannheim, Alemania)
- Kit de detección de apoptosis basado en fluoresceína de Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania)

#### 1.2.5.-PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

---

- Dihidrocloruro [1-naphthyl]etilendiamina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Sulfanilamida (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Dichlorodihidrofluoresceina diacetato acetyl ester (DCFDA, Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

#### 1.2.6.- PARA LA DETECCIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.

---

- Fluo-4AM (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

#### 1.2.7.- PARA CITOMETRÍA DE FLUJO.

---

-Yoduro de Propidio (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

-Ribonucleasa A (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

#### 1.2.8.- PARA LA INMUNODETECCIÓN POR SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT).

---

-Dodecil sulfato sódico (SDS) (USB, Cleveland, Ohio, EE.UU.)

-Inhibidores de proteasas “Complete Mini” (Roche Diagnostics, S.L., Mannheim, Alemania)

-Azul de Bromofenol (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

-β-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

-Acrilamida al 30% (BioRad, CA, EE.UU.)

-Marcador de proteínas (BioRad, CA, EE.UU.)

-TEMED (BioRad, CA, EE.UU.)

- Tris base (Roche Diagnostics, Satn Cugat del Vallés, España)

-Hidróxido sódico (Merck, Darmstadt, Alemania)

-Ácido clorhídrico (Merck, Darmstadt, Alemania)

-Tween-20 (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

-Leche desnatada en polvo (Sveltesse, Nestlé, Barcelona, España)

-Reactivos de detección ECL<sup>TM</sup> (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido)

### 1.2.9.- PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN, TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT) Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

---

- Cloroformo (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Kit de extracción RNeasy® (Quiagen, Reino Unido)
- QIAzol ® (Quiagen, Reino Unido)
- Desoxirribonucleasa I (DNasa I; (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Sistema de transcripción inversa (Promega Biotech Ibérica, S.L., Madrid, España)
- Power SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido)

---

### 1.3.- COMPUESTOS.

---

#### 1.3.1.-ESTÍMULOS.

---

- Cepa Daniel (DA) del virus de Theiler, donado por el Dr. Moses Rodríguez del departamento de Inmunología y Neurología de la Clínica Mayo (Rochester, EE.UU.)

#### 1.3.2.- DROGAS.

---

- LPS derivado de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- IFN $\gamma$  de rata (Peprotech, Londres, Reino Unido)
- Capsacepina (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza)
- MCD (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- A-23187 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)
- ATP (cedido por Alfonso Araque, Instituto Cajal, CSIC, Madrid)
- Tunicamicina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

#### c) Cannabinoides y antagonistas cannabinoides

- Para los estudios *in vivo*, se utilizó Cannabidiol cedido por el profesor Raphael Mechoulam (Universidad Hebrea, Jerusalem, Israel)
- Para los estudios *in vitro*, se utilizó Cannabidiol comercial (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)

-SR14176 (cedido por Sanofi Recherche, Montpellier, Francia)

-AM630 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)

-GW9662 (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

### 1.3.3.- ANTICUERPOS.

---

#### **a) Primarios.**

-SMI32 (Covance, California, EE.UU.)

-panNF (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza)

-PSA-NCAM (DSHB, University of Iowa, EE.UU.)

-RIP (DSHB, University of Iowa, EE.UU.)

-BrdU (DSHB, University of Iowa, EE.UU.)

-CNPasa (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

-A2B5 (R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.)

-Caspasa3 (Cell Signaling Technology, Beverly, EE.UU.)

-eif2alfa fosforilado (Cell Signaling Technology, Beverly, EE.UU.)

-PKR fosforilado (Cell Signaling Technology, Beverly, EE.UU.)

- PKR total (Cell Signaling Technology, Beverly, EE.UU.)

-eif2alfa total (Cell Signaling Technology, Beverly, EE.UU.)

-GFAP (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

-Iba1 (Wako, Osaka, Japón)

-alfa tubulina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

#### **b) Secundarios.**

-Anticuerpo biotinilado de cabra anti IgG de conejo (Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.)

- Anticuerpo biotinilado de cabra anti IgG de ratón (Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.)
- Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, EE.UU.)
- Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, EE.UU.)
- Anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, EE.UU.)
- Anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, EE.UU.)
- Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, EE.UU.)
- Anticuerpo de cabra anti IgM de ratón conjugado con Texas Red<sup>®</sup> (Jackson ImmunoResearch, West Grove, España)-
- Anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Bio Rad, CA, EE.UU.)
- Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Bio Rad, CA, EE.UU.)

---

#### 1.4.- INSTRUMENTOS.

---

- Actímetro (Activity Monitor System Omnithech Electronics, Inc., Columbus, OH, EE.UU.)
- Criostato (Leica Microsystems CM1900, Barcelona, España)
- Microscopio óptico (Carl Zeiss Microscopy, LLC, EE.UU.)
- Microscopio invertido (Leica Microsystems, GMBH, Wetzlar, Alemania)
- Microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemania)
- Equipo electroforético (BioRad POWER-PAC300, CA, EE.UU.)
- Sonicador (Sonics & Materials Inc, *Vibra Cell*, Danbury, CT, EE.UU)

- Centrífuga (Hettich Zentrifugen EBA 12, Tubingen, Alemania)
- Campana de flujo laminar (Steril, Mazzo di Rho, MI, Italia)
- Incubador (RS Biotech Galaxy S, Scotland, Reino Unido)
- Termociclador (MJ Research PTC-100, Watertown, MA, EE.UU.)

---

### 1.5.- OLIGONUCLEOTIDOS.

---

Las sondas para SYBR® en tiempo real se diseñaron a través de la utilización del software Primer Express (Applied Biosystems, Reino Unido), a partir de las secuencias publicadas en la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI, EE.UU.). Los nombres y secuencias de las sondas en dirección 5´- 3´de los genes analizados se describen en la siguiente tabla:

<b>Producto</b>	<b>Cebadores</b>	<b>Secuencia</b>
Olig2	Sentido	GACTCCCCCTCCGTCTAAG
	Antisentido	CGCAGTAAAGCCCACGTTGT
NKx2.2	Sentido	CGCCGACACAGGTCAAGAT
	Antisentido	CCATCCGTCGGTTTTGAAAT
TNF $\alpha$	Sentido	AGAGGCACTCCCCAAAAGA
	Antisentido	CGATCACCCGAAGTTCAGT
IL1 $\beta$	Sentido	TGGTGTGTGACGTTCCCATT
	Antisentido	TCCATTGAGGTGGAGAGCTTTC
CD11b	Sentido	TCCAGGGCAGGAGTCGTATG
	Antisentido	TGCCACAATGAGTGGTACAG
CCL2	Sentido	AGCAGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA
	Antisentido	AAAGGTGCTGAAGACCTTAGGGCA
CCL5	Sentido	TCGTGCCACGTCAAGGAGTATTT
	Antisentido	TCTTCTCTGGGTTGGCACACACTT
CCR2	Sentido	GGCCACCACACCGTATGACT
	Antisentido	ACATGTTGCCACAAACCAAAG
CHOP	Sentido	CCAAAATAACAGCCGGAACCT
	Antisentido	CAAAGGCGAAAGGCAGAGACT
GADD34	Sentido	AGCATGGACACGCCTTAGAAA
	Antisentido	AGGCTGGGAGGAGGGATTT
Bax	Sentido	GGGTGGCAGCTGACATGTTT

	Antisentido	TGATCAGCTCGGGCACTTTA
Bcl-2	Sentido	TGAGAGCAACCGAACGCCCCG
	Antisentido	CCGTGGCAAAGCGTCCCCTC
Caspasa12	Sentido	GAAGGAAGGCCGAACCCGCC
	Antisentido	TGCTCTGGACGGCCAGCAAAC
18S rata	Sentido	ATGCTCTTAGCTGAGTGTCCCG
	Antisentido	ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG
18S ratón	Sentido	ATGCTCTTAGCTGAGTGTCCCG
	Antisentido	ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG

## 2.- MÉTODOS EXPERIMENTALES

---

### 2.1.- ANIMALES.

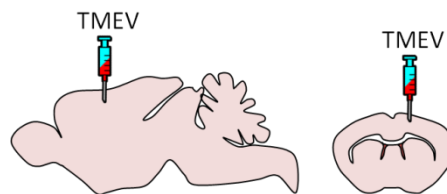
---

Para la experimentación *in vivo* se utilizaron ratones hembra *Mus musculus* susceptibles de la cepa SJL/J (Jackson Laboratories, EEUU), de 4-6 semanas de edad, mantenidos en el Animalario del Instituto Cajal (CSIC, Madrid, España) con una temperatura ambiente de 22°C, sometidos a ciclos regulares de luz/oscuridad de 12 horas y con comida y agua *ad libitum* (dieta estándar, Harlan; España).

#### 2.1.1.- INOCULACIÓN DEL VIRUS DE THEILER.

---

El virus de Theiler (TMEV) fue inoculado intracerebralmente en el hemisferio derecho con  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de placa (ufp) de la cepa Daniel (DA) del virus en 30µl de DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino; en los animales SHAM, se inyectó el mismo volumen de medio con suero como control negativo de la técnica. La evolución de los animales fue evaluada periódicamente hasta su sacrificio.



#### 2.1.2.- EVALUACIÓN DE LA COORDINACIÓN MOTORA.

---

Para evaluar el deterioro neurológico de los ratones infectados con el virus de Theiler, se utilizó como prueba conductual el *actímetro* (Activity monitor System Omnitech electronics, Inc.; Columbus, EEUU), que evalúa la deambulaci3n espontánea (actividad locomotora), la actividad exploratoria y la parapesia (compromiso de las extremidades inferiores). El Actímetro se encontraba acoplado a un analizador Digiscan, y para registrar los movimientos horizontales y verticales de los animales de estudio se realizó una serie de 10 minutos dividida en dos sesiones de 5 minutos, donde se recogió la actividad horizontal (número de interrupciones del haz del láser de los sensores horizontales del aparato) y la actividad vertical (como número de interrupciones del haz del láser del sensor vertical del aparato).

#### 2.1.3.- TRATAMIENTOS *IN VIVO*.

---

Con el fin de evaluar el efecto del Cannabidiol *in vivo*, los animales se trataron mediante inyecci3n intraperitoneal a dos tiempos post-infecci3n distintos: en la fase cr3nica y en la fase inductora de la enfermedad. En todos los casos, los animales fueron tratados con una dosis/día de Cannabidiol a raz3n de 5mg/kg disuelto en PBS + Tween, o con

vehículo. El número de ratones empleados en cada tiempo fue de 18 divididos en tres grupos experimentales de 6 animales por grupo: 6 SHAM (no infectados), 6 TMEV tratados con vehículo, y 6 TMEV tratados con CBD.

El protocolo de tratamiento con CBD fue el siguiente:

1.- Para el tratamiento en fase crónica, los animales se infectaron con el virus de Theiler y fueron tratados con CBD una vez que apareció la sintomatología. Dicho tratamiento se prolongó durante un periodo de 10 días, tras el cual los animales se sometieron a las pruebas de coordinación motora anteriormente descritas, fueron sacrificados y procesados para los estudios de expresión génica e histológicos correspondientes.

2.- Para el tratamiento en fase inductora, un grupo de animales fue infectado con el virus de Theiler y tratado con CBD durante un periodo de 7 días tras la inoculación viral, y en el día octavo post-infección los animales se fueron sacrificados y procesados para los estudios de expresión génica e histológicos correspondientes. Otro grupo de animales fue infectado con el virus de Theiler y tratado con CBD durante el periodo de 1 a 10 días post-infección. Tras el tratamiento, los animales se dejaron en el estabulario hasta la fase crónica de la enfermedad, donde los síntomas motores son evidentes. En dicha fase crónica, los animales se sometieron a las pruebas de coordinación motora anteriormente descritas, fueron sacrificados y procesados para los estudios de expresión génica e histológicos correspondientes.

#### 2.1.4.- MARCAJE DE LAS CÉLULAS PROLIFERATIVAS Y MIGRATORIAS CON BRDU.

---

De manera complementaria, se realizó un tratamiento *in vivo* con BrdU para valorar:

- a) La proliferación a 30 días post-infección en los animales infectados con TMEV y los SHAM, realizando dos inyecciones con BrdU separadas por un intervalo de 2 horas y a una dosis de 50mg/kg en dos grupos experimentales: 3 ratones SHAM y 4 ratones TMEV; dos horas después de la segunda inyección se procedió al sacrificio de los animales, y se extrajeron los cerebros para su estudio histológico.
- b) La migración a 60 días post-infección en los animales infectados con TMEV y los SHAM, realizando cuatro inyecciones con BrdU mediante el siguiente protocolo: dos inyecciones separadas por un intervalo de dos horas entre sí, seguidas de un periodo de 22 horas de descanso y otras dos inyecciones

separadas por un intervalo de dos horas. La dosis empleada fue de 50mg/kg en dos grupos experimentales: 4 ratones SHAM y 4 ratones TMEV; dos horas después de la segunda inyección se procedió al sacrificio de los animales, y se extrajeron los cerebros para su estudio histológico.

#### 2.1.5.- PROCESADO DEL TEJIDO.

---

Tras los tratamientos correspondientes, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital (intraperitoneal, dosis de 50mg/kg), perfundidos transcardíacamente con salino e inmediatamente embebidos en paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1M, pH=7,4 para inmunohistoquímica, o congelados el hielo seco para estudios de expresión proteica o génica.

En el caso del procesamiento para inmunohistoquímica, el cerebro fue extraído por disección y la médula espinal por extrusión; tras la fijación en PFA 4% toda la noche, el tejido nervioso fue lavado con PB y se procedió a crioprotegerlo con una solución en sacarosa al 15%, y posteriormente al 30%, para después ser embebido en Tissue Teck y cortado en secciones transversales de 30µm de grosor en un criostato. Los cortes fueron almacenados en Solución de Olmos (30% sacarosa, 1% polivinilpirrolidona y 30% de etilenglicol en PB) a -20° o en PBS + 0,2% de azida sódica a 4° hasta su utilización.

#### 2.1.6.- INMUNOHISTOQUÍMICA.

---

##### a) Inmunofluorescencia

Las secciones de cerebro o de médula espinal fueron lavadas 3 veces en PB durante 10 minutos cada vez, y se permeabilizaron con PB + Triton X-100 al 0,2%. Tras repetir los 3 lavados en PB se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas utilizando durante una hora a temperatura ambiente una solución al 5% con el suero del animal en el que estaba hecho el anticuerpo secundario (tampón de bloqueo). A continuación, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario o la mezcla de anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4° en agitación, tras lo cual se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PB y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario o la mezcla de anticuerpos secundarios adecuados conjugados a fluoróforo y diluídos en tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, los cortes fueron lavados para eliminar el exceso de anticuerpo con PB durante 3 pases de 10 minutos, seguido de un lavado en PBS:Glicerol al 50% y montados en portaobjetos de cristal.

## b) Marcaje con Diaminobenzidina (DAB)

Las secciones de cerebro o de médula espinal fueron lavadas 3 veces en PB durante (diez minutos/lavado), y se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena con la utilización de 50% metanol y 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PB durante 1h a temperatura ambiente; tras realizar tres lavados de 10 minutos en PB, se permeabilizó el tejido con PB + 0,2% TritonX-100 a temperatura ambiente durante 30 minutos, se repitieron los lavados y se siguió con el bloqueo de uniones específicas como se ha descrito anteriormente en el apartado de inmunofluorescencia. A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario diluído en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4° en agitación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno para lavar el exceso de anticuerpo y se incubaron con el anticuerpo primario conjugado a biotina y diluído en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras repetir los lavados, se procedió a incubar el tejido con avidina-peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente, y tras repetir los 3 lavados de 10 minutos se produjo el revelado con DAB (diaminobenzidina al 0,025% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,003% en PB). Se lavaron las secciones tres veces en PB y se montaron sobre portas gelatinizados. Tras su secado a temperatura ambiente, los cortes fueron deshidratados, inmersos en Xileno y cubiertos con medio DePex y cubreobjetos.

En ambos casos (inmunofluorescencia, revelado con DAB), se realizaron los controles negativos oportunos omitiendo el paso del anticuerpo primario para descartar posibles interacciones inespecíficas de los anticuerpos secundarios.

---

## 2.2.- CULTIVOS PRIMARIOS DE OLIGODENDROCITOS.

---

### 2.2.1.- PREPARACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE OLIGODENDROCITOS.

---

Los cultivos primarios de progenitores de oligodendrocitos se realizaron a partir de cultivos mixtos de rata, según las modificaciones de la técnica de McCarthy y de Vellis (McCarthy y de Vellis, 1980) realizadas en el laboratorio por Molina-Holgado y colaboradores (Molina-Holgado y cols., 2002) y por Mecha y colaboradores (doi:10.1038/protex.2011.218, ver ANEXO I para más detalles). Brevemente, los cultivos primarios mixtos se prepararon a partir de encéfalos de ratas P0-P2, de los que fueron retirados el tronco encefálico y los bulbos olfativos; posteriormente, los encéfalos fueron colocados en DMEM frío, y las meninges y vasos sanguíneos asociados fueron retirados. El tejido cerebral restante fue mecánicamente disgregado

con una pipeta Pasteur recubierta con suero, filtrado con una malla de 150µm de poro y las células resultantes fueron resuspendidas en DMEM 10:10:1 (conteniendo un 10% Suero de Caballo + 10% Suero Fetal de Cabra + 1% Penicilina/Estreptomicina) y sembradas en frascos de 75cm<sup>2</sup> cubiertos con poli-D-lisina (5µg/ml), incubándose a 37° en una atmósfera saturada de agua al 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras 7-10 días *in vitro*, podía observarse la estratificación de las células en el cultivo mixto resultante: una monocapa confluyente de astrocitos en el fondo de los frascos, sobre la que se situaban las llamadas células O2A (del inglés Oligodendrocyte-type 2 Astrocyte, que según el medio de cultivo pueden diferenciarse a oligodendrocitos o a un tipo específico de astrocito denominado tipo 2) fuertemente adheridas a los astrocitos, y células microgliales con débil adherencia o flotando en el medio de cultivo. Los frascos fueron debidamente cerrados y agitados a 230rpm durante 3h a 37° para separar el estrato microglial del cultivo; tras quitar la suspensión microglial por aspiración, el medio de cultivo se repuso con DMEM 10:10:1 nuevo, y los frascos fueron cerrados de nuevo y agitados a 260rpm durante 18h a 37°, con el fin de separar el estrato oligodendroglial del cultivo. La suspensión celular resultante fue filtrada por una malla de nylon de 30µm de poro, transferida a placas Petri no tratadas e incubada durante 1h a 37° con el fin de purificar los progenitores de oligodendrocitos, ya que éstos tienen poca adherencia a la superficie del plástico mientras que las células microgliales o astrogliales que puedan estar presentes en la suspensión celular son atraídas a las placas Petri. Tras el tiempo de incubación, las células O2A purificadas fueron resuspendidas en DMEM 10:10:1 y plaqueadas en placas multipocillo recubiertas con Poli-D-Lisina (5µg/ml) a distintas densidades según experimento, donde se mantuvieron durante 3 horas hasta que el medio fue cambiado a un medio específico sin suero (SFM) y conteniendo factores de crecimiento (o GF del inglés Growth Factors, 5ng/ml de bFGF y PDGF-AA). El SFM consiste en DMEM/F12 complementado con 25 µg/ml Transferrina, 10 nM Biotina, 30 nM Selenito Sódico, 1 µg/ml Putrescina, 5 µg/ml Insulina, 20 nM Hidrocortisona, 20 nM Progesterona, 1% Penicilina/Estreptomicina. En todos los casos, las células permanecieron en una fase inicial de proliferación de 3 días hasta aplicarles cualquiera de los tratamientos posteriores.

La pureza del cultivo se determinó por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos para el marcaje de astrocitos (GFAP), microglía (OX-42) y progenitores de oligodendrocitos (A2B5) para excluir contaminación con otros tipos celulares que

pudiese interferir en los resultados; los cultivos de progenitores de oligodendrocitos obtenidos con el método anteriormente descrito contaban con una pureza mayor al 95%.

### 2.2.2.- INMUNOCITOQUÍMICA.

---

Para la inmunocitoquímica, los progenitores de oligodendrocitos fueron sembrados sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina a una densidad de 50.000 células/pocillo; tras los 3 días de expansión inicial, las células fueron sometidas a los distintos tratamientos farmacológicos y antes de su fijación fueron incubadas durante una hora *in vivo* a 37° con el anticuerpo primario A2B5 (marcador de células tipo O2A que no puede usarse tras la fijación al ser muy sensible a ello) disuelto en SFM+GF a una concentración 1/200. A continuación, las células se lavaron durante 5 minutos con tampón fosfato 0,1M (TF) y fueron fijadas con 4% de paraformaldehído en TF a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras dos lavados de 5 minutos en TF, se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas con tampón bloqueo que contenía PBS + 5% Suero de Cabra + 0,1% de tritón-X100 durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se procedió a la incubación durante toda la noche a 4° con el anticuerpo primario diluido en el mismo tampón. Al día siguiente, los cubreobjetos fueron lavados e incubados con el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo, que estaba disuelto en el mismo tampón de bloqueo anterior y con el que fueron incubados durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron con PBS y fueron montados sobre portaobjetos con una mezcla de PBS:Glicerol al 50%. Para asegurar la ausencia de interacciones inespecíficas del anticuerpo secundario – control negativo de la técnica-, se utilizaron cubreobjetos que fueron sometidos a todo el protocolo pero omitiendo los anticuerpos primarios.

### 2.2.3.- MARCAJE DE CÉLULAS PROLIFERATIVAS CON BRDU.

---

Para analizar el número de células proliferativas en los cultivos, se siguió el mismo protocolo que para Inmunocitoquímica pero incubando las células con BrdU a una concentración 10µM al mismo tiempo que el vehículo o CBD, para que fuese incorporado por las células proliferativas durante las 24h que duraban los tratamientos. Después, las células fueron lavadas con medio e incubadas con el anticuerpo A2B5 como ya ha sido anteriormente descrito, para después de fijadas ser incubadas con el anticuerpo primario BrdU durante toda la noche. Los pasos posteriores (anticuerpo secundario, DAPI), fueron los mismos que para el protocolo de inmunocitoquímica. Los datos se representan como % de células BrdU<sup>+</sup> referidas al número total de células.

#### 2.2.4.- MUERTE CELULAR MEDIDA POR LIBERACIÓN DE LDH.

---

La medición de muerte celular por liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio (lisis celular) se valoró midiendo la actividad LDH en el sobrenadante de los y utilizando un “kit” comercial. Para ello, se siguieron las especificaciones del kit y se calcularon los valores de LDH como porcentaje respecto a la lisis producida tras añadir 1% de Triton X-100 (lisis total) y refiriéndolos asimismo a la muerte basal del cultivo.

#### 2.2.5.- DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

---

Para calcular la producción de especies reactivas de oxígeno, se incubaron los cultivos durante 30 minutos con el compuesto dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (DCFDA, 2 $\mu$ M), un indicador permeable que una vez difunde al interior celular se oxida en presencia de peróxido de hidrógeno y peroxidasa y emite fluorescencia. Tras este tiempo, los cultivos se lavaron con medio y se administraron los distintos tratamientos con peróxido de hidrógeno o LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de CBD, y se valoró la fluorescencia a 485/530nm normalizándola con el control negativo y refiriéndola al grupo control.

#### 2.2.6.-- ANÁLISIS DE CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS).

---

Los progenitores de oligodendrocitos recién purificados fueron mantenidos en placas sin recubrir durante 24h en presencia de vehículo o CBD, tras lo cual fueron recolectadas, resuspendidas en PBS a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml en tubos de citómetro y fijadas con Etanol al 70% a 4° durante 30 minutos y resuspendidas en PBS. A continuación, las células se incubaron con 100  $\mu$ g/ml de Ribonucleasa A y 50  $\mu$ g/ml de Yoduro de Propidio durante 30 minutos a temperatura ambiente y fueron analizadas con el citómetro de flujo FACS Aria, utilizando un laser de excitación de Argón a 488nm para medir la fluorescencia del Yoduro de Propidio a través de un filtro band-pass 616/23. Los debris y los duplitas fueron excluidos del análisis y un mínimo de 10.000 células fueron adquiridas en cada experimento. Para la definición de las fases de ciclo celular, se utilizó el software de análisis FACSDiva.

#### 2.2.7.- ANÁLISIS DE FLUJO DE CALCIO POR MICROSCOPIA.

---

Las células fueron plaqueadas en cubreobjetos de cristal recubiertos con poli-D-lisina (5 $\mu$ g/ml) a una densidad de 50.000 células por pocillo, y tras tres días in vitro fueron incubadas durante 30 minutos a 37° en PBS que contenía 0.3 $\mu$ M de Fluo-4AM y el

detergente plurónico F-127 al 0.04%. Los cubreobjetos fueron transferidos a una cámara del microscopio y bañados en medio extracelular conteniendo: NaCl 40 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, HEPES 10 mM, glucosa 10 mM, sucrosa 6 mM a pH 7.35. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, y las células fueron monitorizadas con un microscopio confocal escáner Olympus FV3 equipado con un objetivo 40x (NA, 0.8). Se utilizó un láser de emisión de 488nm para excitar el Fluo-4, y la señal fluorescente recogida se analizó como una imagen en pseudocolor entre los distintos tratamientos aplicados sobre las células *in situ*, con un tiempo de adquisición de cada frame de 1.12 segundos. La Ionomicina (1 μM) o el ATP (1 mM) fueron aplicados localmente en el baño por pulsos de presión de 0.5-2 segundos a 20 psi mediante una pipeta; el CBD fue aplicado al medio extracelular 10 minutos antes de la aplicación de los pulsos de ionomicina o de ATP. La señal de calcio se estimó de la señal fluorescente registrada como  $\Delta F/F_0$ , y se consideró válida cuando era dos veces superior a la desviación estándar de la línea base media. El análisis de datos se realizó utilizando el programa Image J y Excel..

#### 2.2.8.- ANÁLISIS DE FLUJO DE CALCIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS).

Los progenitores de oligodendrocitos recién purificados fueron resuspendidos en SFM + GF a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en tubos de citómetro e incubadas con el compuesto Fluo-4AM a una concentración 3 μM durante 20 minutos a 37°. A continuación, se lavaron las células con PBS sin calcio y sin magnesio y fueron analizadas con el citómetro de flujo. Como control negativo, se añadió a uno de los tubos el quelante de calcio EGTA a una concentración de 0.5 mM justo antes del análisis con el citómetro.

#### 2.3.- TÉCNICA DE INMUNODETECCIÓN POR SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT).

Para los análisis de Western Blot *in vivo* del tejido nervioso, se diseccionaron tres áreas cerebrales – corteza, cerebelo y tronco encefálico- y se lisaron en 500 μl del buffer de lisis (1.37 M NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) conteniendo 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato sódico, 2 mM NaF, 5 mM DTT, y 20 mM ácido okadaico más 50 μg/ml leupeptina y 100 μg/ml aprotinina. Para los experimentos *in vitro* con progenitores de oligodendrocitos, éstos fueron plaqueados a una densidad de 500.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos recubiertas con poli-D-

lisina (5µg/ml), y tras los correspondientes tratamientos se lavaron con PBS frío y fueron lisados con 30µl del buffer de lisis anterior. Los lisados de tejido o celulares fueron sonicados, mezclados con tampón de muestras Laemmli 5X y fueron hervidos durante 5 minutos; de 30 a 40 µg de proteína -determinada por Bradford- fue corrida en geles de electroforesis de poliacrilamida con un 10% de SDS (SDS-PAGE), transferida a membranas de nitrocelulosa y bloqueada durante 1-2h en tampón de bloqueo conteniendo un 5% de leche desnatada o BSA según la proteína de estudio. A continuación, las membranas se incubaron en cada caso toda la noche a 4° en agitación con los siguientes anticuerpos primarios: anti-caspasa3 (1:1000, Cell Signaling Technology) anti-phospho (Ser<sup>51</sup>), PKR y PKR total, eIF2α (1:1,000; Cell Signaling Technology), anti eif2α TOTAL, anti-α-Tubulina (1:40,000; Sigma-Aldrich). Tras lavarlas fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y diluído en tampón de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. Por último, las membranas fueron lavadas y la reacción de la peroxidasa fue revelada por quimioluminiscencia (ECL, Amersham, Pharmacia Biotech). Las membranas que iban a ser reprobadas con varios anticuerpos diferentes fueron sometidas a un proceso de “stripping” en un tampón 62.5mM de Tris-HCl, pH 6.8 conteniendo un 2% de SDS y un 0,7% de β-Mercaptoetanol. Finalmente, la señal fue cuantificada por densitometría mediante un escáner GS-800 de Bio Rad (Bio-Rad Laboratories; Hercules, EEUU), y los datos fueron corregidos con el control de carga interno (eIF2α total para eIF2α fosforilado, y tubulina para todos los demás).

---

## 2.4.- ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA (QPCR).

---

### 2.4.1.- EXTRACCIÓN DEL ARNM.

---

Para los análisis de expresión génica *in vivo* se usaron médulas espinales (en su sección cervical), y en los experimentos *in vitro* se usaron progenitores de oligodendrocitos que fueron plaqueados a una densidad de 500.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos recubiertas con 5µg/ml de poli-D-lisina. En ambos casos, el RNA se extrajo usando un kit de columnas RNeasy (Qiagen, UK), eliminando la posible contaminación de DNA degradado mediante el tratamiento con DNaseI (Qiagen, UK). La concentración de RNA y su pureza se obtuvo por las medidas de A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> realizadas con un espectrofotómetro Nanodrop® (Nanodrop Technologies).

#### 2.4.2.- RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

---

1 µg de RNA total fue retrotranscrito a cDNA mediante el kit de Transcripción Reversa de Promega (Promega, España) y usando secuencias poly-dT. Las secuencias de los primers (suministradas por Applied Biosystems, UK). La expresión de los genes de estudio por PCR en tiempo real fue cuantificada utilizando SYBR Green (Applied Biosystems, UK) utilizando 1 µl de cDNA (que correspondían a 50ng de RNA) y con los primers en una concentración final de 200 nM. Las condiciones de los ciclos de la PCR consistieron en un paso inicial de activación a 50° durante 2 minutos, 95° durante 10 minutos y 40 ciclos de desnaturalización a 95° durante 15 segundos seguidos de periodos de alineamiento y extensión a 60° durante 1 minuto. Estos ensayos de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos utilizando el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, UK). Cada muestra fue analizada en duplicado y se relacionó con una curva estándar de 6 puntos que era corrida en paralelo; la cuantificación relativa de la cantidad de ARN se obtuvo calculando el ratio entre los valores obtenidos con cada gen de interés y el control interno 18S. Los resultados se expresan como porcentaje de la condición control.

#### 2.4.3.- MARCAJE DE FRAGMENTACIÓN NUCLEAR DE ADN POR EL MÉTODO DE TUNEL.

---

Para el marcaje de las células TUNEL<sup>+</sup> en los progenitores de oligodendrocitos, las células fueron plaqueadas en cubreobjetos de cristal recubiertos con poli-D-lisina (5µg/ml) a una densidad de 50.000 células por pocillo, y tras tres días in vitro fueron incubadas durante 24 h con LPS/IFN $\gamma$  y/o CBD. A continuación, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los siguientes pasos se realizaron siguiendo las indicaciones del “kit” Apoptosis detection Kit (Chemicon). Brevemente, tras lavar las secciones o las células, fueron sometidas a una post-fijación de cinco minutos a -20° con etanol/acético en proporción 2:1; se lavaron de nuevo y fueron incubados con el Equilibration Buffer durante 1 minuto, después de lo cual se procedió a la incubación con la enzima TdT (transferasa terminal de deoxinucleótidos) en el buffer de reacción que traída el kit durante 1 h a 37°. Posteriormente, se procedió al lavado con el buffer de lavado del kit, después con PBS, e incubadas con el anticuerpo secundario anti-digoxigenina diluído 1/200 en el tampón de bloqueo del kit durante media hora a temperatura ambiente y en

una cámara húmeda y oscuridad. Finalmente, se lavaron las secciones y las células y se contratiñeron con DAPI dilución 1/1000 durante 20 minutos a temperatura ambiente. En el caso de los oligodendrocitos, los datos se representan como % de células TUNEL<sup>+</sup> referidas al número total de células.

---

## 2.5.- MICROSCOPIA ÓPTICA Y CONFOCAL.

---

### 2.5.1.- MICROSCOPIA ÓPTICA Y ANÁLISIS DE IMAGEN.

---

Las imágenes de tejido marcado con DAB se realizaron con un microscopio Zeiss al que se encontraba acoplado un sistema de captura de imágenes Nikon. Para el análisis, se tomaron ocho fotos por caso de las áreas seleccionadas, y la intensidad de marcaje fue analizada con el programa Image J, manteniendo el mismo umbral de intensidad para todas las imágenes del mismo experimento. Los datos se expresan como porcentaje de área total marcada referido al control.

### 2.5.2.- MICROSCOPIA CONFOCAL Y ANÁLISIS DE IMAGEN.

---

En el caso de las imágenes del tejido marcado con fluorescencia, se utilizó microscopía confocal (con el modelo de Leica TCS SP5) adquiriendo series de imágenes de cada sección en áreas concretas (corteza motora, tronco cerebral). Para el análisis, se tomaron ocho fotos por caso de las áreas seleccionadas, y la intensidad de marcaje fue analizada con el programa Image J, manteniendo el mismo umbral de intensidad para todas las imágenes del mismo experimento. Los datos se expresan como porcentaje de área total marcada referido al control.

---

## 2.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

---

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS 15.0, y éstos aparecen representados como media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Para hacer comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba paramétrica t de Student, y en aquellos casos en los que hubiese más de dos grupos se recurrió al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con la prueba a *posteriori* de Tuckey o Bonferroni. En aquellos casos en los que la prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene) fue significativa, se empleó el ANOVA de Kruskal-Wallis seguido del test de U de Mann-Whitney. Todos los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando la  $p \leq 0.05$ , muy significativos cuando  $p \leq 0.01$  y altamente significativos cuando  $p \leq 0.001$ .

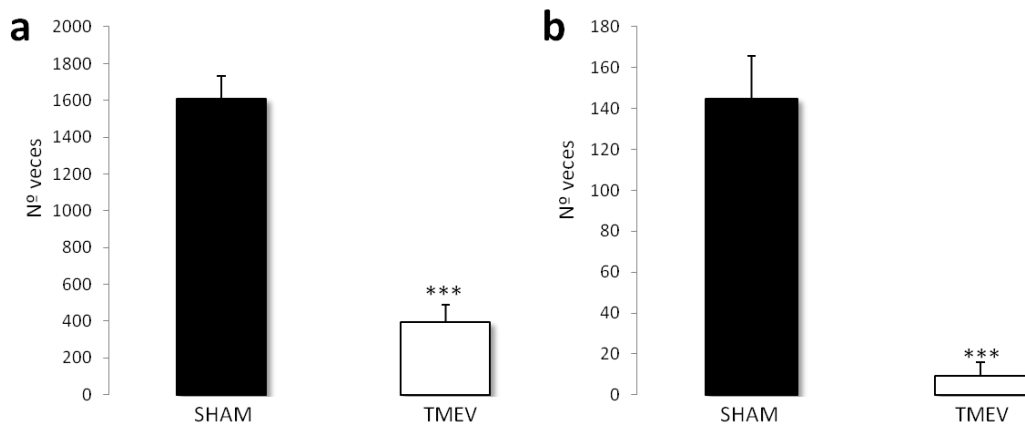
## RESULTADOS

---

1.- FISIOPATOGÉNESIS DE LA ENCEFALOMIELITIS MURINA POR  
INFECCIÓN CON EL VIRUS DE THEILER COMO MODELO  
EXPERIMENTAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

---

La inoculación intracerebral en la cepa de ratón susceptible SJL con la cepa DA del virus de la encefalomiелitis murina de Theiler conduce al desarrollo de una enfermedad crónica desmielinizante, con una patogenia similar a la observada en la EM (Dal Canto, 1975). De esta manera, los ratones infectados con el virus muestran paraparesia espástica, producida por la desmielinización que se localiza principalmente en la médula espinal y cuyos síntomas clínicos aparecen claramente entre el día 105 y 120 post-infección (Clatch, 1986). Con el objetivo de valorar la sintomatología clínica en nuestro modelo de estudio y bajo nuestras condiciones de trabajo, inoculamos ratones de la cepa SJL con la cepa del virus DA según el protocolo utilizado anteriormente en el laboratorio, y realizamos valoraciones de actividad motora mediante la prueba del actímetro en la fase crónica de la enfermedad (80-90 días post-infección), donde está descrito que la enfermedad inicia su fase crónica. Como puede observarse en la Fig.1, en la fase crónica de la enfermedad la actividad horizontal y la vertical están severamente comprometidas ( $p \leq 0,001$ ). En este modelo, la existencia de un margen de tiempo entre la infección vírica y la aparición de la sintomatología coincidiría con estudios epidemiológicos de la EM, según los cuales el desencadenante de la enfermedad en humanos debe actuar en la edad infantil-juvenil aunque la sintomatología no aparecería hasta la edad adulta.



**Figura 1. Alteraciones en la función motora de los ratones TMEV-IDD.** La inoculación intracraneal con el virus de Theiler genera, en ratones de la cepa susceptible SJL/J, alteraciones motoras que se manifiestan como (a) una disminución del tiempo de deambulación en el test del actímetro, determinado por la actividad horizontal, y (b) por una disminución de la actividad vertical o el número de veces que el ratón se mantiene apoyado sobre sus patas traseras. En ambos casos, dichas alteraciones se hacen evidentes en la fase crónica tardía de la enfermedad. \*\*\* $p \leq 0,001$  vs SHAM.

---

## 1.1- CARACTERIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN HISTOPATOLÓGICA (ACTIVACIÓN MICROGLIAL, GRADO DE AFECTACIÓN AXONAL Y DESMIELINIZACIÓN).

---

Dado que la mayoría de los estudios relativos a los daños neurológicos en el modelo de Theiler a lo largo del curso temporal de la enfermedad han estado centrados en la médula espinal, nos propusimos abordar el estudio histopatológico de dos estructuras encefálicas a lo largo de varios tiempos dentro de la enfermedad, incluyendo tanto la fase aguda de la polioencefalomielitis (19 días post infección o dpi), como la fase preclínica temprana (35 dpi) y tardía (60 dpi), y la fase crónica (90 dpi). Para ello, analizamos los niveles de activación glial, el grado de afectación axonal y la desmielinización que tenía lugar tanto en tronco encefálico (como lugar de relevo de conexiones cerebroespinales) como en corteza motora a nivel rostral, abordando así dos estructuras directamente relacionadas con los déficits neurológicos que provoca la enfermedad.

---

### 1.1.1- ANÁLISIS EN TRONCO ENCEFÁLICO.

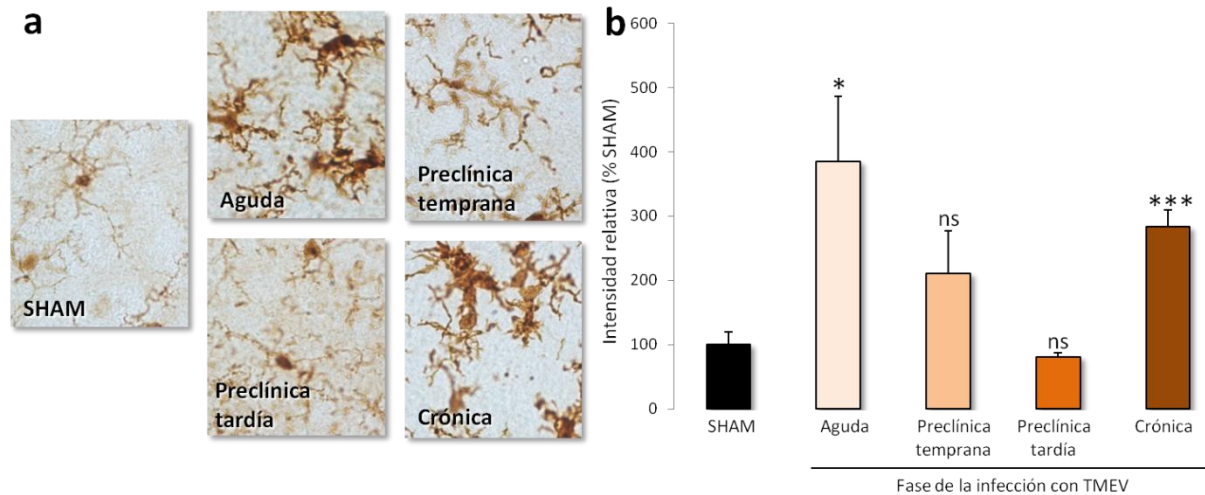
---

#### ***Niveles de activación microglial.***

La inflamación del SNC se caracteriza en primer lugar por la infiltración de células inmunitarias circulantes, y en segundo lugar, por la activación de células inmunitarias residentes como la microglía. En enfermedades con fuerte componente inflamatorio, como la EM y en sus modelos animales, la microglía parece contribuir a la progresión de la enfermedad ya que el bloqueo de estas células limita la patología. La microglía no se encuentra nunca en estado de reposo sino que está continuamente monitorizando el microentorno del SNC; ante daños tisulares, estas células se movilizan hacia la zona afectada y se vuelven reactivas. En este contexto, la microglía sufre un proceso de transformación y retrae sus prolongaciones, llegando a adquirir una morfología ameboide en su estado de máxima activación (Hanisch y Kettenmann, 2007).

Al estudiar el grado de activación microglial en el curso temporal del TMEV-IDD (Fig. 2), puede observarse cómo la microglía presenta ramificaciones y un estado menos activado en los animales control, mientras que la morfología aparece como ameboide en la fase aguda y crónica de la enfermedad (Fig. 2a). El bajo estado de activación en la fase preclínica temprana y tardía queda evidenciado también en el análisis realizado (Fig. 2b), apreciándose cómo la microglía aumenta su reactividad en la etapa inicial de

la enfermedad (caracterizada por una inflamación evidente) y en la fase crónica, donde el componente autoinmune desmielinizante puede estar ejerciendo un papel importante en la patología asociada.

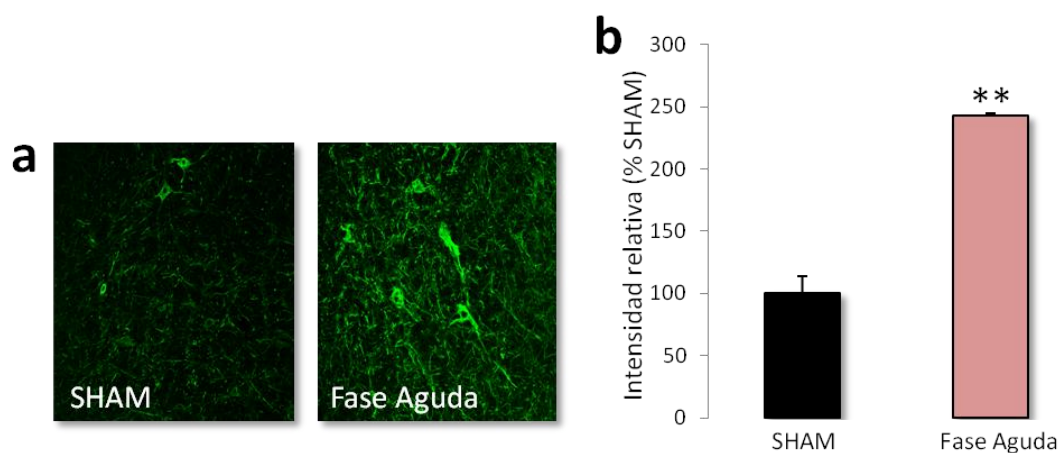


**Figura 2. Curso temporal de la activación microglial en el tronco del encéfalo en el modelo de TMEV-IDD.** La inoculación con el virus de Theiler desencadena una respuesta inflamatoria, traducida en la aparición de células microgliales con morfología reactiva. **(a)** Fotomicrografías de microscopía óptica (40x) representativas de secciones transversales de tronco encefálico de 30  $\mu$ m de grosor marcadas con el anticuerpo Iba1, tanto en animales control como en animales TMEV-IDD en la fase aguda, preclínica temprana, preclínica tardía y crónica. **(b)** La cuantificación del área total marcada con Iba1 a nivel de tronco encefálico revela que hay un incremento significativo de la reactividad en la fase aguda del modelo TMEV-IDD, que disminuye en la fase presintomática y vuelve a aumentar en la fase crónica. \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  vs SHAM.

### **Grado de afectación axonal.**

En el modelo de TMEV-IDD, se ha descrito una significativa pérdida axonal en médula espinal tras el establecimiento de la fase crónica desmielinizante (McGavern y cols., 1999) mientras que, en algunos estudios, los datos apuntan a que el daño axonal acompañado por la apoptosis de los oligodendrocitos precede al proceso de desmielinización y podría ser una de sus causas (Tsunoda y cols., 2003). Sin embargo, estudios en pacientes con EM han mostrado que el daño axonal como componente patológico ocurre en fases tempranas de la enfermedad, relacionadas con la magnitud del proceso inflamatorio (Ferguson y cols., 1997; Trapp y cols., 1998). En relación a estos trabajos, nuestro análisis incluyó el estudio temporal del grado de afectación axonal en el modelo de TMEV-IDD en tronco cerebral a través de dos aproximaciones complementarias: el daño axonal (cuantificado mediante el anticuerpo SMI32, que marca axones hiperfosforilados (Bruck, 2005; Petzold, 2005), y la pérdida de

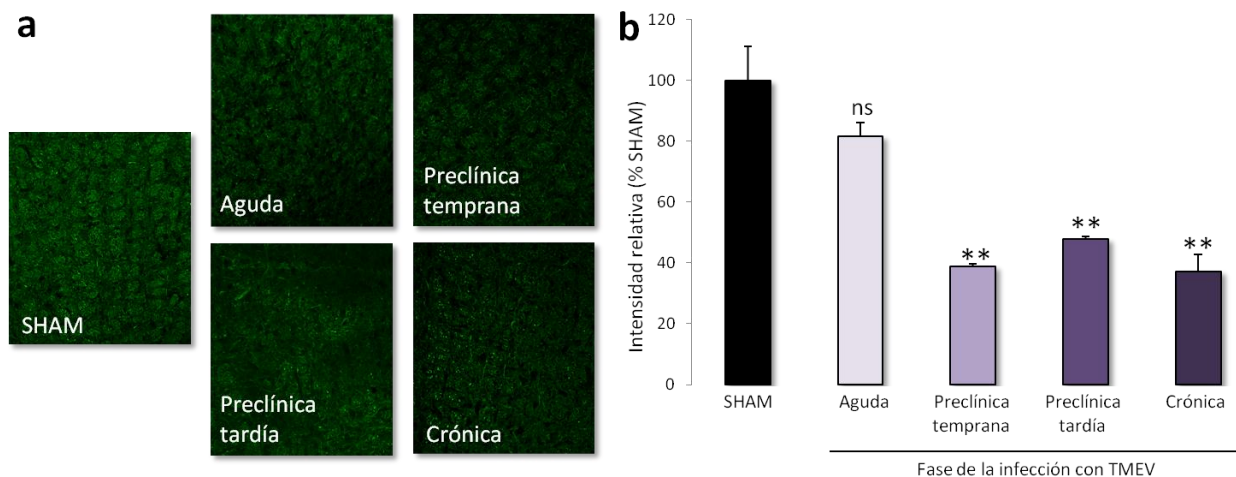
neurofilamento (cuantificado mediante el anticuerpo panNeurofilamento o panNF, que marca filamentos intermedios neuronales).



**Figura 3. Daño axonal temprano en el tronco del encéfalo en el modelo de TMEV-IDD.** (a) Fotomicrografías de microscopía confocal (20x) representativas de secciones transversales de tronco encefálico de 30  $\mu\text{m}$  de grosor que muestran axones marcados con el anticuerpo contra el neurofilamento H no fosforilado (SMI32), tanto en animales control como en animales TMEV-IDD a 19 días post-infección. (b) La cuantificación del área total marcada con SMI32 a nivel de tronco encefálico revela que hay un incremento significativo de marcaje en la fase aguda del modelo TMEV-IDD. \*\* $p \leq 0,01$  vs SHAM.

Como puede observarse en la Fig. 3, el daño medido como aumento de fosforilación de los axones en la zona del tronco cerebral según el marcaje del anticuerpo SMI32, muestra que dicho daño aparecía de manera significativa en la fase aguda del modelo, implicando una afectación temprana de las neuronas y sus prolongaciones en este área cerebral a tiempos cortos de la patología.

Al correlacionarlo con la cantidad de neurofilamento según el marcaje del anticuerpo panNF (Fig. 4) el análisis mostró que la pérdida significativa de axones se producía en una fase preclínica temprana de la enfermedad y se mantenía a lo largo del tiempo, desde las etapas en las que todavía no había sintomatología hasta la fase crónica. Teniendo en cuenta ambos marcadores (daño axonal, neurofilamento), los datos sugieren que el daño neuronal se está produciendo en una fase temprana de la enfermedad posiblemente asociado a la expansión viral y a la inflamación del parénquima nervioso, pero dicho daño no se hace evidente en forma de pérdida de filamento neuronal de un 60% (Fig. 4b) hasta el inicio de la fase preclínica, prolongándose dicha pérdida de manera irrecuperable hasta la fase crónica de la enfermedad.

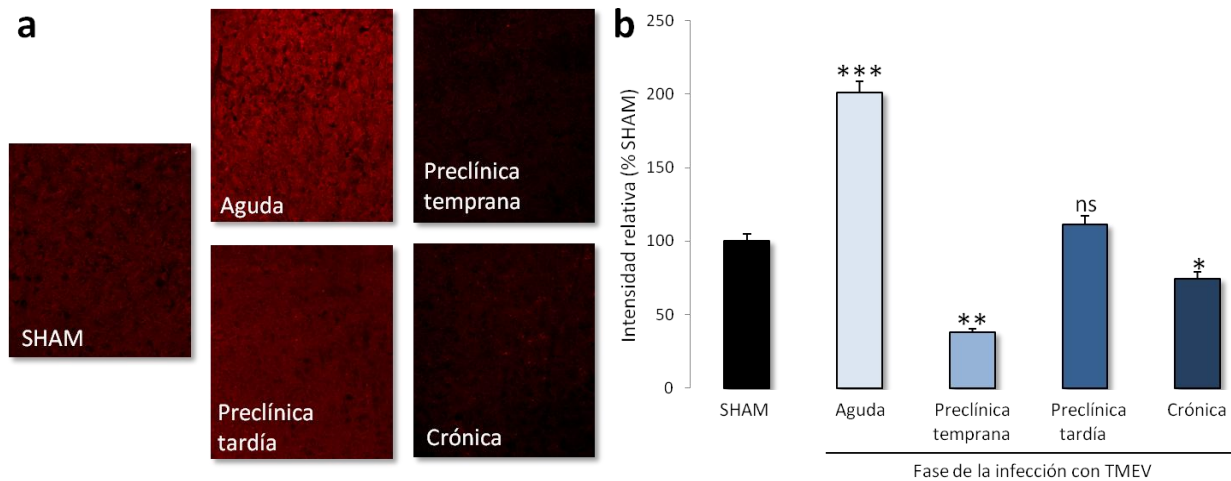


**Figura 4. Curso temporal de la pérdida de densidad axonal en el tronco del encéfalo en el modelo de TMEV-IDD.** (a) Fotomicrografías de microscopía confocal (20x) representativas de secciones transversales de tronco encefálico de 30  $\mu\text{m}$  de grosor que muestran axones marcados con el anticuerpo contra neurofilamentos (panNF), tanto en animales control como en animales TMEV-IDD en la fase aguda, preclínica temprana, preclínica tardía y crónica. (b) La cuantificación del área total marcada con panNF a nivel de tronco encefálico revela que hay un descenso significativo en la cantidad de neurofilamentos en la fase presintomática del modelo TMEV-IDD, y que dicho descenso se mantiene hasta la fase crónica de la enfermedad. \*\* $p \leq 0,01$  vs SHAM.

### ***Grado de desmielinización.***

Tradicionalmente se ha atribuido a la infección por el virus de Theiler en ratones susceptibles al desarrollo de una enfermedad crónica desmielinizante, caracterizada por lesiones multifocales en la sustancia blanca de médula espinal con pérdida de mielina e infiltrados inflamatorios, similar a la patología observada en EM (Dal Canto, 1975). Entre los posibles mecanismos que desencadenan la desmielinización se barajan tanto la muerte lítica en etapas tempranas de los oligodendrocitos afectados por el virus, como el desencadenamiento de una patología autoinmune por un fenómeno de hipersensibilidad retardada en etapas tardías (Tsunoda y Fujinami, 1996). En relación a estas dos hipótesis, nuestro análisis incluyó el estudio temporal del grado de desmielinización en el modelo de TMEV-IDD en tronco cerebral. Como puede verse en la Fig. 5, hay un incremento de marcaje del marcador de mielina CNPasa en la fase aguda que decae significativamente ( $p \leq 0,01$ ) al inicio de la etapa preclínica temprana, para recuperarse hasta niveles control en la fase preclínica tardía, y volver a disminuir en tiempos posteriores crónicos ( $p \leq 0,01$  y  $p \leq 0,05$ , respectivamente). Estos datos sugieren que se produce una desmielinización en etapas tempranas sin que haya manifestación clínica,

seguida de un intento de remielinización que se pierde en la fase crónica, donde la pérdida de mielina acompañada del daño axonal acumulado podría explicar, en parte, los déficits neurológicos observados en el modelo en etapas tardías.



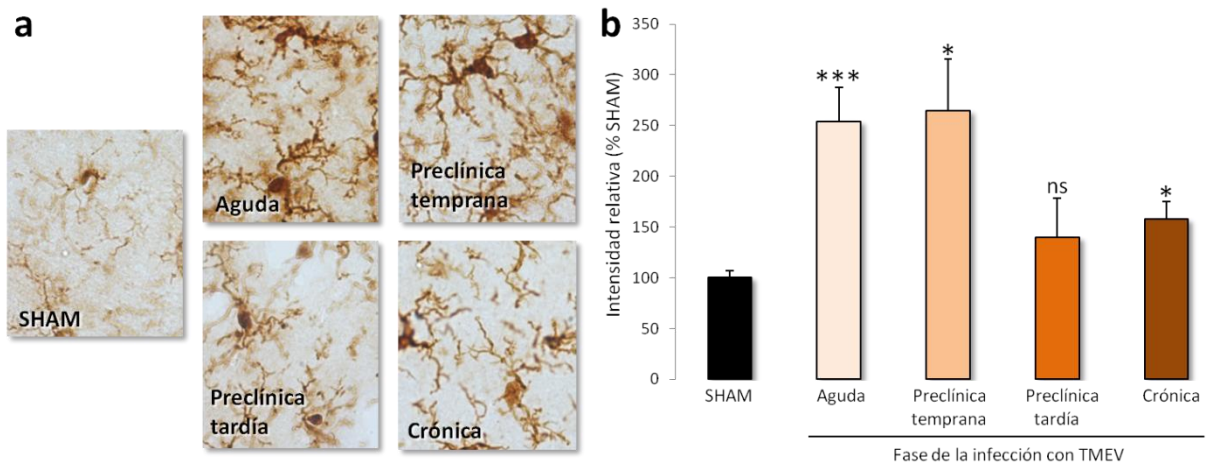
**Figura 5. Curso temporal de la desmielinización en el tronco del encéfalo en el modelo de TMEV-IDD.** (a) Fotomicrografías de microscopía confocal (20x) representativas de secciones transversales de tronco encefálico de 30 μm de grosor que muestran la mielina marcada con el anticuerpo CNPasa, tanto en animales control como en animales TMEV-IDD en la fase aguda, preclínica temprana, preclínica tardía y crónica. (b) La cuantificación del área total marcada con CNPasa a nivel de tronco encefálico revela que hay incremento significativo de mielina en la fase aguda del modelo TMEV-IDD, asumible a la pérdida de oligodendrocitos y generación de debris de mielina en esta etapa; en la fase preclínica temprana se produce una desmielinización que es seguida de una remielinización en la fase preclínica tardía. Finalmente, la desmielinización en la fase crónica se hace evidente en los animales infectados con el virus. \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs SHAM.

### 1.1.2.- ANÁLISIS EN CORTEZA MOTORA.

Una vez completado el estudio de la evolución histopatológica de la enfermedad a nivel de tronco cerebral, pasamos a realizar el mismo análisis (niveles de activación microglial, grado de afectación axonal y grado de desmielinización) en la corteza motora cerebral, ya que trabajos sobre pacientes con EM apuntan a la existencia de un daño axonal cortical unido a desmielinización y activación microglial (Kutzelnigg y cols., 2005).

### *Niveles de activación microglial.*

Al valorar el grado de activación microglial en la corteza motora (Fig. 6), y de manera paralela a lo que estaba sucediendo en tronco cerebral, pudo observarse que en la fase aguda de la enfermedad dicho grado de activación era significativamente superior a los animales control ( $p \leq 0,001$ ), manteniéndose en este estado en la fase preclínica temprana ( $p \leq 0,05$ ), descendiendo en la fase preclínica tardía, y volviendo a aumentar en la fase crónica del TMEV-IDD ( $p \leq 0,05$ ).



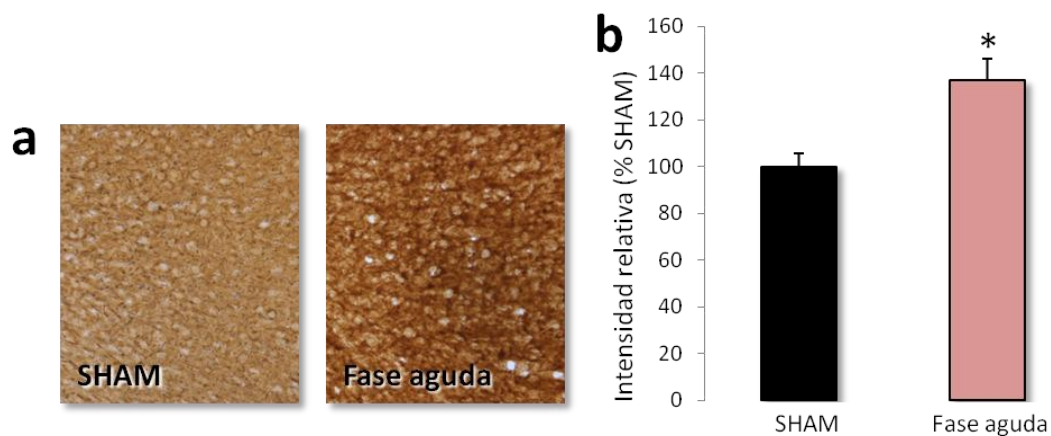
**Figura 6. Curso temporal de la activación microglial en la corteza motora en el modelo de TMEV-IDD.** (a) Fotomicrografías de microscopía óptica (40x) representativas de secciones transversales de corteza motora de 30 µm de grosor marcadas con el anticuerpo Iba1, tanto en animales control como en animales TMEV-IDD en la fase aguda, preclínica temprana, preclínica tardía y crónica. (b) La cuantificación del área total marcada con Iba1 a nivel de tronco encefálico revela que hay un incremento significativo de la reactividad en la fase aguda del modelo TMEV-IDD, que sigue elevado en la fase preclínica temprana para disminuir en la fase preclínica tardía. Asimismo, y como ocurría en tronco cerebral, la reactividad microglial vuelve a estar elevada en la fase crónica tardía de la enfermedad. \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  vs SHAM.

### *Grado de afectación axonal.*

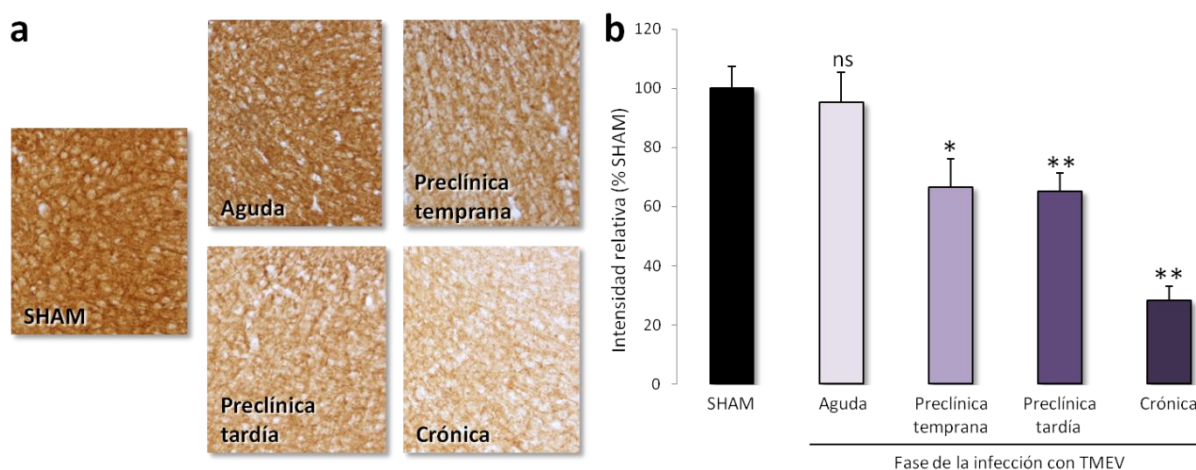
En segundo lugar, y al igual que estaba sucediendo en tronco cerebral en lo relativo al marcador de daño axonal SMI32, puede observarse por inmunohistoquímica (Fig. 7) que en la etapa aguda de la enfermedad hay un incremento de marcaje con respecto a los animales control, apuntando a un daño axonal temprano en corteza motora.

Relacionando este dato con el estudio de la densidad de neurofilamento neuronal mediante el uso del anticuerpo panNF, puede verse (Fig. 8a) cómo se repite el mismo patrón de pérdida axonal que se había observado en tronco cerebral. Así, según el análisis realizado (Fig. 8b), la pérdida axonal se produce tras la fase aguda de la

enfermedad y es progresiva a lo largo del tiempo, llegando a producirse una pérdida del 70% de los neurofilamentos en corteza motora en la etapa crónica.



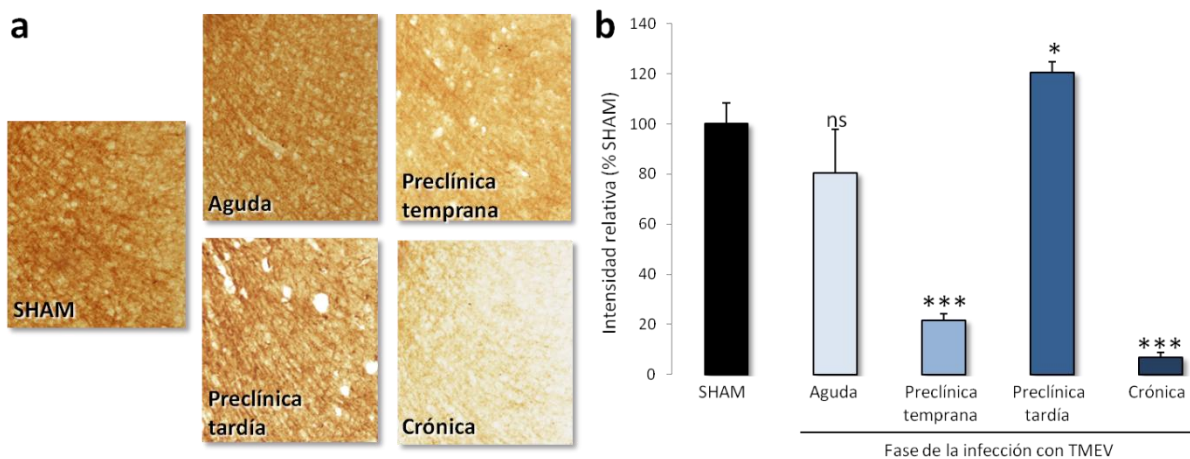
**Figura 7. Daño axonal temprano en la corteza motora en el modelo de TMEV-IDD.** (a) Fotomicrografías de microscopía confocal (20x) representativas de secciones transversales de corteza motora de 30  $\mu\text{m}$  de grosor que muestran axones marcados con el anticuerpo contra el neurofilamento H no fosforilado (SMI32), tanto en animales control como en animales TMEV-IDD en la fase aguda. (b) La cuantificación del área total marcada con SMI32 a nivel de tronco encefálico revela que hay un incremento significativo de marcaje en la fase aguda del modelo TMEV-IDD. \* $p \leq 0,05$  vs SHAM.



**Figura 8. Curso temporal de la pérdida de densidad axonal en la corteza motora en el modelo de TMEV-IDD.** (a) Fotomicrografías de microscopía confocal (20x) representativas de secciones transversales de corteza motora de 30  $\mu\text{m}$  de grosor que muestran axones marcados con el anticuerpo contra neurofilamentos (panNF), tanto en animales control como en animales TMEV en la fase aguda, preclínica temprana, preclínica tardía y crónica. (b) La cuantificación del área total marcada con panNF a nivel de tronco encefálico revela que hay un descenso significativo en la cantidad de neurofilamentos en la fase preclínica del modelo TMEV-IDD, y que dicho descenso se agudiza a lo largo del desarrollo de la enfermedad hasta la fase crónica. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  vs SHAM.

### Grado de desmielinización.

Por último, se valoró la desmielinización en corteza motora a lo largo de la evolución histopatológica del TMEV-IDD en nuestros ratones de estudio. El marcaje de mielina mediante el marcador de mielina RIP (Fig. 9) sigue el mismo patrón que el observado en tronco cerebral: así, puede observarse cómo el marcaje decae significativamente ( $p \leq 0,001$ ) al inicio de la etapa preclínica temprana, para recuperarse por encima de niveles control a 60 dpi ( $p \leq 0,05$ ), y volver a caer en tiempos posteriores crónicos ( $p \leq 0,001$ ). Estos datos siguen apuntando hacia una posible desmielinización en etapas tempranas sin que haya manifestación clínica, seguida de un intento de remielinización que se pierde en la fase crónica.

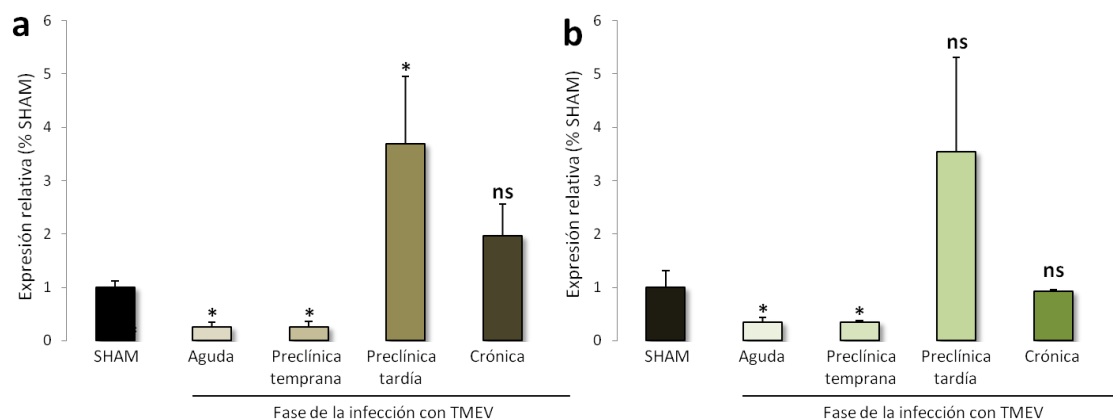


**Figura 9. Curso temporal de la desmielinización en la corteza motora en el modelo de TMEV-IDD.** (a) Fotomicrografías de microscopía confocal (20x) representativas de secciones transversales de corteza motora de 30 µm de grosor que muestran la mielina marcada con el anticuerpo RIP, tanto en animales control como en animales TMEV-IDD en la fase aguda, preclínica temprana, preclínica tardía y crónica. (b) La cuantificación del área total marcada con CNPasa a nivel de tronco encefálico revela que en la fase preclínica temprana se produce una desmielinización que es seguida de una remielinización al final de la fase preclínica, siguiendo el mismo patrón que sucedía en el análisis de la mielina en el tronco del encéfalo. Asimismo, la desmielinización en la fase crónica se hace evidente en los animales infectados con el virus. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs SHAM.

## 1.2- CURSO TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES DE PROGENITORES DE OLIGODENDROCITOS EN MÉDULA ESPINAL CERVICAL.

La presencia fisiológica en personas sanas y enfermas de OPCs dentro del SNC adulto, capaces de protagonizar fenómenos de remielinización espontánea, apunta hacia un potencial terapéutico intrínseco importante en términos de aumento de su migración y diferenciación hacia oligodendrocitos mielinizantes. En esta línea, se ha visto que la

activación de los OPCs necesaria para que el proceso de remielinización se produzca requiere el aumento de expresión de genes asociados con la diferenciación de los oligodendrocitos, como son los factores de transcripción Olig2 y NKx2.2 (del inglés *NK2 transcription factor related locus2*) (Fancy y cols., 2004). Con todo ello, y teniendo en cuenta los resultados del análisis de marcadores de mielina realizados en tronco del encéfalo y corteza motora que apuntan hacia una desmielinización en la fase preclínica temprana, seguida de un intento de remielinización en la fase preclínica tardía, procedimos a realizar un estudio de los factores de transcripción Olig2 y NKx2.2 a lo largo de los distintos tiempos del TMEV-IDD.



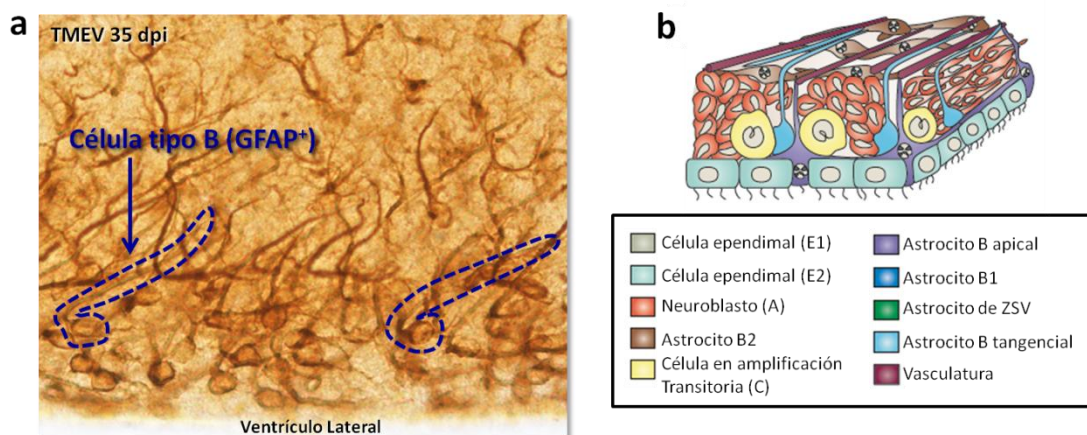
**Figura 10. Curso temporal de la expresión de marcadores de OPCs en médula espinal cervical.** Los histogramas presentan la expresión de los factores de transcripción Olig2 (a) y NKx2.2 (b) tanto en animales control como en animales TMEV-IDD en la fase aguda, preclínica temprana, preclínica tardía y crónica. En ambos histogramas puede observarse que existe una disminución en la expresión de dichos factores en la fase aguda y preclínica temprana, que se incrementa respecto al control en la fase preclínica tardía para volver a niveles basales en la fase crónica. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la expresión de ARNm de cada gen, medido por RT-PCR a tiempo real y normalizado con la expresión del gen 18S. \*  $p \leq 0,05$  vs SHAM.

Como puede observarse en la Fig. 10, el análisis por la técnica de RT-PCR a tiempo real de tejido procedente de médula espinal cervical mostró que la expresión de ambos factores de transcripción estaba significativamente disminuida en la fase preclínica temprana ( $p \leq 0,05$ ) y por el contrario aumentada a en la preclínica tardía ( $p \leq 0,05$ ), para luego regresar a niveles normales en la fase crónica. Estos datos parecen relacionarse con los resultados obtenidos en tronco cerebral con el marcador de mielina CNPasa y en corteza motora con el marcador de mielina RIP, sugiriendo que la desmielinización que era seguida por un incremento de mielina en la etapa preclínica podría explicarse por un

aumento en el número de OPCs en el parénquima nervioso, de tal manera que dicho aumento de progenitores se traduciría en un posible aumento de oligodendrocitos maduros que son los que podrían dar lugar al intento de remielinización espontánea observada.

### 1.3- LA ZONA SUBVENTRICULAR COMO NICHOS NEUROGÉNICO: PROLIFERACIÓN CELULAR, MIGRACIÓN Y DIFERENCIACIÓN A OLIGODENDROCITOS EN ÁREAS LESIONADAS.

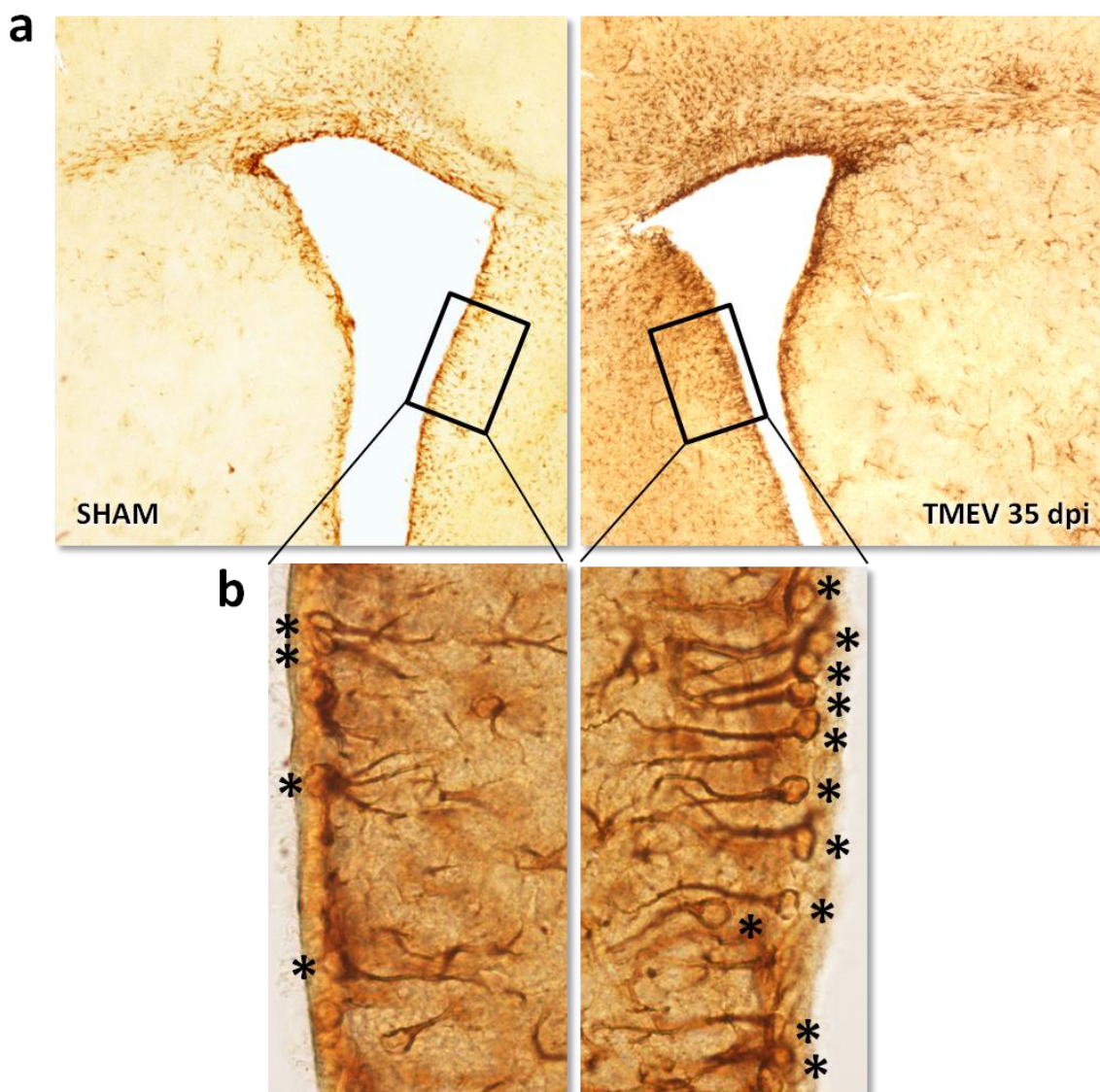
La zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales del encéfalo es una de las áreas germinativas más grandes del cerebro adulto, caracterizada por la presencia de células multipotentes con capacidad proliferativa y potencial de generar células inmaduras; dichas células migran a larga distancia en el caso de roedores (Loisy Alvarez-Buylla, 1994). Hay trabajos que muestran la reactivación de esta zona en EM (Nait-Oumesmar y cols., 2007) y en condiciones de desmielinización experimental (Calza y cols., 1998; Nait-Oumesmar y cols., 1999).



**Figura 11. Células madre neurales GFAP<sup>+</sup> en ZSV del cerebro adulto de ratones TMEV-IDD.** (a) Fotomicrografía representativa de microscopía óptica (40x) de una sección transversal de 30 µm de grosor, que muestra la morfología de las células tipo B de ZSV marcadas con el anticuerpo GFAP en un animal enfermo TMEV a 35 dpi. Nótese el gran soma celular y la prolongación en forma de cilio, característico de estas células progenitoras del SNC adulto según la citoarquitectura de la ZSV descrita en (b). Según una revisión de Shen et al en 2008, en el área periventricular del roedor adulto aparecen los Astrocitos tipo B, subdivididos en apicales y tangenciales (en contacto con la superficie ventricular y con un cilio único), que serían células madre neurales con características astrocíticas que darían lugar a las células tipo C proliferativas. Dichas células tipo C darían lugar a los neuroblastos (o células tipo A), que migrarían hacia bulbo olfativo y se diferenciarían a neuronas. Además, se ha visto que las células tipo B también pueden generar oligodendrocitos (Ihrle and Alvarez-Buylla, 2008).

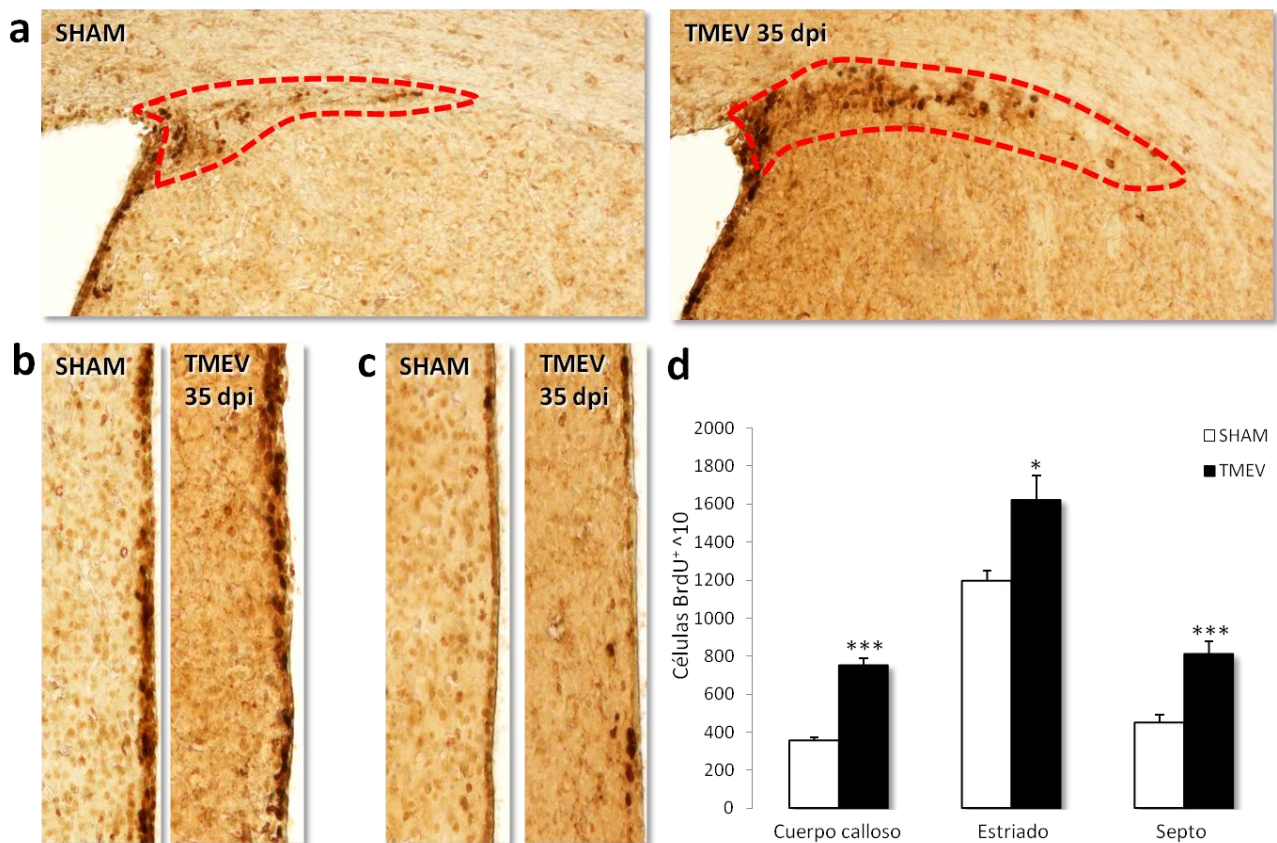
Concretamente en la EAE se ha descrito un incremento de proliferación en la ZSV seguida de la movilización de progenitores hacia un destino oligodendroglial (Picard-Riera y cols., 2002), apuntando hacia la activación específica de esta zona en condiciones de desmielinización e inflamación, y sobre todo sugiriendo una implicación directa en mecanismos de reparación de mielina en SNC.

Con el objetivo de ver la respuesta de la ZSV en nuestro modelo de estudio y teniendo en cuenta los trabajos previos descritos, nuestra primera aproximación a esta zona fue el uso del marcador GFAP, que ha sido descrito como marcador de células madre neurales

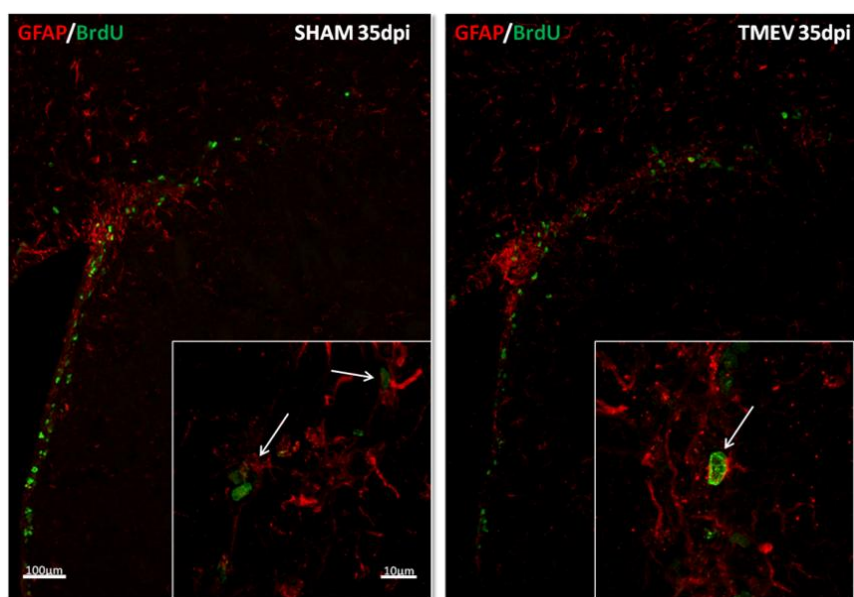


**Figura 12. Activación de la ZSV en los animales TMEV-IDD a 35 dpi.** Fotomicrografías de microscopía óptica a 20x (a) y 40x (b) de una sección transversal de la ZSV de 30 µm de grosor, que muestra un incremento de células tipo B positivas para el anticuerpo GFAP en los animales no infectados en comparación con los animales enfermos a 35dpi.





**Figura 13. La infección con el virus de Theiler produce un aumento de proliferación en la ZSV.** Fotomicrografías de microscopía óptica a 20x de secciones transversales de la ZSV de 30  $\mu$ m de grosor en la salida de cuerpo calloso (a), salida hacia estriado (b) y salida hacia septo (c), marcadas para BrdU mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo específico en animales TMEV y control. (d) Cuantificación del número de células proliferativas de la SVZ en su salida a cuerpo calloso, a estriado y a septo en animales TMEV-IDD a día 35 post-infección (fase preclínica temprana) y en animales control. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar del número de células BrdU<sup>+</sup> de los contajes de 3 animales/grupo con 10 secciones/animal. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  vs SHAM.



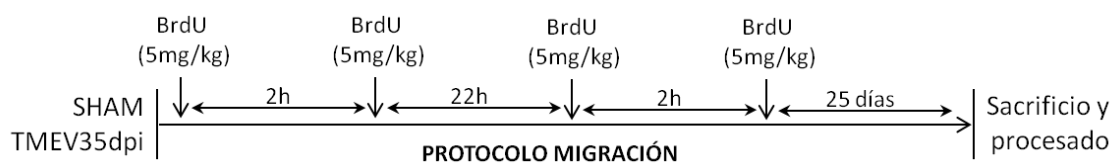
**Figura 14. Doble marcaje para BrdU y GFAP en la ZSV.** Fotomicrografías de microscopía electrónica a 20x y 63x de secciones transversales de la ZSV de 30  $\mu$ m de grosor en la salida de cuerpo calloso, mostrando la colocalización de marcaje para BrdU (verde) y GFAP (rojo)

Como puede apreciarse en las imágenes y en el análisis posterior (Fig. 13), la infección con el virus de Theiler provocó a 35 dpi un aumento significativo de la proliferación en estas tres zonas, de tal manera que el número de células BrdU positivas aumentó en los animales TMEV a razón de 2,12 veces en cuerpo calloso ( $p \leq 0,001$ ), 1,35 veces en la salida a estriado ( $p \leq 0,05$ ) y finalmente 1.8 veces en la salida hacia el septo ( $p \leq 0,001$ ) en comparación con los animales control.

Por último, realizamos un doble marcaje en la ZSV mediante inmunohistoquímica utilizando como marcadores BrdU y GFAP para intentar caracterizar estas células proliferativas (Fig. 14) y, como puede verse, algunas de las células BrdU positivas colocalizan con este marcador de astrocitos y de células madre (ver detalle).

### 1.3.2.- MIGRACIÓN CELULAR Y DIFERENCIACIÓN A OLIGODENDROCITOS MADUROS EN RESPUESTA A TMEV-IDD.

Según nuestros resultados, el incremento de la proliferación en ZSV que se estaba produciendo en los animales infectados a día 35 en comparación con los controles, parecía sugerir que podría haber una relación muy estrecha con la remielinización observada a 60 dpi en distintas estructuras cerebrales, de tal manera que un aumento tanto en la proliferación de progenitores gliales como en su diferenciación a oligodendrocitos maduros podría ser una de las causas de la remielinización espontánea que vimos en nuestro modelo en la fase preclínica tardía.

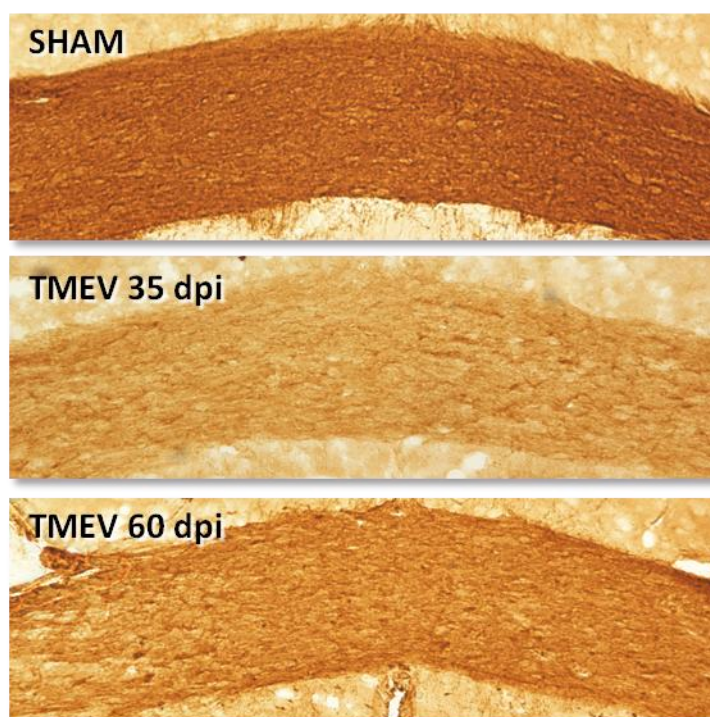


**Esquema 2. Protocolo de administración de BrdU para marcar células que han proliferado en un tiempo concreto y migrado.**

Para comprobarlo, utilizamos un protocolo de administración de BrdU en el que realizamos dos inyecciones intraperitoneales con 2h de diferencia entre sí, tanto en animales control como en animales infectados con el virus a 35 dpi. Transcurridas 22 h desde la última administración, los animales volvieron a someterse al mismo protocolo de administración para asegurar la incorporación del BrdU por el mayor número de células proliferativas posible sin inducir toxicidad al animal, y se les dejó en el

estabulario durante 25 días adicionales, momento en el que fueron sacrificados y procesados para su análisis (Esquema 2).

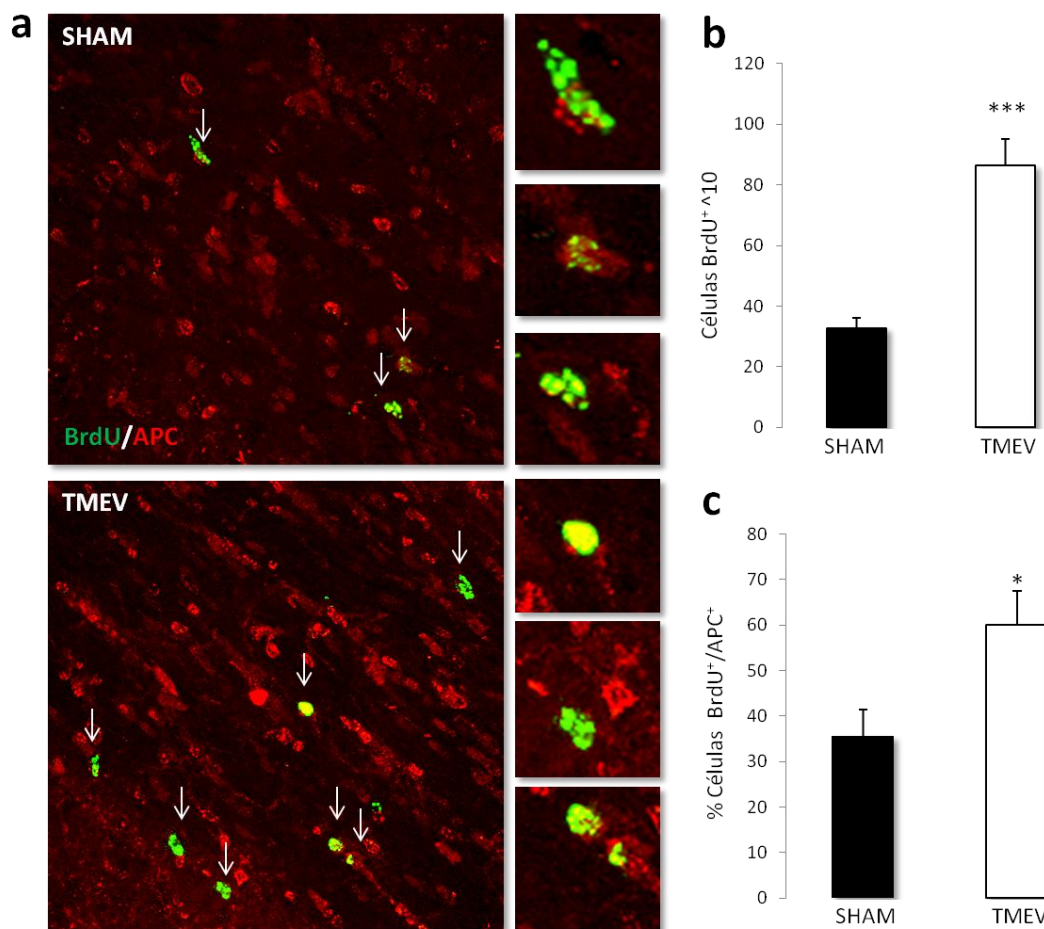
Como nuestro objetivo era intentar explicar la remielinización observada a 60 dpi, nos centramos en una estructura próxima a la ZSV como era el cuerpo calloso, zona que también presentaba una desmielinización evidente a 35 dpi y una remielinización espontánea a 60dpi en nuestro modelo de estudio (Fig. 15). Con este fin, realizamos un doble marcaje mediante inmunohistoquímica con BrdU y APC (un marcador de oligodendrocitos maduros), 25 días después de la última inyección intraperitoneal con BrdU según el protocolo descrito anteriormente, para lo cual se realizaron cortes coronales del encéfalo y se analizó el número de células BrdU y APC positivas en cuerpo calloso (n= 4 secciones analizadas/animal, desde Bregma 0,50mm hasta -0,10mm).



**Figura 15. Desmielinización y remielinización en el cuerpo calloso de los animales TMEV-IDD.** Fotomicrografías de microscopía óptica (20x) representativas de secciones transversales de cuerpo calloso de 30  $\mu$ m de grosor que muestran la mielina marcada con el anticuerpo CNPasa, tanto en animales control como en animales TMEV-IDD a tiempo 35 y 60 dpi. Siguiendo el mismo patrón que las otras dos estructuras encefálicas analizadas (tronco cerebral y corteza motora), en el cuerpo calloso puede observarse una desmielinización a 35 dpi seguida por una remielinización a 60 dpi cuando se comparan los animales infectados con los animales control.

Como puede observarse en la Fig. 16, el número de células BrdU<sup>+</sup> que había migrado hacia el interior del cuerpo calloso era mayor en el caso de los animales infectados con

el virus a 60 dpi, células que además comarcaban en gran parte con el marcador de oligodendrocitos maduros APC. Al realizar el análisis del número de células que habían migrado (Fig. 16b), se pudo comprobar cómo la infección con el virus de Theiler producía un incremento de migración de células BrdU positivas hacia el cuerpo calloso en un ratio de 2.64 veces ( $p \leq 0.001$ ), en consonancia con el trabajo de Picard-Riera de 2002 en el que la desmielinización inducida por EAE provocaba la movilización de células desde la ZSV hacia estructuras periventriculares como el cuerpo calloso (Picard-Riera y cols., 2002).



**Figura 16. Migración de progenitores y diferenciación a oligodendrocitos maduros en TMEV-IDD.** Marcaje de las células derivadas de ZSV en el cuerpo calloso, 25 días después de la administración del BrdU. **(a)** Fotomicrografías de microscopía confocal (20x) representativas de secciones transversales de cuerpo calloso de 30  $\mu\text{m}$  de grosor que muestran el marcaje con BrdU (verde) y APC (rojo) en animales SHAM y TMEV a 60dpi. **(b)** Cuantificación del número de células BrdU positivas y **(c)** BrdU<sup>+</sup>/APC<sup>+</sup> que han migrado hacia cuerpo calloso en animales SHAM y TMEV a 60dpi (fase preclínica tardía). Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar del número de células BrdU<sup>+</sup>/10 y % de células BrdU<sup>+</sup>/APC<sup>+</sup> de los contajes de 3 animales/grupo con 10 secciones/animal. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  vs SHAM.

En este mismo trabajo, la inmunohistoquímica combinada para BrdU y marcadores específicos mostró que las células de la ZSV migraban hacia el cuerpo calloso como progenitores gliales bajo esas condiciones de desmielinización inducida por EAE. En

nuestro caso y de manera similar, las células marcadas con BrdU en la ZSV migraban hacia el cuerpo caloso y se diferenciaban a oligodendrocitos maduros APC<sup>+</sup> a los 60 dpi (Fig. 16c), de tal manera que observábamos un aumento significativo en el número de células BrdU<sup>+</sup>/APC<sup>+</sup> en los animales infectados (60.09±7.3%) respecto a los animales control (35.6±5.8%, p≤0.05), que podría explicar la remielinización espontánea observada en los animales TMEV a 60dpi.

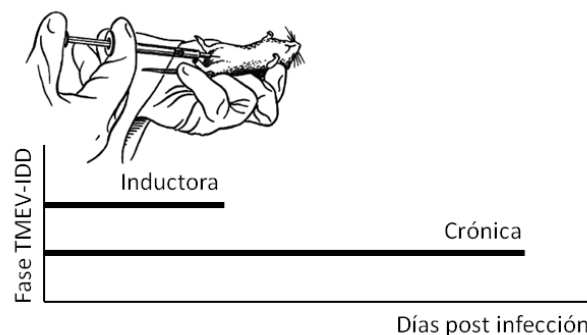
2.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CBD EN LA FASE CRÓNICA  
(TERAPÉUTICA) E INDUCTORA EN EL MODELO TMEV-IDD.

---

Trabajos previos del laboratorio han descrito el efecto terapéutico de la administración de cannabinoides o la modulación del sistema endocannabinoide en el modelo de TMEV-IDD (Mestre y cols., 2005; Docagne y cols., 2007; Loria y cols., 2008; Mestre y cols., 2009; Loria y cols., 2010). Dicho efecto beneficioso ha sido relacionado con las propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y protectoras de estos compuestos en términos de mejora en la actividad y coordinación motora, disminución de reactividad microglial, disminución de expresión de antígenos de MHC-II y de infiltrados linfocitarios CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, disminución en moléculas de adhesión y protección frente a la neurodegeneración, entre otros.

Además, se ha descrito en la literatura que el CBD, uno de los derivados de *Cannabis sativa* sin efectos psicoactivo, es un buen candidato para el tratamiento terapéutico de enfermedades con componente inflamatorio (Mechoulamn y cols., 2007) y neurodegenerativo (Iuvone y cols., 2009). En el caso concreto de la EM, está aprobado el uso del fármaco Sativex<sup>®</sup> (compuesto por THC y CBD en proporción 1:1) para el tratamiento de la espasticidad y el dolor neuropático derivados de la enfermedad.

Con todos estos antecedentes, nuestro siguiente paso fue evaluar el efecto del tratamiento *in vivo* del CBD en el modelo TMEV-IDD, en dos puntos de acción concretos: fase crónica y fase aguda. La valoración de parámetros como la función motora y el efecto inmunomodulador del CBD (en términos de expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, marcadores de activación microglial e infiltrados inflamatorios) quedan descritos en los resultados que se detallan a continuación.



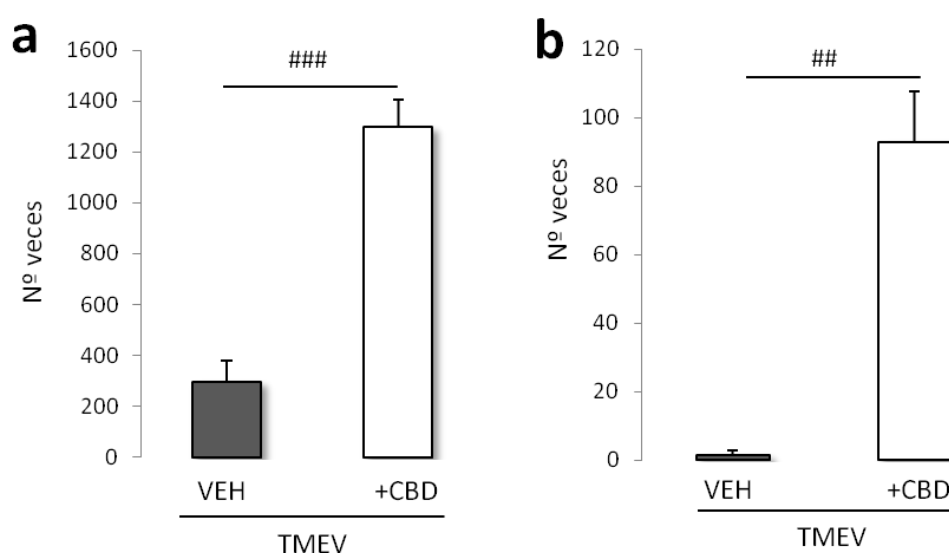
**Esquema 3. Protocolos de tratamiento con CBD en las dos fases de estudio de la enfermedad desmielinizante inducida por el virus de Theiler.**

## 2.1- TRATAMIENTO EN FASE TERAPÉUTICA.

### 2.1.1- FUNCIÓN MOTORA.

Como se ha descrito anteriormente, en el modelo de TMEV-IDD se desencadena una patología con alteraciones en la actividad y la coordinación motora, principalmente de las extremidades posteriores del ratón, que provoca un descenso en la actividad y coordinación motora como mostraba la Figura 1. En la literatura se ha descrito que el tratamiento con CBD en el inicio de la sintomatología de la EAE mejoraba los signos clínicos de los animales inmunizados (Kozela y cols., 2010). Con todo ello, se deduce que aquella manipulación farmacológica que pueda incidir sobre los procesos neurodegenerativos presentes en el modelo de TMEV-IDD tendría gran interés en relación a un posible tratamiento terapéutico de los enfermos de EM.

Según el protocolo de tratamientos *in vivo* en fase crónica descrito en el apartado de material y métodos, se sometió a los animales a la inyección intraperitoneal durante 10 días con el compuesto CBD una vez establecida la fase crónica del TMEV-IDD en nuestros animales, y se procedió a la evaluación del deterioro neurológico a través de la prueba conductual del actímetro.



**Figura 17. El tratamiento con CBD en la fase crónica de la enfermedad induce una mejora en la actividad motora horizontal y vertical en el modelo TMEV-IDD.** Según los resultados de la prueba del actímetro, el tratamiento con CBD durante la fase crónica produce una mejora respecto a los animales infectados y tratados con vehículo tanto en la actividad horizontal (a), como en la actividad vertical (b). ## $p \leq 0,01$  y ### $p \leq 0,001$  vs TMEV.

La valoración de la actividad horizontal y vertical de los animales tratados mostró un notable efecto beneficioso en la mejora de la sintomatología derivada de la enfermedad. Así, según puede observarse en la Fig. 17 que el tratamiento con CBD en la fase crónica aumentó el tiempo de exploración horizontal de los animales infectados de manera significativa ( $p \leq 0,01$ ). Esta mejora estaba acompañada en otro de los parámetros valorados con la prueba del actímetro como es la actividad vertical: así, puede observarse cómo del mismo modo el tratamiento con CBD aumentó el número de veces que los animales infectados se pusieron en posición vertical, de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ). Ambas valoraciones apuntan hacia un efecto terapéutico beneficioso del tratamiento con CBD actuando en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD, con una mejora significativa en la ejecución de la prueba de comportamiento del actímetro que sugiere una mejora en los déficits motores asociados a la patología.

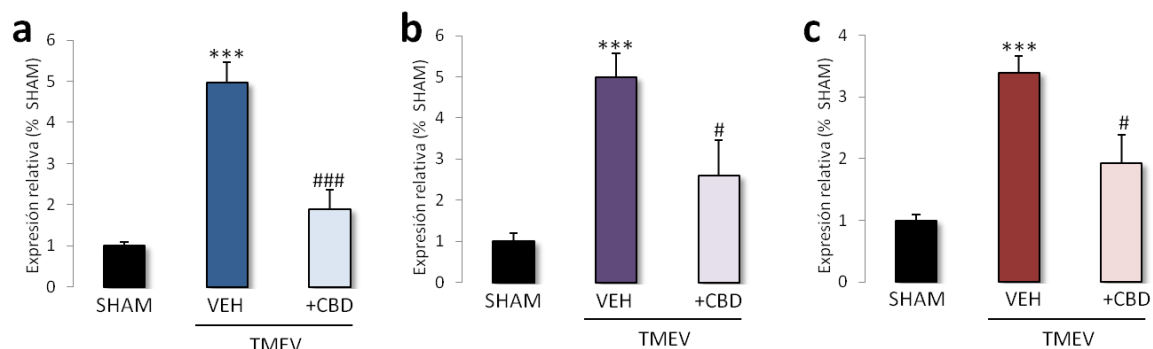
#### 2.1.2- CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y MARCADORES DE ACTIVACIÓN MICROGLIAL.

---

Según diversas publicaciones, el CBD tiene un importante efecto beneficioso en modelos experimentales de inflamación aguda y crónica (Mechoulam y cols., 2007; Zuardi, 2008). Concretamente, el tratamiento con CBD en el modelo de EAE ha mostrado tener un efecto en la disminución de la inflamación, de la actividad microglial y del reclutamiento de linfocitos T en la médula espinal de ratones inmunizados con MOG (Kozela y cols., 2010). Además, se ha descrito que en el TMEV-IDD las células gliales producen mediadores inflamatorios y citotóxicos que son en parte responsables de la pérdida de mielina y del daño axonal que caracterizan al modelo (Pope y cols., 1996).

Por todo ello, nuestro siguiente paso fue la evaluación del efecto del CBD en las dos fases anteriormente mencionadas, sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias y de marcadores microgliales.

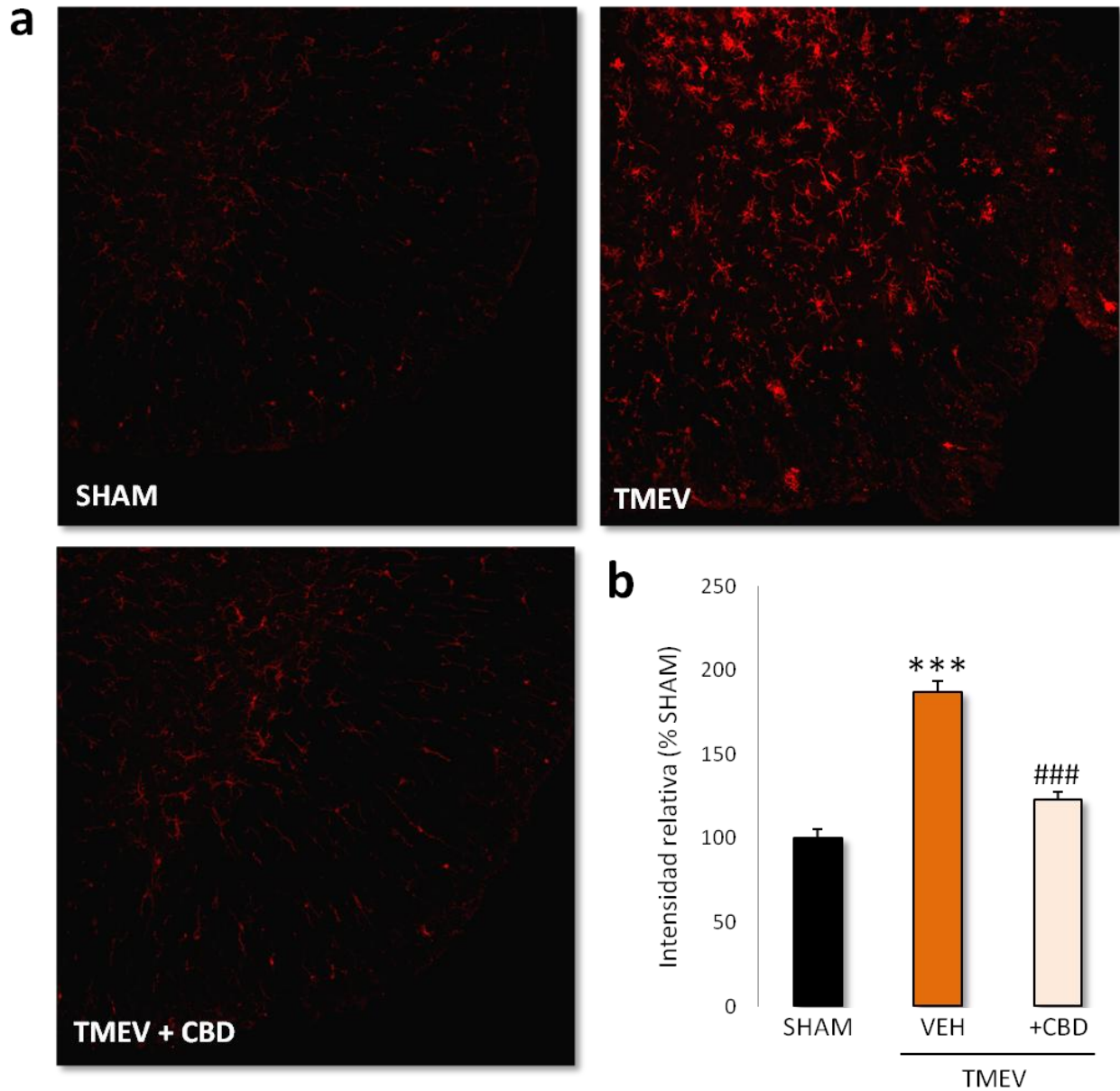
Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores y el efecto beneficioso en sintomatología motora del tratamiento con CBD en nuestro modelo, pasamos a determinar la expresión relativa de ARNm de mediadores inflamatorios. Para ello, y utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real, analizamos la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y del marcador de macrófago/microglía CD11b en la médula espinal cervical de ratones infectados.



**Figura 18.** La infección con el virus de Theiler induce en la fase crónica un aumento en los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y del marcador CD11b en la médula espinal, y el CBD es capaz de atenuar este efecto. El tratamiento con CBD en la fase crónica disminuye significativamente el incremento en expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  (a) e IL-1 $\beta$  (b), así como del marcador de macrófago/microglía CD11b (c). Los histogramas presentan la media  $\pm$  error estándar de la expresión relativa del ARNm, determinada mediante RT-PCR en tiempo real. \*\*\* $p < 0,001$  vs SHAM, # $p < 0,05$  y ### $p < 0,001$  vs TMEV.

Según nuestros resultados y en consonancia con trabajos previos de laboratorio, la infección con el virus de Theiler inducía en la fase crónica (Fig. 18) un aumento significativo en el nivel relativo de ARNm de TNF $\alpha$ , de IL-1 $\beta$  y del marcador de microglía/macrófago CD11b ( $p \leq 0,001$  en todos los casos). El tratamiento con CBD era capaz de disminuir de manera significativa esta inducción de expresión relativa de ARNm de la citoquina proinflamatoria TNF  $\alpha$  ( $p \leq 0,01$ ), de citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  ( $p \leq 0,05$ ) y del marcador de macrófago/microglía CD11b ( $p \leq 0,05$ ).

Siguiendo esta línea, el análisis de la reactividad microglial en médula espinal cuantificada mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo Iba1 (Fig. 19) mostró que el tratamiento con CBD era capaz de revertir la activación microglial que se producía en los animales infectados en fase crónica, hasta niveles control ( $p \leq 0.001$ ). En conjunto, la disminución en la expresión de las citoquinas proinflamatorias y de marcadores de activación de células microgliales apunta hacia un efecto inmunomodulador del CBD en el modelo de TMEV-IDD.



**Figura 19. El tratamiento con CBD en fase crónica disminuye el incremento de reactividad microglial en la médula espinal de los animales TMEV-IDD. (a)** Fotomicrografías de microscopía confocal (20x) representativas de secciones transversales de médula espinal cervical de 30  $\mu$ m de grosor marcadas con el anticuerpo Iba1 en animales control, TMEV y TMEV tratados con CBD. **(b)** La cuantificación del área total marcada con Iba1 en médula espinal cervical revela que hay un incremento significativo de la reactividad en la fase crónica del modelo TMEV-IDD, que disminuye de manera significativa cuando los animales son tratados con CBD. \*\*\* $p \leq 0,001$  vs SHAM y ### $p \leq 0,001$  vs TMEV.

---

## 2.2- TRATAMIENTO EN FASE INDUCTORA.

---

### 2.2.1.- QUIMIOQUINAS, INFILTRADOS LEUCOCITARIOS Y ACTIVACIÓN MICROGLIAL.

---

Después de los datos obtenidos en relación al efecto beneficioso del CBD en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD, tanto en la mejora de la sintomatología motora de los animales infectados como en la disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias y de la activación microglial, quisimos indagar más profundamente el papel inmunomodulador de este cannabinoide en la fase inicial de la polioencefalomielitis de nuestro modelo de estudio a nivel central. Para ello, sobre animales inoculados intracerebralmente con el virus de Theiler según se describe en el apartado de material y métodos, utilizamos un segundo grupo de experimentación sobre el que realizamos un tratamiento intraperitoneal con CBD entre los días 1 y 7 post-infección, procediendo al sacrificio de los animales al séptimo día de tratamiento para el análisis de quimioquinas e infiltrados linfocitarios en corteza prefrontal, así como la reactividad microglial en esta área cerebral. Los resultados obtenidos de este tratamiento en fase aguda se detallan a continuación.

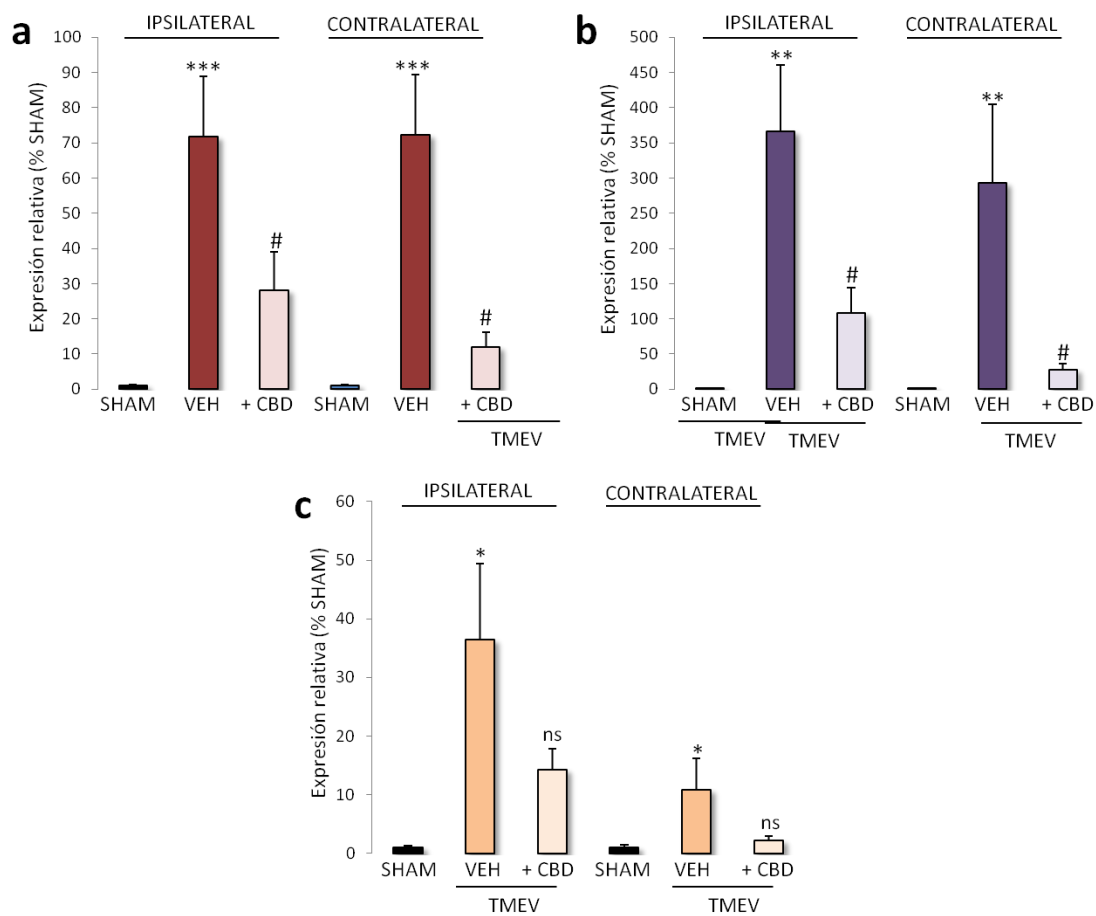
#### ***Expresión de quimioquinas en corteza prefrontal e infiltrados inflamatorios***

La expresión de quimioquinas como moléculas atrayentes de células mononucleares y neutrófilos, que inducen la acumulación de leucocitos en lugares de inflamación (Oppenheim y cols., 1991) ha sido descrita en el modelo de TMEV-IDD, con un incremento en los niveles a nivel de médula espinal y asociada al desarrollo de la sintomatología clínica (Hoffman y cols., 1999). Teniendo en cuenta estos datos previos y el efecto inmunomodulador descrito para el CBD, quisimos valorar los niveles de quimioquinas a los 7 días posteriores de la infección con el virus de Theiler y a nivel de corteza prefrontal, con el fin de evaluar si la modulación de las quimioquinas a nivel central limitaba la infiltración leucocitaria y la inflamación posterior en el SNC.

Para ello, analizamos mediante RT-PCR en tiempo real la corteza prefrontal (próxima al lugar de inoculación del virus en nuestro modelo) de animales control y animales infectados y tratados durante 7 días con CBD, valorando la expresión relativa de ARNm de las quimioquinas CCL2 y CCL5, y del receptor de quimioquinas CCR2.

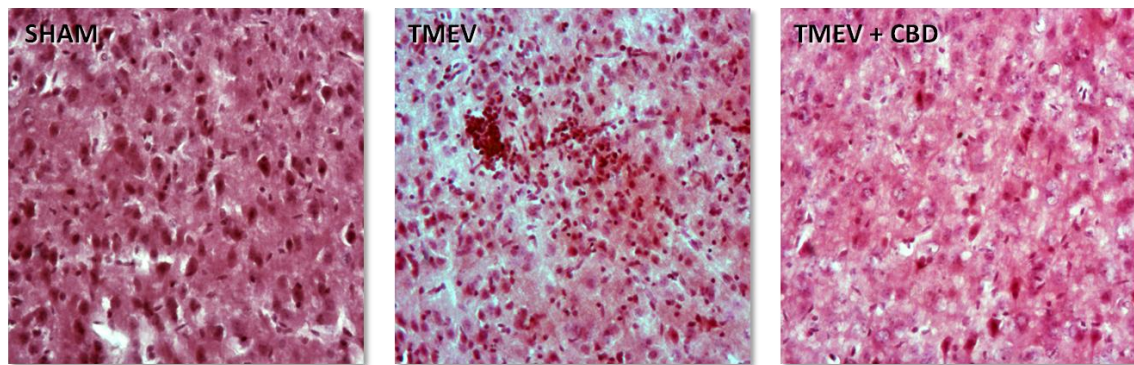
En primer lugar, la inoculación con TMEV inducía un incremento significativo en la expresión de CCL2, CCL5 y CCR2 tanto en la corteza ipsilateral a la inoculación, como en la contralateral (Fig. 20,  $p \leq 0,001$  para CCL2,  $p \leq 0,01$  para CCL5 y  $p \leq 0,05$  para

CCR2 en ambos casos). Y, en segundo lugar, el tratamiento con CBD era capaz de disminuir este incremento en la expresión de CCL2 y de CCL5 (Fig. 20a y 20b, con  $p \leq 0.05$ ) en la corteza ipsilateral y contralateral a la infección, aunque no variaba los niveles de CCR2. Estos resultados apuntan hacia un importante efecto inmunomodulador a nivel central del CBD en el modelo de TMEV-IDD, a través de la disminución de la expresión de quimioquinas (en este caso dos de sus ligandos como serían CCL2 y CCL5) ejercida por la infección con el virus.



**Figura 20. La infección con el virus de Theiler induce en la fase aguda un aumento en los niveles de expresión de las quimioquinas CCL2 y CCL5, y del receptor de quimioquinas CCR2 en corteza prefrontal, y el CBD es capaz de atenuar este efecto.** El tratamiento con CBD durante los 7 primeros días de la infección con el virus de Theiler disminuye significativamente el incremento en expresión de la quimioquina CCL2 (a), de CCL5 (b) y muestra una tendencia a disminuir la expresión del receptor de quimioquinas CCR2 (c), cuando se analiza en corteza prefrontal ipsilateral y contralateral al lugar de inoculación del virus. Los histogramas presentan la media  $\pm$  error estándar de la expresión relativa del ARNm, determinada mediante RT-PCR en tiempo real. \*  $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  y \*\*\* $p \leq 0,001$  vs SHAM, # $p \leq 0,05$  vs TMEV.

Por otro lado, se sabe que durante la fase aguda de la infección con el virus de Theiler, tanto las cepas susceptibles como las resistentes de ratón muestran un elevado número de infiltrados de células mononucleares en SNC, compuestos de células T (CD4 y CD8), células del linaje monocito/macrófago, algunos linfocitos B y pocas células plasmáticas (Oleszak y cols., 2004). Por ello, realizamos una tinción de hematoxilina-eosina para ver la cantidad de infiltrados presentes en parénquima nervioso, y como puede observarse en la Fig. 21, en la fase aguda de la infección con el virus puede observarse una gran cantidad de infiltrados que se localizan mayoritariamente a nivel de corteza y de estriado. En línea con el descenso en la expresión de quimioquinas inducida por el tratamiento con CBD, pudo observarse una disminución evidente en los infiltrados inflamatorios, de tal manera que el parénquima nervioso tenía una apariencia similar a los controles.

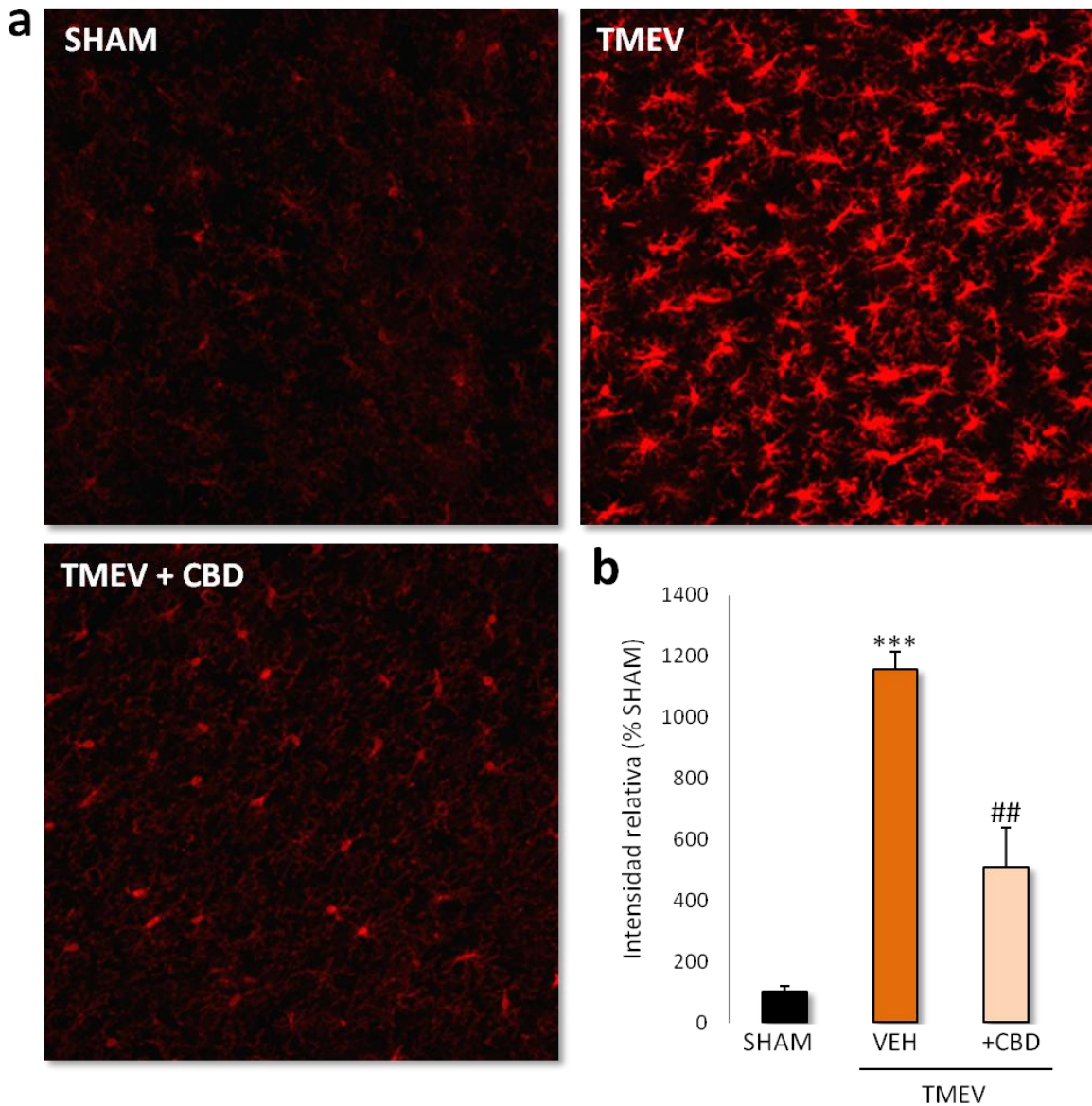


**Figura 21.** El tratamiento con CBD durante la fase inductora disminuye el incremento de infiltrados inflamatorios en la corteza cerebral de los animales infectados. Fotomicrografías de microscopía óptica (20x) representativas de secciones transversales de corteza cerebral de 30  $\mu$ m de grosor marcadas con la técnica de tinción de hematoxilina-eosina, en animales control, TMEV y TMEV tratados con CBD.

### ***Reactividad microglial***

Tras el estudio de dos de los mecanismos clave que median la inflamación inicial en el SNC, como es la entrada de células inmunes a través de la barrera hematoencefálica mediada, entre otros, por la regulación al alza de las quimioquinas en células endoteliales y astrocitos, quisimos ver cómo se encontraban las células inmunes residentes, esto es, las células de microglía. Para ello realizamos mediante la técnica de inmunohistoquímica el marcaje con el anticuerpo Iba1 y pudimos observar que había un gran incremento en la reactividad microglial en parénquima nervioso. Las células de microglía aparecían con morfología ameboides, pocas ramificaciones y el soma engrosado, y se localizaban principalmente en la corteza ipsilateral a la inyección del

virus y en zonas próximas como el estriado (Fig 22a). Concorde a los resultados anteriores, el análisis mostró que el tratamiento con CBD disminuía la reactividad microglial inducida por la inyección con el virus a niveles similares a los animales no infectados (Fig. 22b,  $p \leq 0.01$ ).



**Figura 22. El tratamiento con CBD durante la fase inductora disminuye la reactividad microglial en la corteza cerebral de los animales infectados.** (a) Fotomicrografías de microscopía confocal (20x) representativas de secciones transversales de médula espinal cervical de 30  $\mu\text{m}$  de grosor marcadas con el anticuerpo Iba1 en animales control, TMEV y TMEV tratados con CBD. (b) La cuantificación del área total marcada con Iba1 en médula espinal cervical revela que hay un incremento significativo de la reactividad en la fase crónica del modelo TMEV-IDD, que disminuye de manera significativa cuando los animales son tratados con CBD. \*\*\* $p \leq 0,001$  vs SHAM y ### $p \leq 0,001$  vs TMEV.

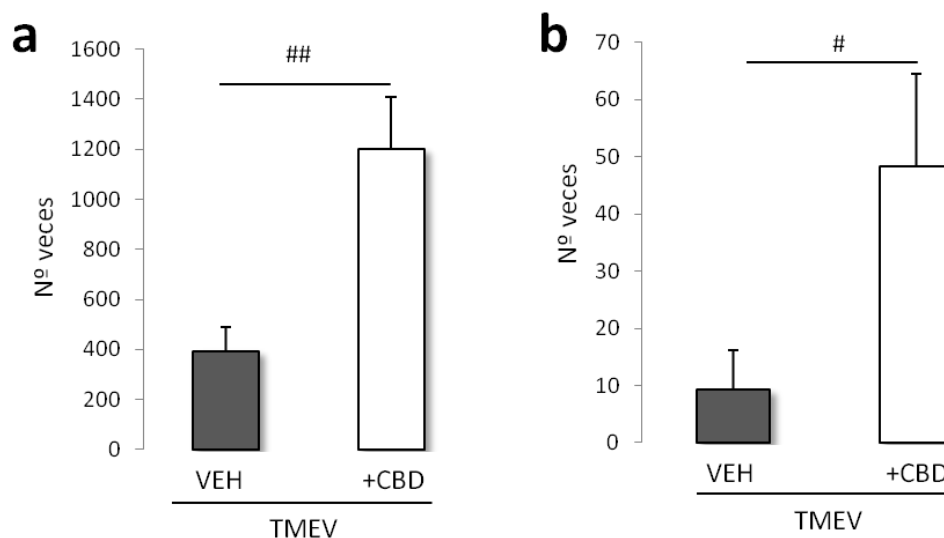
## 2.2.2 IMPLICACIONES DEL TRATAMIENTO CON CBD DURANTE LA FASE INDUCTORA EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD A TIEMPOS CRÓNICOS: FUNCIÓN MOTORA Y CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS.

---

### ***Función motora***

El siguiente paso consistió en la valoración del efecto a largo plazo del CBD en el modelo de TMEV-IDD. Habíamos visto que el tratamiento con CBD en la fase inductora reducía la inflamación generada por la infección viral, de tal manera que disminuía la expresión de las quimioquinas CCL2 y CCL5, disminuía los infiltrados inflamatorios en parénquima nervioso y provocaba un descenso en la reactividad microglial comparado con los animales infectados y tratados con vehículo. Por ello nos propusimos analizar los efectos que el tratamiento con CBD en la fase inductora podía tener en el desarrollo de la enfermedad a tiempos largos. Con tal propósito, y según el protocolo de tratamientos *in vivo* en fase inductora descrito en el apartado de material y métodos, se sometió a los animales a la inyección intraperitoneal durante 10 días con el compuesto CBD tras la infección con el virus de Theiler. Dichos animales se dejaron en el estabulario hasta que apareció la sintomatología motora, y una vez establecida la fase crónica del TMEV-IDD se procedió a la evaluación del deterioro neurológico a través de la prueba conductual del actímetro.

La valoración de la actividad horizontal y vertical de los animales tratados muestra un notable efecto beneficioso en la mejora de la sintomatología asociada a la enfermedad. Así, según puede observarse en la Fig.23a, el tratamiento con CBD en la fase inductora aumentó el tiempo de exploración horizontal de los animales infectados de manera significativa ( $p \leq 0,01$ ). Esta mejora estaba acompañada con otro de los parámetros valorados con la prueba del actímetro, como es la actividad vertical: así, en la Fig 23b puede observarse cómo del mismo modo el tratamiento con CBD en la fase inductora aumentó el número de veces que los animales infectados se pusieron en posición vertical, de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ). Ambas valoraciones subrayan el efecto beneficioso del tratamiento con CBD actuando en la fase inductora de la enfermedad, con una mejora significativa en la ejecución de la prueba de comportamiento del actímetro que sugiere una mejora en los déficits motores derivados del modelo.



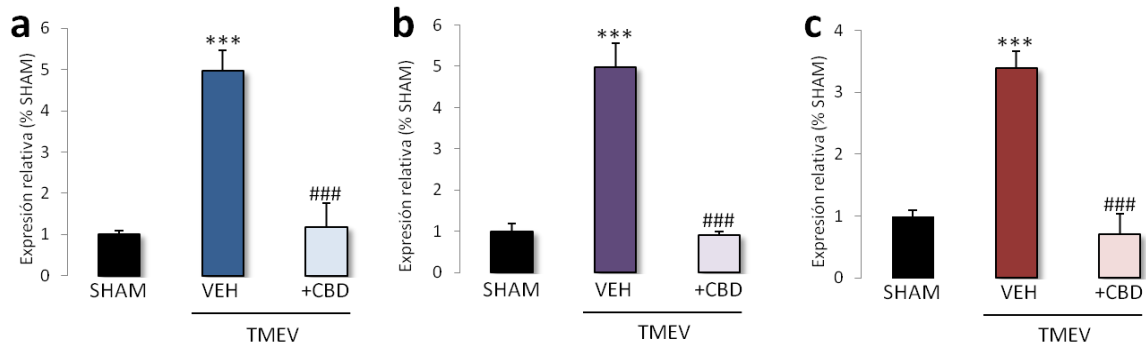
**Figura 23. El tratamiento con CBD en la fase inductora de la enfermedad implica, a largo plazo, una mejora en la actividad motora horizontal y vertical en el modelo TMEV-IDD.** Según los resultados de la prueba del actímetro, el tratamiento con CBD durante la fase inductora produce en la fase crónica una mejora respecto a los animales infectados y tratados con vehículo tanto en la actividad horizontal (a), como en la actividad vertical (b). # $p \leq 0,05$  ## $p \leq 0,01$  vs TMEV.

#### ***Citoquinas proinflamatorias y marcadores de activación microglial.***

Nuestro siguiente paso fue la evaluación del efecto temprano del CBD sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias y de marcadores microgliales en médula espinal de animales, durante la fase crónica de la enfermedad de TMEV-IDD. Con este propósito, y una vez visto el efecto beneficioso del CBD en la limitación de la inflamación durante la fase inductora de la enfermedad, y en la mejora en sintomatología motora en nuestro modelo a largo plazo, pasamos a determinar la expresión relativa de ARNm de mediadores inflamatorios; para ello, y utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real, analizamos la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y del marcador de microglía/macrófago CD11b en la médula espinal cervical de ratones infectados.

Según nuestros resultados y en consonancia con el tratamiento con CBD durante la fase crónica, el tratamiento con CBD durante la fase inductora era capaz de disminuir de manera significativa el incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias, disminuyendo la expresión relativa de ARNm de la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$ , (Fig 24a,  $p \leq 0,001$ ), de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  (Fig 24b,  $p \leq 0,001$ ) y del marcador de macrófago/microglía CD11b (Fig. 24c,  $p \leq 0,001$ ). Estos resultados apuntan hacia un importante efecto inmunomodulador del CBD durante la fase inductora del

modelo de TMEV-IDD, que incide en que el desarrollo de la patología esté retardado en comparación con los animales infectados y tratados con vehículo.



**Figura 24. La infección con el virus de Theiler induce en la fase crónica un aumento en los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y del marcador CD11b en la médula espinal, y el CBD administrado durante la fase inductora es capaz de atenuar este efecto. El tratamiento con CBD en la fase inductora de la enfermedad (1-7 días post-infección) disminuye significativamente el incremento en expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  (a) e IL-1 $\beta$  (b), así como del marcador de microglía/macrófago CD11b (c). Los histogramas presentan la media  $\pm$  error estándar de la expresión relativa del ARNm, determinada mediante RT-PCR en tiempo real. \*\*\* $p \leq 0,001$  vs SHAM y ### $p \leq 0,001$  vs TMEV.**

3.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL CANNABIDIOL EN CULTIVOS  
PRIMARIOS DE PROGENITORES DE OLIGODENDROCITOS.

---

En los últimos años se ha demostrado que el SNC tiene una elevada capacidad reparadora tanto en modelos animales como en humanos y que, como se ha visto, contiene células progenitoras residentes que pueden proliferar y diferenciarse para repoblar zonas lesionadas. Trabajos previos muestran que la remielinización endógena de las lesiones de EM y en el modelo de TMEV-IDD es capaz de mejorar y normalizar la conducción nerviosa, mejorando la función neurológica y contribuyendo a la recuperación funcional (Smith y cols., 1981; Murray y cols., 2001). Dicha remielinización se produciría por la proliferación, migración y diferenciación de células locales precursoras de oligodendrocitos, y la potenciación de esta reparación endógena aparece como una estrategia plausible para mejorar el desarrollo de la sintomatología (Gallo y Armstrong, 2008; Lubetzki, 2008; Rist y Franklin, 2008).

Los OPCs son altamente vulnerables a la inflamación y al estrés oxidativo, y la inflamación es uno de los principales causantes de la muerte oligodendroglial en enfermedades desmielinizantes como la EM (Piaton y cols., 2009). Teniendo en cuenta que el CBD muestra propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y neuroprotectoras (Mechoulam y cols., 2007), nuestro siguiente objetivo fue el estudio de los efectos del CBD en cultivos primarios de OPCs en relación a distintos tipos de estímulos citotóxicos que se detallan a continuación.

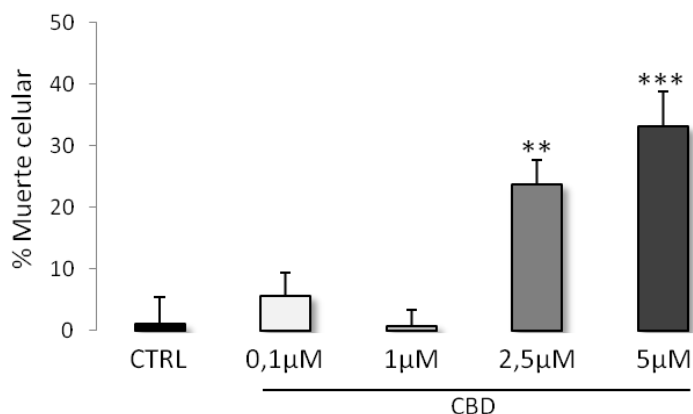
---

### 3.1- EFECTO DEL CANNABIDIOL SOBRE LA VIABILIDAD Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN SITUACIÓN BASAL.

---

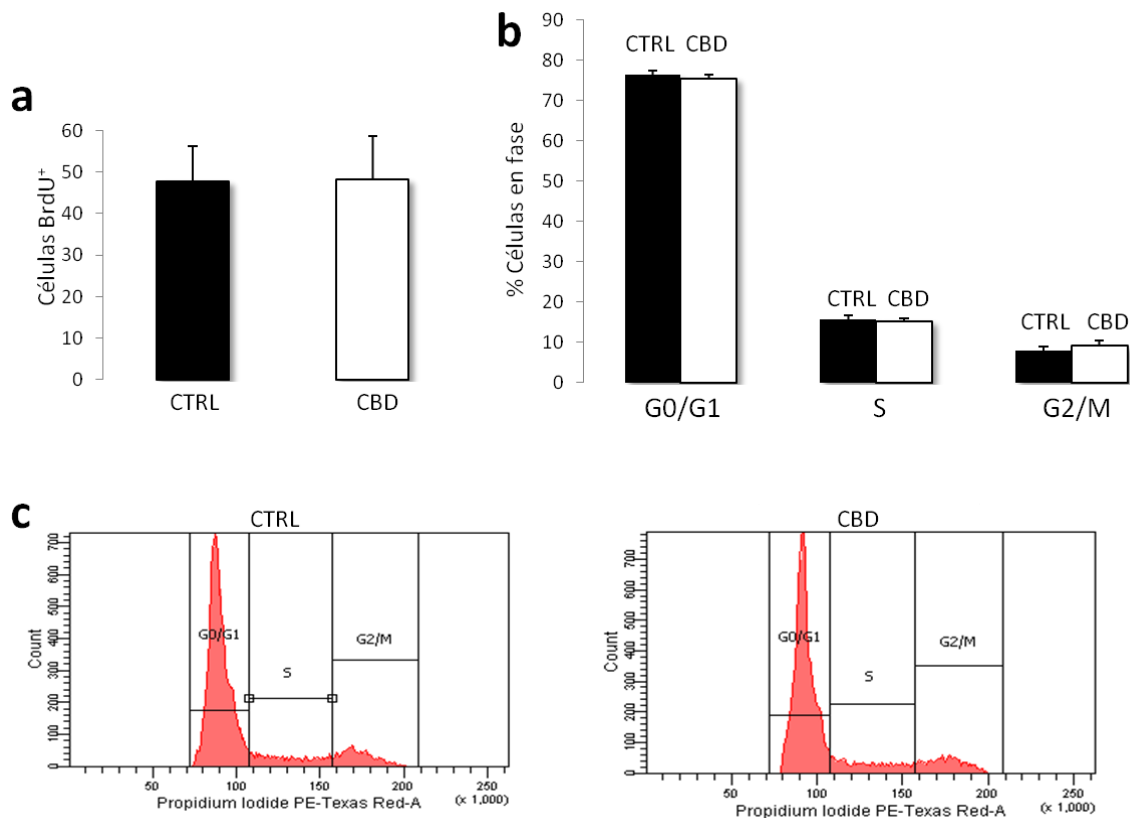
Aunque se ha visto que el CBD induce citotoxicidad por incremento de calcio en oligodendrocitos derivados de nervio óptico (Mato y cols., 2010), también previene la apoptosis en neuronas a través de la reducción del flujo de calcio al interior celular (Alvarez y cols., 2008). Teniendo en cuenta que trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que los cannabinoides sintéticos como el WIN 55212-2 y el HU211 son capaces de proteger a los OPCs de la retirada de factores tróficos (Molina-Holgado y cols., 2002b), decidimos en primer lugar valorar el resultado de la administración de este compuesto en cultivos primarios de OPCs en situación basal. Para ello, realizamos un estudio dosis-respuesta con concentraciones de CBD de 0,1; 1; 2,5 y 5  $\mu$ M, y evaluamos la muerte celular por el método de la LDH tras 24h de exposición al cannabinoide. Como se muestra en la Fig. 1, el CBD no inducía muerte de OPCs a bajas

concentraciones (0,1 y 1  $\mu\text{M}$ ), pero era citotóxico a las mayores concentraciones analizadas (2,5 y 5  $\mu\text{M}$ ). Así, puede observarse que el CBD inducía una muerte respecto al control del  $23,38 \pm 3,98\%$  ( $p \leq 0,01$ ) de las células tras la exposición a la dosis 2,5  $\mu\text{M}$ , y del  $33,13 \pm 5,6\%$  ( $p \leq 0,001$ ) a la de CBD 5  $\mu\text{M}$ . Basado en estos resultados, se decidió utilizar la dosis de 1  $\mu\text{M}$  para todos los experimentos posteriores.



**Figura 1. El CBD no es citotóxico a bajas concentraciones en OPCs.** . Los OPCs fueron expuestos al CBD durante 48 h y se cuantificó la muerte celular por la liberación al medio de la enzima LDH al medio de cultivo. Mientras que el CBD no induce muerte celular a bajas concentraciones (0,1 y 1  $\mu\text{M}$ ), se observa un efecto citotóxico a 2,5 y 5  $\mu\text{M}$ . Los datos representan las medias  $\pm$  error estándar de  $n=3$  cultivos analizados en triplicado. \*\*  $p \leq 0,01$  y \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs control (células no tratadas).

A continuación, y con el objetivo de descartar el posible efecto del CBD sobre el ciclo celular, evaluamos la proliferación de los OPCs en respuesta al CBD mediante el uso de dos aproximaciones distintas: conteo de células en fase de síntesis ( $\text{BrdU}^+$ ) mediante inmunocitoquímica, y valoración de las fases del ciclo celular mediante la técnica de citometría de flujo. La cuantificación de las células  $\text{BrdU}^+$  a las 24 h en los cultivos primarios de OPCs mediante inmunocitoquímica (Fig. 2a) reveló que el CBD no aumentaba la proliferación de los OPCs ( $47,65 \pm 8,61\%$  células proliferativas) con respecto al control ( $48,21 \pm 10,5\%$ ). Estos resultados fueron confirmados mediante la técnica de citometría de flujo (Fig 2b y 2c), donde puede observarse que no hay diferencias en las fases  $G_0/G_1$ , S y  $G_2/M$  entre el tratamiento con CBD de 24 h y el grupo control.

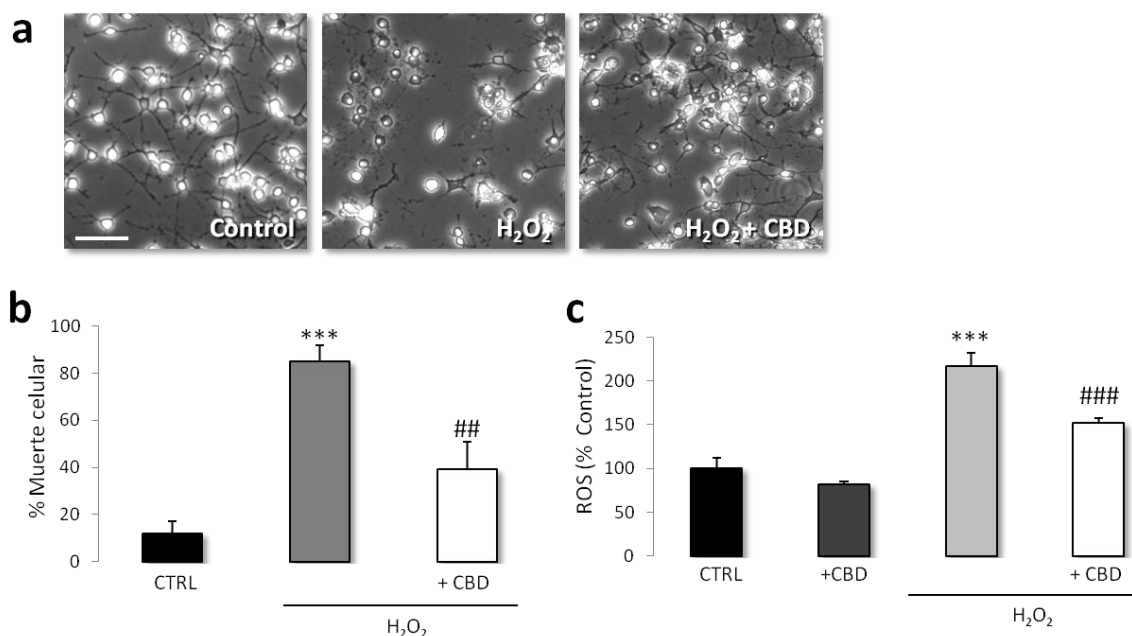


**Figura 2. El CBD no aumenta la proliferación de los OPCs según el método de BrdU y citometría de flujo.** Dicho incremento en la proliferación se habría traducido en un aumento de la incorporación de BrdU en los cultivos tratados (a) Los OPCs fueron incubados con BrdU (10  $\mu$ M) durante 24 h y al menos 10.000 células fueron cuantificadas mediante inmunocitoquímica. (b) El análisis por citometría de flujo revela que el CBD no afecta la progresión del ciclo celular en OPCs. Los progenitores recién purificados fueron incubados durante 24h en presencia o ausencia de CBD, y se analizó el ciclo celular de al menos 10.000 células en un citómetro FACS Aria tras el marcaje con yoduro de propidio. (c) Distribución de las poblaciones de OPCs según su fase del ciclo celular tanto en cultivos sin tratamiento como en grupos tratados con CBD.

### 3.2- EFECTO DEL CANNABIDIOL EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN.

Los progenitores de oligodendrocitos son altamente susceptibles al estrés oxidativo debido al retraso en la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa 1 y 2, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Back y cols., 1998; Baud y cols., 2004), y hay estudios que apuntan hacia el papel de las especies reactivas de oxígeno en desórdenes desmielinizantes como la EM (Smith y cols., 1999). Además, y puesto que el CBD es un compuesto con un anillo aromático tipo resorcinol con potentes propiedades antioxidantes (Hampson y cols., 1998), nuestro siguiente paso fue la valoración de este compuesto como antioxidante en OPCs sometidos a estrés oxidativo directo. Para ello, evaluamos su efecto sobre la muerte celular y la producción de ROS

en cultivos tratados con peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Como se muestra en la Fig. 3a, el tratamiento con peróxido de hidrógeno producía el hinchamiento y despegue de los OPCs de la placa de cultivo, mientras que cuando eran tratados conjuntamente con CBD este efecto era revertido parcialmente. Esta observación quedó plasmada en la evaluación de la muerte celular mediante la técnica de la liberación de la enzima LDH al medio de cultivo tras 18 h de exposición (Fig. 3b) a los tratamientos, donde la muerte celular disminuía desde un  $84,89 \pm 6,39\%$  en el grupo tratado con peróxido de hidrógeno hasta un  $39,12 \pm 1,82\%$  ( $p \leq 0,01$ ) en el grupo que además había sido tratado con CBD.

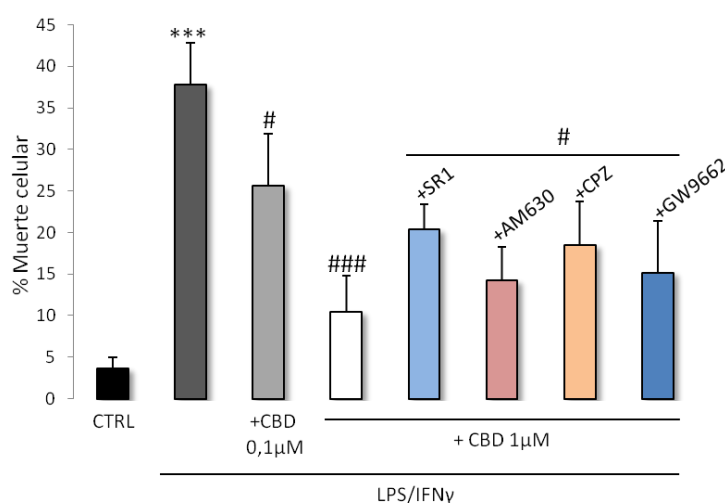


**Figura 3. El CBD protege a los OPCs del estrés oxidativo disminuyendo la producción de ERO.** Los OPCs fueron tratados con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) durante 18 h en presencia/ausencia de CBD. **(a)** Fotomicrografías representativas de microscopía de contraste de fase a 10x que muestran que el tratamiento con peróxido de hidrógeno induce el hinchamiento y despegue de los OPCs de la placa de cultivo, y que este efecto es parcialmente prevenido por el tratamiento con CBD. **(b)** Muerte celular cuantificada usando el método de liberación de la enzima LDH al medio de cultivo. Como puede observarse, el tratamiento con CBD protege frente a la citotoxicidad inducida por peróxido de hidrógeno en cultivos primarios de OPCs. **(c)** Los OPCs fueron incubados con el compuesto permeable DCF-DA durante 30 minutos y estimulados con peróxido de hidrógeno en presencia o ausencia de CBD, y a las 2h se midió la fluorescencia a 485/530nm en un lector de microplacas. El tratamiento con CBD disminuye la producción de ROS en cultivos primarios de OPCs sometidos a estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de 4 cultivos independientes analizados en triplicado. \*\*\* $p \leq 0,001$  vs control (células no tratadas), \*\* $p \leq 0,01$  y ### $p \leq 0,001$  vs células tratadas con peróxido de hidrógeno.

Además, estos efectos protectores se acompañaron de una disminución en la producción de ROS medido por el uso del compuesto fluorescente DCF-DA 1 h después de los

tratamientos (Fig. 3c), de tal manera que el CBD era capaz de disminuir los niveles de ROS de un  $216,63 \pm 15,7\%$  cuando las células se trataban con peróxido de hidrógeno, a un  $151,59 \pm 5,1\%$  ( $p \leq 0,001$ ) cuando además se cotrataban con CBD, tomando el control como 100% de producción de ROS en los cultivos.

Por otro lado, y dado que trabajos previos del laboratorio habían mostrado que el estímulo inflamatorio LPS/IFN $\gamma$  inducía toxicidad en OPCs (Molina-Holgado et al., 2001), valoramos el posible efecto protector del CBD bajo estas condiciones inflamatorias.



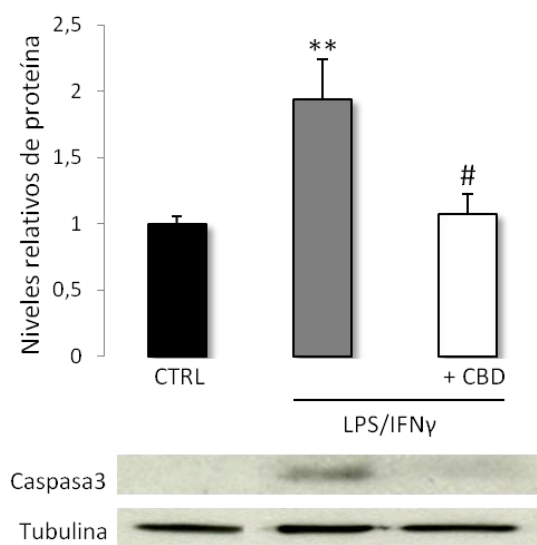
**Figura 4. El CBD protege frente al daño inflamatorio a través de un mecanismo independiente de receptor CB1, CB2 y TRPV1.** La citotoxicidad inducida por LPS/IFN $\gamma$  se atenuó con el tratamiento con CBD, y la administración de antagonistas para los receptores CB1, CB2, el receptor vanilloide TRPV1 y el receptor PPAR $\gamma$  (SR1, AM630, Capsacepina y GW9662, respectivamente) 30 minutos antes que el estímulo no tenía efecto en el porcentaje de muerte de OPCs, indicando que ninguno de estos receptores estaba implicado en los efectos oligoprotectores del CBD. La muerte celular se cuantificó 48 h después de los tratamientos usando el método de liberación de la enzima LDH al medio de cultivo. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de 3 cultivos independientes analizados en triplicado. \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs control (células no tratadas), #  $p \leq 0,05$  ###  $p \leq 0,001$  vs células tratadas con LPS/IFN $\gamma$ .

El análisis de la liberación de la enzima LDH al medio de cultivo a las 48 h (Fig. 4) mostró que el CBD era capaz de disminuir los efectos nocivos del tratamiento con LPS/IFN $\gamma$ , disminuyendo la muerte desde un  $37,84 \pm 4,95\%$  hasta un  $10,41 \pm 4,41\%$  ( $p \leq 0,001$ ). A continuación, y con el fin de identificar los posibles mecanismos subyacentes a la “oligoprotección” producida por el tratamiento con CBD, utilizamos antagonistas para los receptores CB1, CB2 y del receptor vanilloide TRPV1. Dichos antagonistas fueron aplicados media hora antes del estímulo inflamatorio LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de CBD, y ninguno de ellos revertió el efecto protector del CBD

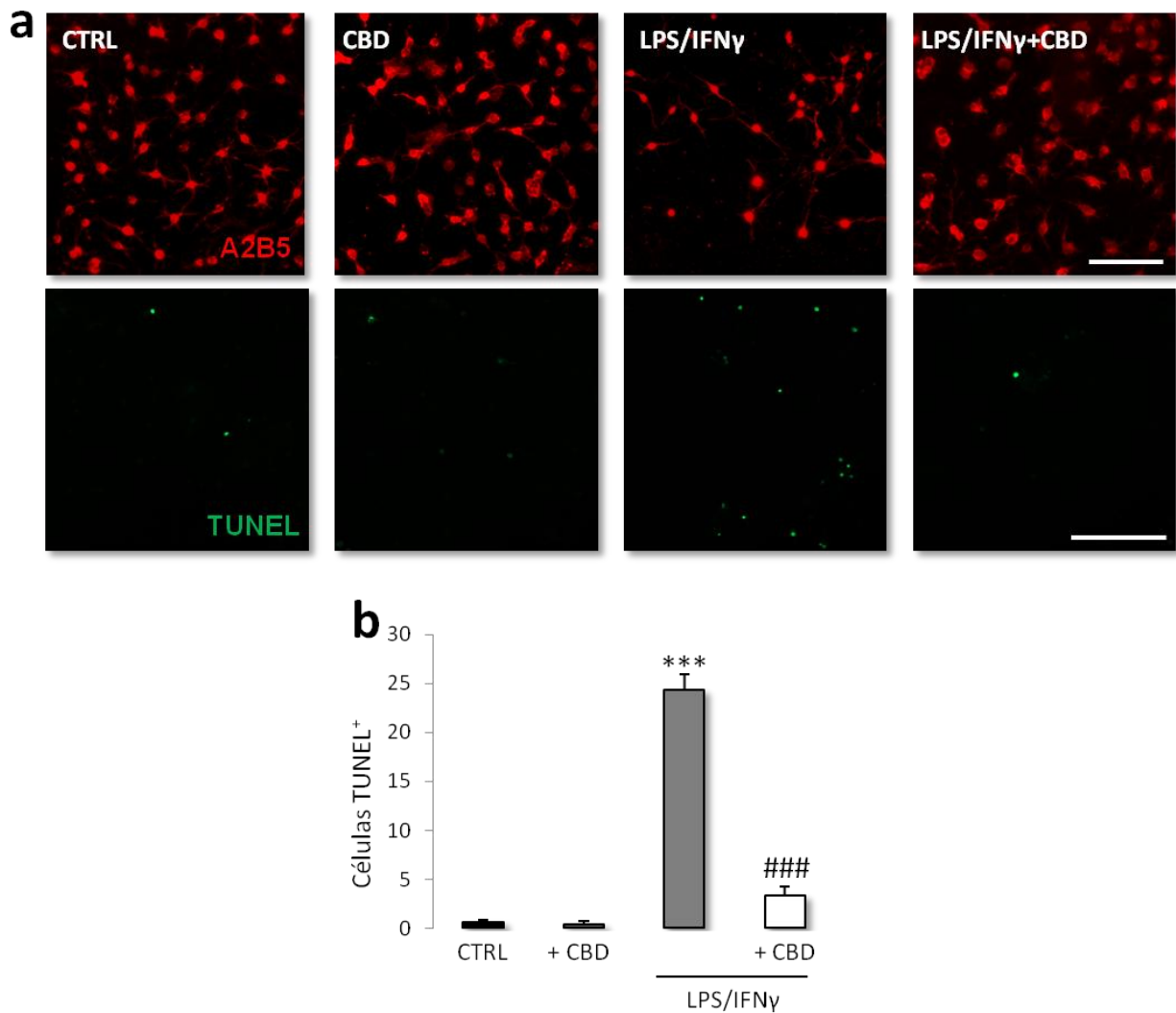
observado en condiciones inflamatorias, sugiriendo que los efectos de este cannabinoide no están mediados por ninguno de estos tres receptores.

Los resultados antiapoptóticos fueron confirmados mediante la técnica de western blot al analizar los niveles de caspasa 3 (Fig. 5), efector apoptótico que era inducido en el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  y revertido a niveles control con CBD, y mediante la técnica de TUNEL.

Al contabilizar el número de células A2B5 y TUNEL<sup>+</sup> en los cultivos de OPCs a las 24 h post-tratamiento (Fig. 6) se observó que el CBD era capaz de revertir el número de células TUNEL<sup>+</sup> de un  $24,35 \pm 1,54\%$  en el grupo tratado con LPS/IFN $\gamma$  hasta niveles control cuando en el medio estaba presente el CBD ( $3,34 \pm 0,96\%$ ,  $p \leq 0,001$ ), indicando una acción directa del CBD en la disminución de la apoptosis de los OPCs bajo condiciones inflamatorias.

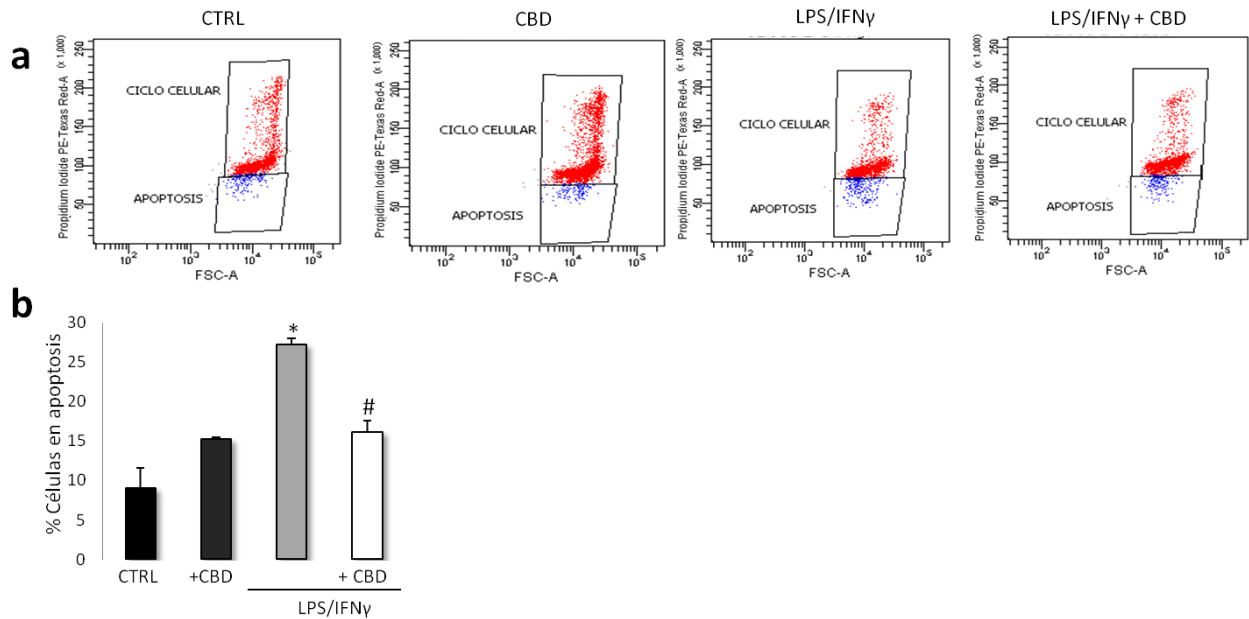


**Figura 5. El CBD atenúa el incremento en caspasa3 inducido por el estímulo inflamatorio LPS/IFN $\gamma$ .** Los OPCs fueron incubados con LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de CBD, y los extractos totales de proteína se prepararon 24 h después para valorar por western blot la cantidad de caspasa3 (17-19KDa) mediante un anticuerpo específico. Como puede observarse, el LPS/IFN $\gamma$  induce un incremento en caspasa3, y el tratamiento con CBD atenúa este efecto. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la densidad óptica normalizada con tubulina de 3 cultivos independientes analizados en triplicado. \*\* $p \leq 0,01$  vs control (células no tratadas), #  $p \leq 0,05$  vs células tratadas con LPS/IFN $\gamma$ .



**Figura 6. El CBD disminuye la apoptosis inducida por LPS/IFN $\gamma$  según la técnica de TUNEL. (a)** Marcaje mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo A2B5 (marcador de OPCs, rojo) y TUNEL (marcador de muerte celular, verde), que muestra que el LPS/IFN $\gamma$  induce un aumento del número de OPCs TUNEL<sup>+</sup>, y que este efecto es revertido por el tratamiento con CBD. **(b)** El conteo del número de células TUNEL positivas en los distintos tratamientos; el LPS/IFN $\gamma$  disminuye significativamente el número de OPCs por un aumento de células apoptóticas, y el CBD es capaz de revertir este efecto a niveles control. Para determinarlo, los OPCs fueron expuestos durante 24h al estímulo inflamatorio en presencia o ausencia de CBD, y al menos 6.000 células A2B5<sup>+</sup> fueron contadas para realizar el análisis. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p \leq 0,001$  vs control (células no tratadas), ### $p \leq 0,001$  vs células tratadas con LPS/IFN $\gamma$ .

Más aún, el efecto antiapoptótico del CBD también quedó validado al analizar mediante la técnica de citometría de flujo el porcentaje de células apoptóticas, consideradas como tal por exclusión dentro de la población total de células que no se encontraba en ciclo celular (Fig. 7), puede observarse como el CBD disminuía el número de células apoptóticas en condiciones inflamatorias desde un  $27,3 \pm 0,75\%$  hasta un  $16,1 \pm 1,5\%$  ( $p \leq 0,05$ ), siguiendo la misma línea de efecto que lo observado mediante las otras aproximaciones.

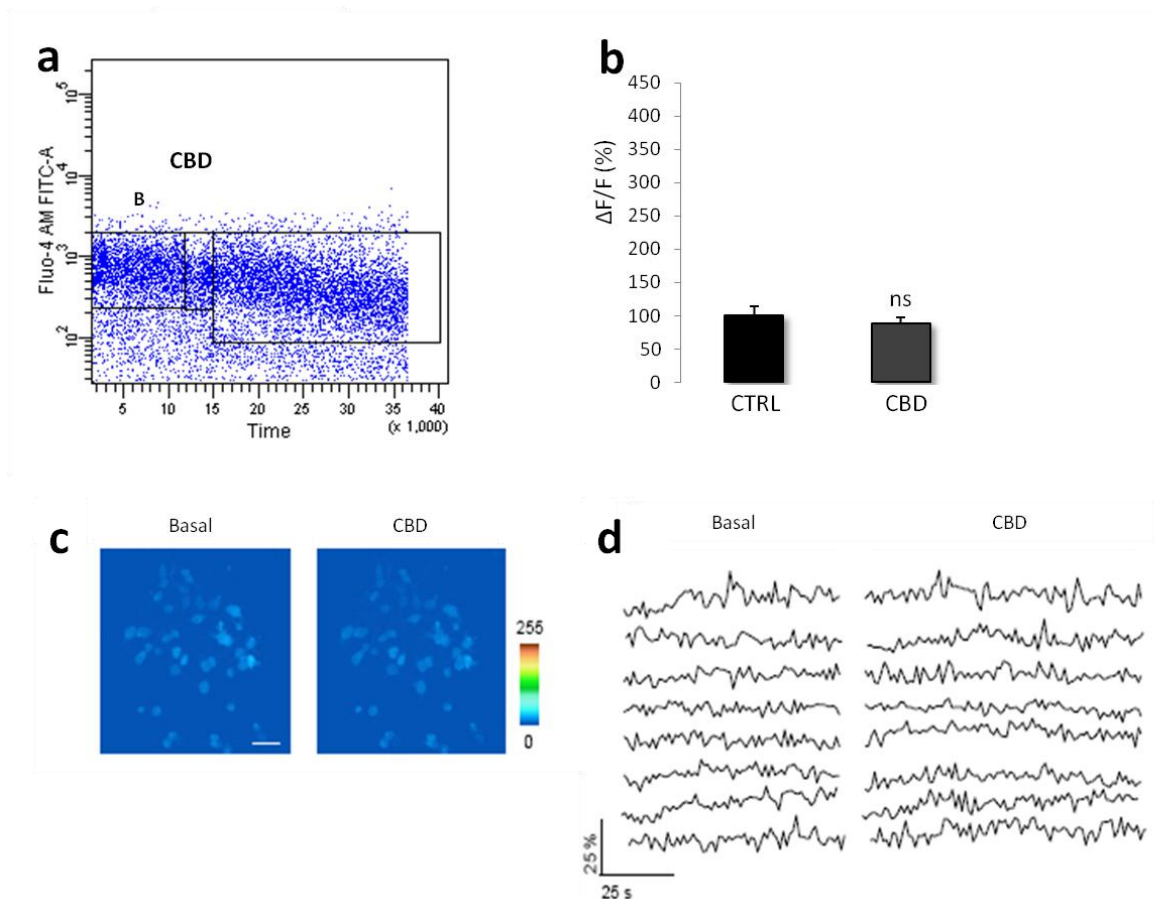


**Figura 7. El CBD disminuye las células apoptóticas medido por citometría de flujo.** (a) El porcentaje de células en apoptosis se determinó por exclusión dentro de los análisis de ciclo celular, de tal manera que se consideraron como tales (puntos azules) cuando quedaban fuera de la zona de marcaje del yoduro de propidio (puntos rojos). (b) El análisis por citometría de flujo revela que el CBD disminuye el porcentaje de células apoptóticas inducido por el estímulo citotóxico LPS/IFN $\gamma$ . Los progenitores recién purificados fueron incubados durante 24 h en la presencia o ausencia de CBD, y se analizó la apoptosis de al menos 10.000 células en un citómetro FACSARIA tras el marcaje con yoduro de propidio y por exclusión. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,05$  vs control (células no tratadas), # $p < 0,05$  vs células tratadas con LPS/IFN $\gamma$ .

### 3.3- EFECTOS DEL CANNABIDIOL EN FLUJOS DE CALCIO.

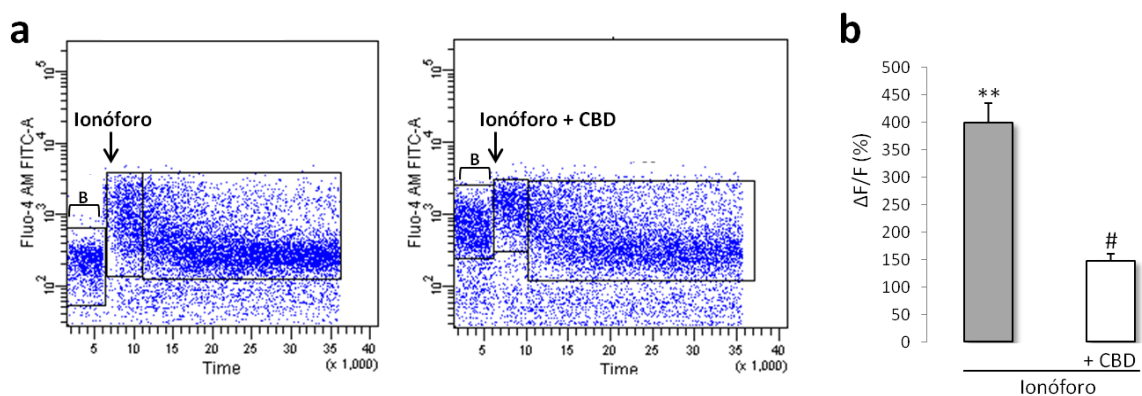
Puesto que el CBD ha sido relacionado con incrementos de  $Ca^{2+}$  intracelular a concentraciones de 0.1 y 1  $\mu$ M y con la inducción de muerte de oligodendrocitos derivados de nervio óptico (Mato y cols., 2010), nuestro último paso fue la evaluación del efecto del CBD en los flujos de  $Ca^{2+}$  en nuestros cultivos primarios de OPCs. Para ello, recurrimos a dos aproximaciones distintas como son la citometría de flujo y el análisis mediante microscopía de fluorescencia de los flujos de  $Ca^{2+}$  procedentes de depósitos intracelulares y en condiciones de ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular. En ambos casos utilizamos como fluoróforo sensible a  $Ca^{2+}$  el compuesto Fluo-4AM y monitorizamos la señal de fluorescencia en condiciones basales y de estímulo.

Al aplicar CBD 1  $\mu\text{M}$  a los OPCs pudimos observar que en situación basal los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares no eran modificados con respecto al control tanto mediante la técnica de citometría de flujo como por la de microscopía de fluorescencia (Fig. 8). Sin embargo, cuando aplicamos el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 a una concentración 50 nM y observamos la respuesta de los OPCs mediante las dos técnicas anteriormente mencionadas, observamos resultados distintos en función del método de detección.



**Figura 8. El CBD no modifica los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares en condiciones basales.** Para la técnica de citometría de flujo (**a**, **b**) los OPCs recién purificados fueron incubados durante 20 minutos con el compuesto sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4, y tras la medición de la fluorescencia basal en un citómetro FACSaria y en condiciones de ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, se aplicó el tratamiento con CBD y se registraron los cambios en la intensidad de fluorescencia. En (**a**) puede observarse cómo la intensidad de fluorescencia no cambia entre el estado basal (denominado “B” en la imagen) y el tratamiento con CBD, datos que se reflejan en el análisis en (**b**) como media  $\pm$  error estándar de los cambios en intensidad de fluorescencia 3 cultivos independientes analizados en triplicado. Para la microscopía de fluorescencia (**c**, **d**) los OPCs adheridos a cubres de cristal fueron incubados durante 20 minutos con Fluo-4, y la señal de fluorescencia se monitorizó en condiciones de ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular con un microscopio confocal en condiciones basales y tras añadir CBD (n=5 cubres). En (**c**) pueden observarse imágenes en pseudocolor representativas que muestran los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en cultivos de OPCs bajo condiciones basales y tras el tratamiento con CBD. En (**d**), las trazas fluorescentes muestran el curso temporal del  $\text{Ca}^{2+}$  en OPCs individuales (n=8) del experimento mostrado en (**c**), tanto en condiciones basales como en presencia de CBD.

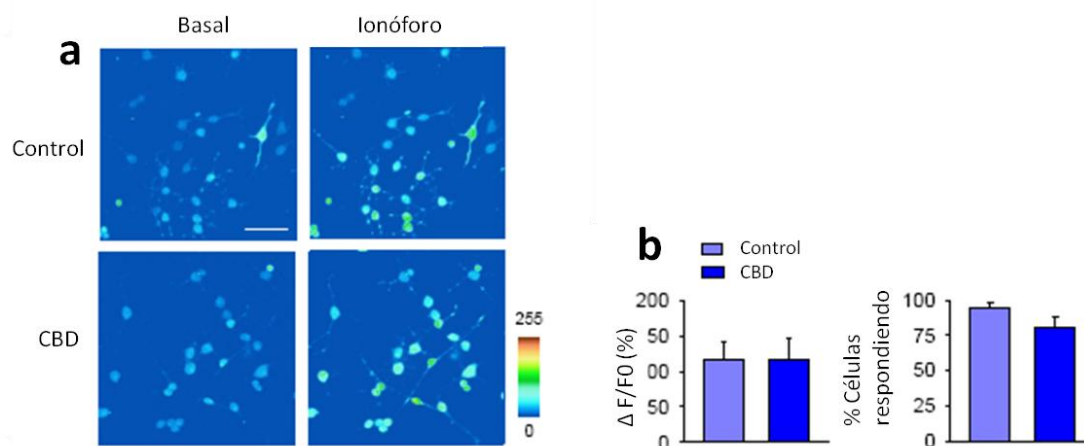
De esta manera, y aunque con las dos técnicas la aplicación del ionóforo inducía un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular muy significativo, la respuesta al cotratamiento con CBD fue distinta en función de si los OPCs eran analizados mediante citometría de flujo o adheridos a un soporte físico. Como puede observarse, al medir el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante la técnica de citometría de flujo (Fig 9) pudo observarse que el CBD era capaz de tamponar la respuesta de los OPCs al ionóforo, evocando un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular similar al nivel control ( $p \leq 0,05$  vs Ionóforo). Sin embargo, al seguir un protocolo de actuación similar pero con OPCs adheridos a un cubre de cristal tratado con polilisina (Fig 10), pudo observarse que la señal de esta modulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ante el ionóforo no se producía con el tratamiento con CBD, ya que no había diferencias entre tratamientos tanto en la amplitud media como el número de células que respondían.



**Figura 9. El CBD disminuye los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares en OPCs tratados con un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando el análisis se realiza con citometría de flujo.** Para la citometría de flujo, los OPCs recién purificados fueron incubados durante 20 minutos con el compuesto sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4, y tras la medición de la fluorescencia basal en un citómetro FACS Aria y en condiciones de ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, se aplicó el tratamiento con A23187 50 nM en ausencia o presencia de CBD y se registraron los cambios en la intensidad de fluorescencia. En (a) puede observarse cómo la intensidad de fluorescencia aumentó tras el tratamiento con A23187 (respecto al nivel basal, “B” en la imagen), y cómo el cotratamiento con CBD indujo un menor incremento de fluorescencia respecto al nivel basal. El análisis se refleja en (b) como la media  $\pm$  error estándar de los cambios en la amplitud media del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\Delta F/F_0$ ) de 3 cultivos independientes analizados en triplicado,  $**p \leq 0,01$  vs control (células no tratadas),  $\#p \leq 0,05$  vs células tratadas con LPS/IFN $\gamma$ .

Es posible que estas diferencias se deban a la metodología de administración del estímulo: puede que la utilización de los “puffs” para aplicar el ionóforo en el caso de la técnica de microscopía de fluorescencia lleven a la aplicación de una concentración de ionóforo mucho mayor a la esperada (la concentración utilizada de A23187 era de 1  $\mu\text{M}$  aplicada durante 0,5-2 s a 20 psi mediante una pipeta local calculando que la

concentración final sería 50 nM, frente a la concentración final de 50 nM homogéneamente distribuida en la técnica de citometría de flujo). Bajo estas circunstancias, el estímulo sería demasiado fuerte como para que el CBD pudiese tamponar la respuesta, dando como resultado unos niveles de calcio intracelulares elevados que podrían explicar la diferencia de efecto observada según la técnica utilizada.

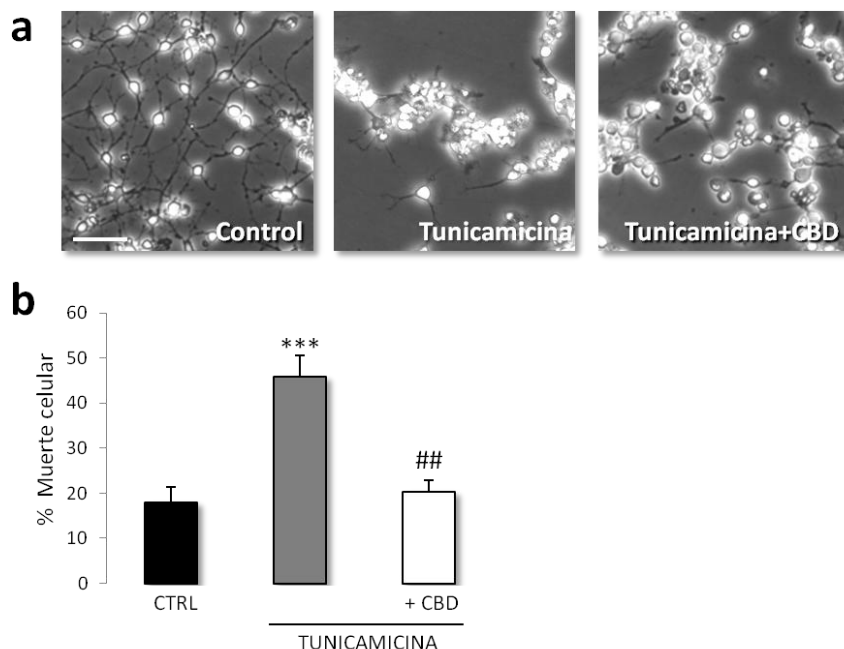


**Figura 10. El CBD no disminuye los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelulares en OPCs tratados con un ionóforo de  $Ca^{2+}$  cuando el análisis se realiza con microscopía confocal.** Para la microscopía confocal de fluorescencia, los OPCs pegados a cubres de cristal fueron incubados durante 20 minutos con Fluo-4, y la señal de fluorescencia se monitorizó tras la aplicación de un puff de A28173 en presencia o ausencia de CBD y en condiciones de ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular. En (a) pueden observarse imágenes en pseudocolor representativas que muestran los niveles de  $Ca^{2+}$  en cultivos de OPCs tras la aplicación de un puff de ionomicina (1  $\mu$ M, 2s, 20psi) en la ausencia (imagen de la izquierda) o presencia (imagen de la derecha) de CBD. En (b) puede observarse la amplitud media del incremento de  $Ca^{2+}$  y el porcentaje medio de células que responden al puff de ionomicina (1  $\mu$ M, 2 s, 20 psi, n=9 cubres) en ausencia (302 células registradas) o presencia (439 células registradas) de CBD. Barra de escala: 50 $\mu$ m.

### 3.4- EFECTO DEL CANNABIDIOL EN CONDICIONES DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.

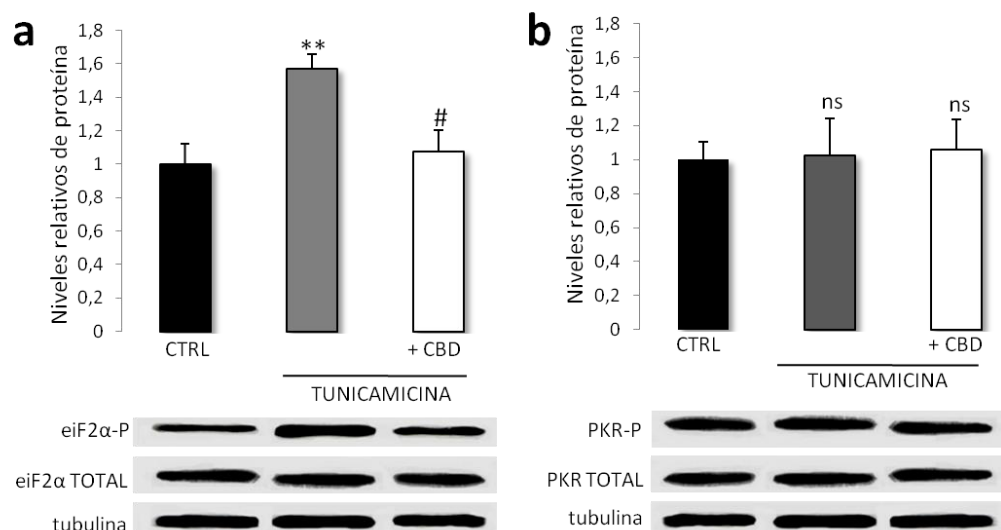
Ya que el estrés de RE ha sido implicado en varias enfermedades con componente inflamatorio como la EM (Mhaille y cols., 2008), nuestro siguiente objetivo se centró en el estudio de la respuesta de los OPCs tras a la activación de este programa celular. Para ello, utilizamos como agente estresante el fármaco tunicamicina, que bloquea la glicosilación de las proteínas provocando un mal plegamiento y acumulación de las mismas dentro del RE, y observamos que el tratamiento durante 24 h con tunicamicina (1  $\mu$ g/ml) inducía la muerte de los OPCs según el método de liberación de la enzima LDH al medio de cultivo (Fig. 11). Dicha muerte ( $45,81 \pm 4,7\%$ ) era atenuada por el

tratamiento con CBD ( $20,39 \pm 2,54\%$ ,  $p \leq 0,01$ ), sugiriendo que CBD podía estar interfiriendo con el ERE inducido por el mal plegamiento de proteínas en los cultivos de OPCs.



**Figura 11. El CBD protege frente al estrés de RE.** La citotoxicidad inducida por tunicamicina (1  $\mu\text{g/ml}$ ) es atenuada con el tratamiento con CBD. **(a)** Fotomicrografías representativas a 10x que muestran que el tratamiento con tunicamicina (1  $\mu\text{g/ml}$ ) induce el despegue de los OPCs de la placa de cultivo, y que este efecto es parcialmente prevenido por el tratamiento con CBD. **(b)** La muerte celular se cuantificó 24 h después de los tratamientos usando el método de liberación de la enzima LDH al medio de cultivo. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de 3 cultivos independientes analizados en triplicado. \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs control (células no tratadas), ##  $p \leq 0,01$  vs células tratadas con tunicamicina.

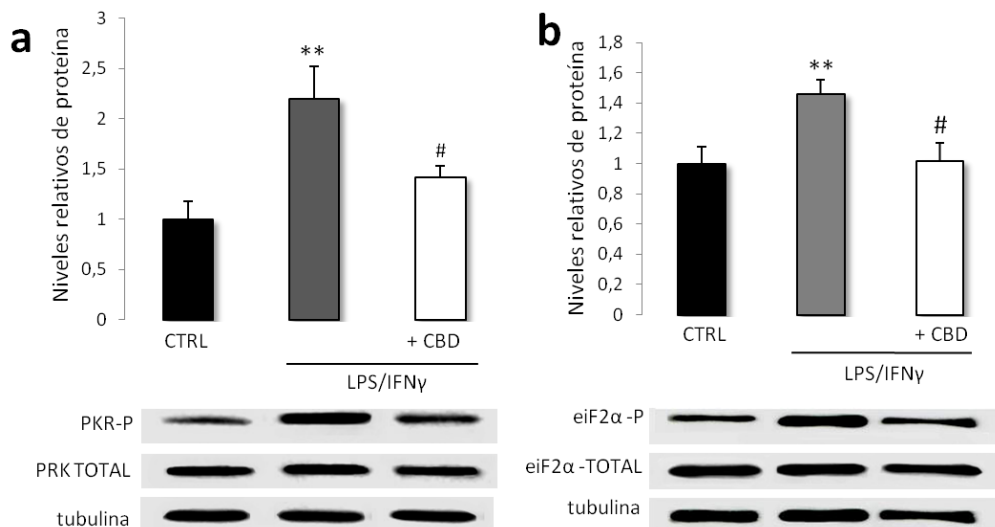
Al estudiar la activación de uno de los iniciadores de la ruta de estrés de RE como es el factor iniciador de la transcripción  $eIF2\alpha$ , cuya fosforilación desencadena el inicio de la ruta apoptótica, observamos mediante la técnica de western blot que el tratamiento durante cinco minutos con tunicamicina (1  $\mu\text{g/ml}$ ) inducía la rápida fosforilación de  $eIF2\alpha$  (Fig. 12a), y que al cotreatar los OPCs con CBD, éste era capaz de disminuir dicha fosforilación a niveles control ( $p \leq 0,05$ ). También mediante la técnica de western blot analizamos la posible fosforilación de la proteína PKR (Fig. 12b), uno de los activadores de  $eIF2\alpha$ , y pudimos concluir que el tratamiento con tunicamicina no inducía la fosforilación de PKR y la muerte inducida por estrés de RE únicamente estaba producida por la activación de  $eIF2\alpha$ .



**Figura 12. El CBD disminuye la fosforilación de eIF2 $\alpha$  inducida por tunicamicina, y la tunicamicina no induce fosforilación de PKR.** Los OPCs fueron incubados con LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de CBD, y los extractos totales de proteína se prepararon 5 minutos después para valorar por western blot (a) la cantidad de eIF2 $\alpha$  (fosforilada, 38 KDa; total, 38 KDa) y (b) la cantidad de PKR (fosforilada, 68 KDa; total, 68 KDa) mediante anticuerpos específicos. Como puede observarse, el LPS/IFN $\gamma$  induce un incremento en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  pero no de PKR, y el tratamiento con CBD revierte la fosforilación de eIF2 $\alpha$  a niveles control. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la densidad óptica normalizada con tubulina de 5 cultivos independientes analizados en triplicado. \*\* $p \leq 0,01$  vs control (células no tratadas), # $p \leq 0,05$  vs células tratadas con LPS/IFN $\gamma$ .

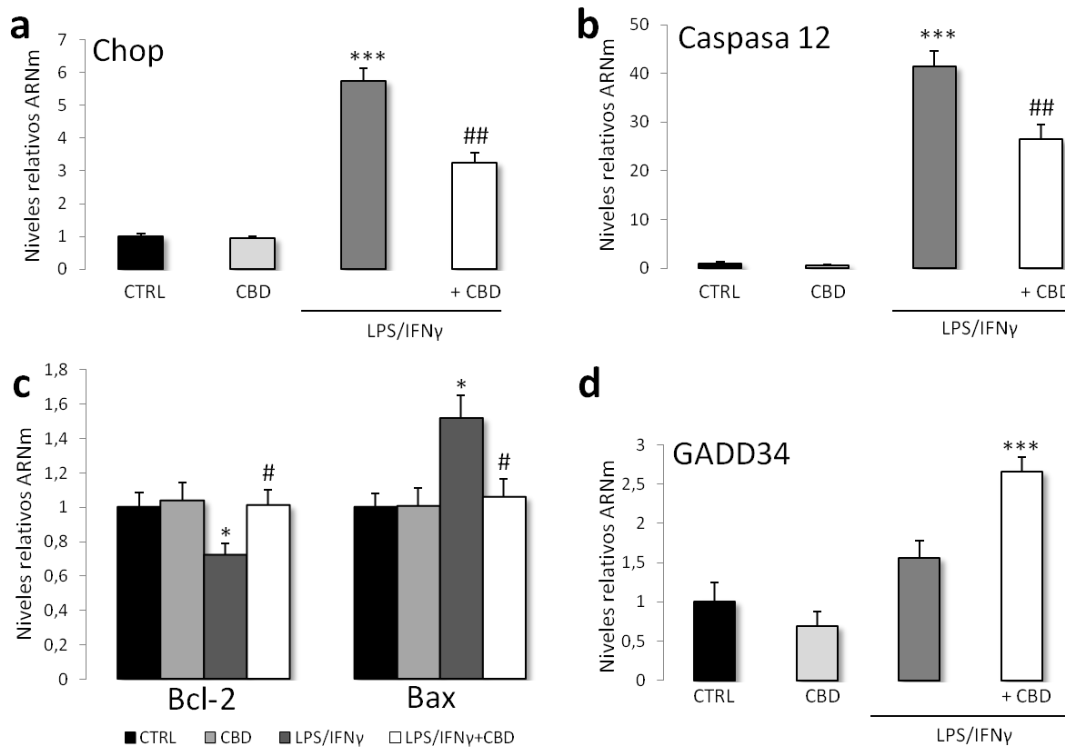
Dada la relación que se ha encontrado entre los mecanismos que subyacen a la inflamación y el estrés de RE (Zhang y Kaufman, 2008), a continuación estudiamos la respuesta de estrés de RE inducido por LPS/IFN $\gamma$  en nuestros cultivos primarios de OPCs. Al examinar por la técnica de western blot el efecto del tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  en la fosforilación de PKR y eIF2 $\alpha$  a los 5 mins de aplicación, pudimos constatar que este estímulo inflamatorio inducía en OPCs la fosforilación de ambas proteínas (Fig. 13) y, lo que era más interesante, que el tratamiento conjunto con CBD reducía dicha fosforilación a niveles control ( $p \leq 0,05$ ), sugiriendo que uno de los efectos protectores del CBD en OPCs implica la reducción del estrés de RE en situación de inflamación.

Con el fin de confirmar los efectos del CBD en el combate del estrés de RE asociado a la inflamación, nuestro siguiente objetivo fue el análisis por la técnica de RT-PCR en tiempo real de los mediadores de la ruta apoptótica del ERE 24h post-tratamiento. Como puede observarse, el tratamiento con CBD interfería la inducción de la expresión génica por inflamación del factor iniciador CHOP, uno de los principales marcadores de estrés de RE (Fig. 14a,  $p \leq 0.01$ ), así como de su efector caspasa 12 (Fig. 14b,  $p \leq 0.01$ ).



**Figura 13. El CBD disminuye la fosforilación de PKR y eIF2 $\alpha$  en condiciones de inflamación.** Los OPCs fueron incubados con LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de CBD, y los extractos totales de proteína se prepararon 5 minutos después para valorar por western blot **(a)** la cantidad de PKR (fosforilada, 68 KDa; total, 68 KDa) y **(b)** la cantidad de eIF2 $\alpha$  (fosforilada, 38 KDa; total, 38 KDa) mediante anticuerpos específicos. Como puede observarse, el LPS/IFN $\gamma$  induce un incremento en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y de PKR, y el tratamiento con CBD revierte estos efectos a niveles control. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la densidad óptica normalizada con tubulina de 5 cultivos independientes analizados en triplicado. \*\* $p \leq 0,01$  versus control (células no tratadas), # $p \leq 0,05$  vs células tratadas con LPS/IFN $\gamma$ .

Además el balance entre proteínas pro-apoptóticas (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-2) que se encontraba desregulado en el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  retornó a la situación basal en presencia de CBD (Fig. 14c,  $p \leq 0.05$ ). Por otro lado, la expresión de GADD34 (uno de los reguladores negativos de la ruta del estrés de RE) aumentó cuando los OPCs sometidos al daño inflamatorio eran cotratados con CBD (Fig. 14d), sugiriendo que este cannabinoide reprimía el programa apoptótico activado con el estrés de RE en cultivos primarios de OPCs.



**Figura 14. La inflamación activa la vía apoptótica del estrés de RE en OPCs, y este efecto es atenuado por el tratamiento con CBD.** El CBD atenúa el aumento inducido por LPS/IFN $\gamma$  en la expresión de CHOP (a), así como la regulación a la alta del efector caspasa 12 (b). Además, este cannabinoide restaura el balance Bcl-2/Bax en OPCs tratados con el estímulo inflamatorio (c), y aumenta la expresión del regulador negativo GADD34 (d). En todos los casos, los OPCs fueron incubados con LPS/IFN $\gamma$  en la presencia o ausencia de CBD, y la expresión de ARNm de cada gen se midió 24h después por RT-PCR a tiempo real normalizado con la expresión del gen 18S. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de 3 cultivos independientes analizados en triplicado. \*\* $p \leq 0,01$  y \*\*\* $p \leq 0,001$  vs control (células no tratadas), # $p \leq 0,05$  y ## $p \leq 0,01$  vs células tratadas con LPS/IFN $\gamma$ .

## DISCUSIÓN

---

En el presente trabajo se ha intentado profundizar en distintas aproximaciones relativas a la patogénesis del modelo de TMEV-IDD, así como en los efectos y posibles mecanismos de acción tanto *in vivo* como *in vitro* del fitocannabinoide CBD. Entre las contribuciones más importantes derivadas del estudio aquí expuesto, se encuentra el estudio de la histopatología a nivel cerebral en animales infectados con el virus de Theiler a distintos tiempos, completando así los datos existentes en cuanto al desarrollo de la enfermedad a nivel de la médula espinal. A modo de resumen, los hallazgos más significativos indican que en el cerebro de los animales infectados existe un intento de remielinización que se debe, en parte, a un incremento de la proliferación celular en la zona subventricular, a una migración de progenitores a zonas de daño como el cuerpo calloso, y a una diferenciación a oligodendrocitos maduros. En el estudio sobre el efecto *in vivo* del CBD en animales TMEV-IDD, se ha visto que su aplicación en fase crónica o aguda no sólo mejora la sintomatología clínica, sino que produce una disminución en las citoquinas proinflamatorias y en la reactividad microglial, apuntando hacia un mecanismo inmunomodulador de este compuesto. Por último, el CBD protege *in vitro* a células progenitoras de oligodendrocito del daño inflamatorio, oxidativo y del estrés de retículo a través de mecanismos que implican una disminución en la salida de calcio de depósitos intracelulares, una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno y una disminución en el estrés de retículo. A continuación, se pasará a desarrollar cada uno de estos puntos en detalle.

**El modelo de TMEV reproduce a nivel cerebral la inflamación, neurodegeneración, desmielinización y remielinización presentes en EM.**

Entre las características neuropatológicas de la EM que conllevan la aparición de placas escleróticas en tronco cerebral, cerebelo o médula espinal entre otras zonas, hay tres factores clave que explican parte de la sintomatología de la enfermedad, y que serían: a) la inflamación, que conllevaría la migración de linfocitos autorreactivos a través de la BHE, la amplificación de la respuesta a nivel de parénquima cerebral y la inducción de respuestas autoinmunes contra componentes de mielina; b) la neurodegeneración, que en algunos pacientes puede variar entre el 20 y 90%; c) la desmielinización, que implicaría tanto daño oligodendroglial como pérdida de la mielina que recubre los axones.

En este sentido, el modelo de TMEV-IDD representa uno de los mejores modelos experimentales de etiología viral para el estudio de la EM de tipo primaria progresiva o secundaria, ya que presenta similitudes neuropatológicas con la enfermedad humana en cuanto a la presencia de infiltrados inflamatorios, daño axonal y desmielinización (Dal Canto, 1975; Lipton, 1975; Rodriguez y cols., 1997; Begolka y cols., 1998; Tsunoda, 2008). Sin embargo, la mayoría de los estudios que se han realizado hasta el momento se han centrado en el análisis de los procesos patológicos que suceden a nivel de médula espinal, ya que de manera clásica se ha asociado la disfunción neurológica observada tanto en EAE como en TMEV (McGavern y cols., 1999; Tsuona y Fujinami, 2002), con la inflamación, la destrucción de la mielina y la pérdida axonal que se produce a nivel de sustancia blanca espinal (Ure y Rodriguez, 2002). Así, se ha descrito que los ratones susceptibles infectados con el virus de TMEV desarrollan una desmielinización inflamatoria en médula espinal que comienza a las 3 semanas post-infección, y persiste a lo largo de la vida del animal acompañada de daño axonal, remielinización mínima y la acumulación progresiva de déficits neurológicos. Sin embargo, los estudios en los modelos experimentales sólo explican parcialmente la patología observada en pacientes de EM, en los que se ha visto que varias áreas cerebrales están afectadas con inflamación global, desmielinización cortical y daño axonal difuso (Kutzelnigg y cols., 2005). Hay trabajos recientes que llaman la atención sobre la patología a nivel encefálico en el modelo de TMEV (Denic y cols., 2012; Scarisbrick y cols., 2012), pero dichos trabajos carecen de un estudio pormenorizado del desarrollo de la inflamación, desmielinización y daño axonal a lo largo de los distintos tiempos de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en el presente estudio en dos áreas cerebrales directamente relacionadas con la sintomatología motora, como son el tronco cerebral y la corteza motora, ayudan a completar los datos existentes acerca de la patología, tanto del modelo de TMEV como de su posible relación con los distintos eventos que suceden en la propia EM. En ambas estructuras hemos observado que, en etapas agudas de la infección, existe un incremento en la activación microglial que podría relacionarse con la respuesta del sistema inmune a la infección vírica (Oleszak y cols., 2004). Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que puede observarse microglía reactiva a nivel encefálico, desde la corteza prefrontal hasta el hipocampo en etapas tempranas post-infección, abarcando así zonas más amplias que exclusivamente el sitio de inyección del virus (Mestre y cols., 2011). Sin embargo, el incremento de la reactividad microglial en fase aguda que hemos observado a un nivel tan alejado de la inoculación del virus como es el tronco cerebral, apunta hacia una respuesta generalizada del sistema inmune residente dentro del SNC, de tal manera que la microglía podría estar ejerciendo, entre otras, sus funciones fagocíticas y como célula presentadora de antígeno en zonas alejadas del foco de infección como parte de la respuesta inmune innata. Así, se ha descrito que las células inmunes residentes en el SNC, es decir, las células de microglía, se activan en estadios tempranos en respuesta al daño y la infección (Olson y cols., 2001; Jin y cols., 2007).

Nuestros datos apuntan hacia la existencia de inflamación en fase aguda a nivel encefálico, valorada como tal por un incremento en la reactividad microglial, que se correlaciona temporalmente con un aumento en el daño axonal. De esta manera, y aunque en etapas tempranas todavía puede observarse tanto preservación axónica como mielínica a nivel de tronco encefálico y corteza motora, en etapas preclínicas se hace evidente que la infección viral, la inflamación y el daño axonal temprano han provocado lesiones evidentes con pérdida de neurofilamento y desmielinización en ambas zonas, confirmando así la correlación vista en médula espinal en otros trabajos (Dal Canto, 1975; Lehrich y cols., 1976; Bjartmar y Trapp, 2003; Sato, 2010).

Aunque se piensa que el daño axonal observado tanto en EM como en la EAE se produce de manera secundaria a la desmielinización inflamatoria (modelo *outside-in*), estudios con el virus de TMEV parecen mostrar que, en el modelo de TMEV-IDD, el daño axonal precede a la desmielinización (modelo *inside-out*) (Tsunoda, 2008). En este sentido, nuestros resultados sugieren que la desmielinización y la degeneración axonal

se estarían produciendo de manera más o menos simultánea en el modelo de TMEV, lo cual indicaría que los modelos *inside-out* y *outside-in* descritos por Tsunoda y Fujinami (Tsunoda y Fujinami, 2002) se están produciendo paralelamente en el SNC. Esta patología inicial puede explicarse parcialmente por la infección viral, ya que aunque en las primeras fases existan antígenos virales en neuronas, astrocitos y sobre todo macrófagos, es raro encontrarlos en oligodendrocitos (Dal Canto y cols., 1996). Por tanto, y aunque la muerte de los oligodendrocitos y el daño axonal en etapas tempranas puede deberse sólo en parte a la infección directa (Sato, 2010), la microglía residente y la respuesta inmune innata también estaría jugando un papel importante a través del contacto célula-célula y de la liberación de mediadores citotóxicos actuando sobre todo a nivel de las células oligodendrogliales y la mielina (Molina-Holgado y cols., 2002a). De hecho, según estudios patológicos las primeras lesiones en médula espinal presentan infiltrados inflamatorios en las meninges y en espacios perivasculares de la sustancia blanca, que invaden el parénquima nervioso y poco tiempo después aparecen los primeros signos de desmielinización. De esta manera, la desmielinización se correlacionaría tanto temporal como anatómicamente con la presencia de células inflamatorias (Dal Canto y cols., 1996).

Si bien según nuestro análisis el daño axonal que se produce en fases agudas parece producir una pérdida de neurofilamento acumulativa tanto en tronco cerebral como en corteza a lo largo de la evolución de la enfermedad, la pérdida de mielina y de OPCs en ambas zonas sigue un patrón distinto y se caracteriza por una desmielinización en la fase preclínica, y una afectación de progenitores en la fase aguda y preclínica temprana. Lo que es más importante, dicha desmielinización inicial sería seguida por un intento de remielinización que alcanza niveles control en la fase preclínica tardía, y que podría explicarse por el incremento en el número de OPCs que se han diferenciado hacia oligodendrocitos maduros, según los resultados con los marcadores Olig2 y Nkx2.2 que están asociados con la diferenciación de los OPCs (Fancy y cols., 2004). De esta manera, en la fase preclínica temprana se estaría produciendo una afectación tanto de oligodendrocitos maduros (reflejada como una pérdida en marcadores de mielina como CNPasa o RIP), así como de como de OPCs (según sugiere la disminución en la expresión de los genes asociados a su diferenciación como son Olig2 y Nkx2.2, que se inicia en la fase aguda). Es interesante destacar que el intento de remielinización espontánea observada en la fase preclínica tardía podría explicarse por el incremento del

número de OPCs que se diferencia a oligodendrocitos maduros, y que serían capaces de repoblar zonas desmielinizadas como ya se ha descrito tanto en EM (Perier y Gregoire, 1965) como en sus modelos animales (Bunge y cols., 1961; Prineas y cols., 1969). Sin embargo, nuestros resultados apuntan a que el intento de remielinización no se consolida probablemente como consecuencia de la alta afectación axonal y así, la desmielinización vuelve a ser evidente tanto en tronco cerebral como en corteza motora en la fase crónica de la enfermedad.

Respecto al daño axonal, resaltar que se está produciendo en etapas agudas de la infección vírica con una pérdida considerable de neurofilamento a partir de la etapa preclínica temprana, y teniendo en cuenta las etapas de desmielinización – remielinización - desmielinización que se han observado en este trabajo, se sugiere la existencia de un mecanismo patogénico bifásico que podría explicarse en la fase aguda por la infección vírica y la consecuente inflamación, y en la fase crónica por la aparición de las respuestas autoinmunes de ataque a la propia mielina. Dicha respuesta autoinmune ha sido descrita en el modelo de TMEV-IDD en trabajos pioneros del grupo de Miller a medida que la presencia viral persiste (Miller y cols., 1997), como consecuencia de los fenómenos de expansión de epítomos y del mimetismo molecular (Croxford y cols., 2005; McMahon y cols., 2005; Olson y cols., 2005). Precisamente, se ha descrito que en la etapa crónica temprana de la infección con el virus de TMEV se generan anticuerpos autorreactivos contra la región antigénica 139-151 de la proteína lipídica PLP (PLP<sub>139-151</sub>), respuesta que se extiende a otras regiones antigénicas tanto de la misma proteína (anticuerpos anti-PLP<sub>178-191</sub> y anti-PLP<sub>58-70</sub>) como de otras (anticuerpos anti-MOG<sub>92-106</sub>, anti-MBP<sub>84-104</sub>) en la etapa crónica tardía (Croxford y cols., 2006; McMahon y cols., 2005). Además, trabajos previos en nuestro laboratorio han mostrado que en la etapa crónica existe un incremento en la síntesis de las citoquinas proinflamatorias IL-12 e IL-23, que concordaría con nuestros resultados de incremento de la reactividad microglial en esta etapa de la enfermedad (Correa y cols., 2011) junto con un incremento de la respuesta DTH a PLP<sub>139-151</sub> (Arévalo-Martín y cols., 2012).

En resumen, entre los hallazgos más importantes de este trabajo se encontrarían: (1) en tronco cerebral y corteza motora se reproducen los procesos de inflamación, neurodegeneración y desmielinización que se habían observado anteriormente en médula espinal en el modelo de TMEV-IDD, ampliando así los datos existentes sobre la

progresión de la enfermedad a nivel encefálico; (2) el daño axonal y la desmielinización se están produciendo de manera simultánea en el modelo de TMEV-IDD; (3) en fases preclínicas los OPCs se diferencian hacia oligodendrocitos maduros, lo que explicaría el intento de remielinización observado en tronco cerebral y corteza motora en la etapa preclínica tardía, si bien dicha remielinización es pasajera ya que se acaba perdiendo en fases más avanzadas de la enfermedad.

**En el modelo de TMEV existe un incremento en proliferación en la ZSV, que se traduce en una migración y repoblación de oligodendrocitos hacia zonas lesionadas.**

La remielinización es un fenómeno de reparación espontánea según el cual se generan nuevas vainas de mielina alrededor de los axones en el SNC, axones que se encuentran desprotegidos como consecuencia de la desmielinización patológica que se produce en enfermedades como la EM. Este fenómeno supone una excepción al principio de la neurociencia que afirma que el SNC adulto tiene una escasa capacidad intrínseca de reparación tras el trauma, paradigma que se resume en la siguiente cita “*En el cerebro adulto, las vías nerviosas son fijas e inmutables; todo puede morir, nada puede regenerarse.*” (Santiago Ramón y Cajal). Se ha demostrado que, aunque la remielinización existe y se da en muchos tipos de enfermedades desmielinizantes, generalmente es incompleta o inadecuada y falla en la mayoría de las lesiones del SNC. Todos los esfuerzos centrados en comprender las causas de este fallo de reparación de la mielina han llevado al estudio de la biología de la remielinización y a los factores celulares y moleculares que regulan este proceso, que ocurre en dos fases principales: colonización de las lesiones por OPCs, y diferenciación de los OPCs a oligodendrocitos mielinizantes que contacten los axones desmielinizados para generar vainas de mielina funcionales (Chari, 2007).

La ZSV es una de las zonas germinativas más grandes del cerebro adulto y ha despertado gran interés por su capacidad de promover la reparación del SNC dañado, debido a la presencia de células madre multipotenciales que son capaces de auto-renovarse, de migrar largas distancias y de diferenciarse haciaa los tres tipos mayoritarios del SNC como son neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Aunque la proliferación y movilización de precursores neurales se ha estudiado ampliamente en modelos animales de isquemia, trauma o daño selectivo de neuronas estriatales (Picard-Riera y cols., 2004), la generación y movilización de oligodendrocitos en respuesta a reparación de mielina ha sido menos abordada. Nuestros resultados amplían los datos existentes sobre el comportamiento de la ZSV en enfermedades desmielinizantes y muestran que, en el modelo de TMEV, también existe una activación de las células madre de este nicho de tal manera que hay un incremento de células tipo B GFAP<sup>+</sup> en la fase preclínica temprana, fase que como ya hemos descrito anteriormente se caracteriza

por afectación axonal y desmielinización en SNC. Además, el marcaje con BrdU de las células proliferativas en la ZSV a 35 días post-infección (fase preclínica temprana) corrobora esta observación, de tal manera que en este nicho germinativo se estaría produciendo un incremento en la proliferación de las células madre multipotentes en respuesta al daño neuronal y oligodendroglial. Estos resultados estarían en la línea de los obtenidos en EAE, donde se ha visto que existe un incremento en el número de células proliferantes en ZSV como consecuencia de la inflamación desmielinizante que caracteriza al modelo (Picard-Riera y cols., 2002).

Si bien los estudios clásicos de remielinización han considerado a las células que expresan el condroitin sulfato proteoglicano NG2 como OPCs que persisten en el SNC adulto para generar oligodendrocitos maduros, hay una nueva corriente de pensamiento que apunta a que dichas células NG2<sup>+</sup> son un nuevo tipo de glía denominada “sinantocitos” o “polidendrocitos” (Butt y cols., 2005). Las células NG2<sup>+</sup> están ampliamente distribuídas a lo largo del SNC, y constituyen entre un 2-9% del número total de células en el cerebro adulto de roedores (Dawson y cols., 2003). Expresan antígenos típicamente oligodendrogliales como el receptor PDGFR $\alpha$ , el antígeno O4 o factores de transcripción como Olig1 y Olig2, y pueden diferenciarse a oligodendrocitos maduros en condiciones de desmielinización (Zhao y cols., 2009), pero estas células positivas para NG2 también poseen propiedades electrofisiológicas y pueden dar lugar tanto a astrocitos como a neuronas (Nishiyama y cols., 2009).

Sin embargo, aunque los precursores oligodendrogliales NG2<sup>+</sup> residen en el parénquima nervioso y se ha visto que son los principales contribuyentes en la remielinización del SNC (Chandran y cols., 2008), la participación relativa de oligodendrocitos derivados de uno de los principales nichos proliferativos como es la ZSV en el modelo de TMEV-IDD todavía no ha sido explorada. Existen estudios que muestran una reactivación de la ZSV en EM (Nait-Oumesmar y cols., 2007) y en condiciones de desmielinización experimental inducida por EAE o por inyección de lisolecitina (Calza y cols., 1998; Nait-Oumesmar y cols., 1999) así como daño neuronal (Kin y Szele, 2008).

Los datos que se presentan en este estudio son los primeros en mostrar que en la desmielinización inflamatoria que se produce en el modelo de TMEV-IDD existe un incremento en la proliferación celular en la ZSV durante la fase preclínica temprana, y una movilización de precursores oligodendrogliales desde la ZSV hacia áreas

desmielinizadas en la fase preclínica tardía. Así, los progenitores de oligodendrocitos procedentes de los laterales ventriculares serían capaces de diferenciarse a oligodendrocitos maduros y remielinizar zonas dañadas, como por ejemplo el cuerpo calloso. En esta línea, se ha descrito que los progenitores presentes en la ZSV adulta son capaces de responder a la desmielinización a través de un incremento en la proliferación y en la migración inducida por inyección intraparenquimal en cuerpo calloso de lisofosfatidil-colina, de tal manera que los progenitores generados alcanzaban zonas distales a la ZSV para dar tanto astrocitos como oligodendrocitos (Nait-Oumesmar y cols., 2008). Además, se sabe que los astrocitos tipo B pueden generar oligodendrocitos (Menn y cols., 2006).

Por todo ello, la implicación de la ZSV en la remielinización que hemos visto en el modelo durante la fase preclínica tardía demuestra por primera vez que la desmielinización producida en el modelo de TMEV-IDD induce la diferenciación de células inmaduras que se movilizan hacia áreas de daño, para dar lugar a fenotipos maduros que intenten recuperar las funciones perdidas, en línea con los resultados obtenidos con otro de los modelos de EM como es la EAE (Picard-Riera y cols., 2002). Estos datos están en concordancia con el incremento en los marcadores Olig2 y Nkx2.2 analizados en médula espinal en nuestro modelo, apuntando hacia una respuesta generalizada del SNC para reclutar progenitores oligodendrogiales (OPCs presentes en el tejido lesionado o procedentes de ZSV) que se diferenciarían hacia oligodendrocitos maduros y podría explicar el intento de remielinización espontánea observada en la fase preclínica tardía.

## **El tratamiento *in vivo* con CBD es inmunomodulador y mejora los déficits neurológicos en animales infectados con TMEV.**

La inflamación es una reacción de defensa activa frente a distintos estímulos, que está encaminada a la eliminación de agentes nocivos y a la inhibición de sus efectos perjudiciales. Si bien la inflamación tiene una función protectora en el control de las infecciones y en la promoción de la reparación tisular, en ciertas circunstancias puede provocar daño tisular y el desencadenamiento de una patología. Así, puede encontrarse inflamación en el SNC en desórdenes desmielinizantes como la EM y en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la isquemia o el daño cerebral por trauma (Walter y Stella, 2003).

Los resultados obtenidos en el presente estudio con el modelo de Theiler resaltan la importancia de la inflamación en fenómenos como el daño axonal o la desmielinización en SNC en enfermedades como la EM, e indican la eficacia del CBD como agente terapéutico para esta enfermedad a través de un mecanismo inmunomodulador, ya que mejora los déficits neurológicos asociados al modelo si se aplica en la fase crónica o en la fase inductora de la infección con el virus. En nuestro caso, hemos visto que en el modelo de TMEV-IDD existe un incremento en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y del marcador CD11b en la médula espinal de ratones durante la fase crónica de la enfermedad, y que el tratamiento sub-crónico con CBD administrado en cualquiera de las dos fases anteriormente mencionadas (tardía o inductora) es capaz de disminuir la expresión de estos tres marcadores inflamatorios. Dado que estos resultados se acompañan en ambos casos por una disminución de la reactividad microglial, y además en el caso de la fase inductora por una disminución en los infiltrados inflamatorios en parénquima nervioso y en el bloqueo de la inducción de quimioquinas, se deduce que el CBD podría estar ejerciendo un efecto inmunoregulador que tendría como resultado una disminución en la activación microglial y en la expresión de citoquinas inflamatorias en la fase crónica del modelo, implicando una reducción de los procesos inflamatorios locales en el SNC de los ratones infectados a etapas tardías, que podrían explicar en parte la mejora en la sintomatología motora de los ratones tratados con CBD.

Los efectos beneficiosos del CBD que hemos observado en nuestro estudio estarían de acuerdo con el trabajo de Kozela y colaboradores en el modelo de EAE, donde se ha

visto que el tratamiento con CBD es capaz de disminuir la severidad de la sintomatología clínica, acompañado de la disminución en la inflamación y en la activación microglial en la médula espinal de los animales enfermos (Kozela y cols., 2010). Además, en estudios previos abordados por nuestro grupo, se ha visto que la administración de cannabinoides sintéticos o la potenciación del sistema cannabinoide endógeno en la fase crónica es capaz de mejorar la sintomatología motora en el modelo de TMEV-IDD (Arévalo-Martín y cols., 2003; Correa y cols., 2005; Ortega-Gutierrez y cols., 2005; Docagne y cols., 2007; Loría y cols., 2008; Hernangómez y cols., 2012).

Dado que los tratamientos que actualmente se utilizan en pacientes de EM como el IFN $\beta$  y el AG (Noseworthy y cols., 2000; Arnon y Sela, 2003), tienen un mecanismo de acción basado en la modulación de la respuesta inmune, los cannabinoides se perfilan como unos buenos candidatos para el tratamiento terapéutico de enfermedades inflamatorias desmielinizantes, ya que en modelos animales de EM se han realizado numerosos trabajos que señalan los efectos beneficiosos de los cannabinoides como agentes reguladores de la respuesta inflamatoria (Arévalo-Martín y cols., 2003; Croxford y Miller, 2003; Ortega-Gutiérrez y cols., 2005) y como agentes neuroprotectores (Croxford y Miller, 2003; Docagne y cols., 2007; Loria y cols., 2008; Loria y cols., 2010). También se ha visto que en pacientes con EM, los cannabinoides son capaces de mejorar la sintomatología (Pertwee, 2002). Concretamente, el fitocannabinoide CBD exhibe una gran cantidad de acciones con relevancia terapéutica en enfermedades como la EM, como serían sus acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras; además, es un compuesto bien tolerado en humanos con baja toxicidad que carece de efectos psicoactivos y cognitivos (Scuderi y cols., 2009), y cuya utilización ha sido legalizada a través del fármaco Sativex®.

Los resultados aquí expuestos sugieren que el CBD podría resultar beneficioso para el tratamiento terapéutico de la EM, donde la patogénesis puede implicar una fase inflamatoria inicial que es seguida de una fase de desmielinización selectiva y, finalmente, una fase neurodegenerativa. Según la hipótesis de la etiología autoinmune de la EM, aquellos individuos que muestran susceptibilidad genética a padecer la enfermedad albergan células T que reaccionan con autoantígenos del SNC; dichas células T podrían permanecer durante décadas en estado de reposo y en algún momento ser reactivadas en la periferia posiblemente debido a un fenómeno de mimetismo molecular, y ello produce su migración a través de la BHE al cerebro y la médula

espinal donde una vez reactivadas liberarían citoquinas proinflamatorias y dirigirían la destrucción de las vainas de mielina (Neuhaus y cols., 2003). De la misma manera, en la hipótesis de la etiología viral de la EM existen mecanismos de inflamación desmielinizante que serían responsables, en parte, de la aparición de la enfermedad crónica y de la aparición de células T autorreactivas y el consecuente desarrollo de la autoinmunidad por expansión de epítomos (Miller y Karpus, 1994; Miller y cols., 1997). Por lo tanto, aquellos fármacos que puedan frenar o atenuar esta exacerbación del sistema inmune como los cannabinoides serían altamente beneficiosos en enfermedades con componente inflamatorio como la EM en su etiología autoinmune o viral.

Un aspecto interesante de nuestro estudio, dadas las propiedades inmunomoduladoras del CBD, fue el estudio de la expresión de las quimioquinas CCL2 y CCL5 y del receptor CCR2. Según nuestros resultados, la inoculación intracerebral del virus de Theiler que desencadena la patología desmielinizante induce, en su fase aguda (7 días post-infección) un incremento en la expresión de las quimioquinas CCL2 y CCL5 y del receptor de quimioquinas CCR2 a nivel ipsi y contralateral a la inoculación del virus, que podría explicar el incremento en la extravasación de infiltrados inflamatorios al parénquima nervioso observado en esta etapa temprana. Lo que es más importante, el tratamiento con CBD de manera subcrónica tras la inoculación del virus era capaz de disminuir la expresión de CCL2 en ambos hemisferios cerebrales, efecto que era acompañado de una disminución en la cantidad de infiltrados y de la reactividad microglial a nivel encefálico.

Distintos estudios muestran que tanto las quimioquinas como sus receptores pueden estar implicados en la patogénesis de la EM a través de la regulación del tráfico de células inmunes a través de la barrera hematoencefálica, modulando su transferencia hacia sitios de lesión. La migración de las células inflamatorias sería facilitada por la regulación al alza de moléculas de adhesión como ICAM-1 o VCAM-1, y las quimioquinas formarían gradientes de concentración que atraerían a los leucocitos y activarían las integrinas leucocitarias, aumentando la adherencia y extravasación de estas células inmunes (Opdenakker y cols., 2003). De hecho, estas moléculas pueden ser detectadas en lesiones desmielinizantes activas y se ha visto un incremento en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM durante la remisión de los brotes. De manera concreta, CCR2 y su ligando CCL2 parecen jugar un papel esencial en la patogénesis de la EM: CCR2 ha sido detectado en macrófagos y microglía activada de lesiones activas

de EM, y la expresión de CCL2 se ha encontrado en astrocitos y macrófagos de lesiones agudas y crónicas de EM; además, la quimioquina CCL5 también puede detectarse en placas de lesión y su expresión se asocia al reclutamiento de linfocitos T en la EM (Szcucinski y Losy, 2007). Por ello, la regulación que podría estar ejerciendo el CBD en el reclutamiento de células T, macrófagos y microglía en los sitios de lesión que desencadena la muerte oligodendroglial y el daño axonal observado en EM, parece una aproximación terapéutica bastante efectiva para limitar los daños irreversibles que provoca esta enfermedad desmielinizante y neurodegenerativa.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que los cannabinoides son capaces de limitar la transmigración leucocitaria a través de modulación de las moléculas de adhesión en el endotelio cerebral, limitando la transmigración de linfocitos T, regulando la respuesta microglial y dando como resultado una mejora en la sintomatología y una reducción en la neuroinflamación (Mestre y cols., 2009; Mestre y cols., 2011). Además, en el modelo de TMEV-IDD se ha descrito un incremento en la expresión de quimioquinas (Hoffman y cols., 1999) que serían las responsables de la atracción de células mononucleares y neutrófilos, e inducirían la acumulación de leucocitos en lugares de inflamación (Oppenheim y cols., 1991). También se ha visto que el THC disminuye la producción constitutiva de CCL2 y CCL5 en células inmunes humanas, pero hasta el momento se desconocían las posibles acciones del CBD en relación a la regulación de estas quimioquinas. Por lo tanto, los hallazgos encontrados en relación al efecto del CBD en la fase inductora de la infección (disminución en la expresión de quimioquinas, de infiltrados inflamatorios y de reactividad microglial) unidos al efecto a largo plazo en la fase crónica del modelo (disminución en la expresión de citoquinas proinflamatorias y disminución de reactividad), apuntan hacia un efecto importante del CBD en la fase inductora de la enfermedad. Dicho efecto tendría implicaciones en la evolución de la enfermedad, de tal manera que estaría influyendo tanto en el paso de infiltrados a través de la barrera encefálica a nivel temprano como en la respuesta inmune que se desencadenaría posteriormente en la fase crónica del modelo TMEV-IDD, con el consecuente beneficio en la mejora de la sintomatología motora que se ha observado en nuestro estudio.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con CBD en la fase crónica o inductora mejora las funciones motoras y reduce la respuesta inflamatoria de células macrofágico/microgliales en el modelo TMEV-IDD, disminuyendo no sólo la reactividad microglial en médula espinal sino también la expresión de citoquinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ ; asimismo, la administración de este fitocannabinoide tras la inoculación viral (fase de inducción de la enfermedad) no sólo era capaz de disminuir la expresión de la quimioquina CCL2 y regular el tráfico linfocitario al interior del parénquima nervioso, sino que este efecto se prolongaba en el tiempo y tenía consecuencias a largo plazo, atenuando los déficits motores asociados al modelo. Por todo ello, el tratamiento con CBD puede resultar beneficioso en el tratamiento de la EM y de otras enfermedades con componente inflamatorio a través de la limitación de la respuesta del sistema inmune y del daño asociado en etapas agudas y crónicas.

**El tratamiento *in vitro* con CBD protege a las células progenitoras de oligodendrocitos de la citotoxicidad inducida por daño inflamatorio, oxidativo y de estrés de retículo.**

Los OPCs son células relativamente quiescentes que derivan de precursores del SNC perinatal y que constituyen aproximadamente el 2-9% de la población glial total del cerebro en adulto. Bajo condiciones de daño, los OPCs son capaces de dividirse y diferenciarse a oligodendrocitos mielinizantes nuevos que serían capaces de reemplazar a aquellos que han sido perdidos en áreas desmielinizadas (Levine y cols., 2001). Sin embargo, los OPCs son células altamente vulnerables al estrés oxidativo, ya que tienen una elevada tasa metabólica, un alto contenido intracelular en hierro y baja concentración del antioxidante glutathione. Además, son susceptibles tanto a citoquinas inflamatorias como a daño por altos niveles de  $Ca^{2+}$ , lo cual las convierte en unas células altamente sensibles a una gran cantidad de estímulos citotóxicos y de alteraciones de la homeostasis tisular y celular. En la EM y otras enfermedades desmielinizantes, la neuroinflamación, el estrés oxidativo y los mediadores proinflamatorios son considerados efectores clave en los mecanismos primarios que subyacen a la patogénesis de estos desórdenes, y en esta línea se han publicado algunos trabajos que apuntan hacia la citotoxicidad de estímulos inflamatorios y daño oxidativo sobre OPCs (Back y cols., 1998; Molina-Holgado y cols., 2001; Lehndart y cols., 2002; Baud y cols., 2004).

Por ello, todos aquellos compuestos que posean potencial para la protección de dichos progenitores se perfilan como buenas estrategias terapéuticas para frenar la desmielinización y el desarrollo de enfermedades como la EM. Así, trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que cannabinoides sintéticos como el WIN 55212-2 y el HU211 pueden proteger a los OPCs de la apoptosis inducida por la retirada de los factores tróficos (Molina-Holgado y cols., 2002), aunque su utilidad es limitada debido a los efectos psicotrópicos derivados de estos compuestos.

En el caso del CBD, si bien se ha visto que este cannabinoide puede inducir citotoxicidad en oligodendrocitos maduros derivados de nervio óptico a través de un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular en condiciones basales (Mato y cols., 2010), también es capaz de prevenir la cascada apoptótica en neuronas a través de una reducción del flujo de  $Ca^{2+}$  intracelular (Alvarez y cols., 2008), lo cual indica que los efectos de este

cannabinoide pueden ser distintos en función del tipo celular. Al estudiar los efectos del CBD en cultivos primarios de OPCs, únicamente observamos efectos citotóxicos en concentraciones superiores a 2,5  $\mu\text{M}$ ; a la dosis de 1  $\mu\text{M}$ , que previamente había sido descrita como citotóxica al incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en oligodendrocitos (Mato et al.), el CBD no producía dicho incremento en condiciones basales ni un efecto nocivo en los OPCs y, lo que era más importante, ejercía un efecto protector tamponando el incremento en los niveles de calcio intracelular cuando los progenitores eran tratados con ionomicina y según análisis de citometría de flujo. Este resultado contradictorio en relación a lo obtenido por Mato y colaboradores en 2010 puede deberse a la distinta fuente de la que derivan los oligodendrocitos (nervio óptico vs encéfalo) y/o al distinto estado de diferenciación de las células (oligodendrocitos madures vs progenitores), sugiriendo un efecto distinto del CBD en función del momento de desarrollo de la célula.

Aunque el CBD también había sido previamente implicado en la regulación del ciclo celular (Izzo y cols., 2009), descartamos esta posibilidad en OPCs al estudiar la incorporación de BrdU y la progresión del ciclo celular por citometría de flujo. Además, a bajas dosis el CBD protegía a los OPCs de la muerte celular inducida por LPS/ $\text{IFN}\gamma$ , como resultó evidente por el descenso de liberación de enzima LDH al medio, así como por la reducción de caspasa 3 y del número de células TUNEL<sup>+</sup>. Si bien los OPCs expresan receptores CB1 y CB2 (Molina-Holgado y cols., 2002), la protección inducida por el CBD no estaba mediada por la activación de estos receptores. De la misma manera, el bloqueo del receptor vanilloide o del receptor nuclear PPAR $\gamma$  tampoco tenía efecto sobre la capacidad del CBD de proteger a los OPCs del daño inflamatorio, descartando la participación de estos receptores. Estos resultados son consistentes con descripciones en otros trabajos en los que los efectos del CBD ocurren de manera independiente de receptores cannabinoideos clásicos y alternativos (Lim y cols., 2011).

Además, el CBD protegía a los OPCs del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno a través de la disminución de la producción de ERO, de manera consistente con las propiedades antioxidantes atribuidas a este compuesto en distintos modelos experimentales (El-Remessy y cols., 2008). Este efecto antioxidante es importante, ya que los OPCs son altamente vulnerables al estrés oxidativo (Back y cols., 1998), y éste es considerado uno de los mecanismos patogénicos que subyacen a la desmielinización y al daño axonal en EM.

Por otro lado, se sabe que el estrés de RE modula la respuesta de los oligodendrocitos a estímulos inflamatorios (Lin y cols., 2005) a través de la activación de la kinasa de serina/treonina activada por ARN de doble cadena (PKR), que ha sido implicada en la respuesta celular a la infección y varios tipos de estrés (Lee y cols., 2005). PKR es una de las proteínas transmembrana localizadas en el RE que coordina un programa adaptativo conocido como “respuesta de integración al estrés” o UPR (del inglés *Unfolded Protein Response*), y que implica la fosforilación del factor iniciación de la transcripción  $2\alpha$  (Proud y cols., 2005). Bajo condiciones de estrés de retículo, una de las vías que se activan más rápidamente implica la represión de la translación proteica, que puede ser mediada por PKR entre otras proteínas, y que conlleva la fosforilación de  $eIF2\alpha$ . Si bien esta vía parece ser citoprotectora en gran número de tipos celulares (Lu y cols., 2004), también puede inducir apoptosis en otros (Southwood y cols., 2002). De manera particular, los oligodendrocitos son muy sensibles a alteraciones en la homeostasis del ER y el resultado de la activación de esta vía podría estar determinado por el estatus de desarrollo de la célula, de tal manera que en oligodendrocitos maduros promovería la supervivencia celular, mientras que en oligodendrocitos que se encontrasen activamente mielinizando/remielinizando induciría muerte celular (Lin y Popko, 2009). Además, el estrés de RE ha sido asociado a apoptosis de oligodendrocitos mielinizantes inducida por  $IFN\gamma$  (Lin y cols., 2005), y durante isquemia (Kraskiewicz y Fitzgerald, 2011); cabe destacar que hay numerosas enfermedades humanas en las que la desmielinización/hipomielinización parece estar producida por la agravación del estrés de RE, como en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (Pennuto y cols., 2008), la leucodistrofia con desaparición de sustancia blanca (Van der Voorn y cols., 2005; Van Kollenburg y cols., 2006) e incluso desórdenes desmielinizantes mediados por el sistema inmune como la EM (Mhaille y cols., 2008). Bajo esta perspectiva y a un nivel más celular, se asume que el mal plegamiento de proteínas genera estrés de RE, y puede contribuir a la muerte celular bajo distintas condiciones patológicas, de manera que se ha visto que mutaciones que afecten al plegamiento de constituyentes de la mielina provocan muerte de células oligodendrogiales (Gow y cols., 1998).

Al estudiar el efecto del estrés de RE en los OPCs, mediante el uso de un estresor como es la tunicamicina, observamos que dicho estrés era citotóxico a través de un mecanismo que implicaba la fosforilación de  $eIF2\alpha$ , pero que era independiente de la fosforilación y activación de PKR, sugiriendo que la inducción de esta vía por el

tratamiento con tunicamicina debe depender de otras proteínas implicadas en el estrés de RE, y que dicho estrés en progenitores de oligodendrocitos tiene efectos nocivos e induce su muerte. La capacidad del CBD de proteger a los OPCs del daño causado por el estrés de RE a través del descenso en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  inducida por tunicamicina resalta el potencial terapéutico de este compuesto en condiciones patológicas en las que la homeostasis del retículo endoplásmico está comprometida, como se ha propuesto para enfermedades neurodegenerativas y desmielinizantes (Hoozemans y cols., 2012; Stefani y cols., 2012).

Hay bastantes evidencias que relacionan la inflamación con el estrés de RE a través de varias vías intracelulares (Lee y cols., 2005; Zhang y Kaufman, 2008), y en modelos animales de EM el IFN $\gamma$  induce estrés de RE en oligodendrocitos que se encuentran mielinizando de manera activa, lo cual lleva a su muerte por apoptosis y a anomalías en la mielinización (Lin y cols., 2006). Los resultados aquí expuestos apuntan hacia una relación estrecha entre la inflamación y el estrés de RE en OPCs, ya que el LPS/IFN $\gamma$  implica la fosforilación de PKR y de eIF2 $\alpha$  y provoca la muerte celular de los progenitores. Además, esta vía ha sido asociada con un aumento en la expresión de factores proapoptóticos, como es el factor de transcripción CHOP (Ron y Habener, 1992), que promueve la apoptosis a través de la represión de Bcl-2 (Gotoh y cols., 2004), o mediante la inducción de caspasa 12 (Nakagawa y cols., 2000). En OPCs, nuestras observaciones muestran que la inflamación provoca la inducción de la caspasa 3, promueve la expresión de CHOP y de caspasa 12, y altera el balance entre Bax y Bcl-2, implicando directamente el estrés de RE en la apoptosis mediada por LPS/IFN $\gamma$ .

Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia de la protección ofrecida por el CBD en OPCs frente a la apoptosis inducida por un estímulo inflamatorio, debido al bloqueo del estrés de RE por un descenso en la fosforilación de PKR y eIF2 $\alpha$ , una recuperación de los niveles de expresión basales de CHOP, caspasa 12, Bcl-2 y Bax, así como un incremento en la expresión de GADD34, proteína que regula negativamente la ruta (Novoa y cols., 2001).

En resumen, los datos aquí expuestos indican que a bajas dosis el CBD tiene efectos “oligoprotectores” en OPCs *in vitro* bajo condiciones de inflamación, estrés oxidativo y estrés de RE. En condiciones de estrés oxidativo, el efecto protector del CBD estaba mediado por un descenso en la producción de ROS, mientras que bajo condiciones de

neuroinflamación, el CBD combatía la apoptosis mediante un descenso en el estrés de RE a través de la modulación de la vía PKR- eiF2 $\alpha$ .

Por todo ello, se propone que el CBD, como derivado de *Cannabis sativa* que carece de propiedades psicoactivas, es un buen candidato para la protección de progenitores de oligodendrocitos frente al daño inflamatorio, con un potencial terapéutico significativo para el tratamiento de patologías desmielinizantes.

## CONCLUSIONES

---

- En la fase aguda del modelo de TMEV y en dos estructuras cerebrales como son el tronco cerebral y la corteza motora, existe una inflamación y un daño axonal que se traducen en la fase preclínica temprana en una pérdida permanente de neurofilamento neuronal. Dicha pérdida se acompaña de una desmielinización que se sucede por un intento de remielinización en la fase preclínica tardía, correlacionado con un aumento en marcadores de mielina y en factores de transcripción que median el paso de progenitor a oligodendrocito maduro. Dicho intento de remielinización es fallido y se pierde en la fase crónica, donde la inflamación del SNC vuelve a ser evidente y aparecen los síntomas motores asociados a la enfermedad.

- En el modelo de TMEV existe un incremento en la proliferación de células madre de la ZSV en la fase preclínica temprana, que se traduce en la migración y repoblación de oligodendrocitos hacia zonas lesionadas en la fase preclínica tardía, y que podría explicar en parte el intento de remielinización espontánea observada a estos tiempos post-infección.

- El tratamiento *in vivo* con CBD es inmunomodulador y mejora los déficits neurológicos en animales infectados con TMEV, tanto si se aplica en la fase crónica de la enfermedad como si se aplica en la fase inductora. En ambos casos, el tratamiento con CBD disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias y disminuye la reactividad microglial en la médula espinal de los animales infectados a tiempos tardíos. Además, en el tratamiento con CBD durante la fase inductora existe una disminución en la expresión de quimioquinas, en los infiltrados leucocitarios y en la reactividad microglial en corteza próxima al lugar de la inyección viral.

- El tratamiento *in vitro* con CBD protege a las células progenitoras de oligodendrocitos de la citotoxicidad inducida por daño oxidativo, inflamatorio, de estrés de retículo y por incrementos en la concentración intracelular de calcio. En el caso del daño oxidativo, el CBD protege a los OPCs a través de una disminución en la producción de ROS. En caso de daño inflamatorio y de estrés de retículo, el CBD tiene un efecto antiapoptótico asociado a la disminución en el estrés de retículo endoplásmico. Además, el CBD tampona los incrementos de  $Ca^{2+}$  intracelulares procedentes de depósitos internos cuando se analiza por FACS, pero no al analizarlo por microscopía.

## REFERENCIAS

---

## A

Aguado, T., Monory, K., Palazuelos, J., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzman, M., and Galve-Roperh, I. (2005). *The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation*. *FASEB J* 19, 1704-1706.

Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J.M. (2002). *Neurogenesis in adult subventricular zone*. *J Neurosci* 22, 629-634.

Alvarez, F.J., Lafuente, H., Rey-Santano, M.C., Mielgo, V.E., Gastiasoro, E., Rueda, M., Pertwee, R.G., Castillo, A.I., Romero, J., and Martinez-Orgado, J. (2008). *Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets*. *Pediatr Res* 64, 653-658.

Arevalo-Martin, A., Molina-Holgado, E., and Guaza, C (2012). *A CB(1)/CB(2) receptor agonist, WIN 55,212-2, exerts its therapeutic effect in a viral autoimmune model of multiple sclerosis by restoring self-tolerance to myelin*. *Neuropharmacology*. Epub ahead of print.

Arevalo-Martin, A., Vela, J.M., Molina-Holgado, E., Borrell, J., and Guaza, C. (2003). *Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis*. *J Neurosci* 23, 2511-2516.

Arnon, R., and Sela, M. (2003). *Immunomodulation by the copolymer glatiramer acetate*. *J Mol Recognit* 16, 412-421.

## B

Back, S.A., Gan, X., Li, Y., Rosenberg, P.A., and Volpe, J.J. (1998). *Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion*. *J Neurosci* 18, 6241-6253.

Baud, O., Greene, A.E., Li, J., Wang, H., Volpe, J.J., and Rosenberg, P.A. (2004). *Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes*. *J Neurosci* 24, 1531-1540.

Begolka, W.S., Vanderlugt, C.L., Rahbe, S.M., and Miller, S.D. (1998). *Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis*. *J Immunol* 161, 4437-4446.

Benito, C., Nunez, E., Tolon, R.M., Carrier, E.J., Rabano, A., Hillard, C.J., and Romero, J. (2003). *Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains*. *J Neurosci* 23, 11136-11141.

Berard, J.L., Wolak, K., Fournier, S., and David, S (2010). *Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice*. *Glia* 58, 434-445.

Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., and Di Marzo, V. (2001). *Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide*. *Br J Pharmacol* 134, 845-852.

Bjartmar, C., and Trapp, B.D. (2001). *Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences*. *Curr Opin Neurol* 14, 271-278.

Bjartmar, C., and Trapp, B.D. (2003). *Axonal degeneration and progressive neurologic disability in multiple sclerosis*. *Neurotox Res* 5, 157-164.

Blakemore, W.F. (2008). *Regeneration and repair in multiple sclerosis: the view of experimental pathology*. *J Neurol Sci* 265, 1-4.

Borrelli, F., Aviello, G., Romano, B., Orlando, P., Capasso, R., Maiello, F., Guadagno, F., Petrosino, S., Capasso, F., Di Marzo, V., and Izzo, A.A. (2009). *Cannabidiol, a safe and non-psychotropic ingredient of the marijuana plant Cannabis sativa, is protective in a murine model of colitis*. *J Mol Med (Berl)* 87, 1111-1121.

Bradl, M.a.L., H (2010). *Oligodendrocytes: biology and pathology*. *Acta Neuropathol* 119, 37-53.

Bruck, W. (2005). *The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage*. *J Neurol* 252 Suppl 5, v3-9.

Bunge, M.B., Bunge, R.P., and Ris, H. (1961). *Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord*. *J Biophys Biochem Cytol* 10, 67-94.

Butt, A.M., Hamilton, N., Hubbard, P., Pugh, M., and Ibrahim, M. (2005). *Synantocytes: the fifth element*. *J Anat* 207, 695-706.

## C

Cabral, G.A., Harmon, K.N., and Carlisle, S.J. (2001). *Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB1 receptor participation*. *Adv Exp Med Biol* 493, 207-214.

Calza, L., Giardino, L., Pozza, M., Bettelli, C., Micera, A., and Aloe, L. (1998). *Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3209-3214.

Campos, A.C., and Guimaraes, F.S. (2008). *Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats*. *Psychopharmacology (Berl)* 199, 223-230.

Carrier, E.J., Kearns, C.S., Barkmeier, A.J., Breese, N.M., Yang, W., Nithipatikom, K., Pfister, S.L., Campbell, W.B., and Hillard, C.J. (2004). *Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism*. *Mol Pharmacol* 65, 999-1007.

Clatch RJ, L.H., Miller SD (1986). *Characterization of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-specific delayed-type hypersensitivity responses in TMEV-induced demyelinating disease: correlation with clinical signs*. *J Immunol* 136, 920-927.

Correa, F., Hernangomez-Herrero, M., Mestre, L., Loria, F., Docagne, F., and Guaza, C. (2011). *The endocannabinoid anandamide downregulates IL-23 and IL-12 subunits in a viral model of multiple sclerosis: evidence for a cross-talk between IL-12p70/IL-23 axis and IL-10 in microglial cells*. *Brain Behav Immun* 25, 736-749.

Correa, F., Mestre, L., Molina-Holgado, E., Arevalo-Martin, A., Docagne, F., Romero, E., Molina-Holgado, F., Borrell, J., and Guaza, C. (2005). *The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation*. *Mini Rev Med Chem* 5, 671-675.

Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thone-Reineke, C., Ortmann, S., et al. (2003). *The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis*. *J Clin Invest* 112, 423-431.

Cree, B.A., Rioux, J.D., McCauley, J.L., Gourraud, P.A., Goyette, P., McElroy, J., De Jager, P., Santaniello, A., Vyse, T.J., Gregersen, P.K., et al. *A major histocompatibility Class I locus contributes to multiple sclerosis susceptibility independently from HLA-DRB1\*15:01*. *PLoS One* 5, e11296.

Croxford, J.L., Ercolini, A.M., Degutes, M., and Miller, S.D. (2006). *Structural requirements for initiation of cross-reactivity and CNS autoimmunity with a PLP139-151 mimic peptide derived from murine hepatitis virus*. *Eur J Immunol* 36, 2671-2680.

Croxford, J.L., and Miller, S.D. (2003). *Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+WIN55,212*. *J Clin Invest* 111, 1231-1240.

Croxford, J.L., Olson, J.K., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2005). *Initiation and exacerbation of autoimmune demyelination of the central nervous system via virus-induced molecular mimicry: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis*. *J Virol* 79, 8581-8590.

Chandran, S., Hunt, D., Joannides, A., Zhao, C., Compston, A., and Franklin, R.J. (2008). *Myelin repair: the role of stem and precursor cells in multiple sclerosis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 171-183.

Chari, D.M. (2007). *Remyelination in multiple sclerosis*. *Int Rev Neurobiol* 79, 589-620.

## D

Dal Canto, M.C., Kim, B.S., Miller, S.D., and Melvold, R.W. (1996). *Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV)-Induced Demyelination: A Model for Human Multiple Sclerosis*. *Methods* 10, 453-461.

Dal Canto MC, L.H. (1975). *Primary demyelination in theiler's virus infection: an ultrastructural study*. *Lab Invest* 33, 626-637.

Dawson, M.R., Polito, A., Levine, J.M., and Reynolds, R. (2003). *NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS*. *Mol Cell Neurosci* 24, 476-488.

Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Mu, J., Whyte, A., and 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.

Denic, A., Pirko, I., Wootla, B., Bieber, A., Macura, S., and Rodriguez, M. (2012). *Deletion of Beta-2-Microglobulin Ameliorates Spinal Cord Lesion Load and Promotes Recovery of Brainstem NAA Levels in a Murine Model of Multiple Sclerosis*. *Brain Pathol*. Epub ahead of print.

Devane, W.A., Dysarz, F.A., 3rd, Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. (1988). *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. *Mol Pharmacol* 34, 605-613.

Docagne, F., Muneton, V., Clemente, D., Ali, C., Loria, F., Correa, F., Hernangomez, M., Mestre, L., Vivien, D., and Guaza, C. (2007). *Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation*. *Mol Cell Neurosci* 34, 551-561.

Doetsch, F. (2003). *The glial identity of neural stem cells*. *Nat Neurosci* 6, 1127-1134.

Durst, R., Danenberg, H., Gallily, R., Mechoulam, R., Meir, K., Grad, E., Beeri, R., Pugatsch, T., Tarsish, E., and Lotan, C. (2007). *Cannabidiol, a nonpsychoactive Cannabis constituent, protects against myocardial ischemic reperfusion injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H3602-3607.

Dutta, R., and Trapp, B.D. (2007). *Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis*. *Neurology* 68, S22-31; discussion S43-54.

## E

El-Remessy, A.B., Tang, Y., Zhu, G., Matragoon, S., Khalifa, Y., Liu, E.K., Liu, J.Y., Hanson, E., Mian, S., Fatteh, N., and Liou, G.I. (2008). *Neuroprotective effects of cannabidiol in endotoxin-induced uveitis: critical role of p38 MAPK activation*. *Mol Vis* 14, 2190-2203.

Esposito, G., De Filippis, D., Carnuccio, R., Izzo, A.A., and Iuvone, T. (2006a). *The marijuana component cannabidiol inhibits beta-amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/beta-catenin pathway rescue in PC12 cells*. *J Mol Med (Berl)* 84, 253-258.

Esposito, G., De Filippis, D., Maiuri, M.C., De Stefano, D., Carnuccio, R., and Iuvone, T. (2006b). *Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement*. *Neurosci Lett* 399, 91-95.

Esposito, G., Scuderi, C., Savani, C., Steardo, L., Jr., De Filippis, D., Cottone, P., Iuvone, T., Cuomo, V., and Steardo, L. (2007). *Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression*. *Br J Pharmacol* 151, 1272-1279.

## F

Facchinetti, F., Del Giudice, E., Furegato, S., Passarotto, M., and Leon, A. (2003). *Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide*. *Glia* 41, 161-168.

Fancy, S.P., Zhao, C., and Franklin, R.J. (2004). *Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS*. *Mol Cell Neurosci* 27, 247-254.

Ferguson, B., Matyszak, M.K., Esiri, M.M., and Perry, V.H. (1997). *Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions*. *Brain* 120 ( Pt 3), 393-399.

Formukong, E.A., Evans, A.T., and Evans, F.J. (1988). *Analgesic and antiinflammatory activity of constituents of Cannabis sativa L*. *Inflammation* 12, 361-371.

Fujinami, R.S., and Oldstone, M.B. (1985). *Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity*. *Science* 230, 1043-1045.

## G

Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995). *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. *Eur J Biochem* 232, 54-61.

Gallo, V., and Armstrong, R.C. (2008). *Myelin repair strategies: a cellular view*. *Curr Opin Neurol* 21, 278-283.

Gaoni, Y., and Mechoulam, R. (1971). *The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish*. *J Am Chem Soc* 93, 217-224.

Glass, M., Dragunow, M., and Faull, R.L. (1997). *Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain*. *Neuroscience* 77, 299-318.

Goldschmidt, T., Antel, J., Konig, F.B., Bruck, W., and Kuhlmann, T. (2009). *Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity*. *Neurology* 72, 1914-1921.

Gong, J.P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., and Uhl, G.R. (2006). *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain*. *Brain Res* 1071, 10-23.

Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). *hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria*. *Cell Death Differ* 11, 390-402.

Gow, A., Southwood, C.M., and Lazzarini, R.A. (1998). *Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease*. *J Cell Biol* 140, 925-934.

Grundy, R.I., Rabuffetti, M., and Beltramo, M. (2001). *Cannabinoids and neuroprotection*. *Mol Neurobiol* 24, 29-51.

Guo, J., and Ikeda, S.R. (2004). *Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons*. *Mol Pharmacol* 65, 665-674.

## H

Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., Ivinson, A.J., *et al.* (2007). *Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study*. *N Engl J Med* 357, 851-862.

Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J., and Wink, D. (1998). *Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8268-8273.

Hampson, A.J., Grimaldi, M., Lolic, M., Wink, D., Rosenthal, R., and Axelrod, J. (2000). *Neuroprotective antioxidants from marijuana*. *Ann N Y Acad Sci* 899, 274-282.

Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394.

Hanus, L.O. (2007). *Discovery and isolation of anandamide and other endocannabinoids*. *Chem Biodivers* 4, 1828-1841.

Henderson, A.P., Barnett, M.H., Parratt, J.D., and Prineas, J.W. (2009). *Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions*. *Ann Neurol* 66, 739-753.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1991). *Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study*. *J Neurosci* 11, 563-583.

Hernangomez, M., Mestre, L., Correa, F.G., Loria, F., Mecha, M., Inigo, P.M., Docagne, F., Williams, R.O., Borrell, J., and Guaza, C. (2012). *CD200-CD200R1 interaction contributes to neuroprotective effects of anandamide on experimentally induced inflammation*. *Glia*. Epub ahead of print.

Hoffman, L.M., Fife, B.T., Begolka, W.S., Miller, S.D., and Karpus, W.J. (1999). *Central nervous system chemokine expression during Theiler's virus-induced demyelinating disease*. *J Neurovirol* 5, 635-642.

Hoozemans, J.J., van Haastert, E.S., Nijholt, D.A., Rozemuller, A.J., and Scheper, W. (2012). *Activation of the Unfolded Protein Response Is an Early Event in Alzheimer's and Parkinson's Disease*. *Neurodegener Dis.* 10, 212-215.

Howlett, A.C. (1984). *Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantadol compounds*. *Life Sci* 35, 1803-1810.

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., *et al.* (2002). *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors*. *Pharmacol Rev* 54, 161-202.

Hulshof, S., Montagne, L., De Groot, C.J., and Van Der Valk, P. (2002). *Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions*. *Glia* 38, 24-35.

## I

Ihrle, R.A., and Alvarez-Buylla, A. (2008). *Cells in the astroglial lineage are neural stem cells*. *Cell Tissue Res* 331, 179-191.

Iuvone, T., Esposito, G., De Filippis, D., Scuderi, C., and Steardo, L. (2009). *Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders?* *CNS Neurosci Ther* 15, 65-75.

Izzo, A.A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V., and Mechoulam, R. (2009). *Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb*. *Trends Pharmacol Sci* 30, 515-527.

## **J**

Jackson, S.J., Diemel, L.T., Pryce, G., and Baker, D. (2005). *Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease*. J Neurol Sci 233, 21-25.

Jin, Y.H., Mohindru, M., Kang, M.H., Fuller, A.C., Kang, B., Gallo, D., and Kim, B.S. (2007). *Differential virus replication, cytokine production, and antigen-presenting function by microglia from susceptible and resistant mice infected with Theiler's virus*. J Virol 81, 11690-11702.

Jordt, S.E., Bautista, D.M., Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Hogestatt, E.D., Meng, I.D., and Julius, D. (2004). *Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1*. Nature 427, 260-265.

## **K**

Karussis, D., Grigoriadis, S., Polyzoidou, E., Grigoriadis, N., Slavin, S., and Abramsky, O. (2006). *Neuroprotection in multiple sclerosis*. Clin Neurol Neurosurg 108, 250-254.

Kathmann, M., Flau, K., Redmer, A., Trankle, C., and Schlicker, E. (2006). *Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 372, 354-361.

Kim, D., and Thayer, S.A. (2001). *Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture*. J Neurosci 21, RC146.

Kim, Y., and Szele, F.G. (2008). *Activation of subventricular zone stem cells after neuronal injury*. Cell Tissue Res 331, 337-345.

Kozela, E., Lev, N., Kaushansky, N., Eilam, R., Rimmerman, N., Levy, R., Ben-Nun, A., Juknat, A., and Vogel, Z. *Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice*. Br J Pharmacol 163, 1507-1519.

Kraskiewicz, H., and FitzGerald, U. *Partial XBP1 knockdown does not affect viability of oligodendrocyte precursor cells exposed to new models of hypoxia and ischemia in vitro*. J Neurosci Res 89, 661-673.

Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C.F., Stadelmann, C., Bruck, W., Rauschka, H., Bergmann, M., Schmidbauer, M., Parisi, J.E., and Lassmann, H. (2005). *Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis*. Brain 128, 2705-2712.

## **L**

Lambert, D.M., and Fowler, C.J. (2005). *The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications*. J Med Chem 48, 5059-5087.

Lastres-Becker, I., Molina-Holgado, F., Ramos, J.A., Mechoulam, R., and Fernandez-Ruiz, J. (2005). *Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease*. Neurobiol Dis 19, 96-107.

Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.Y., Lu, H.C., Hille, B., and Mackie, K. (2008). *GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current*. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 2699-2704.

- Lee, J.H., Park, E.J., Kim, O.S., Kim, H.Y., Joe, E.H., and Jou, I. (2005). *Double-stranded RNA-activated protein kinase is required for the LPS-induced activation of STAT1 inflammatory signaling in rat brain glial cells*. *Glia* 50, 66-79.
- Lehnardt, S., Lachance, C., Patrizi, S., Lefebvre, S., Follett, P.L., Jensen, F.E., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., and Vartanian, T. (2002). *The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS*. *J Neurosci* 22, 2478-2486.
- Lehrich, J.R., Arnason, B.G., and Hochberg, F.H. (1976). *Demyelinative myelopathy in mice induced by the DA virus*. *J Neurol Sci* 29, 149-160.
- Levine, J.M., Reynolds, R., and Fawcett, J.W. (2001). *The oligodendrocyte precursor cell in health and disease*. *Trends Neurosci* 24, 39-47.
- Ligresti, A., Moriello, A.S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., Laezza, C., Portella, G., Bifulco, M., and Di Marzo, V. (2006). *Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma*. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 1375-1387.
- Lim, M.P., Devi, L.A., and Rozenfeld, R. *Cannabidiol causes activated hepatic stellate cell death through a mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. *Cell Death Dis* 2, e170.
- Lin, W., Harding, H.P., Ron, D., and Popko, B. (2005). *Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma*. *J Cell Biol* 169, 603-612.
- Lin, W., Kemper, A., Dupree, J.L., Harding, H.P., Ron, D., and Popko, B. (2006). *Interferon-gamma inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress*. *Brain* 129, 1306-1318.
- Lin, W., and Popko, B. (2009). *Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells*. *Nat Neurosci* 12, 379-385.
- Lipton, H.L. (1975). *Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination*. *Infect Immun* 11, 1147-1155.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain*. *Science* 264, 1145-1148.
- Loria, F., Petrosino, S., Hernangomez, M., Mestre, L., Spagnolo, A., Correa, F., Di Marzo, V., Docagne, F., and Guaza, C. (2010). *An endocannabinoid tone limits excitotoxicity in vitro and in a model of multiple sclerosis*. *Neurobiol Dis* 37, 166-176.
- Loria, F., Petrosino, S., Mestre, L., Spagnolo, A., Correa, F., Hernangomez, M., Guaza, C., Di Marzo, V., and Docagne, F. (2008). *Study of the regulation of the endocannabinoid system in a virus model of multiple sclerosis reveals a therapeutic effect of palmitoylethanolamide*. *Eur J Neurosci* 28, 633-641.
- Lu, P.D., Jousse, C., Marciniak, S.J., Zhang, Y., Novoa, I., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ron, D., and Harding, H.P. (2004). *Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2*. *EMBO J* 23, 169-179.

Lubetzki, C. (2008). *Regenerative capacity in multiple sclerosis*. Bull Acad Natl Med 192, 495-504; discussion 505-496.

Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. Ann Neurol 47, 707-717.

Ludwin, S.K. (2006). *The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies*. J Neuropathol Exp Neurol 65, 305-318.

## M

Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., and Mitchell, R. (1995). *Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor*. J Neurosci 15, 6552-6561.

Maresz, K., Carrier, E.J., Ponomarev, E.D., Hillard, C.J., and Dittel, B.N. (2005). *Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli*. J Neurochem 95, 437-445.

Martin-Moreno, A.M., Reigada, D., Ramirez, B.G., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., and de Ceballos, M.L. (2010). *Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease*. Mol Pharmacol 79, 964-973.

Mato, S., Victoria Sanchez-Gomez, M., and Matute, C. (2010). *Cannabidiol induces intracellular calcium elevation and cytotoxicity in oligodendrocytes*. Glia 58, 1739-1747.

McCarthy, K.D., and de Vellis, J. (1980). *Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue*. J Cell Biol 85, 890-902.

McGavern, D.B., Murray, P.D., and Rodriguez, M. (1999). *Quantitation of spinal cord demyelination, remyelination, atrophy, and axonal loss in a model of progressive neurologic injury*. J Neurosci Res 58, 492-504.

McKallip, R.J., Jia, W., Schlomer, J., Warren, J.W., Nagarkatti, P.S., and Nagarkatti, M. (2006). *Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: A novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression*. Mol Pharmacol 70, 897-908.

McMahon, E.J., Bailey, S.L., Castenada, C.V., Waldner, H., and Miller, S.D. (2005). *Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis*. Nat Med 11, 335-339.

Mechoulam, R., and Gaoni, Y. (1965). Hashish. IV. *The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids*. Tetrahedron 21, 1223-1229.

Mechoulam, R., Parker, L.A., and Gallily, R. (2002). *Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects*. J Clin Pharmacol 42, 11S-19S.

Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., and Hanus, L.O. (2007). *Cannabidiol--recent advances*. Chem Biodivers 4, 1678-1692.

Mechoulam, R., Shani, A., Edery, H., and Grunfeld, Y. (1970). *Chemical basis of hashish activity*. Science 169, 611-612.

- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). *Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain*. J Neurosci 26, 7907-7918.
- Mestre, L., Correa, F., Arevalo-Martin, A., Molina-Holgado, E., Valenti, M., Ortar, G., Di Marzo, V., and Guaza, C. (2005). *Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis*. J Neurochem 92, 1327-1339.
- Mestre, L., Docagne, F., Correa, F., Loria, F., Hernangomez, M., Borrell, J., and Guaza, C. (2009). *A cannabinoid agonist interferes with the progression of a chronic model of multiple sclerosis by downregulating adhesion molecules*. Mol Cell Neurosci 40, 258-266.
- Mestre, L., Inigo, P.M., Mecha, M., Correa, F.G., Hernangomez-Herrero, M., Loria, F., Docagne, F., Borrell, J., and Guaza, C. (2011). *Anandamide inhibits Theiler's virus induced VCAM-1 in brain endothelial cells and reduces leukocyte transmigration in a model of blood brain barrier by activation of CB(1) receptors*. J Neuroinflammation 8, 102.
- Mhaille, A.N., McQuaid, S., Windebank, A., Cunnea, P., McMahon, J., Samali, A., and FitzGerald, U. (2008). *Increased expression of endoplasmic reticulum stress-related signaling pathway molecules in multiple sclerosis lesions*. J Neuropathol Exp Neurol 67, 200-211.
- Miller, S.D., and Karpus, W.J. (1994). *The immunopathogenesis and regulation of T-cell-mediated demyelinating diseases*. Immunol Today 15, 356-361.
- Miller, S.D., Vanderlugt, C.L., Begolka, W.S., Pao, W., Yauch, R.L., Neville, K.L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A., and Kim, B.S. (1997). *Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading*. Nat Med 3, 1133-1136.
- Mishima, K., Hayakawa, K., Abe, K., Ikeda, T., Egashira, N., Iwasaki, K., and Fujiwara, M. (2005). *Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine1A receptor-dependent mechanism*. Stroke 36, 1077-1082.
- Molina-Holgado, E., Arevalo-Martin, A., Vela, J.M., and Guaza, C. (2002a). *Theiler's virus encephalomyelitis infection as a model for multiple sclerosis: cytokines and pathogenic mechanisms*. Rev Neurol 35, 973-978.
- Molina-Holgado, E., Vela, J.M., Arevalo-Martin, A., Almazan, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J., and Guaza, C. (2002b). *Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling*. J Neurosci 22, 9742-9753.
- Molina-Holgado, E., Vela, J.M., Arevalo-Martin, A., and Guaza, C. (2001). *LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10*. Eur J Neurosci 13, 493-502.
- Molina-Holgado E., V.J.M., Arévalo-Martín A., Almazán G., Molina-Holgado F., Borrel J., Guaza C. (2002). *Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling*. J Neurosci 22, 9742-9753.

Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (2004). *Disguising adult neural stem cells*. *Curr Opin Neurobiol* 14, 125-131.

Murray, P.D., McGavern, D.B., Sathornsumetee, S., and Rodriguez, M. (2001). *Spontaneous remyelination following extensive demyelination is associated with improved neurological function in a viral model of multiple sclerosis*. *Brain* 124, 1403-1416.

## N

Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., and Baron-Van Evercooren, A. (1999). *Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination*. *Eur J Neurosci* 11, 4357-4366.

Nait-Oumesmar, B., Picard-Riera, N., Kerninon, C., and Baron-Van Evercooren, A. (2008). *The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: from animal models to multiple sclerosis*. *J Neurol Sci* 265, 26-31.

Nait-Oumesmar, B., Picard-Riera, N., Kerninon, C., Decker, L., Seilhean, D., Hoglinger, G.U., Hirsch, E.C., Reynolds, R., and Baron-Van Evercooren, A. (2007). *Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: evidence for early glial progenitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4694-4699.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. *Nature* 403, 98-103.

Neuhaus, O., Archelos, J.J., and Hartung, H.P. (2003). *Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection*. *Trends Pharmacol Sci* 24, 131-138.

Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., and Zhu, X. (2009). *Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity*. *Nat Rev Neurosci* 10, 9-22.

Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B.G. (2000). *Multiple sclerosis*. *N Engl J Med* 343, 938-952.

Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha*. *J Cell Biol* 153, 1011-1022.

Nunez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., Gonzalez, S., Tolon, R.M., and Romero, J. (2004). *Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study*. *Synapse* 53, 208-213.

Nunez, E., Benito, C., Tolon, R.M., Hillard, C.J., Griffin, W.S., and Romero, J. (2008). *Glial expression of cannabinoid CB(2) receptors and fatty acid amide hydrolase are beta amyloid-linked events in Down's syndrome*. *Neuroscience* 151, 104-110.

## O

Offertaler, L., Mo, F.M., Batkai, S., Liu, J., Begg, M., Razdan, R.K., Martin, B.R., Bukoski, R.D., and Kunos, G. (2003). *Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor*. *Mol Pharmacol* 63, 699-705.

Oleszak, E.L., Chang, J.R., Friedman, H., Katsetos, C.D., and Platsoucas, C.D. (2004). *Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis*. Clin Microbiol Rev 17, 174-207.

Olson, J.K., Ercolini, A.M., and Miller, S.D. (2005). *A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis*. Curr Top Microbiol Immunol 296, 39-53.

Olson, J.K., Girvin, A.M., and Miller, S.D. (2001). *Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus*. J Virol 75, 9780-9789.

Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., et al. (2006). *Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain*. Ann N Y Acad Sci 1074, 514-536.

Ontaneda, D., Hyland, M., and Cohen, J.A. (2011). *Multiple sclerosis: new insights in pathogenesis and novel therapeutics*. Annu Rev Med 63, 389-404.

Opdenakker, G., Nelissen, I., and Van Damme, J. (2003). *Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis*. Lancet Neurol 2, 747-756.

Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1991). *Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family*. Annu Rev Immunol 9, 617-648.

Ortega-Gutierrez, S., Molina-Holgado, E., Arevalo-Martin, A., Correa, F., Viso, A., Lopez-Rodriguez, M.L., Di Marzo, V., and Guaza, C. (2005). *Activation of the endocannabinoid system as therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis*. FASEB J 19, 1338-1340.

Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L., and Kunos, G. (2005). *Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity*. J Clin Invest 115, 1298-1305.

## **P**

Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzman, M., and Galve-Roperh, I. (2006). *Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation*. FASEB J 20, 2405-2407.

Pazos, M.R., Tolon, R.M., Benito, C., Rodriguez, C.F., Gorgojo, J.J., Nevado, M., Alvarez, M., Arias, F., Almodovar, F., Fernandez, M.T., et al. (2008). *Cannabinoid CB1 receptors are expressed by parietal cells of the human gastric mucosa*. J Histochem Cytochem 56, 511-516.

Pennuto, M., Tinelli, E., Malaguti, M., Del Carro, U., D'Antonio, M., Ron, D., Quattrini, A., Feltri, M.L., and Wrabetz, L. (2008). *Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice*. Neuron 57, 393-405.

Perier, O., and Gregoire, A. (1965). *Electron microscopic features of multiple sclerosis lesions*. Brain 88, 937-952.

Perras, C. (2005). *Sativex for the management of multiple sclerosis symptoms*. Issues Emerg Health Technol, 1-4.

Pertwee, R.G. (2002). *Cannabinoids and multiple sclerosis*. Pharmacol Ther 95, 165-174.

Pertwee, R.G. (2008). *The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin*. Br J Pharmacol 153, 199-215.

Petzold, A. (2005). *Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss*. J Neurol Sci 233, 183-198.

Piaton, G., Williams, A., Seilhean, D., and Lubetzki, C. (2009). *Remyelination in multiple sclerosis*. Prog Brain Res 175, 453-464.

Picard-Riera, N., Decker, L., Delarasse, C., Goude, K., Nait-Oumesmar, B., Liblau, R., Pham-Dinh, D., and Evercooren, A.B. (2002). *Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13211-13216.

Picard-Riera, N., Nait-Oumesmar, B., and Baron-Van Evercooren, A. (2004). *Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system*. J Neurosci Res 76, 223-231.

Pope, J.G., Karpus, W.J., VanderLugt, C., and Miller, S.D. (1996). *Flow cytometric and functional analyses of central nervous system-infiltrating cells in SJL/J mice with Theiler's virus-induced demyelinating disease. Evidence for a CD4+ T cell-mediated pathology*. J Immunol 156, 4050-4058.

Prineas, J., Raine, C.S., and Wisniewski, H. (1969). *An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. 3. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in the central nervous system*. Lab Invest 21, 472-483.

Proud, C.G. (2005). *eIF2 and the control of cell physiology*. Semin Cell Dev Biol 16, 3-12.

Pryce, G., Ahmed, Z., Hankey, D.J., Jackson, S.J., Croxford, J.L., Pocock, J.M., Ledent, C., Petzold, A., Thompson, A.J., Giovannoni, G., *et al.* (2003). *Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis*. Brain 126, 2191-2202.

## **R**

Rist, J.M., and Franklin, R.J. (2008). *Taking ageing into account in remyelination-based therapies for multiple sclerosis*. J Neurol Sci 274, 64-67.

Rodriguez, M. (2003). *A function of myelin is to protect axons from subsequent injury: implications for deficits in multiple sclerosis*. Brain 126, 751-752.

Rodriguez, M., Rivera-Quinones, C., Murray, P.D., Kariuki Njenga, M., Wettstein, P.J., and Mak, T. (1997). *The role of CD4+ and CD8+ T cells in demyelinating disease following Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis*. J Neurovirol 3 Suppl 1, S43-45.

Ron, D., and Habener, J.F. (1992). *CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription*. Genes Dev 6, 439-453.

Ross, R.A. (2003). *Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors*. Br J Pharmacol 140, 790-801.

Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., and Greasley, P.J. (2007). *The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor*. *Br J Pharmacol* 152, 1092-1101.

Rychly, J., and Nebe, B. (2006). *Therapeutic strategies in autoimmune diseases by interfering with leukocyte endothelium interaction*. *Curr Pharm Des* 12, 3799-3806.

## S

Sarne, Y., and Mechoulam, R. (2005). *Cannabinoids: between neuroprotection and neurotoxicity*. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4, 677-684.

Sato F, T.H., Hasanovic F and Tsunoda I (2010). *Theiler's virus infection: pathophysiology of demyelination and neurodegeneration*. *Pathophysiology* 18(1):31-41.

Scarisbrick, I.A., Yoon, H., Panos, M., Larson, N., Blaber, S.I., Blaber, M., and Rodriguez, M. (2012). *Kallikrein 6 Regulates Early CNS Demyelination in a Viral Model of Multiple Sclerosis*. *Brain Pathol*. Epub ahead of print.

Scuderi, C., Filippis, D.D., Iuvone, T., Blasio, A., Steardo, A., and Esposito, G. (2009). *Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders*. *Phytother Res* 23, 597-602.

Scherer, M.T., Ignatowicz, L., Winslow, G.M., Kappler, J.W., and Marrack, P. (1993). *Superantigens: bacterial and viral proteins that manipulate the immune system*. *Annu Rev Cell Biol* 9, 101-128.

Sheng, W.S., Hu, S., Min, X., Cabral, G.A., Lokensgard, J.R., and Peterson, P.K. (2005). *Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes*. *Glia* 49, 211-219.

Sinha, D., Bonner, T.I., Bhat, N.R., and Matsuda, L.A. (1998). *Expression of the CB1 cannabinoid receptor in macrophage-like cells from brain tissue: immunochemical characterization by fusion protein antibodies*. *J Neuroimmunol* 82, 13-21.

Smith, K.J., Blakemore, W.F., and McDonald, W.I. (1981). *The restoration of conduction by central remyelination*. *Brain* 104, 383-404.

Smith, K.J., Kapoor, R., and Felts, P.A. (1999). *Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species*. *Brain Pathol* 9, 69-92.

Southwood, C.M., Garbern, J., Jiang, W., and Gow, A. (2002). *The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease*. *Neuron* 36, 585-596.

Srivastava, M.D., Srivastava, B.I., and Brouhard, B. (1998). *Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells*. *Immunopharmacology* 40, 179-185.

Stangel, M., and Hartung, H.P. (2002). *Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis*. *Prog Neurobiol* 68, 361-376.

Stefani, I.C., Wright, D., Polizzi, K.M., and Kontoravdi, C. (2012). *The role of ER stress-induced apoptosis in neurodegeneration*. *Curr Alzheimer Res*. 9(3):373-87.

Stella, N. (2004). *Cannabinoid signaling in glial cells*. *Glia* 48, 267-277.

Sun, Y., and Bennett, A. (2007). *Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs*. *PPAR Res* 2007, 23513.

Szczuczinski, A., and Losy, J. (2007). *Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies*. *Acta Neurol Scand* 115, 137-146.

## T

Theiler, M. (1937). *Spontaneous Encephalomyelitis of Mice, a New Virus Disease*. *J Exp Med* 65, 705-719.

Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., and Pertwee, R.G. (2007). *Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro*. *Br J Pharmacol* 150, 613-623.

Trapp, B.D., Bo, L., Mork, S., and Chang, A. (1999). *Pathogenesis of tissue injury in MS lesions*. *J Neuroimmunol* 98, 49-56.

Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., and Bo, L. (1998). *Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis*. *N Engl J Med* 338, 278-285.

Traugott, U., and Lebon, P. (1988a). *Demonstration of alpha, beta, and gamma interferon in active chronic multiple sclerosis lesions*. *Ann N Y Acad Sci* 540, 309-311.

Traugott, U., and Lebon, P. (1988b). *Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis*. *Ann Neurol* 24, 243-251.

Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K., and Walker, J.M. (1998). *Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system*. *Neuroscience* 83, 393-411.

Tsunoda, I., and Fujinami, R.S. (1996). *Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus*. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 673-686.

Tsunoda, I., and Fujinami, R.S. (2002). *Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination*. *Springer Semin Immunopathol* 24, 105-125.

Tsunoda, I., Kuang, L.Q., Libbey, J.E., and Fujinami, R.S. (2003). *Axonal injury heralds virus-induced demyelination*. *Am J Pathol* 162, 1259-1269.

Tsunoda, I.a.F., RS (2008). *Neuropathogenesis of Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus infection, an animal model for Multiple Sclerosis*. *J Neuroimmune Pharmacol* doi 10.1007/s11481-009-9179-x

## U

Ure, D.R., and Rodriguez, M. (2002). *Preservation of neurologic function during inflammatory demyelination correlates with axon sparing in a mouse model of multiple sclerosis*. *Neuroscience* 111, 399-411.

## V

Vaccani, A., Massi, P., Colombo, A., Rubino, T., and Parolaro, D. (2005). *Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism*. *Br J Pharmacol* 144, 1032-1036.

van der Stelt, M., and Di Marzo, V. (2005). *Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection*. *Neuromolecular Med* 7, 37-50.

van der Voorn, J.P., van Kollenburg, B., Bertrand, G., Van Haren, K., Scheper, G.C., Powers, J.M., and van der Knaap, M.S. (2005). *The unfolded protein response in vanishing white matter disease*. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 770-775.

van Kollenburg, B., van Dijk, J., Garbern, J., Thomas, A.A., Scheper, G.C., Powers, J.M., and van der Knaap, M.S. (2006). *Glia-specific activation of all pathways of the unfolded protein response in vanishing white matter disease*. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 707-715.

## W

Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K., and Stella, N. (2003). *Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration*. *J Neurosci* 23, 1398-1405.

Walter, L., and Stella, N. (2004). *Cannabinoids and neuroinflammation*. *Br J Pharmacol* 141, 775-785.

Watzl, B., Scuderi, P., and Watson, R.R. (1991). *Marijuana components stimulate human peripheral blood mononuclear cell secretion of interferon-gamma and suppress interleukin-1 alpha in vitro*. *Int J Immunopharmacol* 13, 1091-1097.

Waxman, S.G. (2006). *Ions, energy and axonal injury: towards a molecular neurology of multiple sclerosis*. *Trends Mol Med* 12, 192-195.

Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2001). *Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses*. *Nature* 410, 588-592.

Willer, C.J., Dyment, D.A., Risch, N.J., Sadovnick, A.D., and Ebers, G.C. (2003). *Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12877-12882.

Willer, C.J., Dyment, D.A., Sadovnick, A.D., Rothwell, P.M., Murray, T.J., and Ebers, G.C. (2005). *Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study*. *BMJ* 330, 120.

Wotherspoon, G., Fox, A., McIntyre, P., Colley, S., Bevan, S., and Winter, J. (2005). *Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons*. *Neuroscience* 135, 235-245.

## Z

Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2008). *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response*. *Nature* 454, 455-462.

Zhao, J.W., Raha-Chowdhury, R., Fawcett, J.W., and Watts, C. (2009). *Astrocytes and oligodendrocytes can be generated from NG2+ progenitors after acute brain injury: intracellular localization of oligodendrocyte transcription factor 2 is associated with their fate choice*. *Eur J Neurosci* 29, 1853-1869.

Zuardi, A.W. (2008). *Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action*. Rev Bras Psiquiatr 30, 271-280.

## EPÍLOGO

---

Caemos más rápido que la velocidad de la luz. Y desde esta distancia al fondo de la tierra, comprendo (y acaso espero) que el simple hecho de chocar contra el núcleo no será capaz de romper nuestro espíritu en mil pedazos. Ni siquiera quebrantará esta voluntad que nos impulsa a agarrarnos con uñas y dientes a las paredes escarpadas del precipicio, como si al apretar la mandíbula consiguiésemos frenar (o acaso detener) la caída frentética.

Rápido. Salta. Huye.

Amordaza el grito que se escapa y se enreda entre el sondido de las campanadas de nuestra suerte metafórica, pues sólo una replicará eternamente recordando las vidas perdidas en el fondo de un vaso de cristal que contiene la esencia misma de las cosas.

Leyendo a Hesse recuerdo: *“La soledad era fría, es cierto, pero también era tranquila, maravillosamente tranquila y grande, como el tranquilo espacio frío en el que se mueven las estrellas”*. Soledad, fría y tranquila, que me ha llevado a convertirme (como diría Unamuno) en quien soy hoy en día a través de distintos estados de consciencia.

El primero de ellos, se lo debo a mi familia. A mi madre Teresa, el ser más hermoso que pueda llegar a existir sobre la faz de la tierra, a quien vuelvo una y otra vez como las olas del mar sobre la arena para alimentar este espíritu insaciable que nunca descansa. A mi padre Antonio, arrebatado de este mundo antes de tiempo, cuya vida y muerte moldearon hasta tal límite la entraña más profunda que pueda albergar mi cuerpo, que me hacen seguir buscándole en sueños una y otra vez en un bucle que se repite hasta el final del tiempo. A mis hermanos y sus parejas (Toni, Mayte, David, Vanessa, Jose, Patri), distintos e iguales al mismo tiempo, cuartos indivisibles y únicos de un todo que constituye este lugar espiritual insustituible al que llamamos hogar. A mi otra hermana Duna, ese animal cuyos ojos decían más que muchos tratados sobre psicología o amor, y cuya presencia siempre echaré de menos. Y por último a mis sobrinos Lucía, Dani, Alejandra, Pablo y Sara, cuya locura y alegría he redescubierto en mí misma gracias a sus preguntas y sus juegos. A todos ellos dirijo mi mirada en la oscuridad de la noche cuando necesito encontrar la luz del faro que me permita redirigir mi trayectoria errante. Sin ellos, no sé quien sería hoy en día, pero desde luego, no sería yo. Sería otra Miriam, en otra vida, en otro mundo, en otro sueño. Otro yo.

El segundo de ellos, se lo debo a mis amigos. Al núcleo indivisible que surgió del colegio y del instituto y a todos los que llegaron después para ampliar la familia, en la universidad, en mi primer laboratorio, en el Instituto Cajal, y en el resto de facetas de las que se compone mi vida. Amigos que me conocen tanto que sólo basta una mirada para comprender cualquier situación imaginable por el ser humano. Hemos crecido juntos, y eso es muy bello. Es más hermoso aun al comprender que seguimos llevándonos de la mano día a día por este sendero desconocido que es la vida, sendero que ya ha sido recorrido miles de millones de veces por otros pies distintos a los nuestros, y cuyo horizonte siempre se nos planteará incierto y peligroso. Y aunque haya perdido mucha gente por el camino que haya dejado una huella imborrable, sé que pase lo que pase los amigos seguirán ahí, aguantando despiertos hasta altas horas de la madrugada sólo para preguntar qué tal, buscando en el interior del corazón la herida abierta para intentar curarla, compartiendo felicidad, alegrías y sobre todo disfrutando de la vida. Con ellos, puedo permitirme el lujo de cerrar los ojos y dejarme llevar sin

importar hacia dónde me conduzca el camino, pues sin lugar a dudas lo mejor del viaje siempre seguirá siendo su compañía.

El tercero de ellos, se lo debo a mi primera jefa, María José. Ella me abrió la puerta al mundo de la investigación, me cogió de la mano y me ayudó a cruzar el umbral. Despertó en mí esa sed insaciable de conocimiento, esa búsqueda de respuestas a todas las preguntas inciertas que el cerebro humano es capaz de imaginar sobre sí mismo si es capaz de asumir la paradoja. Me enseñó a ser autosuficiente, a no rendirme nunca, a volver atrás en el tiempo para buscar el error y corregirlo. Me ayudó a dirigir mis pasos, y a ayudar a otros a dirigir los suyos. Ojalá (si vuelve a haber justicia en el mundo) algún día podamos volver a trabajar juntas y pueda volver a escuchar, sin restricciones, cómo esa risa suya tan especial que alegra la sangre y el alma vuelve a retumbar entre las paredes del laboratorio.

El cuarto de ellos, se lo debo a mi actual jefa y directora de tesis, Carmen. Ella apostó fuerte por mí desde el primer momento, me alojó debajo de su ala y cuidó todos los pensamientos que surgían de nuestra mente científica para ayudarme a volar libre, protegida, segura. Volar hacia una meta que culmina en el texto que se recoge en esta tesis, permitiendo que durante el trayecto aprendiese cosas nuevas, que me pelease gracias a su apoyo con las técnicas y los resultados, que cometiese mis propios errores para enseñarme, siempre afable, a solucionarlos, y sobre todo que siguiese creciendo como investigadora y como persona. Gracias a ella construimos este pequeño hogar que es el laboratorio C-05, donde seguimos compartiendo (los que estuvieron y los que ahora están) mucho más que ciencia. Y también, gracias a ella, quiero seguir trabajando en esto. Esta tesis va sobre todo por ti, Carmen. Gracias por confiar en mí.

El último estado de consciencia, no por ello menos importante y aun a riesgo de parecer vanidosa, me lo debo a mí misma. A la Miriam que respira, la que ríe, la que sufre. A la que se preocupa, se emociona y hace todo lo posible por no hacer daño. A la que tiembla, la que se pregunta, la que intenta mirar más allá. A la que no pierde la perspectiva del interior o del exterior, la que suspira, la que se emociona. A ese yo que siente la palabra y la música, que intenta comprender a los demás, al que se levanta una y otra vez para seguir adelante y al que quiero (sin dudarlo) seguir descubriendo.

Por eso deseo terminar este escrito con la frase de una canción de mi querida banda de música Alter Bridge, que dice “*We could be so much more than we are*”.

Podemos ser mucho más de lo que somos.

Seámoslo.

## ANEXOS

---

**MEJORA DEL PROTOCOLO DE OBTENCIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS PRECURSORAS DE OLIGODENDROCITOS DE RATA** publicado en Nature Protocol Exchange, con doi:10.1038/protex.2011.218

**AN EASY AND FAST WAY TO OBTAIN A HIGH NUMBER OF GLIAL CELLS FROM RAT CEREBRAL TISSUE: A BEGINNERS APPROACH.**

Miriam Mecha, Paula M. Iñigo, Miriam Hernangómez, Leyre Mestre, José Borrell and Carmen Guaza

Neuroimmunology Group, Neural Plasticity Department, Cajal Institute, CSIC, 28002 Madrid, Spain.

Corresponding Author: Carmen Guaza, Neuroimmunology Group, Neural Plasticity Department, Cajal Institute, CSIC, 28002 Madrid, Spain. E-mail: [cgjb@cajal.csic.es](mailto:cgjb@cajal.csic.es)

**Primary glial cell cultures are the most commonly used *in vitro* model for neurobiological studies. However, the lack of an easy and fast protocol for the isolation and culture of these cells leads to long incubating times with the use of high number of rat brains. Here, we describe a quick protocol based on mixed glial culture for the highly-enriched isolation of microglia, astrocyte and oligodendrocyte cells. The procedure is suitable for beginners as it makes available the easier way to obtain the nervous tissue, the evolution of the mixed culture throughout the time, and the final results after the isolation of each cell type. More than  $20 \times 10^6$  cells per rat brain can be obtained using this protocol, with no more than 11 days of incubation. This facilitates the use of the primary culture as a tool for researchers to study the development, properties and functions of glial cells *in vitro*.**

## INTRODUCTION

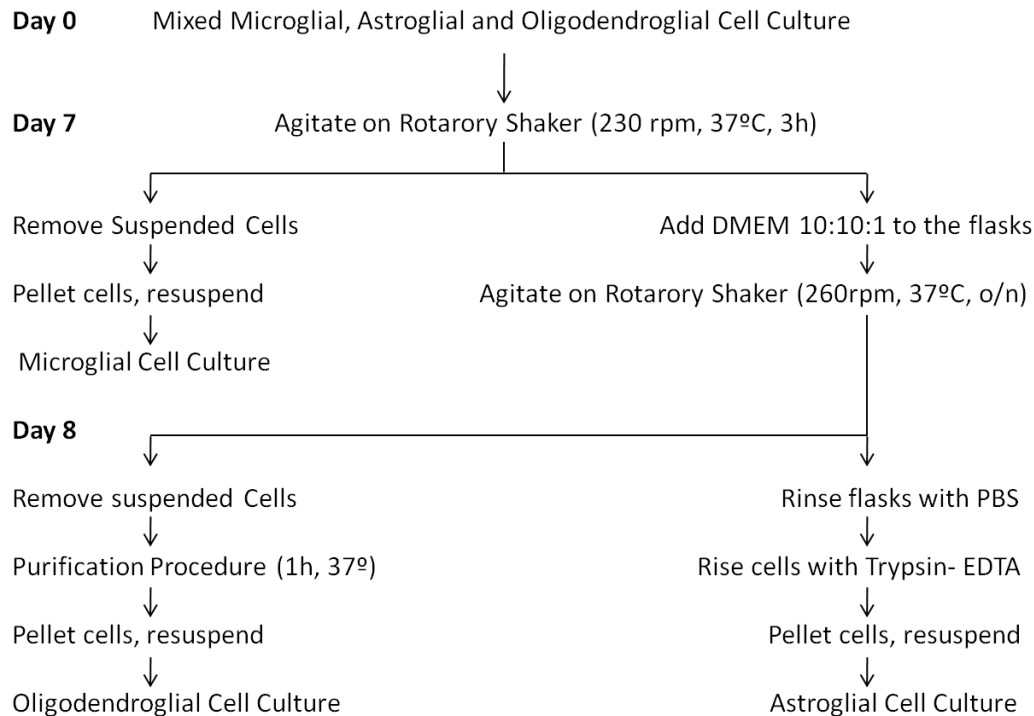
Glial cells are a highly specialized population of the Central Nervous System (CNS) that maintain homeostasis, permit the transmission of the electrical impulse or act as supportive and active cells for neuronal networks. In mammalian, glia is referred to microglial, oligodendroglial and astroglial cells. Microglial cells are derived from myeloid lineage and are the resident immune cell population in the CNS. They become activated in response to alterations in the environment like neuronal damage, as a physiological response to restore the homeostasis of the CNS<sup>1</sup>. Oligodendrocytes are the cells responsible for myelin synthesis in the CNS. They can be found as progenitor cells (termed O2A cells *in vitro* as they can develop into either oligodendrocytes or type-2 astrocytes depending on the culture conditions<sup>2</sup>) or as mature oligodendrocytes that assemble and maintain myelin sheaths around the axons<sup>3</sup>. Astrocytes are the cells that provide trophic, metabolic and structural support for neural networks. They also have a critical role in the maintenance of the Blood Brain Barrier, Ca<sup>2+</sup> signaling or synaptic transmission, among others<sup>4</sup>.

During the past years, the development and improvement of techniques to grow cerebral tissue *in vitro* has led to a better understanding of the composition, function and biochemical structure of the brain. Particularly, the primary culture of glial cells is a highly powerful tool for neuroscientists to investigate interactions, properties and differentiation of these cells at the cellular and molecular level as they develop in culture in the same schedule as *in vivo*<sup>5</sup>.

Among the techniques used for this approach, the most popular are Flow Cytometry sorting<sup>6</sup>, Percoll Gradient<sup>7</sup> and Mixed Primary glial culture<sup>8</sup>. In rats, the highest yield of the cell culture fluctuates between:  $2,7 \times 10^4$  and  $1 \times 10^6$  for microglial cells/brain<sup>8,9</sup>,  $7,5 \times 10^5$  and  $1 \times 10^5$  for O2A cells/brain<sup>8,10</sup>, and  $1,5 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  for astrocytes/brain<sup>8,11</sup> with time considerations that often includes 6h of dissection and plating of nervous tissue plus 2-3 weeks of incubation. Moreover, these protocols require a high number of pups to increase the yield of one type of these cells, usually by decreasing the number of the others if a specific media is used<sup>12</sup>.

We developed an economic, simple, and reproducible protocol (Fig.1), improved from previous modifications of our group<sup>13</sup> that were made according to the technique described by McCarthy and de Vellis<sup>14</sup>. The method we show here is by far an easy, fast and economic way to obtain microglial, astroglial and oligodendroglial cells with high

yield rates, high purity, low waiting times and low number of animals used, which supposes a useful method for *in vitro* studies such as assays of toxicity, cell division, migration, differentiation or apoptosis.



**Figure 1. Flow chart for the preparation of separate microglial, oligodendroglial and astroglial culture**

### **Experimental design**

The following points should be considered before beginning the experiment:

- (1)The use of newborn rat pups ensures the absence of viable neurons in de subsequent culture, and allows an easy separation of the meninges from the cerebral tissue.
- (2)The length of the mixed glial culture should be held between 7 and 10 days because of the stratification of the cells in the culture flasks. At first, the nature of the separation procedure is mechanical, so longer times will lead to the clustering and detachment of astrocytes above the normal bed layer that will contaminate the other two types of cell cultures when isolated.
- (3)The mixed cell culture should be held in DMEM supplemented with 10% Horse Serum, 10% Fetal Calf Serum and 1% antibiotics (DMEM 10:10:1), so it can promote the proliferation of the three types of glial cells at the same time.

(4) There's no need to change the culture media until the second shaking step, as the production of conditioned media by astrocytes also promotes the proliferation of the mixed cell culture.

## **MATERIALS**

### **REAGENTS**

- Wistar rats (Harlan industries Inc)

CAUTION Experiments involving live animals must conform to National and Institutional regulations

- Dulbecco's modified Eagle's Media (DMEM, Lonza BE12-604F)
- DMEM/F12 (Gibco, 31331-028)
- Phosphate Saline Buffer (PBS, Gibco, 10010-015)
- Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, 10270-106)
- Horse Serum (HS, Gibco, 26050-088)
- Penicillin/Streptomycin (Gibco, 15070-063)
- Bovine Serum Albumine (BSA, Gibco, 15260-037)
- Apo-transferrin (Sigma, T1147)
- Insuline (Sigma, 11070-73-8)
- Putrescine dihydrochloride (Sigma, P7505)
- Progesterone (Sigma, P6149)
- Sodium Selenite (Sigma, S9133)
- D-Biotin (Sigma, B4639)
- Hydrocortisone (Sigma, 07904)
- Human PDGF-AA (Peprotech, 100-13A)
- Basic FGF (Peprotech, 100-18B)
- Poly-D-Lysine (Sigma, P7280)
- Trypsin/EDTA (Gibco, 15090)
- Trypan Blue (Sigma, T8154)

### **EQUIPMENT**

- Laminar flow hood
- Dissecting magnifying glass

- Water bath at 37°C
- Humidified tissue culture incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
- Sterilized microdissecting instruments: large dissecting scissors, mouse-teeth forceps, curved forceps and fine Dumont forceps
- Orbital Shaker (Boeco OS 20)
- Tabletop centrifuge
- 50 ml plastic conical tubes (Sarstedt, 62.547.004)
- T75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks with plug-seal (BD Falcon, 137787)
- Tissue culture plates (Falcon)
- Petri dishes (Sterilin)
- 30 µm sterile nylon mesh (Saatile, Hitech)

## REAGENT SETUP

**DMEM 10:10:1** DMEM, 10% of Fetal Bovine Serum, 10% of Horse Serum, 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)

**DMEM 5:5:1** DMEM, 5% of Fetal Bovine Serum, 5% of Horse Serum, 1% P/S

**SERUM FREE MEDIUM + GROWTH FACTORS** DMEM/F12 containing 25 µg/ml transferrin, 10 nM biotin, 30 nM sodium selenite, 1 µg/ml putrescine, 5 µg/ml insulin, 20 nM hydrocortisone, 20 nM progesterone, 1% P/S + Growth Factors (5 ng/ml PDGF-AA and 5 ng/ml bFGF)

**Trypsin/EDTA solution** 0.05% Trypsin + 0,02% EDTA in HBSS w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>

## EQUIPMENT SETUP

**Poly-D-Lysine-coated flasks** Dilute 5 mg of the product in 50 ml of sterile MilliQ H<sub>2</sub>O, to make a 20x stock solution. 10ml aliquots can be stored at -20°C and diluted in 190ml of MilliQ H<sub>2</sub>O to make the 1x working concentration solution (5 µg/ml). Coat the culture flasks with 5ml of 1x Poly-D-Lysine (for 1-2h, or overnight) in a 37°C incubator. Remove the coating solution, while the centrifugation step of the tissue homogenate, and wash once with 5ml of sterile MilliQ H<sub>2</sub>O. Keep in the laminar flow hood until use.

**Poly-D-Lysine-coated plates** Coat the culture plates with 1x Poly-D-Lysine and keep overnight in a 37°C incubator. Remove the coating solution while the centrifugation step of the cell supernatant, wash once with 5ml of sterile MilliQ H<sub>2</sub>O, and keep in the

laminar flow hood until use for microglial/astrocyte cells. For OPCs, wash while the purification step and air-dry in the laminar flow hood until use. In all cases, plates can be stored at 4°C under sterile conditions until use.

Poly-D-Lysine from coated flasks/plates can be used twice if stored at 4°C under sterile conditions.

## **PROCEDURE**

### **1 | Preparation of mixed glial cell culture TIMING ~ 7-10 days**

- (i) Dissect the brains: decapitate P0-P2 neonatal rat pups using sterile large scissors and gently place the head into a petri dish containing 70% Ethanol.
- (ii) Transfer the head to a petri dish containing cold DMEM.
- (iii) Use Mouse-teeth forceps to hold the nose portion of the head, and follow the midline to cut the skin and the skull from the nose to the foramen magnum using curved forceps.

CAUTION Make precision movements with the curved forceps as the skull is very soft, in order to avoid the damage of the brain.

- (iv) Expose the whole brain, and keeping intact the olfactory bulbs, remove the nervous tissue from the skull base.
- (v) Place the head in a new petri dish containing cold DMEM.
- (vi) Under a dissecting magnifying glass and using thin Dumont forceps, remove the meningeal layer from the brain following the instructions showed in Supplementary video 1 online. Briefly, remove the meningeal layer from the inner midbrain, cut the meninges between the hemispheres and eliminate them. Then, clamp the olfactory bulbs and remove the meningeal layer from both hemispheres. Carefully open the hemispheres, remove the choroideal plexus covering of the inside, and remove brainstem and cerebellum.

CRITICAL STEP Avoid spending more than 5 minutes in the dissection of each forebrain to minimize the ischemic damage to the brain tissue.

- (vii) Place all the forebrains in new petri dishes containing cold DMEM.
- (viii) Using the Dumont forceps, transfer the forebrains to a 50ml Falcon tube. Transfer also ~ 0.5 ml of DMEM media to the tube.

(ix) Gently triturate and dissociate the nervous tissue with a serum-coated Pasteur Pipette, adding small amounts of DMEM as long as the content is being aspirated and discarded, until a homogenate can be found in the media.

CAUTION Cells can be attached to the Pasteur pipette if it's not a serum-coated one.

(x) Centrifuge the tubes for 10 min to 168g (~1000 r.p.m.).

(xi) Discard the supernatant by aspiration, and suspend the pellet in 20 ml of warm DMEM 10:10:1 per forebrain.

CAUTION The pellet is very loose and it can be aspirated, so take care when removing the supernatant.

(xii) Seed Poly-D-Lysine covered 75 cm<sup>2</sup> flasks with 10 ml of cell suspension/each.

CAUTION Use Poly-D-lysine covered flasks to allow an easy attachment of the cells to the surface.

(xiii) Incubate at 37°C in water saturated 5% CO<sub>2</sub>:95% air atmosphere for 7 to 10 days, without changing the culture medium along this time. See Supplementary video 2 online to find out the evolution of the culture in this time.

## **2 | Isolation of microglial cells TIMING ~ 30 min to 24h**

(i) After the incubation time, properly close the flasks and place them in an orbital shaker.

(ii) Shake at 230 r.p.m during 3 hours.

(iii) Centrifuge the cell suspension for 10 min to 168g. If you want to proceed with the isolation of OPCs/astrocytes (steps 3 and 4), immediately add warm DMEM 10:10:1 (10ml/each) to the flasks and place them in the orbital shaker.

(iv) Discard the supernatant by aspiration, and suspend the pellet in 1ml of warm DMEM 10:10:1.

CAUTION The pellet is very loose and it can be aspirated, so take care when removing the supernatant.

(v) Determine the number of viable cells by gently mixing 10 µl of homogenate with 80 µl of PBS and 10 µl of Trypan Blue. Use a Neubauer chamber to count the number of viable (not stained) microglial cells.

CAUTION To calculate the number of viable cells, divide the whole number of cells counted by 4 (as 4 is the number of quadrants in the Neubauer chamber), and

multiplicate by  $10^5$  (the dimension of the Neubauer chamber is  $10^4$  and we have done an additional x10 dilution).

(vi) Dilute the cell suspension to the desired cell concentration with warm DMEM 10:10:1. Incubate for 24h in a tissue culture incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

(vii) At this point, microglial cells can be used to perform in vitro experiments.

CAUTION Use Poly-D-lysine covered plates to avoid clustering of the cells.

### **3 | Isolation of Oligodendrocyte Progenitor Cells (OPCs) TIMING ~ 1h30min to 3 days**

(i) Shake at 260 r.p.m overnight.

CAUTION A completely closed environment with presumably a low O<sub>2</sub> level allows OPCs to detach easily from the astrocyte layer, so be sure that the flasks are completely closed before shaking.

(ii) Filter cell suspension through a sterile 30 µm nylon mesh. If you want to proceed with the isolation of astrocytes (step 4), immediately add warm DMEM 10:10:1 to the flasks (5-10 ml/each) and keep them in the incubator.

CRITICAL STEP Avoid pipette passage of the OPCs as they can easily attach even to serum-coated pipettes. Filtration can be done directly from the flasks to the petri dishes.

(iii) Transfer filtered cell suspension to untreated Petri dishes and incubate for 1h -1h30 min, CRITICAL STEP This incubation is done to purificate OPCs, as it's based on the low attachment of the O2A cells to the plastic surface, whereas the remaining microglial or astroglial cells that can be present in the suspension are attached to the dishes.

(iv) Centrifuge the cell suspension for 10 min to 168g.

CRITICAL STEP Again, avoid pipette passage of the OPCs. Cells can be transferred directly from the petri dishes to the falcon tubes.

(v) Discard the supernatant by aspiration, and suspend the pellet in 1ml of warm DMEM 10:10:1.

CAUTION The pellet is very loose and it can be aspired, so take care when removing the supernatant.

(vi) To determine the number of viable cells, repeat step 2 v).

(vii) Dilute the cell suspension to maximum 100.000 viable cells/ml with warm DMEM 10:10:1.

**CRITICAL STEP** As OPCs continue proliferating after cultured, a high initial density can result in an excessive final number of cells that can be detrimental for the culture.

(viii) Plate and incubate for 3h in a tissue culture incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

**CAUTION** Use Poly-D-lysine covered plates to allow the OPCs to attach and proliferate.

(ix) Change the culture media to a Serum-free Defined Media containing growth factors.

(x) Incubate for 2-3 days in order to allow the progenitor cells to proliferate.

(xi) At this point, OPCs can be used to perform in vitro experiments.

**CAUTION** Change the OPCs medium every 48h to renew the growth factors and maintain them in a progenitor (bipolar) state.

#### **4 | Isolation of astroglial cells TIMING ~ 45 min to 24h**

(i) Replace the culture media of the flasks with 5 ml of warm PBS/each. Wash twice while gently shaking the flasks in the laminar flow hood.

**CAUTION** Wash the monolayer properly to remove all the traces of serum, so the enzyme can be effective.

(ii) Remove the PBS and add 5ml of Trypsin (0.05%) - EDTA(0.02%). Place the flasks in the incubator for 5-10 minutes and gently shake them to raise the cells from the bottom.

**CRITICAL STEP** Trypsinization needs to be effective to lift up the astrocyte monolayer. The time required for removal of cells depends on their density, serum concentration and temperature.

(iii) Add 5ml of DMEM 5:5:1/each to inactivate the enzyme, gently mix and collect all supernatants.

(iv) Pellet by centrifugation for 10 min to 168g.

(v) Discard the supernatant by aspiration, and suspend the pellet in 1ml of warm DMEM 5:5:1.

**CAUTION** The pellet is very loose and it can be aspirated, so take care when removing the supernatant.

(vi) To determine the number of viable cells, repeat step 2 v).

(vii) Dilute the cell suspension to the desired number of cells with warm DMEM 5:5:1.

(viii) Plate and incubate for 24h in a tissue culture incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

CAUTION Use Poly-D-lysine covered plates to avoid clustering of the cells.

(ix) At this point, astrocytes can be used to perform in vitro experiments.

## **TIMING**

(1) Preparation of mixed glial cell culture from 3 rats

Steps i-xii, Dissection and plating of forebrains: 1h

Step xiii, culture of rat mixed glial culture: 7~10 days

(2) Isolation of microglial cells

Step i, shaking of mixed cultures: 3h

Steps ii-vii, plating of microglial cells: 30 min

Step viii-ix, culture of microglial cells: 24h

(3) Isolation of oligodendroglial cells

Step i, shaking of oligodendroglial-astroglial cultures: 18h

Steps ii-iii, purification of OPCs: 1~2h

Steps iv-ix, plating of OPCs: 3h 30 min

Step x-xii, culture of OPCs: 3~4 days

(4) Isolation of astroglial cells

Steps i-vii, plating of astrocytes: 45 min

Steps viii-ix, culture of astrocytes: 24h

## **TROUBLESHOOTING**

Some tricks can be applied to improve the development of the culture:

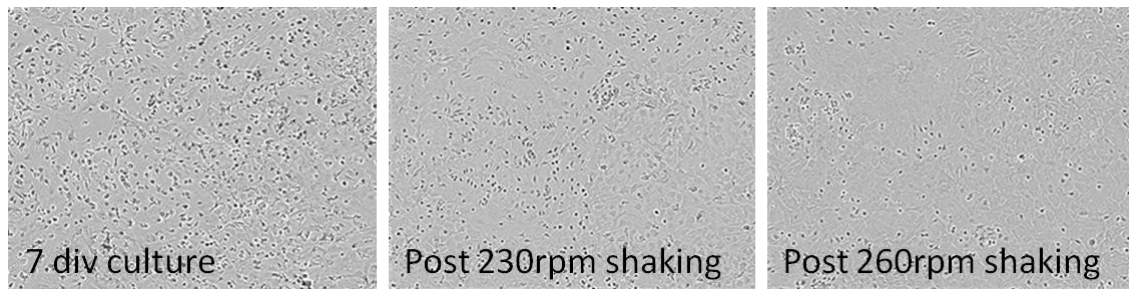
- (1) In the dissection procedure, leave the olfactory bulbs intact so they can help you to remove quickly the meninges from the cerebral hemispheres.
- (2) If the meninges have not been completely removed, forebrain-cell suspension can be passed through a 150µm nylon mesh after the mechanical dissociation, to prevent the contamination with fibroblasts.
- (3) If the mechanical dissociation of the nervous tissue isn't enough to obtain a homogenate, a serum-coated fire polished Pasteur pipette (with decreased diameter of the tip) can be used to ensure the triturating of the forebrains.

- (4) Avoid the use of plastic/glass pipettes by passing the cells directly from the flask to the falcon or the Petri dish; if needed, they can be coated with Horse Serum or Fetal Serum simply taking some milliliters and releasing them, as this coating provides a smooth hydrophobic barrier so the adherence of cells to the glass/plastic surface is greatly reduced, and minimizes physical damage to the cells.
- (5) P2 animals have more OPCs than younger ones: use them instead of P0 pups if a higher number of OPCs is needed.
- (6) If a high number of pups is used, increase the volume to determine the number of viable cells (i.e. for 3 pups, 2 ml) to facilitate the cell countings.

## **ANTICIPATED RESULTS**

One of the most important remarks in this protocol is that it allows the simultaneous preparation of three glial cell type (microglial, oligodendroglial and astroglial) cultures from rat cerebral forebrains, obtaining a high number of cells with low time considerations and easy steps, and thereby optimizing the use of live animals used for *in vitro* approaches. See the flow chart showed in Figure 1 to visualize the whole protocol steps.

- (1) Using the method showed in Supplementary video 1 online, the time spent in the dissection is around 5 minutes/forebrain, which ensures a subsequent high viability as nervous tissue undergoes autolysis relatively quickly and it can be detrimental for the cells.
- (2) With our procedure and reagents, the evolution of the mixed glial culture (see Supplementary video 2 online) reaches confluence in just 7 days *in vitro*: at this time, no debris at all can be found in the culture media, and we can find a confluent monolayer of astrocytes, and over it a large number of O2A cells (strongly attached) and microglial cells (poorly attached or floating in the media). It allows the mechanical separation of each layer of cells in the shaking steps of the protocol (Figure 2), ensures a high viability of the cells, and decreases the time spent until each type of cell can be used.



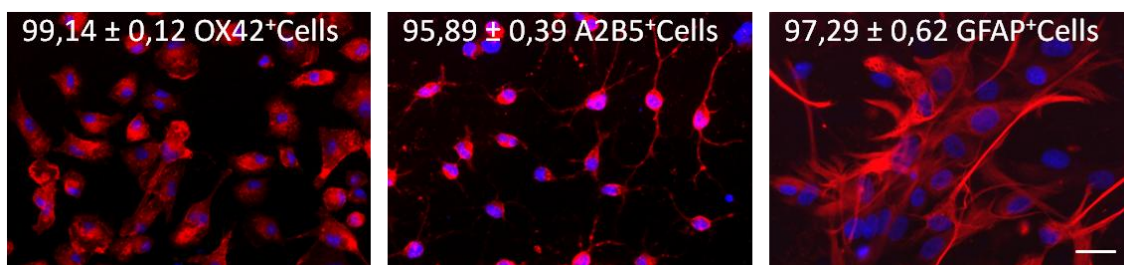
**Figure 2. Phase contrast images of the glial culture at different times**

(3) The protocol described above results in the isolation of (per forebrain, and depending on the researcher's expertise):

- (i)  $7 \times 10^6$  microglial cells - 7 folds higher than previous reports<sup>9</sup> -.
- (ii)  $5,5 \times 10^6$  Oligodendrocyte Progenitor Cells - 55 folds higher than the number of OPCs obtained from optic nerve<sup>10</sup> and 5.5 folds higher than rat brain extracts<sup>15</sup> -.
- (iii)  $13 \times 10^6$  astrocyte cells - 1.3 folds above previous publications<sup>11</sup> -.

This increases considerably the yield of the culture when comparing to other protocols.

(4) The purity of each cell culture is similar to the obtained in other approaches. It was assessed by immunocytochemistry using OX42 as a microglial marker (99,14% purity), A2B5 as a OPC marker (95,89% purity) and GFAP as an astrocyte marker (97,29% purity), and is shown in Figure 3.



**Figure 3. Immunocytochemistry and purity of microglial, oligodendroglial and astroglial cultures**

(5) This method also allows the obtaining of pre-oligodendrocytes and mature oligodendrocytes, by changing the culture media to a Serum Free Defined Media containing triiodothyronine and without growth factors (see ref<sup>13</sup> for further details).

Although many studies have been published to isolate and purificate glial cells, the protocol that's shown here is one of the faster and easiest approach available to obtain high amounts of microglial, oligodendroglial and astroglial cells, that reduces considerably the number of animals used for all types of *in vitro* experiments.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2007/60038, CAM S-SAL0261/2006), and by the ISCIII, RETICS Program (Red Española de Esclerosis Múltiple, RD07/0060/0010). We are grateful to Dr. Molina-Holgado for his kindly advice and to E. Baides, A. Hernandez and J. Sancho for their excellent technical assistance.

## COMPETING FINANTIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

1. Prinz M, Mildner A. (2010). "Microglia in the CNS: immigrants from another world." *Glia* (in advance of print).
2. Espinosa de los Monteros, A., Zhang MS, de Vellis J (1993). "O2A progenitor cells transplanted into the neonatal rat brain develop into oligodendrocytes but not astrocytes." *PNAS* 90: 50-54
3. Miron VE, Kuhlmann T. a. Antel J. (2010). "Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination." *Biochimica et Biophysica Acta* doi:10.1016/j.bbadis.2010.09.010
4. Nag S. (2011). "Morphology and properties of astrocytes." *Methods Mol. Biol.*(686): 69-100.
5. Abney ER, Bartlett P., Raff MC (1981). "Astrocytes, ependymal cells and oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cell cultures of embryonic rat brain." *Dev Biol* 83: 301-310.
6. Gard A.L., Burrell M. R., Pfeiffer S.E., Rudge J.S., Williams II W.C. (1995). "Astroglial control of oligodendrocyte survival mediated by PDGF and Leukemia Inhibitory Factor-like protein." *Development* 121: 2187-2197.
7. Cardona A.E., Huang D., Sasse M.E., Ransohoff R.M. (2006). "Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry." *Nature Protocols* 1: 1947-1951.
8. Cunha A., V. L. (1991). "Simultaneous preparation of four cell type enriched glial cultures from rat cerebral cortex." *Dev Biol* 13: 31-38.
9. Ni, M. a. A., M (2010). "Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing and selected applications." *Curr Protocol Toxicol* 12.17.1-12.16.16.
10. Böger, O. (2001). "Isolation and purification of primary oligodendrocyte precursors." *Curr Protoc Neurosci*.
11. Allen JW, Mutkus LA, Aschner M. "Isolation of neonatal rat cortical astrocytes for primary cultures". *Curr Protoc Toxicol* 12.4.1-12.4.15.
12. Colton CA, Y. J., Taffs RE, Keri JE, Oster-Granite ML. (1999). "Abnormal production of interleukin-1 by microglia from trisomy 16 mice." *Neuroscience Letters* 132: 270-274.

13. Molina-Holgado E., Vitkovic J. M., Arévalo-Martín A., Almazán G., Molina-Holgado F., Borrel J., Guaza C. (2002). "Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling." *J Neurosci* 22(22): 9742-9753.
14. McCarthy K.D. and De Vellis, J. (1980). "Preparation of separate astroglial and microglial cell cultures from rat cerebral tissue." *J Cell Biol* 85: 890-902.
15. Yang Z., Watanabe M., Nishiyama A. (2005). "Optimization of oligodendrocyte progenitor culture method for enhanced survival." *J Neurosci Methods* 149(1): 50-56.

# Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress

M Mecha<sup>1</sup>, AS Torrao<sup>1,2</sup>, L Mestre<sup>1</sup>, FJ Carrillo-Salinas<sup>1</sup>, R Mechoulam<sup>3</sup> and C Guaza<sup>\*1</sup>

Cannabidiol (CBD) is the most abundant cannabinoid in *Cannabis sativa* that has no psychoactive properties. CBD has been approved to treat inflammation, pain and spasticity associated with multiple sclerosis (MS), of which demyelination and oligodendrocyte loss are hallmarks. Thus, we investigated the protective effects of CBD against the damage to oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) mediated by the immune system. Doses of 1  $\mu$ M CBD protect OPCs from oxidative stress by decreasing the production of reactive oxygen species. CBD also protects OPCs from apoptosis induced by LPS/IFN $\gamma$  through the decrease of caspase 3 induction via mechanisms that do not involve CB1, CB2, TRPV1 or PPAR $\gamma$  receptors. Tunicamycin-induced OPC death was attenuated by CBD, suggesting a role of endoplasmic reticulum (ER) stress in the mode of action of CBD. This protection against ER stress-induced apoptosis was associated with reduced phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , one of the initiators of the ER stress pathway. Indeed, CBD diminished the phosphorylation of PKR and eIF2 $\alpha$  induced by LPS/IFN $\gamma$ . The pro-survival effects of CBD in OPCs were accompanied by decreases in the expression of ER apoptotic effectors (CHOP, Bax and caspase 12), and increased expression of the anti-apoptotic Bcl-2. These findings suggest that attenuation of the ER stress pathway is involved in the 'oligoprotective' effects of CBD during inflammation.

*Cell Death and Disease* (2012) 3, e●; doi:10.1038/cddis.2012.71; published online XX XX 2012

**Subject Category:** Neuroscience

Cannabidiol (CBD) is the most abundant cannabinoid in *Cannabis sativa* that is devoid of psychoactive properties. CBD exerts anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective effects,<sup>1</sup> and it has been approved for the treatment of inflammation, pain and spasticity associated with multiple sclerosis (MS).<sup>2</sup> Studies in an animal model of EAE have shown that CBD ameliorates the severity of the disease by attenuating neuroinflammation and axonal damage.<sup>3</sup> Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) are relatively quiescent cells derived from precursors of the perinatal CNS that make up around 5–8% of the glial cell population in the adult; in the injured CNS, they can divide and are thought to differentiate to new myelinating oligodendrocytes that replace those that have been lost in demyelinating areas.<sup>4</sup> OPCs are highly vulnerable to inflammation and oxidative stress as they have a high metabolic rate, high intracellular iron, and low concentrations of the antioxidative glutathione; they also express an arsenal of molecules rendering them susceptible to inflammatory cytokines or high calcium levels among others.<sup>5</sup> It is known that inflammation contributes to oligodendroglial damage in demyelinating diseases such as MS.<sup>6</sup> Synthetic cannabinoids such as WIN 55212-2 and HU211 can protect oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) from the apoptosis induced by the withdrawal of trophic support,<sup>7</sup> although their utility is limited due to their unwanted psychotropic effects. However, little is known about the effects of CBD on the apoptosis of OPCs

induced by inflammation. Although CBD induces cytotoxicity in oligodendrocytes of the optic nerve under basal conditions by increasing intracellular calcium,<sup>8</sup> it also prevents apoptotic signaling in neurons by reducing calcium influx.<sup>9</sup> The pharmacological basis of the effects of CBD remains elusive, although multiple potential targets of CBD have been proposed in function of the stimuli and cell type involved.<sup>1</sup>

The endoplasmic reticulum (ER) stress response modulates the response of oligodendrocytes to inflammatory stimuli,<sup>10</sup> and it involves the activation of the double-stranded RNA-activated serine/threonine kinase (PKR), which has been implicated as an important component of host responses to infection and various situations of cellular stress.<sup>11</sup> PKR is one of the ER transmembrane protein factors that coordinates an adaptive program known as the integrated stress response by phosphorylating the translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ).<sup>12</sup> Oligodendrocytes produce vast amounts of myelin and they are highly sensitive to homeostatic changes in the ER.<sup>10</sup> The most rapidly activated pathway in conditions of ER stress involves translational repression, which can be mediated by the activation of PKR among others, and results in the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ .<sup>13</sup> Although this pathway appears to offer cytoprotection to a variety of cell types,<sup>14</sup> it can also activate apoptosis in others<sup>15</sup>; particularly in oligodendrocytes the ER stress outcome may be determined by the developmental status of the cell, as in fully

<sup>1</sup>Department of Functional and Systems Neurobiology, Neuroimmunology Group, Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and <sup>3</sup>Institute of Drug Research, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel

\*Corresponding author: C Guaza, Department of Functional and Systems Neurobiology, Neuroimmunology Group, Cajal Institute, CSIC, Avda. Dr. Arce 37, 28002 Madrid, Brazil. Tel: + 34 5854742; Fax: + 34 5854754; E-mail: cgjb@cajal.csic.es

**Keywords:** cannabidiol; OPCs; inflammation; oxidative stress; ER stress; multiple sclerosis

Received 28.2.12; revised 8.5.12; accepted 11.5.12; Edited by D Bano

myelinated mature oligodendrocytes it promotes cell survival, but in actively myelinating/remyelinating oligodendrocytes leads to cell death.<sup>10</sup> Indeed, ER stress has been linked with the apoptosis of myelinating oligodendrocytes induced by IFN $\gamma$ <sup>16</sup> and during ischemia.<sup>17</sup> Moreover, several human diseases that involve demyelination/hypomyelination appear to involve aggravated ER stress. In Charcot–Marie–Tooth disease,<sup>18</sup> Vanishing White Matter disease,<sup>19,20</sup> and even in immune-mediated demyelinating disorders such as MS,<sup>21</sup> severe ER stress and activation of the unfolded protein response (UPR) are considered central to the pathogenesis of the disease.

In the present study, we provide evidence that CBD offers protection to OPCs against inflammation-induced damage, as well as protecting OPCs from oxidative stress by decreasing ROS production. Finally, we demonstrate that the protective effects of CBD against inflammatory damage and ER stress are associated with modifications in the expression of apoptotic effectors of the UPR.

## Results

### Dose–response studies of the effects of CBD on OPCs.

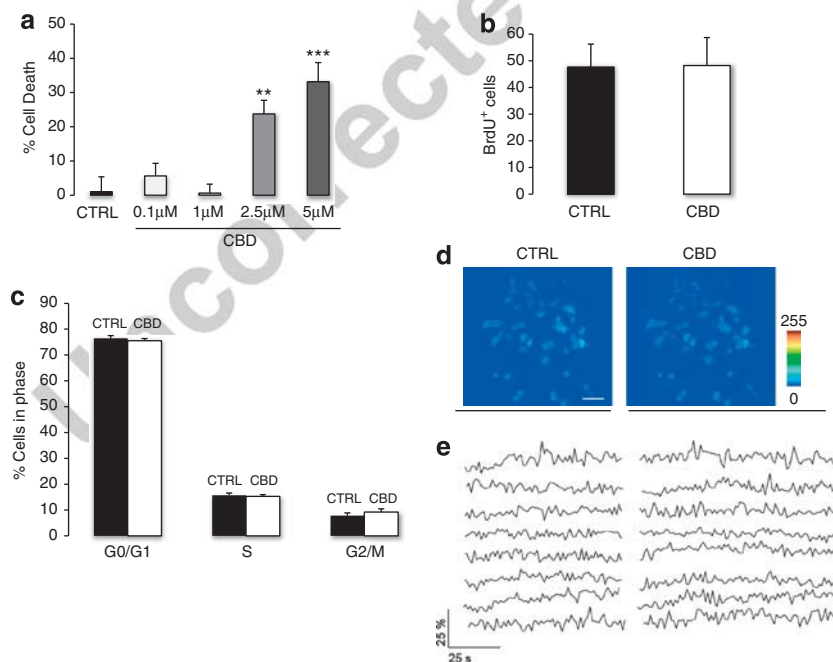
As CBD has different effects on distinct cell types, we evaluated its effects on primary OPC cultures under basal conditions. In dose–response experiments (0.1, 1, 2.5 and 5  $\mu$ M) CBD failed to induce cell death at low concentrations (0.1 and 1  $\mu$ M: Figure 1a), although some cytotoxicity was observed

at higher concentrations, resulting in the death of  $23.38 \pm 3.98\%$  of cells ( $P \leq 0.01$ ) after a 24-h exposure to 2.5  $\mu$ M CBD, and of  $33.13 \pm 5.6\%$  ( $P \leq 0.001$ ) at 5  $\mu$ M. Based on these findings, a dose of 1  $\mu$ M was selected for the subsequent experiments.

We next investigated the effect of CBD (1  $\mu$ M) on the cell cycle by evaluating OPC proliferation. Quantification of BrdU<sup>+</sup> cells in OPC primary cultures ( $n = 10\,000$  cells, Figure 1b) revealed that CBD did not increase the proliferation of OPCs *in vitro* ( $47.65 \pm 8.61\%$ ) with respect to the controls ( $48.21 \pm 10.5\%$ ). These results were confirmed by subsequently analyzing the cell cycle by flow cytometry (Figure 1c), in which no differences were observed between G0/G1, S and G2/M phases.

At doses of 0.1 and 1  $\mu$ M, CBD has been reported to increase intracellular Ca<sup>2+</sup> and to induce oligodendrocyte death in the optic nerve.<sup>8</sup> Thus, we investigated whether 1  $\mu$ M CBD-induced Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in cultured OPCs loaded with the Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye, Fluo-4. There was no difference in the fluorescence signal obtained under basal conditions and in the presence of CBD (1  $\mu$ M: Figures 1d and e), indicating that intracellular Ca<sup>2+</sup> levels were not significantly modified by CBD.

**CBD protects OPCs from inflammatory stimuli and from apoptosis in a cannabinoid receptor-independent manner.** As we previously reported that the LPS/IFN $\gamma$  inflammatory stimuli induced cytotoxicity in OPCs,<sup>22</sup> it was



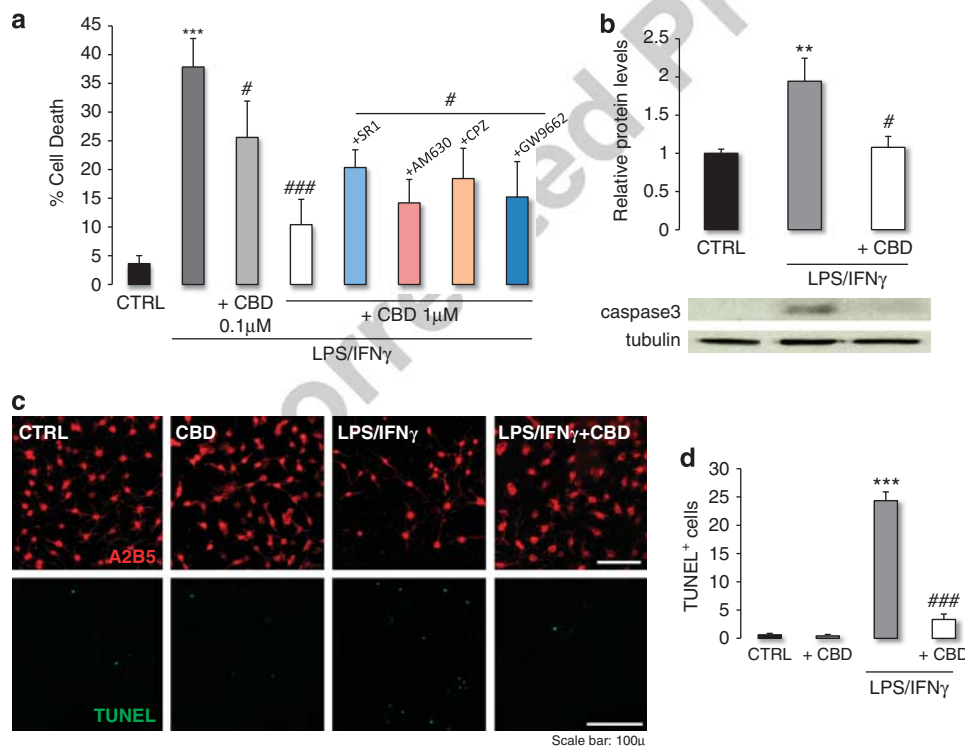
**Figure 1** Effects of CBD on OPC cytotoxicity. (a) Although CBD did not induce cell death at low concentrations (0.1 and 1  $\mu$ M), cytotoxic effects were observed at 2.5 and 5  $\mu$ M. OPCs were exposed to CBD and cell death was quantified 48 h later using the LDH method. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of  $n = 3$  cultures analyzed in triplicate. Statistical significance was determined by a one-way ANOVA: \*\* $P \leq 0.01$  and \*\*\* $P \leq 0.001$  versus untreated cells. (b) CBD did not augment OPC proliferation evident as an increase in BrdU incorporation. OPCs were incubated with BrdU (10  $\mu$ M) for 24 h and at least 10 000 cells were then quantified by immunocytochemistry. (c) Flow cytometry analysis revealed the CBD does not affect the cell cycle progression of OPCs. Freshly isolated OPCs were incubated for 24 h in the presence or absence of CBD (1  $\mu$ M), and the cell cycle of a minimum of 10 000 cells was analyzed on a FACSaria flow cytometer following PI staining. (d, e) CBD did not alter intracellular Ca<sup>2+</sup> levels under basal conditions. OPCs were loaded with the Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye Fluo-4 and the fluorescence signal was monitored on a scanning confocal microscope under basal conditions and after adding CBD (1  $\mu$ M;  $n = 5$  coverslips). (d) Representative pseudocolor images showing Ca<sup>2+</sup> levels in cultured OPCs under basal conditions and in the presence of CBD (1  $\mu$ M). Scale bar = 50  $\mu$ m. (e) Fluorescence traces showing the Ca<sup>2+</sup> time course in individual OPCs ( $n = 8$ ) from the experiment shown in (d), both under basal conditions and in the presence of CBD.

noteworthy that CBD (1  $\mu$ M) protected OPCs from the noxious effects of inflammation ( $P \leq 0.001$ , Figure 2a), decreasing cell death from  $37.84 \pm 4.95\%$  to  $10.41 \pm 4.41\%$ . Indeed, the induction of the apoptotic effector caspase 3 (Figure 2b) by LPS/IFN $\gamma$  was reversed by the treatment with CBD ( $P \leq 0.05$ ), and the number of TUNEL $^+$  cells ( $24.35 \pm 1.54\%$ ) fell to control levels in the presence of CBD ( $3.34 \pm 0.96\%$ ,  $P \leq 0.001$ ) when quantified 24 h post treatment (Figures 2c and d). To investigate the mechanisms underlying the oligoprotection offered by CBD, antagonists of CB1, CB2, TRPV1 and PPAR $\gamma$  receptors were administered before the LPS/IFN $\gamma$  insult in the presence and absence of CBD. None of these antagonists reversed the protective effects of CBD observed in inflammatory conditions, suggesting that the effects of CBD are not mediated by these receptors (Figure 2a).

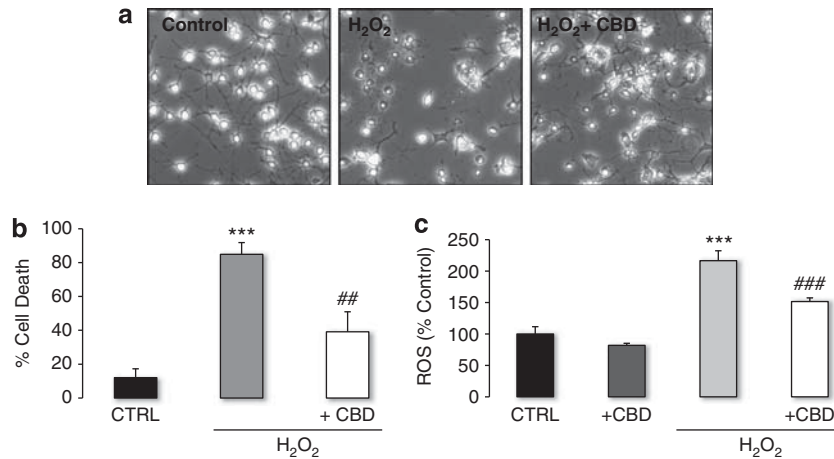
**CBD rescues OPCs from H $_2$ O $_2$ -induced death by decreasing ROS production.** CBD is a resorcinol-based compound with direct and potent antioxidant properties;<sup>23</sup> hence, we investigated whether CBD acts as an antioxidant

in OPCs subjected to oxidative stress by evaluating its effects on the cell death and ROS production induced by hydrogen peroxide (100  $\mu$ M). CBD prevented the detachment and swelling of OPCs induced by direct oxidative stress (Figure 3a), and decreased cell death from  $84.89 \pm 6.93\%$  to  $39.12 \pm 1.82\%$  ( $P \leq 0.01$ , Figure 3b). Moreover, this effect was accompanied by a decrease in ROS production, as determined in DCF-DA assays 1 h post treatment (H $_2$ O $_2$  + vehicle,  $216.63 \pm 15.7\%$ ; H $_2$ O $_2$  + CBD,  $151.59 \pm 5.10\%$ ;  $P \leq 0.001$ , Figure 3c). To separate the antioxidant properties of CBD of its possible cytoprotective effects on OPCs during inflammation, we also evaluated the effects of CBD on NO production in response to LPS/IFN- $\gamma$  by measuring nitrites and by western blot to assess NOS-2 expression, but CBD was not able to modify NO production (data not shown).

**ER stress induces OPC death, an effect that is attenuated by CBD via decreased eIF2 $\alpha$  phosphorylation.** As ER stress is implicated in several diseases with inflammatory components, such as MS,<sup>21</sup> we analyzed primary OPC death in response to activation of this cellular program.



**Figure 2** CBD protects against inflammatory damage by diminishing apoptosis and decreases the number of TUNEL $^+$  OPCs through a mechanism that does not involve CB1, CB2, TRPV1 or PPAR $\gamma$  receptors. (a) LPS/IFN $\gamma$ -induced cytotoxicity in OPCs was attenuated by CBD, a dose of 1  $\mu$ M proving to be the most effective). Administration of CB1, CB2, TRPV1 or PPAR $\gamma$  antagonists (SR1, AM639, CPZ: 1  $\mu$ M and GW9662: 50 nM) 30 min before the stimulus had no effect, indicating that none of these receptors are implicated in the protective effects of CBD. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of  $n = 3$  independent cultures analyzed in triplicate, and the statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney U test: \*\*\* $P \leq 0.001$  versus untreated cells, # $P \leq 0.05$  and ### $P \leq 0.001$  versus cells exposed to LPS/IFN $\gamma$  alone. (b) Cleaved caspase3 western blot shows that LPS/IFN $\gamma$  treatment induces the activation of the apoptotic pathway, whereas the co-treatment with CBD reduces this induction. OPCs were incubated with LPS/IFN $\gamma$  in presence or absence of CBD (1  $\mu$ M). Total protein extracts were prepared 24 h later and cleaved caspase 3 (19 KDa) was assessed in western blots probed with specific antibodies. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. optical density normalized to tubulin from three independent cultures analyzed in triplicate, and statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test: \*\* $P \leq 0.01$  compared with non-treated cells, # $P \leq 0.05$  compared with LPS/IFN $\gamma$  group. (c and d) A2B5 and TUNEL staining show that LPS/IFN $\gamma$  decreased OPC number by inducing apoptosis, an effect that was reversed by CBD as previously confirmed by caspase 3 measurement. OPCs were exposed for 24 h to the cytotoxic stimulus, in the presence or absence of CBD (1  $\mu$ M), and 6000 OPCs cells were counted. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M., and the statistical significance was determined using the Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney U test: \*\*\* $P \leq 0.001$  versus untreated cells, and ### $P \leq 0.001$  versus cells exposed to LPS/IFN $\gamma$  alone



**Figure 3** Oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces OPC detachment and death, an effect that was attenuated by CBD by decreasing ROS production. (a) Phase contrast images ( $\times 10$ ) show that treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced the swelling and detachment of OPCs, an effect prevented by CBD treatment. (b) CBD protects OPCs from oxidative stress. OPCs were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of CBD (1  $\mu$ M) and cell death was quantified 18 h later using the LDH method. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of four independent cultures analyzed in triplicate, and the statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test: \*\*\* $P \leq 0.001$  versus untreated cells, ## $P \leq 0.01$  versus cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone. (c) CBD decreased ROS production under conditions of oxidative stress. OPCs were loaded with DCF-DA for 30 min and stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of CBD (1  $\mu$ M). Fluorescence was measured 2 h later at 485/530 nm in a microplate reader and the data represent the means  $\pm$  S.E.M. of  $n = 3$  independent cultures analyzed in triplicate. Statistical significance was determined using Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney U test: \*\*\* $P < 0.001$  versus untreated cells, ### $P < 0.001$  versus cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone

Tunicamycin-induced ER stress led to OPC death 24 h post treatment ( $45.81 \pm 4.7\%$ ; Figure 4a), which was attenuated by treatment with CBD ( $20.39 \pm 2.54\%$ ,  $P \leq 0.01$ ). Exposure to CBD also decreased the phosphorylation of the eIF2 $\alpha$  protein ( $P \leq 0.05$ ), an initiator of the apoptotic pathway induced by ER stress (Figure 4b). Interestingly, tunicamycin-induced ER stress was not mediated by the phosphorylation of PKR, a potential activators of eIF2 $\alpha$  in the ER (data not shown).

**CBD attenuates the activation of the ER apoptotic pathway in inflammatory conditions.** Given the link between the mechanisms underlying inflammation and ER stress recently reported,<sup>24</sup> we investigated the ER stress response induced by LPS/IFN $\gamma$ . When we examined the effect of LPS/IFN- $\gamma$  on PKR and eIF2 $\alpha$  phosphorylation in OPCs, an increase in the phosphorylation of these proteins was evident in Western blots (Figures 4c and d). Interestingly, CBD impaired this increase in PKR and eIF2 $\alpha$  phosphorylation, which remained at control levels ( $P \leq 0.05$ ), suggesting that one of the protective effects of CBD in OPCs involves the reduction of ER stress during neuroinflammation.

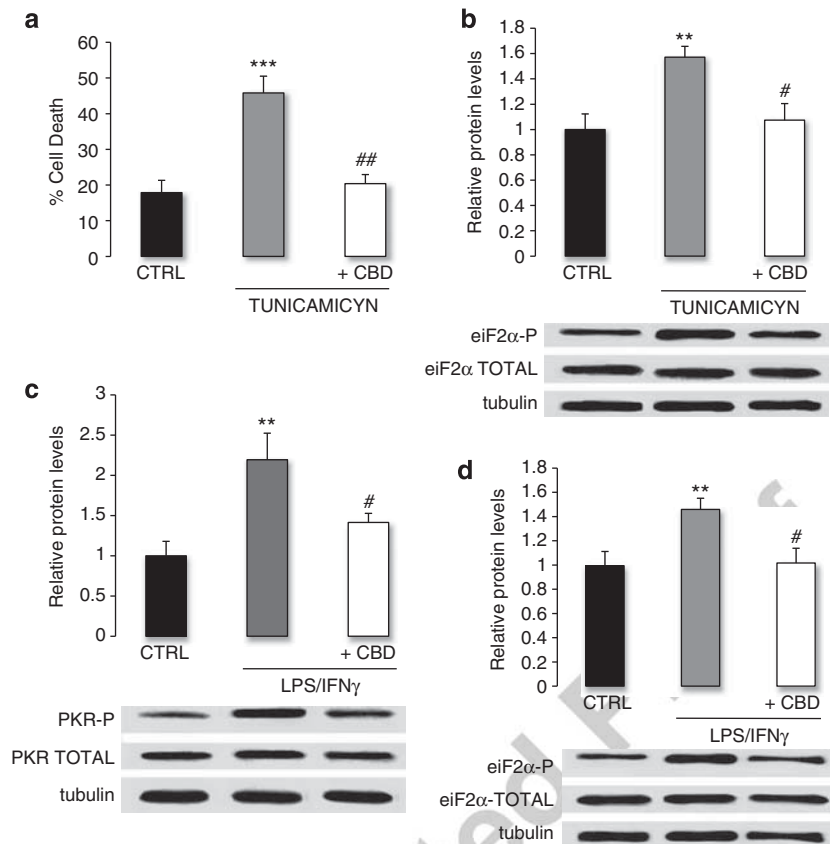
To confirm the effects of CBD in combating the ER stress associated with inflammation, we analyzed ER mediators of the apoptotic pathway. CBD significantly dampened the induction of ER pro-apoptotic molecules by LPS/IFN $\gamma$ , such as the initiator CHOP, a major ER stress marker, and the effector caspase 12, as evident by real-time (RT)-PCR ( $P \leq 0.01$ ; Figure 5). In addition, the balance of pro-apoptotic (Bax) and anti-apoptotic (Bcl-2) proteins, which is deregulated by LPS/IFN $\gamma$  treatment, returned to the basal state in the presence of CBD ( $P \leq 0.05$ ). Furthermore, the expression of GADD34, a negative feedback protein in this pathway augmented when OPCs were treated with CBD ( $P \leq 0.001$ ),

suggesting that this cannabinoid represses this apoptotic program.

## Discussion

In this study, we show that the nonpsychotropic cannabinoid, CBD, prevents OPC death induced by inflammatory, oxidative or direct ER stress. CBD does not modify the OPC cell cycle and its protective effect was unaltered by classical cannabinoid, vanilloid or PPAR $\gamma$  receptor antagonists. Moreover, the anti-apoptotic effect of CBD appears to be mediated by decreasing the expression of pro-apoptotic effectors and dampening the activity of the ER stress pathway. These findings define a novel mode of action for CBD in OPCs, supporting its therapeutic potential to protect OPCs in pathologies involving demyelination.

Neuroinflammation is one of the primary mechanisms underlying the pathogenesis of MS, and proinflammatory mediators are considered key effectors of the damage in demyelinating disorders. Indeed, previous studies have shown that inflammatory stimuli induce apoptosis in OPCs.<sup>6,22</sup> When we initially studied the effects of CBD on primary OPC cultures, cytotoxic effects were only observed at doses  $> 2.5 \mu$ M. At doses of 0.1 and 1  $\mu$ M, CBD was previously reported to increase intracellular calcium and provoke cytotoxic effects,<sup>8</sup> although no such Ca<sup>2+</sup> influx was observed here on exposure to 1  $\mu$ M CBD. These conflicting findings may reflect the different source of oligodendrocytes (optic nerve *versus* encephalon) and/or the state of differentiation of the cells (mature oligodendrocytes *versus* progenitors), pointing out to a different effect of CBD depending on the developmental state of the cell. Although CBD has previously been implicated in the regulation of the cell cycle,<sup>1</sup> we ruled out this possibility by studying BrdU incorporation and cell cycle progression. Importantly, at



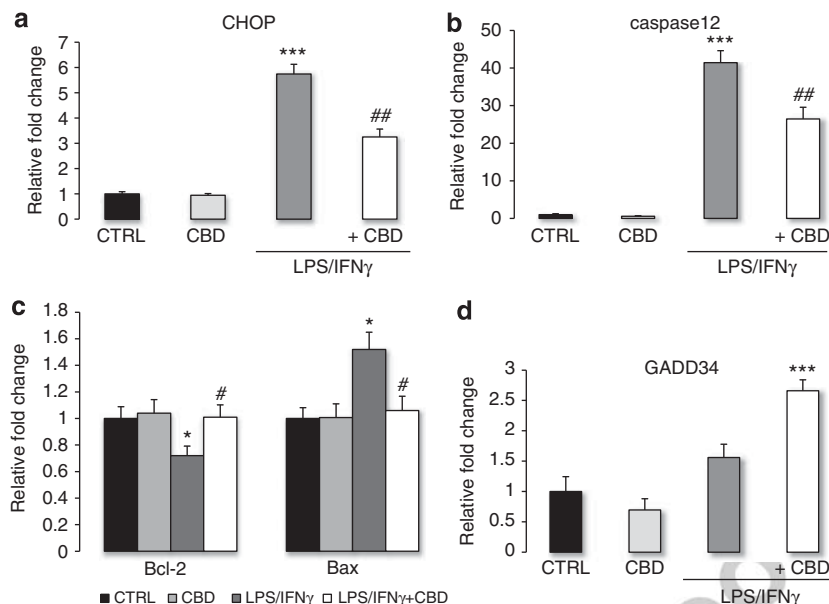
**Figure 4** OPC death is mediated by ER stress, an effect that is attenuated by CBD through decreased PKR and eIF2 $\alpha$  phosphorylation in conditions of inflammation. (a) CBD attenuated tunicamycin-induced OPC death. OPCs were incubated with tunicamycin (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of CBD (1  $\mu$ M), and cell death was quantified 24 h later by the LDH method. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent cultures analyzed in triplicate, and the statistical significance was determined using Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney U test: \*\*\* $P \leq 0.001$  versus untreated cells, \*\* $P \leq 0.01$  versus cells exposed to tunicamycin alone. (b) Tunicamycin treatment induced the eIF2 $\alpha$  phosphorylation, an effect that was attenuated by CBD. OPCs were incubated with tunicamycin (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of CBD (1  $\mu$ M). Total protein extracts were prepared 5 min later and the phosphorylated (38 kDa) and total (38 kDa) eIF2 $\alpha$  was assessed in western blots probed with specific antibodies. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. optical density normalized to tubulin from four independent cultures analyzed in triplicate, and the statistical significance was determined using Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney U test: \*\* $P \leq 0.01$  versus untreated cells, # $P \leq 0.05$  versus cells exposed to tunicamycin alone. (c and d) Inflammation-induced PKR and eIF2 $\alpha$  phosphorylation, an effect that was attenuated by CBD. OPCs were treated with LPS/IFN $\gamma$  in the presence or absence of CBD (1  $\mu$ M). Total protein extracts were prepared 5 min later and PKR (phosphorylated, 68 kDa; total, 68 kDa) and eIF2 $\alpha$  (phosphorylated, 38 kDa; total, 38 kDa) was assessed in western blots probed with specific antibodies. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. optical density normalized to tubulin from five cultures, and the statistical significance was determined using Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney U test: \*\* $P \leq 0.01$  versus untreated cells, # $P \leq 0.05$  versus cells exposed to LPS/IFN $\gamma$  alone

low doses, CBD protected OPCs from LPS/IFN $\gamma$ -induced cell death, evident by the reduction of caspase 3 and the number of TUNEL $^+$  cells. Although CBD protected OPCs from inflammatory damage, we did not observe alterations neither in nitrites nor NOS-2 induction by LPS/IFN $\gamma$ , indicating the lack of participation of NO in the protective effects of CBD. Although CB1 and CB2 receptors were expressed on OPCs,<sup>7</sup> CBD-induced protection of OPCs was not mediated by the activation of these receptors. Blocking of vanilloid receptors or of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  also had no effect on the capacity of CBD to protect OPCs from inflammatory damage, precluding the involvement of these receptors. These findings are consistent with reports of other effects of CBD that occur independently of classical and alternative cannabinoid receptors.<sup>25</sup>

CBD protected OPCs from hydrogen peroxide-induced oxidative stress by diminishing ROS production, consistent with the antioxidant properties attributed to this compound in

different experimental models.<sup>26</sup> This is an important finding, as OPCs are very vulnerable to oxidative stress,<sup>27</sup> considered to be one of the pathogenic mechanisms underlying demyelination and axonal damage in MS.

Oligodendrocytes are very sensitive to alterations in ER homeostasis. Misfolded proteins generate ER stress and contribute to cell death in pathophysiological conditions, while mutations affecting the folding of myelin constituents lead to oligodendrocyte death.<sup>28</sup> We investigated the role of ER stress in OPC death *in vitro*. Tunicamycin, an ER stressor, induced OPC cytotoxicity through a mechanism that involved the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , without altering PKR phosphorylation, suggesting that the induction of the UPR pathway with the tunicamycin treatment can be mediated by other ER transmembrane protein factors such as IRE1 $\alpha$  or ATF6. Activating this pathway has been linked with the developmental status of the cell<sup>10</sup> and here we present evidence of the detrimental effects of ER stress in OPCs. The ability of



**Figure 5** Inflammation activates the ER apoptotic pathway in OPCs, an effect that was attenuated by CBD. (a) CBD attenuated the inflammation-induced increase in CHOP expression. (b) The upregulation of caspase 12 expression in conditions of inflammation was attenuated by CBD. (c) CBD restores the Bcl-2/Bax balance in OPCs treated with LPS/IFN $\gamma$ . (d) CBD increases the expression of the negative feedback regulator GADD34 under conditions of inflammation. In all cases, OPCs were incubated with LPS/IFN $\gamma$  in the presence or absence of CBD (1  $\mu$ M). The mRNA expression of each gene was measured 24 h later by quantitative RT-PCR and normalized to the expression of the 18S gene. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent cultures analyzed in triplicate, and the statistical significance was determined using Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney U test: \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  versus untreated cells; and # $P \leq 0.05$ , ## $P \leq 0.01$  versus cells exposed to LPS/IFN $\gamma$  alone

CBD to protect OPCs from the damage caused by ER stress through decreasing eIF2 $\alpha$  phosphorylation highlights the potential therapeutic properties of this compound in pathological conditions in which ER homeostasis is compromised, as proposed in neurodegenerative and demyelinating diseases.<sup>29,30</sup>

There is substantial evidence linking inflammation with ER stress through several intracellular pathways.<sup>11,24</sup> In animal models of MS, IFN $\gamma$  induces ER stress in actively myelinating oligodendrocytes, leading to apoptosis and abnormalities in neuronal myelination.<sup>31</sup> Our results point to the crosstalk between inflammation and ER stress in OPCs, as LPS/IFN $\gamma$ -induced cell death involved the phosphorylation of PKR and eIF2 $\alpha$  and hence, the apoptotic pathway activated by the UPR. This pathway has been associated with increased expression of pro-apoptotic factors, such as the CHOP transcription factor (C/EBP homologous protein)<sup>32</sup> that primarily promote apoptosis by repressing Bcl-2 expression<sup>33</sup> or by inducing caspase 12.<sup>34</sup> In OPCs, we found that inflammation involved caspase 3 activation, induced the expression of CHOP and caspase 12, and altered the balance between Bax and Bcl-2, implicating ER stress in cell apoptosis.

Our findings constitute the first evidence that CBD protects OPCs from inflammation-induced apoptosis by blocking ER stress. In inflammatory conditions, CBD decreased the levels of phosphorylated PKR and eIF2 $\alpha$  in OPCs. Moreover, this effect was accompanied by the restoration of CHOP, caspase 12, Bcl-2 and Bax mRNA to control levels, together with an increase in GADD34 expression, a negative feedback regulator of this pathway.<sup>35</sup>

In summary, the findings presented here indicate that low doses of CBD exert oligoprotective effects in OPCs under

conditions of inflammation, oxidative and ER stress. In conditions of oxidative stress, the protective effect of CBD was mediated by a decrease in ROS production, while under neuroinflammatory conditions, CBD combated apoptosis by decreasing ER stress through the modulation of the PKR-eIF2 $\alpha$  pathway. We propose that CBD, a *C. sativa* derivative that lacks psychoactive properties, is a good candidate to protect OPCs from different cytotoxic insults, with significant therapeutic potential for the treatment of demyelinating pathologies.

#### Material and Methods

**Animals.** Animal handling and care was performed in compliance with European Union guidelines (86/609/EEC) and Spanish regulations (BOE67/8509-12; BOE1201/2005) regarding the use and care of laboratory animals, and all the protocols were approved by the local Animal Care and Ethics Committee of the CSIC.

**Reagents.** Griess reagent (sulfanilamide, *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine), BrdU, DCFDA, hydrogen peroxide, LPS and tunicamycin were purchased from Sigma. IFN $\gamma$  was acquired from Peprotech, CPZ from Alexis Biochemicals, CBD, AM630 and GW9662 from Tocris and SR1 was kindly provided by Sanofi-Aventis.

**Culture of oligodendrocyte progenitors.** Primary cultures of OPCs derived from P0–P2 Wistar rats were prepared as described previously,<sup>22,36</sup> with some modifications in doi:10.1038/protex.2011.218. Cells were plated on poly-D-lysine-coated plates at 50 000 cells/cm<sup>2</sup> for western blotting or 25 000 cells/cm<sup>2</sup> for other assays, and they were maintained for 3 days at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in serum-free defined medium containing 5 ng/ml of growth factors (bFGF and PDGF-AA).

**Cell toxicity.** Oligodendrocyte death was quantified by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) from damaged cells into the bathing medium 18, 24 and 48 h after exposure to hydrogen peroxide, tunicamycin and LPS/IFN $\gamma$ , respectively, according to the manufacturer's instructions (cytotoxicity detection kit, Roche). All experiments compared the cell death induced with the basal levels of cell death in the cultures.

**TUNEL assay.** OPCs were seeded on poly-D-lysine-coated coverslips and maintained for 24 h with LPS/IFN $\gamma$  and/or CBD. After they were fixed in 4% PFA, post-fixed in EtOH/acetic acid for 5 min at  $-20^{\circ}\text{C}$  and maintained in equilibration buffer for 1 min, they were incubated with the TdT enzyme in a reaction buffer for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  (Apoptosis detection kit, Chemicon). After washing, the coverslips were incubated with the anti-DIG antibody in blocking solution and counterstained with DAPI. The data represent TUNEL $^{+}$  cells as a percentage of the total number of cells.

Q11

**Immunocytochemistry.** For BrdU analysis, OPCs were seeded on poly-D-lysine-coated coverslips and incubated with BrdU ( $10\ \mu\text{M}$ ) for 24 h in the presence or absence of CBD. Cells were then fixed in 4% PFA for 20 min, treated with 2 N HCl for 10 min, blocked and incubated with anti-BrdU antibody (DSHB, 1:1000). After washing, the cells were incubated with an anti-mouse secondary antibody (1:1000) and counterstained with DAPI. For A2B5 staining, the cells were treated for 24 h with LPS/IFN $\gamma$  in the presence or absence of CBD, incubated *in vivo* with anti-A2B5 marker (R&D Systems, 1:200), fixed in 4% PFA and incubated with the secondary antibody (1:1000).

Q12

**Flow cytometry.** Freshly isolated OPCs were maintained on uncoated plates for 24 h with vehicle or CBD. The cells were then collected, fixed in cold 70% ethanol for 30 min, resuspended in phosphate buffer saline (PBS) and incubated with  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$  Ribonuclease A (Sigma) and  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$  propidium iodide (PI; Sigma) for 30 min. Argon laser excitation at 488 nm was used to measure PI fluorescence through a band-pass 616/23 nm filter using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Debris and duplets were excluded from the analysis and a minimum of 10 000 cells were acquired in each experiment. FACSDiva analysis software (BD Biosciences) was used to define the cell cycle stages.

**Measurement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .** Cells were seeded on coverslips and incubated for 20–30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in PBS containing Fluo4-AM ( $0.3\ \mu\text{M}$ , Invitrogen) and pluronic F-127 (0.04%, Sigma). The coverslips were then transferred to the microscope chamber and bathed in an extracellular medium containing (in mM): NaCl 140, KCl 5,  $\text{MgCl}_2$  4, HEPES 10, glucose 10 and sucrose 6 (pH 7.35). All experiments were performed at room temperature. Cells were imaged with an Olympus FV3 scanning confocal microscope equipped with a  $\times 40$  objective (NA, 0.8) and laser emission at 488 nm was used to excite Fluo-4. The fluorescent signal recorded is displayed as a pseudocolor image and the look-up-table used is indicated in each figure. The time frame acquisition was 1.12 s.

Q13

Q14

**ROS determination.** OPCs were loaded with dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (DCFDA,  $2\ \mu\text{M}$ ) for 30 min, washed and stimulated with hydrogen peroxide for 2 h or with LPS/IFN $\gamma$  for 24 h in the presence or absence of CBD. Fluorescence was measured at 485/530 nm in a microplate reader and normalized to the negative control.

**Western blot analysis.** Western blot analysis was performed as previously described<sup>7</sup> using 30–40  $\mu\text{g}$  of OPC protein extract and an anti-cleaved caspase3 (Asp<sup>175</sup>; 1:1000, Cell Signaling), anti-phospho (Ser<sup>51</sup>) eIF2 $\alpha$  (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-total eIF2 $\alpha$  (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-phospho (Thr<sup>446</sup>) PKR (1:1000, Upstate) and anti-total PKR (1:1000, Millipore). Anti- $\alpha$ -tubulin (1:40 000; Sigma-Aldrich) was used as a loading control.

Q15

Q16

Q17

Q18

Q19

Q20

Q21

Q22

Q23

**RNA extraction, reverse transcription and RT-PCR.** Total OPC RNA was extracted using the RNeasy mini columns kit (Qiagen, UK) and treated with DNaseI (Qiagen), and the RNA concentration and purity were determined in a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Total RNA ( $1\ \mu\text{g}$ ) was reverse transcribed using the Promega reverse transcription kit (Promega, Spain) and RT-PCR was performed on  $1\ \mu\text{l}$  of cDNA (corresponding to 50 ng RNA input) with 200 nM of the primers listed below (Applied Biosystems, UK), quantifying expression using SYBR Green (Applied Biosystems). The amplification cycles involved an initial activation step at  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min and a denaturation step at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and annealing/extension at  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. PCR assays were carried out in 96-well plates using a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Each sample was assayed in duplicate and a 6-point standard curve was run in parallel. The ratio between the values obtained for each gene and the 18S house-keeping gene

provided a relative quantification of expression. The 5'-3' primer sequences used were the following: CHOP (forward 5'-CCAAAATAACAGCCGGAACCT-3'; reverse 5'-CAAAGGCCAAAGGCAGAGACT-3'), GADD34 (forward 5'-AGCATGGACACG CCTTAGAAA-3'; reverse 5'-AGGCTGGGAGGAGGATT-3'), Bax (forward 5'-GGTGGCAGCTGACATGTTT-3'; reverse 5'-TGATCAGCTCGGGCACTTTA-3'), Bcl-2 (forward 5'-TGAGAGCAACCGAACGCCG-3'; reverse 5'-CCGTGGCAAAG CGTCCCTC-3'), caspase 12 (forward 5'-GAAGGAAGCCGAACCGCC-3'; reverse 5'-TGCTCTGGACGGCCAGCAAC-3') and 18S (forward 5'-ATGCTCTT AGCTGAGTGCCG-3'; reverse 5'-ATTCTAGCTGCGGTATCCAGG-3')

**Data analysis.** All data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n$ ), where  $n$  refers to the number of cultures assayed, each obtained from a different group of animals and evaluated in triplicate. One-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test, or Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney U test was used to determine the statistical significance in all cases. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest

**Acknowledgements.** We acknowledge the financial support of the Ministry of Science and Innovation (MICINN, project SAF-2010/17501), Instituto de Salud Carlos III (project RD07/0060/0010 RETICS program, Red Española de Esclerosis Múltiple, REEM). Mecha M is supported by REEM. We thank to Alfonso Araque and Eduardo D Martín for their help with electrophysiological studies. We are also grateful to Joaquín Sancho and Elisa Baidés Rosell for their excellent technical assistance.

- Izzo AA, Borelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* 2009; **30**: 515–527.
- Sastre-Garriga J, Vila C, Clissold S, Montalban X. THC and CBD oromucosal spray (Sativex(R)) in the management of spasticity associated with multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 11: 627–637.
- Kozela E, Lev N, Kaushansky N, Eilam R, Rimmerman N, Levy R *et al*. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br J Pharmacol* 163: 1507–1519.
- Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 2001; **24**: 39–47.
- Bradl M.a.L., H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; **119**: 37–53.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE *et al*. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 2002; **22**: 2478–2486.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrel J, Guaza C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 2002; **22**: 9742–9753.
- Mato S, Victoria Sanchez-Gomez M, Matute C. Cannabidiol induces intracellular calcium elevation and cytotoxicity in oligodendrocytes. *Glia* 58 1739–47.
- Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, Mielgo VE, Gastiasoro E, Rueda M *et al*. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res* 2008; **64**: 653–658.
- Lin W, Popko B. Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells. *Nat Neurosci* 2009; **12**: 379–385.
- Lee JH, Park EJ, Kim OS, Kim HY, Joe EH, Jou I *et al*. Double-stranded RNA-activated protein kinase is required for the LPS-induced activation of STAT1 inflammatory signaling in rat brain glial cells. *Glia* 2005; **50**: 66–79.
- Proud CG. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**: 3–12.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M *et al*. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 2000; **6**: 1099–1108.
- Lu PD, Jousse C, Marciniak SJ, Zhang Y, Novoa I, Scheuner D *et al*. Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *EMBO J* 2004; **23**: 169–179.
- Southwood CM, Garbern J, Jiang W, Gow A. The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron* 2002; **36**: 585–596.
- Lin W, Harding HP, Ron D, Popko B. Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. *J Cell Biol* 2005; **169**: 603–612.

Q24

17. Kraskiewicz H, FitzGerald U. Partial XBP1 knockdown does not affect viability of oligodendrocyte precursor cells exposed to new models of hypoxia and ischemia *in vitro*. *J Neurosci Res* 2008; **89**: 661–673.
18. Pennuto M, Tinelli E, Malaguti M, Del Carro U, D'Antonio M, Ron D *et al*. Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. *Neuron* 2008; **57**: 393–405.
19. van der Voorn JP, van Dijk J, Garbern J, Thomas AA, Scheper GC, Powers JM *et al*. The unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; **64**: 770–775.
20. van Kollenburg B, van Dijk J, Garbern J, Thomas AA, Scheper GC, Powers JM *et al*. Glia-specific activation of all pathways of the unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; **65**: 707–715.
21. Mhaille AN, McQuaid S, Windebank A, Cunnea P, McMahon J, Samali A *et al*. Increased expression of endoplasmic reticulum stress-related signaling pathway molecules in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; **67**: 200–211.
22. Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Guaza C. LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur J Neurosci* 2001; **13**: 493–502.
23. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D *et al*. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8268–8273.
24. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008; **454**: 455–462.
25. Lim MP, Devi LA, Rozenfeld R. Cannabidiol causes activated hepatic stellate cell death through a mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cell Death Dis* 2010; **1**: e170.
26. El-Remessy AB, Tang Y, Zhu G, Matragoon S, Khalifa Y, Liu EK *et al*. Neuroprotective effects of cannabidiol in endotoxin-induced uveitis: critical role of p38 MAPK activation. *Mol Vis* 2008; **14**: 2190–2203.
27. Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 1998; **18**: 6241–6253.
28. Gow A, Southwood CM, Lazzarini RA. Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* 1998; **140**: 925–934.
29. Stefani IC, Wright D, Polizzi KM, Kontoravdi C. The role of ER stress-induced apoptosis in neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res*. **Q26**
30. Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Scheper W. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*. **Q27**
31. Lin W, Kemper A, Dupree JL, Harding HP, Ron D, Popko B. Interferon-gamma inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress. *Brain* 2006; **129Pt 5**: 1306–1318.
32. Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 1992; **6**: 439–453.
33. Gotoh T, Terada K, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pairs prevent nitric oxide-mediated apoptosis in RAW 264.7 macrophages. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 357–366.
34. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; **403**: 98–103.
35. Novoa J, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1011–1022.
36. Almazan G, Afar DE, Bell JC. Phosphorylation and disruption of intermediate filament proteins in oligodendrocyte precursor cultures treated with calyculin. *J Neurosci Res* 1993; **36**: 163–172.



**Cell Death and Disease** is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>