

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ciencias Químicas



**ESTUDIO NEUROPATOLÓGICO Y FUNCIONAL
DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE GLIAL EN
PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Cristina Benito Sastre

Bajo la dirección de los doctores

Rosa María Tolón Rafael
Julián Romero Paredes

Madrid, 2010

• ISBN: 978-84-693-4100-1

© Cristina Benito Sastre, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ESTUDIO NEUROPATOLÓGICO Y FUNCIONAL
DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE GLIAL EN
PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS**

TESIS DOCTORAL

CRISTINA BENITO SASTRE

Madrid, 2009

2-AG	2-araquidonil glicerol
Aβ	Péptido β -amiloide
ACEA	Araquidonil-2-cloroetilamida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Araquidonil etanolamida
AMPc	Adenosina-3', 5' monofosfato cíclico
APP	Proteína precursora amiloide
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
CBD	Cannabidiol
CCL5	Quimioquina (motivo C-C) ligando 5
CGMs	Células gigantes multinucleadas
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CREAE	Recaída crónica de EAE
DAB	Diaminobencidina
DAG	Diacilglicerol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Encefalitis alérgica experimental
EM	Esclerosis múltiple
EVIH	Encefalitis inducida por el VIH
EVIS	Encefalitis inducida por el VIS
FAAH	Amido hidrolasa de ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
GFAP	Proteína glial fibrilar acídica
HLA-DR	Región D del antígeno leucocitario humano
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LDH	Lactato deshidrogenasa
LOX	Lipoxigenasas
LPS	Lipopolisacárido
MAGL	Monoacilglicérido lipasa
MAP-2	Proteína asociada a microtúbulos tipo 2
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno

MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos
MHC-II	Complejo de histocompatibilidad de clase II
MIP	Proteína inflamatoria de macrófago
NFκB	Factor nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
PEA	Palmitoiletanolamida
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 quinasa
PKB	Proteína quinasa B
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PSEN-1	Presenilina 1
PSEN-2	Presenilina 2
OEA	Oleoiletanolamida
OPCs	Células precursoras de oligodendrocitos
PMB	Proteína básica de mielina
SCE	Sistema cannabinoide endógeno
SDS	Dodecil sulfato sódico
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SR1	SR144716A
SR2	SR144528
Δ^9-THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
TMEV	Encefalomiелitis murina de Theiler
TNF-α	Factor de necrosis tumoral tipo alfa
TRPV1	Receptor para vanilloide tipo 1
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIS	Virus de la inmunodeficiencia simia

INTRODUCCIÓN	1
I. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	2
1. RECEPTORES CANNABINOIDES	2
1.a. Receptor CB_1	2
1.b. Receptor CB_2	4
1.c. "Candidatos" a receptores cannabinoides	5
1.c.1. GPR55	5
1.c.2. Receptor "abnormal-cannabidiol"	5
1.d. Receptor vanilloide $TPRV_1$	5
1.e. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas	6
2. LIGANDOS CANNABINOIDES	7
2.a. Endocannabinoides	7
2.a.1. AEA	7
2.a.2. 2-AG	9
2.a.3. Noladin éter	9
2.a.4. Virodamina	9
2.a.5. NADA	9
2.a.6. ARA-S	10
2.b. Fitocannabinoides	10
2.b.1. Δ^9 -THC	10
2.b.2. Δ^8 -THC	11
2.b.3. Cannabinol	11
2.b.4. Cannabidiol	11
2.c. Ligandos sintéticos	11
2.c.1. Agonistas clásicos	12
2.c.2. Agonistas no clásicos	12
2.c.3. Aminoalquilindoles	12
2.c.4. Eicosanoides	13
3. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES CELULARES	14
3.a. Mecanismo de transducción de señales del receptor CB_1	15
3.b. Mecanismo de transducción de señales del receptor CB_2	16
4. MECANISMO DE INACTIVACIÓN ENDOCANNABINOIDE	16
4.a. Recaptación de endocannabinoides	16
4.b. Hidrólisis de AEA	17
4.c. Hidrólisis de 2-AG	19
4.d. Otros mecanismos de inactivación endocannabinoide	19

II. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE GLÍAL	21
1. ASTROCITOS	21
1.a. <i>Astrocitos y SCE</i>	22
2. OLIGODENDROCITOS	24
2.a. <i>Oligodendrocitos y SCE</i>	25
3. MICROGLÍA	26
3.a. <i>Microglia y SCE</i>	27
III. NEUROINFLAMACIÓN Y SCE	29
1. ENCEFALITIS INDUCIDA POR VIH	30
1.a. <i>Rasgos neuropatológicos de EVIH</i>	31
1.b. <i>Papel de las células gliales en EVIH</i>	31
1.c. <i>Modelos animales de encefalitis</i>	32
1.d. <i>La proteína viral Tat</i>	33
1.e. <i>Papel terapéutico de los cannabinoides</i>	35
2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE	35
2.a. <i>Modelos animales de EM y SCE</i>	37
2.a.1. <i>EAE y cannabinoides</i>	37
2.a.2. <i>TMEV-IDD y cannabinoides</i>	38
2.b. <i>Ensayos clínicos con extractos medicinales basados en Cannabis</i>	38
2.c. <i>Estatus del SCE en EM</i>	40
3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	41
3.a. <i>Procesamiento del péptido Aβ</i>	42
3.b. <i>El péptido Aβ</i>	43
3.c. <i>Papel de las células gliales en EA</i>	44
3.d. <i>Modelos animales de EA</i>	46
3.e. <i>EA y SCE</i>	46
3.e.1. <i>Estudios in vitro</i>	46
3.e.2. <i>Estudios in vivo</i>	47
3.e.3. <i>SCE y EA en humanos</i>	48
<u>OBJETIVOS</u>	51
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	53
I. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL SCE EN PATOLOGÍAS NEUROINFLAMATORIAS	
1. TEJIDOS	53
1.a. <i>Modelo animal de EVIS</i>	53

1.b. Muestras de EVIH	53
1.c. Muestras de EM	54
1.c.1. Clasificación de las placas de EM	55
2. INMUNOHISTOQUÍMICA	55
3. INMUNOFLUORESCENCIA	57
4. WESTERN-BLOT MUESTRAS EVIS	58
II. ESTUDIOS IN VITRO EN CULTIVOS PRIMARIOS	
A. Péptido β -amiloide	59
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	59
1.a. Genotipado de la colonia de ratones FAAH	59
2. CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS DE RATÓN	60
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	61
3.a. Tiempo-respuesta de exposición al péptido A β	61
3.b. Tratamiento con antagonistas de los receptores CB ₁ y CB ₂	61
3.c. Activación de las vías ERK1/2 y p38 MAPK	61
3.d. Activación de NF κ B	62
4. EL PÉPTIDO A β ₁₋₄₂	62
5. MUERTE CELULAR	62
6. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS	63
6.a. Paneles de citoquinas	63
6.b. Cuantificación de los niveles por ELISA	63
7. ANÁLISIS DEL ARNm	63
7.a. Extracción del ARN y transcripción inversa	63
7.b. PCR cuantitativa a tiempo real	64
8. WESTERN-BLOT	65
8.a. Análisis de proteínas quinasas	65
8.b. Análisis de la activación de NF κ B	67
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
B. Proteína viral Tat	69
1. TRANSFORMACIÓN, CRECIMIENTO BACTERIANO Y EXTRACCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO	69
2. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA MEDIADA POR LIPOSOMAS CATIONICOS	70
3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA	70
4. ANÁLISIS DEL ARNm	71
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	71

<u>RESULTADOS</u>	73
1. LOCALIZACIÓN DEL SCE EN UN MODELO ANIMAL DE EVIS	73
1.a. <i>Receptores CB₁</i>	73
1.b. <i>Receptores CB₂</i>	74
1.c. <i>Enzima FAAH</i>	75
2. LOCALIZACIÓN DEL SCE EN CEREBRO DE PACIENTES AFECTADOS DE EVIH	80
2.a. <i>Receptores CB₁</i>	80
2.b. <i>Receptores CB₂</i>	81
2.c. <i>Enzima FAAH</i>	81
3. LOCALIZACIÓN DEL SCE EN CEREBRO DE PACIENTES CON EM	85
3.a. <i>Características de las placas de EM y composición celular</i>	85
3.b. <i>Receptores CB₁</i>	86
3.c. <i>Receptores CB₂</i>	87
3.d. <i>Enzima FAAH</i>	87
4. RESPUESTA AL PÉPTIDO β-AMILOIDE DE ASTROCITOS PRIMARIOS FAAH-wt Y FAAH-ko	92
4.a. <i>Muerte celular</i>	92
4.b. <i>Parámetros inflamatorios</i>	93
4.c. <i>Activación de las vías ERK1/2 y p38 MAPK</i>	96
4.d. <i>Activación de NFkB</i>	99
4.e. <i>Expresión de PPARs</i>	101
4.f. <i>Expresión del receptor CB₂</i>	102
4.g. <i>Tratamiento con SR1 y SR2</i>	102
5. RESPUESTA A LA PROTEÍNA VIRAL Tat DE CÉLULAS GLIALES FAAH-wt Y FAAH-ko	105
<u>DISCUSIÓN</u>	111
1. CAMBIOS EN ELEMENTOS DEL SCE EN CEREBRO AFECTADO POR EVIS Y EVIH	111
2. CAMBIOS EN ELEMENTOS DEL SCE EN CEREBRO HUMANO AFECTADO POR EM	115
3. RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS FAAH-ko AL PÉPTIDO Aβ	119
4. RESPUESTA GLÍAL A LA PROTEÍNA VIRAL Tat Y SCE	123
<u>CONCLUSIONES</u>	129
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	134

INTRODUCCIÓN

Del *Cannabis*.....al Sistema endocannabinoide



La *Cannabis sativa* y más concretamente los productos elaborados con sus flores y hojas, marihuana y hachís, son desde los años 60 una de las drogas de abuso con fines recreativos más consumidas en las sociedades occidentales, debido a su capacidad para alterar la percepción sensorial y causar júbilo y euforia. Pero esta planta de origen asiático, posiblemente una de las más antiguas cultivadas por el hombre y de gran versatilidad, como producto alimenticio, combustible y fibra textil, tiene tras de sí una historia milenaria como planta

de uso medicinal. Las primeras evidencias de su utilidad terapéutica se remontan al reinado del emperador Sheng-Nung en China (año 2737 a.C.), quien recoge en manuscritos de farmacopea su utilidad para tratar calambres, dolor reumático y menstrual. En el antiguo Egipto, numerosos papiros también describen la administración de preparados de *cannabis* en el tratamiento de diversas dolencias. Pero en Europa, no es hasta el siglo XIX cuando el *cannabis* se convierte en una medicina común y de uso legal por su utilidad en el tratamiento de dolor, convulsiones, espasmos y emesis. Sin embargo, en el año 1925 la Convención de Génova incluye el *cannabis* y hachís en la lista de drogas ilícitas y peligrosas.

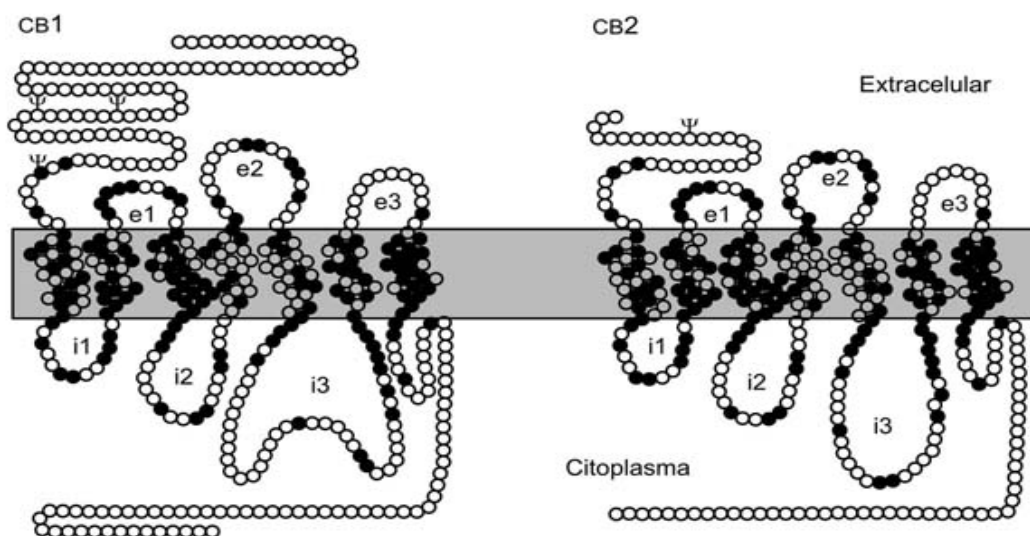
La *Cannabis sativa* contiene más de 460 compuestos químicos diferentes, de los cuales, más de 60 están agrupados bajo el término “cannabinoides”, que hace referencia a las sustancias que tienen una estructura carbocíclica de 21 carbonos. En 1964, Gaoni y Mechoulam aíslan y determinan la estructura del principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta, Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), y en 1988, Devane y cols. descubren el receptor específico de este cannabinoide, el receptor CB₁. Estos hallazgos han permitido descubrir y caracterizar en los últimos 20 años un sistema de señalización endógena conocido como Sistema endocannabinoide. Este sistema ejerce su papel modulador principalmente en el cerebro pero también en la periferia, y consta de receptores, ligandos (endógenos, fitocannabinoides o sintéticos) y enzimas responsables de su síntesis y degradación.

I. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

1. RECEPTORES CANNABINOIDES

La naturaleza liposoluble de los ligandos naturales hizo pensar, en un principio, que estos compuestos ejercían sus efectos a través de interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Pero la inhibición de la actividad adenil ciclasa por el ligando Δ^9 -THC a través de proteínas $G_{i/o}$ (Howlett, 1984) y la existencia de sitios de unión estereoespecíficos y de alta afinidad en membranas de cerebro de rata para el ligando cannabinoide sintético [3 H]CP-55940 (Devane y cols., 1988), demostraron la existencia de receptores cannabinoides. Hasta el momento, los dos receptores clonados, CB_1 y CB_2 , pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ con siete dominios transmembrana y comparten un 44% de homología de secuencia.

Figura 1. Estructura de los receptores CB_1 y CB_2 .



1.a. Receptor CB_1

Este receptor, clonado por primera vez en cerebro de rata por Matsuda y cols. (1990) y poco después en humano (Gerard y cols., 1991) y ratón (Abood y cols., 1997), entre otras especies animales (revisado en Lambert y Fowler, 2005), es el más abundante en cerebro de mamífero. Se localiza principalmente en neuronas del cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico, pero también en órganos y tejidos periféricos como son células

inmunes, glándulas adrenal y pituitaria, corazón, pulmón y partes del tracto gastrointestinal, urinario y reproductivo (Howlett y cols., 2002). Recientemente se han unido a la lista, adipocitos (Cota y cols., 2003), hígado (Osei-Hyiaman y cols., 2005) y células parietales de estómago (Pazos y cols., 2008).

Estudios de autoradiografía (Herkenham y cols., 1991) e inmunohistoquímica (Tsou y cols., 1998a) en rata muestran con detalle su distribución en el Sistema Nervioso Central (SNC), encontrando una mayor densidad de receptores en ganglios basales, hipocampo y cerebelo. Estas áreas del cerebro están relacionadas con la actividad motora, capacidad cognitiva y memoria, y coordinación respectivamente, de modo que algunos de los efectos farmacológicos ejercidos por cannabinoides están vinculados a la distribución del receptor CB₁. En humanos, esta distribución se mantiene aunque se encuentra una expresión mayor del receptor en la corteza límbica que en regiones motoras y sensoriales, lo que sugiere que CB₁ desempeña un papel importante en el procesamiento de la información motivacional y cognitiva (Glass y cols., 1997).

Su expresión es mayoritariamente presináptica, en axones y terminales nerviosos, donde puede mediar la inhibición de la liberación de neurotransmisores, aunque también puede estar presente en las dendritas y soma de neuronas (Howlett y cols., 2002).

Los niveles de expresión de CB₁ en células gliales son inferiores pero está presente en astrocitos (revisado en Stella, 2004), oligodendrocitos (Molina-Holgado y cols., 2002) y progenitores neurales (Aguado y cols., 2005). La expresión de CB₁ en microglía sólo se describe en estudios *in vitro* (Sinha y cols., 1998; Cabral y cols., 2001; Facchinetti y cols., 2003; Carrier y cols., 2004).

El receptor CB₁ está muy conservado entre especies, siendo la homología de secuencia entre humano y ratón del 91% y entre humano y rata del 90%. Se han identificado variantes de CB₁ por procesamiento alternativo con niveles bajos de expresión, CB_{1A} en rata y humano, y más recientemente, CB_{1B} sólo en humano. También se han detectado mutaciones y polimorfismos en el gen del receptor CB₁ (CNR1) relacionados con el abuso de sustancias y la mayor susceptibilidad a padecer esquizofrenia y obesidad (revisado en Grotenhermen, 2005; Russo y cols., 2007).

1.b. Receptor CB₂

Este segundo receptor se clonó en el año 1993 por Munro y cols. en muestras humanas, (revisado en Howlett y cols., 2002), y posteriormente en ratón (Shire y cols., 1996) y rata (Griffin y cols., 2000; Brown y cols., 2002). A diferencia del receptor CB₁, se localiza principalmente en células del sistema inmune y hematopoyético. Los niveles más altos de ARNm del receptor CB₂ se encuentran en Linfocitos B > Natural Killer >> monocitos > neutrófilos > Linfocitos T8 > Linfocitos T4 (Galiege y cols., 1995).

Tras años de gran controversia, ahora se acepta que la distribución de CB₂ no es estrictamente periférica y que también se encuentra en el SNC. En 1996, Skaper y cols. por medio de técnicas de hibridación *in situ* describieron expresión del ARNm de CB₂ en cerebelo, concretamente en las células granulares y de Purkinje. Años más tarde, Ross y cols. (2001) detectaron expresión de CB₂ *in vitro* en neuronas sensoriales y, Van Sickle y cols. (2005) localizaron el receptor en neuronas del tallo cerebral donde podría modular emesis. Algunos estudios proponen una distribución más amplia del receptor en cerebro (Gong y cols., 2006; Onaivi y cols., 2006) y una expresión en neuronas inducida por procesos patológicos (Wotherspoon y cols., 2005). También se ha identificado la presencia de CB₂ *in vivo* e *in vitro* en progenitores neurales (Palazuelos y cols., 2006).

El receptor CB₂ en células gliales se expresa *in vitro* en astrocitos (Sheng y cols., 2005), oligodendrocitos (Molina-Holgado y cols., 2002) y microglía (Stella, 2004; Cabral y Marciano-Cabral, 2005). En cerebro sano (no patológico), se identifica CB₂ en la subpoblación de microglía que rodea los vasos sanguíneos, la llamada microglía perivascular (Núñez y cols., 2004). Sin embargo, en procesos inflamatorios del SNC, se induce la expresión de CB₂ en microglía activada donde su nivel de expresión es superior (Benito y cols., 2003; Maresz y cols., 2005; Nuñez y cols., 2008).

La secuencia del receptor CB₂ es más divergente entre especies. El grado de homología entre humano, rata y ratón es alto exceptuando la región carboxi terminal, que en rata es 50 y 63 aminoácidos más larga que en humano y ratón, respectivamente (Brown y cols., 2002).

El desarrollo de ratones knock out para CB₁ (Zimmer y cols., 1999; Ledent y cols., 1999) y CB₂ (Buckley y cols., 2000), ha proporcionado en los últimos años un nuevo sistema *in vivo* para el estudio de la regulación genética, desarrollo, fisiología y disfunciones asociadas con el sistema cannabinode.

1.c. “Candidatos” a receptores cannabinoides

En los últimos años, varios estudios sugieren la existencia de receptores cannabinoides adicionales, distintos de CB₁ y CB₂, capaces de mediar efectos específicos en la transmisión sináptica, el sistema vascular y el sistema inmune. Cabe destacar:

1.c.1. GPR55 (receptor huérfano acoplado a proteínas G)

Este receptor ha sido caracterizado, muy recientemente, por Ryberg y cols., (2007), quienes han clonado y determinado su secuencia en rata, ratón y humano. GPR55 se expresa en cerebro, con un patrón de expresión diferente en rata y humano, pero también en tejido periférico (Sawzdargo y cols., 1999; Ryberg y cols., 2007).

Varios cannabinoides, incluyendo endógenos (AEA, 2-AG, PEA, virodamina, OEA), naturales (Δ^9 -THC) y sintéticos (CP-55940, O-1602), se comportan como agonistas potentes de GPR55. Además, PEA, 2-AG y virodamina ejercen una acción más potente a través de este receptor, que a través de CB₁ o CB₂. GPR55 se propone como candidato a convertirse en el receptor cannabinoide que controle el tono vascular (Ryberg y cols., 2007).

Datos recién publicados señalan que este posible receptor cannabinoide es capaz de activar rutas de señalización diferentes a las usadas por CB₁ y CB₂, e incrementar la excitabilidad neuronal (Lauckner y cols., 2008).

1.c.2. Receptor “abnormal-cannabidiol”

Este receptor, de identidad molecular desconocida, se localiza en el endotelio vascular, donde media la vaso-relajación de la arteria mesentérica, y abnormal-cannabidiol y O-1918 son su agonista y antagonista selectivos, respectivamente (Offertáler y cols., 2003). También se sugiere su implicación en angiogénesis, puesto que es capaz de modular la migración de las células del endotelio vascular via PI3K/Akt (Mo y cols., 2004).

1.d. Receptor vanilloide TPRV₁

TPRV₁ es un receptor ionotrópico, activado por capsaicina, el ingrediente activo del chile picante, y resiniferatoxina (Caterina y cols., 1997),

que se expresa en neuronas sensoriales primarias, SNC y células no neuronales (Mezey y cols., 2000; Sanchez y cols., 2005).

Los receptores TRPV₁ y CB₁ comparten los ligandos AEA y NADA (Zygmunt y cols., 1999), y se co-expresan en grupos de neuronas de los sistemas nerviosos periférico y central (Cristino y cols., 2006). El endocannabinoide AEA es capaz de modular la activación de TRPV₁, teniendo una implicación potencial en el tratamiento de desórdenes inflamatorios, respiratorios y cardiovasculares (revisado en Ross, 2003). La relación existente entre el sistema vanilloide y cannabinoide es evidente, y por ello TRPV₁ puede ser considerado un receptor cannabinoide ionotrópico (Jordt y cols., 2004).

1.e. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)

Los PPARs son una familia de factores de transcripción nucleares, pertenecientes a la superfamilia de receptores esteroideos, que incluye tres isoformas: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ . Los PPARs heterodimerizan con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y se unen a elementos de respuesta induciendo la transcripción de genes diana involucrados en la regulación del metabolismo lipídico, diferenciación celular e inflamación (Ferre, 2004; Moraes y cols., 2006; Stienstra y cols., 2007). Las tres isoformas se expresan en el cerebro y en el sistema nervioso periférico (Moreno y cols., 2004). Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que PPAR β/δ es la isoforma prevalente en el cerebro, y que se encuentra en todos los tipos celulares, mientras que PPAR α se expresa predominantemente en astrocitos a muy bajo nivel (Basu-Modak y cols., 1999). Los astrocitos poseen los tres isotipos de PPAR, aunque en rangos diferentes dependiendo del área del cerebro y edad del animal (Cristiano y cols., 2001). El isotipo γ es la isoforma dominante en microglía (Cullingford y cols., 1998).

En los últimos años, numerosas evidencias sugieren que los cannabinoideos, y en particular los endocannabinoideos, pueden activar la familia de receptores nucleares PPAR a través de rutas directas o indirectas y mediar respuestas fisiológicas que incluyen regulación de la alimentación, pérdida de peso, lipólisis, analgesia y efectos anti-inflamatorios (revisado en Sun y Bennett, 2007). Así OEA a través de la activación de PPAR α regula el apetito y peso corporal, estimula la lipólisis y tiene efectos neuroprotectores (Fu y cols., 2003; Guzmán y cols., 2004; LoVerme y cols., 2005; Sun y cols.,

2006). También PEA presenta propiedades anti-inflamatorias y analgésicas mediadas por PPAR α (LoVerme y cols., 2005). Otros endocannabinoides que activan PPAR α son AEA, virodamina y noladin éter (Sun y cols., 2006). Los endocannabinoides, AEA y 2-AG, y el ácido ajulémico tienen propiedades anti-inflamatorias mediadas por PPAR γ (Liu y cols., 2003a; Rockwell y cols., 2006). En cuanto a PPAR β/δ , poco se sabe sobre su posible activación por cannabinoides.

2. LIGANDOS CANNABINOIDES

2.a. Endocannabinoides

Estos componentes endógenos, capaces de unirse a los receptores cannabinoides y activarlos funcionalmente, son sintetizados y liberados sólo “por demanda”, es decir, cuando y donde son necesarios, siguiendo estímulos psicológicos o patológicos. Posteriormente, son recaptados y degradados enzimáticamente en el interior de la célula.

Hasta la fecha se han identificado distintos endocannabinoides, todos ellos derivados de ácido araquidónico, aunque los más importantes son AEA y 2-AG:

2.a.1. *N*-araquidonil-etanolamida (AEA)

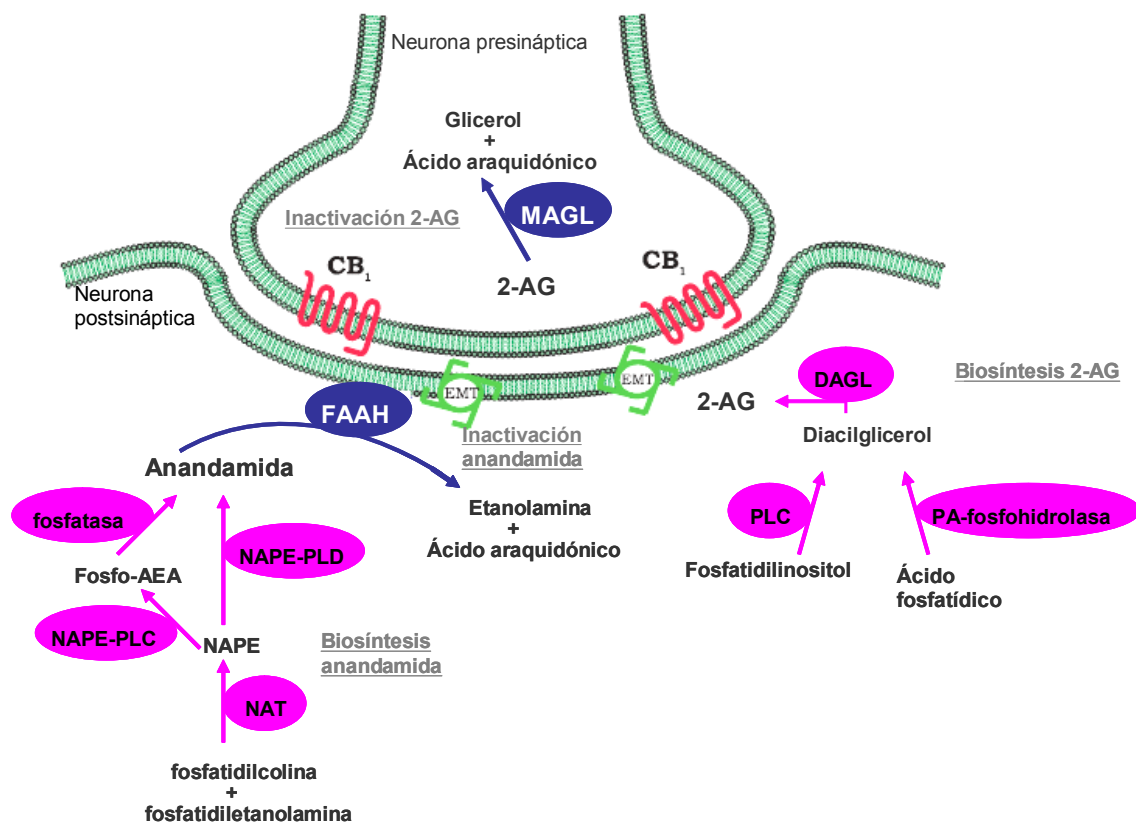
También conocida como anandamida, se aisló de cerebro porcino y se identificó como cannabinoide endógeno en 1992 por Devane y cols.

AEA puede actuar como ligando endógeno de los receptores CB₁, CB₂, TRPV₁ (Zygmunt y cols., 1999) y PPAR γ (Bouaboula y cols., 2005). Tiene una afinidad por CB₁ similar a Δ^9 -THC (Pertwee, 2004) y dependiendo del tejido y la respuesta biológica que se mida, se comporta como agonista parcial o completo del receptor CB₁. Como agonista parcial de CB₂ tiene muy baja eficiencia, pudiendo incluso actuar como antagonista (Gonsiorek y cols., 2000).

La producción de AEA no se restringe a neuronas, también astrocitos y microglía, entre otros tipos celulares, producen este ligando (Felder y cols., 1996; Schmid y cols., 1997; Walter y cols., 2003).

La principal ruta de síntesis de AEA (revisado en Pacher y cols., 2006; ver esquema, **Figura 2**), a partir de fosfolípidos de membrana, es a través de una reacción en dos pasos, donde se produce la transferencia enzimática de ácido araquidónico de la posición *sn*-1 de fosfatidilcolina (PC) al grupo amino de fosfatidiletanolamina (PE), formando *N*-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). Esta reacción es catalizada por una trans-acilasa dependiente de Ca^{2+} que no ha sido clonada hasta este momento. El precursor NAPE es entonces hidrolizado a AEA por una fosfolipasa D (PLD). Esta fosfolipasa es selectiva para NAPEs (NAPE-PLD) y se ha clonado recientemente. En estómago, el precursor *N*-acil-fosfatidiletanolamina también puede ser hidrolizado por la fosfolipasa A_2 y el producto, *N*-acil-liso-fosfatidiletanolamina, es entonces metabolizado por una liso-PLD, formando varias *N*-aciletanolaminas, y entre ellas AEA. En macrófagos RAW246.7, la producción de AEA inducida por lipopolisacárido (LPS) parece seguir también una ruta alternativa donde NAPE es hidrolizada a fosfo-AEA, y ésta posteriormente desfosforilada.

Figura 2. Esquema de la síntesis y degradación de AEA y 2-AG en neuronas pre y postsinápticas (adaptación de Pacher y cols. 2006). EMT, transportador de endocannabinoides; DAGL, diacilglicérido lipasa; FAAH, amido hidrolasa de ácidos grasos; MAGL, monoacilglicérido lipasa; NAT, N-aciltransferasa; NAPE, *N*-araquidonil-fosfatidiletanolamina; PLC, fosfolipasa C.



2.a.2. 2-Araquidonil glicerol (2-AG)

Este segundo endocannabinoide se identificó en 1995 en intestino canino (Mechoulam y cols., 1995) y cerebro de rata (Sugiura y cols., 1995). 2-AG se comporta como agonista de CB₁ y CB₂, aunque parece que con una potencia menor que AEA.

Los niveles basales de 2-AG en cerebro son mucho mayores que los de AEA, aunque sólo una fracción del total es la que probablemente esté involucrada en la señalización cannabinoide, puesto que 2-AG también interviene en el metabolismo lipídico (revisado en Sugiura y cols., 2006).

2-AG se sintetiza a partir de la hidrólisis de diacilglicerol (DAG) por una DAG lipasa selectiva para la posición *sn*-1. Por su parte, DAG puede generarse a partir de la hidrólisis de, o bien fosfoinosítidos (PI), catalizada por una fosfolipasa C selectiva para PI (PI-PLC), o bien ácido fosfatídico (PA), catalizada por una PA fosfohidrolasa (Sugiura y cols., 2006). Dos isoenzimas DAG lipasa (α y β) han sido clonadas (Bisogno y cols., 2003) y localizadas en la membrana plasmática postsináptica en cerebro adulto.

2.a.3. 2-araquidonilglicerol éter (Noladin éter)

Identificado en 2001 en cerebro porcino (Hanus y cols., 2001), este endocannabinoide se comporta como agonista de CB₁ y CB₂, aunque la afinidad por CB₁ es mucho mayor (Pertwee, 2004).

2.a.4. O-araquidonil etanolamina (Virodamina)

Se aisló de cerebro de rata, pero también se encontró en varios tejidos periféricos incluyendo piel, bazo, riñón y corazón. Se comporta como agonista parcial de CB₁ y agonista completo de CB₂ (Porter y cols., 2002).

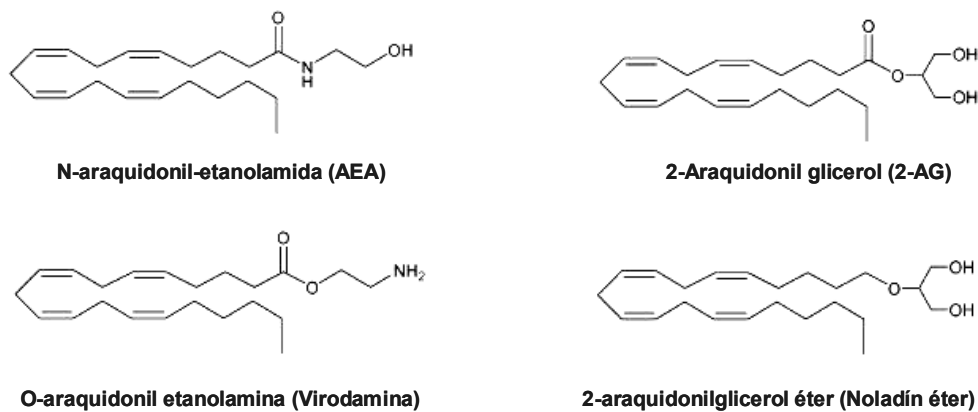
2.a.5. N-araquidonil-dopamina (NADA)

Se identificó en cerebro bovino y de rata (Huang y cols., 2002). Es agonista de CB₁ (Bisogno y cols., 2000) y también actúa como ligando de TRPV₁ (Huang y cols., 2002).

2.a.6. N-araquidonil-L-serina (ARA-S)

Este endocannabinoides, identificado muy recientemente, se aisló de cerebro bovino y se une débilmente a CB₁, CB₂ y TRPV₁ (Milman y cols., 2006).

Figura 3. Estructura química de los principales endocannabinoides.



También existen otros derivados de ácidos grasos endógenos considerados endocannabinoides porque, aunque no activan receptores cannabinoides, son capaces de potenciar la actividad de AEA y 2-AG a través de un mecanismo llamado “entourage effect”, (Ben-Shabat y cols., 1998; Mechoulam y cols., 2002; Smart y cols., 2002). Entre ellos se encuentran palmitoiletanolamida (PEA), estearoiletanolamida (SEA), oleoiletanolamida (OEA), araquidonilglicina, 2-lineoilglicerol y 2-palmitoilglicerol y oleamida (revisado en Hanus, 2007).

2.b. Fitocannabinoides

Con este término se designa a los más de 60 cannabinoides presentes en la planta *Cannabis sativa*. Los más importantes son:

2.b.1. Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)

Es el primer constituyente aislado (Gaoni y Mechoulam, 1964), y el responsable de las propiedades psicoactivas del *cannabis*. Se comporta como agonista parcial de CB₁ y CB₂, y dependiendo del nivel de expresión y la eficiencia en el acoplamiento a esos receptores, activará o bloqueará su activación por otros cannabinoides (revisado en Pertwee, 2008).

2.b.2. Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC)

Sólo aparece en algunas variedades de la planta y su concentración es muy pequeña en comparación con la de Δ^9 -THC. Su perfil farmacológico es muy parecido a Δ^9 -THC, aunque sus efectos son más débiles (Mechoulam y cols., 1972).

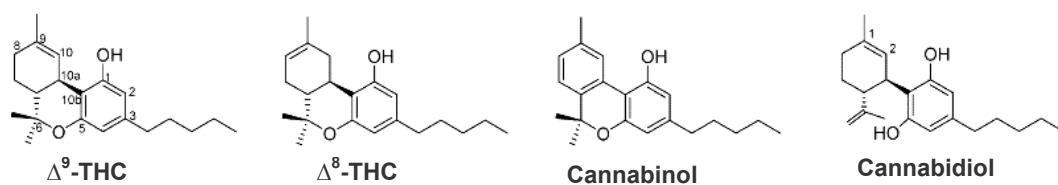
2.b.3. Cannabinol (CBN)

Fue el primer cannabinoide obtenido en una forma pura (revisado en Mechoulam y Hanus, 2000), y presenta mayor afinidad por el receptor CB_2 que por CB_1 . También tiene propiedades psicoactivas, pero son aproximadamente una décima parte de las descritas para Δ^9 -THC (Munro y cols., 1993).

2.b.4. Cannabidiol (CBD)

Es el principal constituyente no psicoactivo del *cannabis* y un potente anti-oxidante. Tiene muy poca afinidad por los receptores cannabinoideos, aunque, muy recientemente, se ha señalado que puede actuar como antagonista de los agonistas de CB_1 y CB_2 (revisado en Pertwee, 2008). CBD tiene efectos biológicos de potencial interés terapéutico en neuroprotección, náuseas, emesis, isquemia cerebral, diabetes tipo 1, ansiedad, artritis reumatoide y cáncer (revisado en Mechoulam y cols., 2007).

Figura 4. Estructura química de los principales cannabinoideos naturales



2.c. Ligandos sintéticos

Se clasifican en cuatro categorías (clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides), aunque varios agonistas (JTE 907 y BAY38-7271) y antagonistas (diarilpirazolas como SR141716A) no tienen cabida en esa clasificación (Howlett y cols., 2002):

2.c.1. Agonistas clásicos

Mantienen la estructura de dibenzopirano de los fitocannabinoides y se incluyen compuestos como HU-210, DMH-cannabidiol, nabilona, dronabinol, y ácido ajulémico (CT3), todos ellos ligandos de CB₁ y CB₂ (Palmer y cols., 2002; Pacher y cols., 2006). Nabilona (Cesamet®) y dronabinol (Marinol®) se comercializan para controlar las náuseas y vómitos producidos por la quimioterapia (revisado en Ben Amar, 2006) y prevenir la pérdida de peso en pacientes con SIDA, respectivamente (Beal y cols., 1995). El ácido ajulémico es un potente anti-inflamatorio y analgésico, sin efectos psicoactivos o sobre el comportamiento.

La distribución, mayoritariamente periférica, de los receptores CB₂, les ha convertido en una diana atractiva para el desarrollo de fármacos, ya que además su estimulación está desprovista de los efectos psicotrópicos mediados por CB₁. Por ello, se han desarrollado agonistas selectivos, como son JWH-051, JWH-133, JWH-139, L-759633 y L-759656, capaces de unirse a CB₂ a concentraciones por debajo del rango nanomolar (Hollett y cols., 2002).

2.c.2. Agonistas no clásicos

Son análogos bicíclicos y tricíclicos de Δ^9 -THC que carecen del anillo de pirano. El principal representante es el CP-55940, agonista de ambos receptores, cuya forma tritrida se utilizó para demostrar la existencia de receptores cannabinoides (Devane y cols., 1988). También se encuentran CP-55244, CP-47497, levonantradol y el agonista selectivo CB₂, HU-308 (Palmer y cols., 2002). Levonantradol se emplea administrado intramuscularmente como anti-emético y analgésico (revisado en Ben Amar, 2006).

2.c.3. Aminoalquilindoles

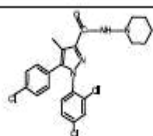
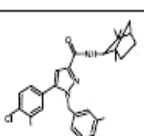
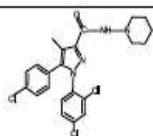
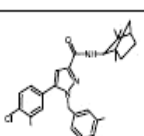
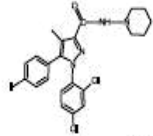
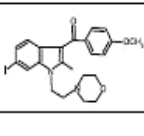
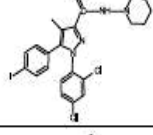
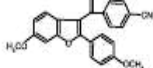
La estructura química de estos compuestos difiere bastante de la de los grupos anteriores, y su principal representante es WIN-55212, agonista de los receptores CB₁ y CB₂ (Palmer y cols., 2002). Los agonistas selectivos CB₂ de este grupo, JWH-015, L-768242, AM124, GW405833 y GW842166X, tienen efectos útiles en modelos de inflamación y dolor (Howlett y cols., 2002; Nackley y cols., 2003).

2.c.4. Eicosanoides

Derivados principalmente de la estructura de AEA, pero más estables a la hidrólisis enzimática que el endocannabinoide, encontramos metanandamida (AM356), araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA), araquidonil-ciclopropilamida (ACPA) y O-1812, todos ellos agonistas selectivos de CB₁ (Hollett y cols., 2002). También pertenecen a este grupo O-585, O-689, O-1812 (Wiley y cols., 1998), retroanandamida (Parkkari y cols., 2006), los agonistas híbridos CB₁/TPRV₁, O-1861 y arvanil (Di Marzo y cols., 2001; Di Marzo y cols., 2002), y el híbrido CB₂/TPRV₁, PhAR (Appendino y cols., 2006).

En cuanto a los antagonistas, algunos ejemplos de diarilpirazolas selectivas de CB₁ son, SR141716A, AM251 y AM281 (Hollett y cols., 2002). SR141716A (Rinaldi-Carmona y cols., 1994), también conocido como Rimonabant, fue el primer antagonista descrito para CB₁ y está siendo testado para el tratamiento de obesidad, dependencia al tabaco y factores de riesgo cardiometabólicos (Gelfand y Cannon, 2006). Recientemente se ha anunciado la suspensión temporal de los ensayos clínicos realizados con Rimonabant así como su comercialización como fármaco contra la obesidad como consecuencia de los trastornos psiquiátricos derivados de su uso (Lee y cols., 2009). Otro antagonista selectivo de CB₁, perteneciente a otra serie química es LY320135. Los antagonistas selectivos de CB₂ más destacados son SR144528, AM630 y JTE907 (Lambert y Fowler, 2005).

Figura 5. Antagonistas selectivos de los receptores CB₁ y CB₂

Receptor CB ₁		K _i (nM)		Receptor CB ₂		K _i (nM)	
		CB ₁	CB ₂			CB ₁	CB ₂
SR 141716		11,8 12,3 5,6 1,8	13,200 702 >1,000 514	SR 144528		437 >10,000 70 50,3	0,60 5,8 0,28 1,89
AM251		7,49	2,290	AM630		5,152	31,2
AM281		12	4,200				
LY320135		141	14,900				

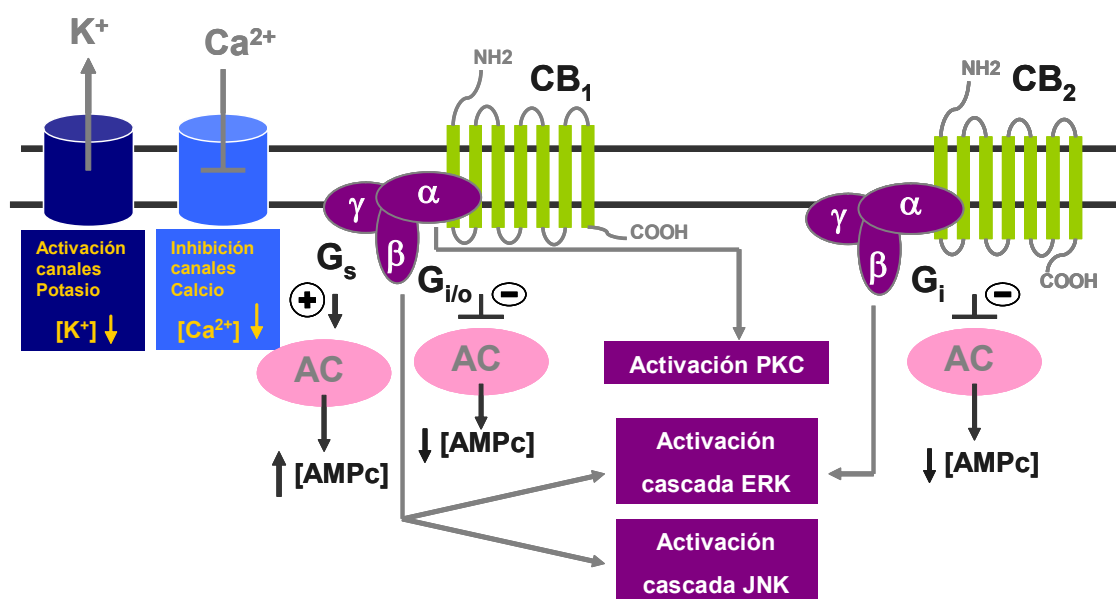
Las áreas terapéuticas propuestas para el uso de antagonistas cannabinoides son obesidad, dependencia a nicotina y alcohol, y desórdenes del SNC, entre otras (Grotenhermen, 2005).

Todos estos antagonistas, además de prevenir o atenuar acciones cannabimiméticas bloqueando el tono endógeno, también pueden por sí solos provocar efectos contrarios a los evocados por agonistas cannabinoides, comportándose como agonistas inversos en algunos sistemas (Pertwee, 1999). Por ello, también se han desarrollado antagonistas neutros, incapaces de producir efectos cannabimiméticos inversos en ausencia de agonistas endógenos o exógenos añadidos. Todavía no se han desarrollado antagonistas neutros de CB₂, pero para CB₁ encontramos O-2654, O-2050, VCHSR y NESS0327 (Pertwee, 2005).

3. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES CELULARES

La transducción de señales a través de los receptores CB₁ y CB₂, ocurre fundamentalmente a través de su interacción con proteínas G_{i/o}, lo que produce la inhibición de la actividad adenil ciclasa y una estimulación de la vía MAP quinasa. Además el receptor CB₁ esta también acoplado a canales iónicos de Ca²⁺ y K⁺, característica que no comparte CB₂.

Figura 6. Rutas de transducción de los receptores cannabinoides (adaptación de Lambert y Fowler, 2005).



3.a. Mecanismo de transducción de señales del receptor CB₁

En la mayoría de los tejidos el receptor CB₁ se acopla a proteínas G_{i/o}, aunque en determinadas circunstancias puede unirse a proteínas G_s (revisado en Howlett, 2004), y algún estudio también sugiere que a G_{q/11} (Lauckner y cols., 2005).

La activación de CB₁ es capaz de modular los niveles de AMPc intracelular, y por tanto regular la fosforilación de la proteína kinasa A y producir cambios en la actividad celular (Childers y Deadwyler., 1996). Su acoplamiento a las isoformas I, V, VI o VIII de adenil ciclasa a través de proteínas G_{i/o} siempre resulta en la inhibición de la actividad ciclasa, a través de la liberación de la subunidad G_{iα}, y la disminución de los niveles de AMPc intracelular. Pero los cannabinoides también pueden estimular las isoformas II, IV o VII de la enzima, a través de la liberación del dímero Gβγ, y producir un incremento de AMPc (Rhee y cols., 1998).

Los ligandos cannabinoides, también a través de la subunidad Gβγ, inhiben los canales de Ca²⁺ tipo N y P/Q y activan los canales de K⁺ tipo A (Mackie y Hille, 1992; Mackie y cols., 1995). Sin embargo, algunos ligandos inhiben los canales de K⁺ tipo D (Mu y cols., 1999) y M (Schweitzer, 2000) en neuronas del hipocampo.

Los niveles de Ca²⁺ intracelular también son regulados vía CB₁, ya que su activación y acoplamiento a proteínas G_{i/o}, activa la fosfolipasa C (PLC) y libera Ca²⁺ de los reservorios sensibles a inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Sugiura y cols., 1997). El agonista cannabinoide WIN55,212-2 también es capaz de aumentar de la concentración de Ca²⁺ intracelular vía CB₁ por acoplamiento a G_{q/11} y aumento de la actividad de PLC (Lauckner y cols., 2005).

La ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) es un mecanismo de señalización clave que regula funciones celulares como crecimiento celular, transformación y apoptosis. Los receptores CB₁ han mostrado activar positivamente algunos miembros de la ruta como p42/p44 MAPK (también conocida como ERK 1/2) (Bouaboula y cols., 1995; Sanchez y cols., 1998b), c-JUN N-terminal kinasa (Rueda y cols., 2000) y p38 kinasa (Rueda y cols., 2000; Derkinderen y cols., 2001). Aunque el mecanismo de modulación de MAPK por CB₁ no se conoce, se han propuesto dos rutas de transducción de señales. La primera a través de la activación de fosfatidilinositol 3 kinasa/proteína kinasa B (PI3k/PKB) que media la fosforilación de tirosina y la activación de Raf (Gómez del Pulgar y cols., 2000). La segunda a partir de la liberación de ceramidas, que como mensajeros lipídicos

secundarios activan la cascada Raf MAPK (Sanchez y cols., 1998b). Las ceramidas pueden provenir de la hidrólisis de esfingomielina (Sanchez y cols., 1998b; 2001b) o ser sintetizadas de novo (Gomez del Pulgar y cols., 2002).

3.b. Mecanismo de transducción de señales del receptor CB₂

El receptor CB₂ también inhibe la adenilato ciclasa a través de su interacción con proteínas G_{i/o} (Bayewitch y cols., 1995), pero a diferencia de CB₁, no está acoplado a G_s (Felder y cols., 1995).

Los cannabinoides pueden modular también la ruta MAPK vía CB₂, a través de la activación de PI3k/PKB, que en este caso induce la translocación de Raf-1 a la membrana y la fosforilación de p42/p44 MAPK (Sánchez y cols., 2003).

La estimulación del receptor CB₂ también incrementa los niveles de Ca²⁺ intracelular a través de la activación de PLC y la consiguiente liberación de Ca²⁺ de los reservorios sensibles a IP₃ (Zoratti y cols., 2003).

4. MECANISMO DE INACTIVACIÓN ENDOCANNABINOIDE

Los endocannabinoides, como ocurre con los neurotransmisores clásicos, tienen un sistema específico de inactivación encargado de terminar su actividad biológica. Esta inactivación tiene lugar a través de un proceso de dos pasos que incluye la retirada del medio del ligando y su degradación enzimática en el interior de la célula.

4.a. Recaptación de endocannabinoides

En un principio, debido a la estructura hidrofóbica de los endocannabinoides, se consideró que el transporte de estos ligandos a través de la membrana celular era un proceso pasivo. Sin embargo, en 1994 Di Marzo y cols. sugieren que la acumulación de AEA en neuronas es a través de un proceso de difusión facilitada, mediado por una proteína transportadora presente en la membrana. Años más tarde, varios estudios confirman que la recaptación de AEA es un proceso de transporte facilitado, es decir, un proceso rápido, saturable, específico, dependiente de la temperatura e independiente de Na⁺ y de ATP (Beltramo y cols., 1997; Hillard y cols., 1997; Maccarrone y cols., 2000). El transporte de endocannabinoides se ha estudiado y caracterizado en neuronas, células gliales y líneas celulares centrales y periféricas (Beltramo y cols., 1997; Hillard y cols., 1997;

Maccarrone y cols., 2000). Pero hasta este momento, esta proteína transportadora no se ha conseguido aislar y/o clonar, lo que ha generado cierta controversia sobre su existencia. Un estudio muy reciente acaba de identificar a las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) como los primeros transportadores intracelulares de AEA (Kaczocha y cols., 2009).

Otros mecanismos de recaptación que se han propuesto incluyen: a) difusión simple a través de la membrana, regulada por la hidrólisis de AEA (Kaczocha y cols., 2006), b) difusión simple y secuestro de AEA intracelular por una proteína o compartimiento lipídico (Hillard y Jarrahian, 2003), c) internalización de AEA independiente de su hidrólisis enzimática (Fegley y cols., 2004; Hillard y cols., 2007), d) endocitosis mediada vía caveola/lipids rafts (McFarland y cols., 2004).

Aunque el mecanismo responsable de la acumulación de AEA no está resuelto, en los últimos años se han desarrollado y caracterizado compuestos como AM404, VDM11, OMDM-1, OMDM-2 y UCM707, capaces de inhibir su recaptación (revisado en Lambert y Fowler, 2005).

En cuanto a la recaptación de 2-AG, se conocen pocos datos. Hasta el momento parece que el proceso de internalización es mediado por un transportador común para AEA y 2-AG, puesto que el compuesto AM404 es capaz de inhibir la recaptación de ambos endocannabinoides (Piomelli y cols., 1999; Bisogno y cols., 2001). También se propone que sean dos los transportadores que median el transporte de AEA y 2-AG, funcionalmente similares y selectivos para cada ligando, pero capaces de transportar ambos endocannabinoides con una eficacia similar (Bisogno y cols., 2001).

4.b. Hidrólisis de AEA

Una vez en el interior de la célula, la enzima responsable de hidrolizar el enlace amida de AEA, dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina, es la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). FAAH es una proteína integral de membrana, perteneciente a la familia de las amidasas, que ejerce su actividad principalmente en retículo endoplasmático y aparato de Golgi, y es capaz de hidrolizar varias *N*-aciletanolamidas y amidas primarias de ácidos grasos, como PEA, OEA y oleamida.

Se clonó por primera vez en rata (Cravatt y cols., 1996), y posteriormente en humano, ratón y cerdo, compartiendo todas ellas un 73% de homología de secuencia (revisado en Lambert y Fowler, 2005).

La distribución de FAAH varía entre especies. En rata, se distribuye principalmente en hígado, intestino delgado, cerebro, riñón, testículos, pulmón y bazo, y en humano, en páncreas, cerebro, riñón y músculo esquelético (Cravatt y cols., 1996; Lambert y Fowler, 2005).

En cerebro, FAAH se localiza en el soma y dendritas de células piramidales y de Purkinje en cerebelo, corteza e hipocampo (Egertová y cols., 1998; Tsou y cols., 1998b), regiones con un elevado nivel de expresión de CB₁. A pesar de la localización postsináptica de la enzima (Gulyas y cols., 2004), las neuronas FAAH positivas no se localizan postsinápticamente con respecto a las neuronas que expresan CB₁, por tanto, el receptor y la enzima no presentan un patrón de expresión complementario (Egertová y cols., 2003). FAAH también está presente en oligodendrocitos (Egertová y cols., 2003) y astrocitos (Stella y cols. 1997; Romero y cols., 2002), siendo su expresión y actividad más elevadas en los astrocitos reactivos próximos a los depósitos de β-amiloide, característicos de la enfermedad de Alzheimer (Benito y cols., 2003) y Síndrome de Down (Nuñez y cols., 2008).

Recientemente, se ha identificado en humano y primates una segunda amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH-2), que comparte un 20% de homología de secuencia con FAAH (Wei y cols., 2006). FAAH-2 también hidroliza amidas primarias de ácidos grasos y es sensible a las principales clases de inhibidores de FAAH, pero su distribución tisular es diferente (Wei y cols., 2006).

El desarrollo de inhibidores de FAAH (revisado en Lambert y Fowler, 2005), entre los que destacan URB597 y OL-135, ha permitido obtener efectos beneficiosos en dolor, ansiedad y depresión, eliminando los efectos secundarios que acompañaban a la activación de CB₁ (Kathuria y cols., 2003; Lichtman y cols., 2004a; Gobbi y cols., 2005).

Los ratones knock out para la enzima, en los que los niveles de AEA y otras *N*-aciletanolamidas son 10 veces superiores que en animales *wild type* (Cravatt y cols., 2001), también muestran una menor sensibilidad al dolor (Lichtman y cols., 2004b), como consecuencia del aumento del tono endocannabinoide. Más recientemente, se ha generado un segundo modelo de ratones knock out para FAAH (Cravatt y cols., 2004), en los que la expresión de la enzima se ha restringido al SNC. En este modelo, la analgesia parece ser mediada por la interacción de AEA con los receptores cannabinoides en el SNC, mientras que la actividad anti-inflamatoria es

mediada por los niveles periféricos elevados de amidas de ácidos grasos (Cravatt y cols., 2004).

4.c. Hidrólisis de 2-AG

El endocannabinoide 2-AG también puede ser sustrato de la enzima FAAH *in vitro* (Goparaju y cols., 1998), pero no *in vivo*, puesto que los niveles de 2-AG en cerebro de ratones knock out para FAAH no varían con respecto a *wild type* (Pacher y cols., 2005).

2-AG es hidrolizado por una monoacilglicérido lipasa (MAGL) (Dinh y cols., 2002), clonada en ratón (Karlsson y cols., 1997) y rata (Dinh y cols., 2002), que no hidroliza AEA, y que se localiza en neuronas presinápticas (Gulyas y cols., 2004).

Esta enzima se expresa principalmente en riñón, testículos, tejido adiposo, glándula adrenal y cerebro (Karlsson y cols., 1997). En cerebro, los niveles más altos de MAGL, al igual que FAAH, se encuentran en aquellas regiones donde CB₁ también es abundante, tales como hipocampo, corteza, tálamo anterior y cerebelo (Dinh y cols., 2002; Gulyas y cols., 2004).

Un estudio reciente sugiere la existencia de una nueva MAGL, que se expresa en microglía primaria de ratón y en la línea celular BV-2, y que está enriquecida en las fracciones mitocondrial y citosólica. Esta enzima es farmacológicamente diferente a MAGL y sería la responsable de controlar los niveles de 2-AG en microglía (Muccioli y cols., 2007).

La familia de inhibidores de MAGL contiene pocos miembros y la mayoría de ellos son poco selectivos. Los inhibidores de FAAH, como URB597 y OL-135, no producen una inhibición significativa de MAGL. Sin embargo, dos análogos de araquidonilglicerol, O-2203 y O-2204, son capaces de inhibir MAGL y FAAH, con una potencia similar y sin activar los receptores CB₁ (revisado en Lambert y Fowler, 2005).

4.d. Otros mecanismos de inactivación endocannabinoide

Algunos datos señalan que AEA y 2-AG, también pueden ser susceptibles a mecanismos oxidativos catalizados por varios tipos de oxigenasas. Estas enzimas están involucradas en la producción eicosanoide de ácido araquidónico e incluyen lipoxigenasas (LOX), ciclooxigenasas (COX) y oxidasas del citocromo P450 (Kozak y Marnett, 2002).

La isoforma constitutiva de COX, COX-1, es menos efectiva que COX-2 metabolizando endocannabinoideos (Kozak y cols., 2003). Sin embargo, la

isoforma inducible, COX-2, oxigena AEA (Yu y cols., 1997) y 2-AG (Kozak y cols., 2000) proporcionando prostaglandin etanolamidas y prostaglandin glicerol ester, una clase nueva de prostaglandinas involucradas en la plasticidad sináptica del hipocampo (Yang y cols., 2008).

2-AG también puede ser metabolizado por LOX-12 (Moody y cols., 2001) y LOX-15, pero no por la enzima LOX-5 (Kozak y cols., 2002). El derivado 15 hidro-peroxi, generado a partir de la oxigenación de 2-AG por LOX 15, puede actuar como ligando de los receptores nucleares PPAR α , pero no de PPAR γ (Kozak y cols., 2002). De modo que la oxigenación de 2-AG puede representar una ruta para la generación de agonistas de PPAR α . AEA también puede ser metabolizada por diferentes lipoxigenasas, y todos sus derivados oxigenados son buenos inhibidores de FAAH (van der Stelt y cols., 2002).

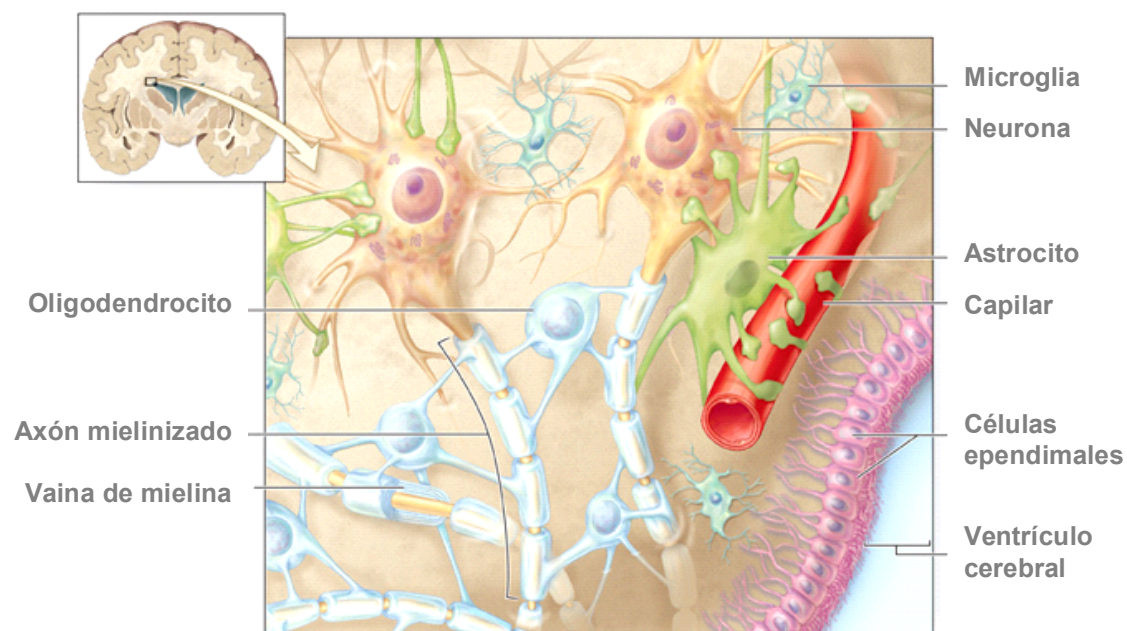
El metabolismo oxidativo de AEA y 2-AG por las enzimas del citocromo P450 produce un grupo diverso de productos oxigenados, que incluye epóxidos e hidroximetabolitos (Snider y cols., 2007).

Cabe la posibilidad de que la oxigenación de AEA y 2-AG, represente una fuente de mediadores noveles, que posean actividades biológicas potentes y diferentes de las que presentan los endocannabinoides de los que proceden.

II. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE GLIAL

El SNC está constituido por neuronas y células gliales, y la relación entre estos dos tipos de células es fundamental para mantener la homeostasis cerebral. Las células gliales tienen como función servir de soporte a las neuronas, regular las funciones metabólicas del tejido nervioso y mantener los niveles de oxígeno y nutrientes, además de participar en procesos inflamatorios que defienden al SNC y lo ayudan a recuperarse frente a agresiones externas.

Figura 7. Tipos celulares del SNC.



1. ASTROCITOS

Los astrocitos son el tipo celular no neuronal más numeroso en el SNC y de mayor tamaño. Como su nombre sugiere, son células en forma de estrella con numerosas prolongaciones citoplasmáticas, largas y estrechas, llamadas “foot processes”, que irradian del soma hacia células vecinas. Los astrocitos pueden ser (revisado en Raivich y cols., 1999): i) protoplasmáticos, con prolongaciones ramificadas y cortas, que se localizan principalmente en la sustancia gris dispersa entre los cuerpos neuronales; y ii) fibrosos, o células en forma de araña, con prolongaciones más largas y más delgadas, que se sitúan principalmente en la sustancia blanca entre los haces de axones mielinizados.

Estas células gliales forman la micro-arquitectura del cerebro, proporcionando soporte estructural, trófico y metabólico a las neuronas (Chen y Swanson, 2003). Además responden a distintos neurotransmisores (glutamato, GABA y acetilcolina, entre otros), modulan la excitabilidad neuronal y participan activamente en la transmisión y almacenamiento de la información sináptica (Perea y Araque, 2007).

También ayudan a establecer y mantener los límites del SNC, tales como la barrera hematoencefálica (BHE), a través de interacciones con las células endoteliales, y regulan la expresión y función de varios transportadores endoteliales (revisado en Abbott y cols., 2006).

En respuesta a patologías del SNC tales como trauma, isquemia, tumores o enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos se activan, dando lugar al proceso conocido como “gliosis reactiva” o “astrogliosis”. Este proceso es fundamental para limitar las áreas de daño (por la formación de cicatrices) y recuperar la actividad neuronal. Su rasgo distintivo es el aumento en número de astrocitos y la hipertrofia de sus procesos celulares. Además, se caracteriza por la sobreexpresión de algunas proteínas del filamento intermedio como la proteína glial fibrilar acídica (GFAP) y la vimentina (Eddleston y Mucke, 1993). En dichas condiciones patológicas, los astrocitos además producen una serie de mediadores químicos (glutamato, aspartato, ATP, NO, MIP-2, TNF- α e IL-1 β , entre otros) que incrementan la permeabilidad de la BHE (Ballabh y cols., 2004).

1.a. Astrocitos y SCE

La presencia del receptor CB₁ en astrocitos está bien documentada. Se ha descrito inmunoreactividad para CB₁ en astrocitos del *nucleus accumbens* en ratas Sprague-Dawley (Rodríguez y cols., 2001) y también en astrocitos localizados en el córtex cingulado, el tracto medial del cerebro anterior, la amígdala, *nucleus accumbens* y lámina I y II del asta dorsal del hipocampo en ratas Wistar (Moldrich y Wenger, 2000). Las fibras gliales perivasculares también muestran una densidad moderada-alta de la proteína CB₁ en las estructuras olfatoria y límbica (Salio y cols., 2002).

Los datos *in vitro*, por el contrario, son más controvertidos. Cultivos de astrocitos humanos, de diferentes grados, y astrocitos de rata expresan el receptor CB₁ (Bouaboula y cols., 1995; Sánchez y cols., 1998a). Molina y cols., (2002) también detectan expresión del receptor en astrocitos en cultivo de ratones CD1, mientras que Walter y Stella (2003) no consiguen ver expresión en astrocitos de ratones C57BL/6. Además, dos estudios llevados a cabo en astrocitos de ratones Swiss-Webster presentan resultados

contradictorios (Sagan y cols., 1999; Abood y cols., 2001). Estas discrepancias pueden ser reflejo de las diferencias en las estructuras del SNC utilizadas para preparar los cultivos de astrocitos, diferencias en los sistemas de cultivo o condiciones, edad de los cultivos y entre las especies. Es importante apuntar que la expresión de CB₁ cambia con el estado de diferenciación de las células en cultivo (Daaka y cols., 1996; Noe y cols., 2000).

También existen datos contradictorios con respecto a si los astrocitos expresan el receptor CB₂. Dos estudios realizados en astrocitos primarios de rata y ratón no encuentran expresión de CB₂ (Bouaboula y cols., 1995; Walter y Stella, 2003). Por el contrario, Carlisle y cols. (2002) y Sheng y cols. (2005) encuentran ARNm de CB₂ en cultivos de astrocitos corticales de rata y astrocitos humanos, respectivamente. Estos resultados pueden ligarse al hecho de que los niveles o expresión del receptor CB₂ pueden cambiar en función de la activación celular (Carlisle y cols., 2002).

Los cannabinoides inducen efectos muy diferentes en astrocitos. Así, los cannabinoides, WIN55212-2 y HU-210 vía CB₁, protegen astrocitos de la apoptosis inducida por ceramidas *in vitro* e *in vivo*, a través la activación de PI3K y ERK (Galve-Roperh y cols., 2002; Gómez del Pulgar y cols., 2002a). Pero, contrariamente a este papel protector, cannabinoides como WIN55,512-2, Δ⁹-THC y JWH-133, también inducen apoptosis en gliomas. (Galve-Roperh y cols., 2000; Sánchez y cols., 1998; Sánchez y cols., 2001a), Estos efectos divergentes a cannabinoides por parte de astrocitos y gliomas pueden ser debidos a diferencias en la regulación en la ruta de síntesis de ceramidas *de novo* (Carracedo y cols., 2004). Los cannabinoides también son capaces de reducir la expresión de iNOS y la liberación de NO, y potenciar la producción de IL-6 a través de CB₁, en gliomas y astrocitos primarios tratados con LPS y astrocitos infectados con el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (Molina-Holgado y cols., 1998; Esposito y cols., 2001). En astrocitos activados por IL-1β, WIN55,512-2 es capaz de inhibir la producción de mediadores inflamatorios como TNF-α, MCP-1, RANTES, IP10, IL-8 y las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 (Sheng y cols., 2005).

Hasta el momento se desconoce sí los astrocitos producen endocannabinoides, principalmente a causa de la limitada sensibilidad de los

métodos empleados (Di Marzo y cols., 1994; Stella y cols., 1997). Aunque recientemente, Walter y cols. (2002) han desarrollado un nuevo método, que permite detectar femtomoles de AEA y otras aciletanolamidas en muestras biológicas, gracias al cual han detectado y cuantificado la producción de AEA, PEA y OEA y otras aciletanolaminas, por astrocitos de ratón en cultivo.

Finalmente, son muchas las evidencias sobre la inactivación de endocannabinoides a través de su recaptura o hidrólisis por parte de astrocitos y líneas celulares de astrocitoma (Beltramo y cols., 1997; Deutsch y cols., 2000; Bisogno y cols., 2001). Datos inmunohistoquímicos y enzimáticos muestran expresión de la enzima FAAH en astrocitos perivasculares humanos de la sustancia blanca y gris, en córtex y ganglios basales (Romero y cols., 2002). En un estudio previo, en cultivo de astrocitos de ratón, también se detectó expresión de las proteínas FAAH y MAGL, así como sus correspondientes actividades enzimáticas (Stella y cols., 1997). Beltramo y cols., (1997) pudieron mostrar cómo el 2-AG era metabolizado rápidamente por células de astrocitoma humano.

2. OLIGODENDROCITOS

Son las células productoras de mielina en el SNC (revisado en Ndubaku y de Bellard, 2008) y el principal tipo celular de la sustancia blanca, lo que en humanos constituye alrededor del 50% del volumen total del cerebro. Los oligodendrocitos son células más pequeñas que los astrocitos y con pocas prolongaciones. Se han identificado dos tipos celulares: i) los oligodendrocitos interfasciculares, que se encuentran en la sustancia blanca y se encargan de la producción y mantenimiento de la mielina; estas células pueden recubrir con mielina los axones de más de una neurona, a diferencia de las células de Schwann, y para tal fin sus procesos se extienden desde el soma celular hasta establecer contacto con los axones, formando un entramado sostén para las neuronas (Butt y Ransom, 1993); y ii) los oligodendrocitos satélites, se encuentran en la sustancia gris y se asocian fuertemente a los somas, sin saber cuál es el tipo de unión ni su finalidad.

Los oligodendrocitos expresan receptores de glutamato permeables a Ca^{2+} y presentan baja resistencia a procesos de estrés oxidativo, dos factores que les hace particularmente susceptibles a procesos de apoptosis y necrosis (revisado en Matute y cols., 2007). El daño de los oligodendrocitos compromete la función del

cerebro, y su lesión o muerte es una característica importante en desórdenes desmielinizantes y neurodegenerativos como esclerosis múltiple (EM).

Las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), que se originan durante el desarrollo embrionario del SNC (revisado en Sher y cols., 2008), restauran parcialmente la mielina perdida en estos desórdenes. Estas células son reclutadas en áreas desmielinizadas para llevar a cabo el proceso de remielinización (Chang y cols., 2002). Sin embargo, su supervivencia y exitosa diferenciación a oligodendrocitos mielinizantes requiere un contacto axón-oligodendrocito adecuado (Fernández y cols., 2000) y factores tróficos liberados por neuronas y astrocitos (Barres y cols., 1992; Gard y cols., 1995). Por ello, la aplicación en la zona de lesión de células madre neurales derivadas de OPCs, óptimamente funcionales, se ha convertido en una aproximación terapéutica para promover el proceso de remielinización (revisado en Sher y cols., 2008).

2.a. Oligodendrocitos y SCE

Molina-Holgado y cols., (2002b) detectaron expresión del receptor CB₁ en las distintas etapas del desarrollo de oligodendrocitos de rata en experimentos *in vivo* e *in vitro*. En cultivos primarios, los oligodendrocitos, progenitores y diferenciados, también expresaban CB₂, pero no así *in vivo*.

Los cannabinoides, a través de la activación de los receptores CB₁ y CB₂ protegen los progenitores de oligodendrocitos de la apoptosis, vía un mecanismo dependiente de la ruta de señalización PI₃K/Akt (Molina-Holgado y cols., 2002b). También son capaces de reducir la respuesta de las células T-CD4⁺ en un modelo animal de EM, consiguiendo un incremento significativo en la capacidad de remielinización de los axones (Arévalo-Martín y cols., 2003). Estos autores sugieren que los cannabinoides, a través de sus acciones anti-inflamatorias y los efectos en la supervivencia y diferenciación de los oligodendrocitos, pueden favorecer la reparación de la mielina de forma directa.

No existen datos sobre la producción de endocannabinoides bajo condiciones basales o estimuladas por oligodendrocitos, o si son capaces de recapturarlos (Witting y Stella, 2004). Un estudio inmunohistoquímico comparativo sobre la distribución de FAAH y el receptor CB₁ en cerebro de ratón, reveló la presencia de la enzima en tractos de fibras identificadas como oligodendrocitos (Egertová y cols., 2003). En el cerebro medio la expresión de FAAH por oligodendrocitos era particularmente llamativa y abundante en

la sustancia blanca que rodea el núcleo cerebelar. Hasta la fecha, se desconoce la función de FAAH en estas células gliales. La asociación de FAAH con oligodendrocitos en tractos de fibras es de particular interés si se considera la reducción de su actividad en el estriado descrita en un modelo de la enfermedad de Parkinson (Gubellini y cols., 2002). Egertová y cols., (2003) especulan que la pérdida de neuronas también puede conducir a la pérdida de los oligodendrocitos asociados que expresan FAAH, lo que podría motivar los niveles reducidos de FAAH estriatal en ese modelo experimental.

3. MICROGLIA

Esta población celular constituye el 12% de las células en el SNC y fue descrita originariamente por Pío del Río-Hortega (del Río-Hortega, 1932). Son las células inmunes efectoras del SNC, o los también llamados “macrófagos del cerebro”, y sus funciones incluyen fagocitosis, presentación del antígeno, y producción y liberación de factores neurotóxicos (TNF- α , IL- β , IL-6 y especies reactivas de oxígeno) y neurotróficos (Gehrmann y cols., 1995; Rock y cols., 2004). Aunque su origen exacto es un tema controvertido, numerosos estudios, apoyando la hipótesis de Del Río-Hortega, sostienen que la microglía deriva de células precursoras del mesodermo. Sin embargo, también se ha demostrado que monocitos circulantes penetran en el cerebro, durante el desarrollo embrionario y primeras etapas postnatales, colonizando los espacios perivasculares y el propio parénquima (Ling y Wong, 1993).

La microglía del parénquima se localiza próxima a las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos en la sustancia gris y entre los tractos de fibras en la sustancia blanca del SNC (Lawson y cols., 1990). Estas células se han clasificado en cuatro tipos en base a estudios patofisiológicos y de desarrollo (revisado en Gehrmann y cols., 1995): (i) la microglía ameboide, se localiza, principalmente durante la etapa perinatal, en áreas de sustancia blanca como el cuerpo calloso. Fenotípicamente es similar a la microglía reactiva, con un gran cuerpo celular globular y procesos cortos; (ii) Durante las etapas postnatales del desarrollo la microglía ameboide se transforma en la microglía ramificada o “resting microglia”, que representa la población permanente del SNC adulto no patológico. Se caracteriza por presentar gran cantidad de ramificaciones y un pequeño citoplasma perinuclear (Kaur y Ling, 1991). Estas células también muestran ser células dinámicas, que se encuentran supervisando constantemente su medio ambiente a través de la motilidad sus procesos (Nimmerjahn y cols., 2005); (iii) la microglía activada no-fagocítica se

encuentra en áreas de inflamación del SNC y presenta un cuerpo celular hipertrófico y un retroceso en sus ramificaciones; (iv) la microglía fagocítica o microglía reactiva, que recupera sus propiedades ameboides y de movilidad necesarias para desempeñar su función macrofágica, se localiza en áreas de infección, trauma o necrosis neuronal. Estas diferentes formas de la microglía del parénquima no son independientes unas de otras, sí no que representan las transformaciones de un tipo celular en otro. La microglía muestra plasticidad en su morfología y apariencia, especialmente durante una lesión o enfermedad (revisado en Davoust y cols., 2008).

La microglía perivascular es un tipo especializado de microglía que se encuentra en la proximidad de los vasos sanguíneos del SNC, separada del parénquima cerebral por una lámina basal (Graeber y cols., 1989). Estas células perivasculares poseen funciones fagocíticas y de presentación de antígeno, y se cree que existen predominantemente en estado activado (Hickey y Kimura, 1988; Gehrmann y cols., 1995).

3.a. Microglía y SCE

La expresión de CB₁ en microglía es constitutiva, pudiéndose detectar niveles bajos del receptor en todos los estados de activación en células de rata, ratón y humano en cultivo (Sinha y cols., 1998; Carlisle y cols., 2002; Molina-Holgado y cols., 2002; Facchinetti y cols., 2003; Klegeris y cols., 2003; Cabral y Marciano-Cabral, 2005). Sin embargo, los niveles de ARNm y proteína del receptor CB₂ en microglía están modulados diferencialmente en relación al estado de activación (Carlisle y cols., 2002; Cabral y Marciano-Cabral, 2005). La microglía en estado “resting” no expresa receptores CB₂, ya que este receptor parece estar ausente en cerebro sano de rata y ratón (Howlett y cols., 2002). Aunque en cerebelo de pacientes sanos (sin patología en el SNC), Nuñez y cols. (2004) describieron expresión de CB₂ en una población microglial específica, la microglía perivascular. Este trabajo no descarta que sea debido a la inducción de este subtipo de receptor cannabinoide en respuesta al periodo de agonía o post-mortem previos, así como posibles diferencias entre especies. Sin embargo, la microglía activada de rata, ratón y humano, expresa receptores CB₂, *in situ* e *in vitro*, y su nivel de expresión depende del estado de activación celular (Carlisle y cols., 2002; Facchinetti y cols., 2003; Klegeris y cols., 2003; Walter y cols., 2003; Cabral y Marciano-Cabral, 2005).

Los cannabinoides son capaces de reducir la expresión, inducida por LPS, de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 α , IL1 β , IL-6 y TNF- α , en células microgliales de rata, a través de un mecanismo aparentemente independiente de CB₁ y CB₂ (Puffenberger y cols., 2000; Facchinetti y cols., 2003). También son capaces de modular la liberación de NO por la microglía, a través de la activación de CB₁, aunque los datos son contradictorios (Stefano y cols., 1996; Waksman y cols., 1999). Varios trabajos describen que la activación del receptor CB₂ estimula funciones microgliales tales como la migración (Walter y cols., 2003; Franklin y Stella, 2003) y la proliferación celular (Carrier y cols., 2004). Frente a estas acciones pro-inflamatorias, los cannabinoides también tienen efectos anti-inflamatorios mediados por CB₂ y son capaces de reducir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y expresión de iNOS en células microgliales activadas por diferentes estímulos (Klegeris y cols., 2003; Ortega-Gutiérrez y cols., 2005a; Ehrhart y cols., 2005; Eljaschewitsch y cols., 2006).

Las células microgliales son capaces de producir e inactivar endocannabinoides. Varios grupos han demostrado que monocitos/macrófagos producen 2-AG y AEA (Di Marzo y cols., 1996, 1999; Schmid y cols., 1997), y que estos niveles se incrementan con estímulos específicos, tales como LPS y el factor de activación plaquetaria (Liu y cols., 2003b). Estos ligandos endógenos también son sintetizados por microglía, que produce aproximadamente 20 veces más endocannabinoides que neuronas y astrocitos (Walter y cols., 2003). Los niveles basales de AEA y 2-AG también aumentan cuando la microglía se estimula, siendo mayor la producción de 2-AG (Walter y cols., 2003; Carrier y cols., 2004). Recientemente, se ha detectado la expresión y actividad enzimática de FAAH en microglía, no estimulada y tratada con LPS, en cultivos de microglía cortical de rata y la línea celular BV-2 (Tham y cols., 2007). En esta línea celular murina, también se ha descrito la expresión de una MAGL nueva, farmacológicamente diferente de MAGL, que sería la responsable de controlar los niveles de 2-AG en microglía (Muccioli y cols., 2007).

II. NEUROINFLAMACIÓN Y SCE

El proceso inflamatorio que tiene lugar en el cerebro cuando la glía, especialmente astrocitos y microglía, es activada en respuesta a estímulos tales como una infección, o un episodio de daño o trauma se conoce como “neuroinflamación”. En condiciones normales, esta inflamación del SNC, es generalmente beneficiosa y permite al cerebro responder a cambios en su ambiente y deshacerse de tejido dañado o sustancias no deseadas a través de procesos fagocíticos y de la producción de factores de protección o reparación. Sin embargo, en ocasiones este balance se altera y el proceso inflamatorio persiste, incluso cuando el estímulo que ha provocado la inflamación es eliminado, jugando un papel clave en la progresión del daño en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, encefalopatía por VIH, esclerosis múltiple, isquemia y daño por trauma cerebral.

Esta respuesta inmune comprende la activación de microglía y astrocitos, la producción de citoquinas, quimioquinas, proteínas del complemento, proteínas de fase aguda y en muchos casos infiltración de linfocitos. Los mediadores neurotóxicos y pro-inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, eicosanoides, NO y especies reactivas de oxígeno) producidos por las células gliales, principalmente por microglía reactiva, pueden resultar perjudiciales para las neuronas exacerbando su degeneración y contribuyendo al proceso neurodegenerativo (Boje y Arora, 1992; Liu y Hong, 2003; Wyss-Coray, 2006).

Los cannabinoides naturales y sintéticos son capaces de contrarrestar algunos de estos efectos y proporcionar neuroprotección en dichas condiciones patológicas (revisado en Martínez-Orgado y cols., 2007). Las acciones neuroprotectoras se creen que son mediadas a través de una variedad de mecanismos, que incluyen acciones anti-oxidantes (Hampson y cols., 1998), inhibición del flujo de Ca²⁺ mediado por NMDA (Mackie y Hille, 1992; Nadler y cols., 1993) e inhibición de la liberación de glutamato (Köfalvi y cols., 2007). Los cannabinoides actúan sobre las neuronas y glía para inhibir la liberación de moléculas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1, TNF- α y NO (Molina-Holgado y cols., 1997 2002a; Puffenbarger y cols., 2000; Cabral y cols., 2001), y aumentar la liberación de las citoquinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10 (Klein y cols., 2000) e IL-1ra (Molina-Holgado y cols., 2003), etc. De modo que, los efectos beneficiosos en neuroinflamación se deben a la inhibición de la producción de mediadores pro-inflamatorios, aumento de la producción de factores anti-inflamatorios, inhibición del reclutamiento de microglía y aumento de la supervivencia de astrocitos y oligodendrocitos.

1. **ENCEFALITIS INDUCIDA POR VIH (EVIH)**

Este proceso inflamatorio subyace a la sintomatología clínica de la demencia asociada a VIH, que afecta, al menos, a un 5-7% de pacientes con SIDA por año, sólo en Europa (Mollace y cols., 2001). A pesar del descenso inicial en la incidencia de encefalitis y/o demencia como resultado de la terapia antiretroviral, este porcentaje está aumentando de nuevo, debido a la mayor esperanza de vida en los individuos infectados por VIH. Estos pacientes presentan numerosos síntomas motores y cognitivos, incluyendo debilidad en las piernas, pérdida de memoria, apatía, aislamiento social y cambios en la personalidad. En su forma más severa y avanzada, la enfermedad conduce al paciente de forma progresiva a un estado vegetativo (González-Scarano y Martín-García, 2005). El cerebro de los niños parece ser más vulnerable, probablemente debido a la inmadurez de la BHE cuando son infectados.

Generalmente, se cree que la entrada del VIH-1 en el cerebro sigue la estrategia conocida como “caballo de Troya” (Kaul y cols., 2001). De acuerdo a esta hipótesis, los monocitos periféricos infectados que migran a través de la BHE para reemplazar a los macrófagos perivasculares, actúan como portadores del virus. De este modo, todos los virus que se encuentran en el cerebro probablemente derivan de monocitos que se han diferenciado a macrófagos perivasculares (González-Scarano y Martín-García, 2005). Una vez en el interior del SNC, los macrófagos infectados productivamente constituyen una fuente del virus e infectan la microglía que también contribuye a la producción del virus y actúa como reservorio viral. Aunque se han descrito varios mecanismos de infección de astrocitos por VIH, generalmente se acepta que la infección de este tipo celular no es productiva y que no contribuyen a la replicación viral (González-Scarano y Martín-García, 2005). También parece bien establecido que las neuronas no son infectadas de forma directa. El daño neuronal se atribuye a varios mecanismos, que incluyen stress oxidativo, producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias, y/o daño directo por proteínas virales, que conducen a la neurodegeneración y los subsiguientes síntomas clínicos (González-Scarano y Martín-García, 2005).

La entrada de linfocitos T-CD4⁺ periféricos dentro del SNC es una característica adicional de EVIH, aunque su contribución no está clara, principalmente porque los análisis genotípicos y fenotípicos muestran que los virus del cerebro son más similares a aquellos que proceden de monocitos y/o macrófagos que a los que provienen de linfocitos T (González-Scarano y Martín-García, 2005).

1.a. Rasgos neuropatológicos de EVIH

La demencia asociada a VIH se asocia patológicamente con EVIH, y este tipo de encefalitis vírica se caracteriza por la formación de células gigantes multinucleadas (CGMs) (resultado de la fusión de macrófagos y microglía), nódulos microgliales, infiltración de macrófagos desde la periferia, astrogliosis extensa, palidez de la mielina y pérdida neuronal (Persidsky y Gendelman, 2003). La palidez de la mielina, se cree que es indicativa de daño axonal o mielínico, o de la ruptura de la BHE. El 50% de los pacientes con este tipo de demencia presentan CGMs y mielina pálida cuando se les realiza la autopsia. Estos rasgos neuropatológicos, se encuentran generalmente en las regiones subcorticales del cerebro tales como los ganglios basales, tallo cerebral y sustancia blanca profunda. Por ello, no sorprende que la demencia asociada a VIH presente rasgos más característicos de una demencia subcortical (enfermedad de Huntington) que de una demencia cortical (enfermedad de Alzheimer) (Patrick y cols., 2002).

1.b. Papel de las células gliales en EVIH

Las células microgliales y macrófagos infectados por VIH se activan y secretan tanto neurotoxinas endógenas (TNF- α , IL-1 β , IL-8, eicosanoides y NO) como proteínas virales (Tat, gp120 y gp41), que pueden resultar tóxicas para las neuronas y/o astrocitos (Nottet y cols., 1995; Adamson y cols., 1996). Estas células microgliales también pueden inducir el reclutamiento de más macrófagos y microglía al sitio de infección induciendo a las células endoteliales a liberar citoquinas tales como MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3 y MIP-1 β /CCL4 (Lipton y Gendelman, 1995; Persidsky y cols., 1999). Niveles elevados de MCP-1, RANTES/CCL5 se han detectado en el cerebro y fluido cerebroespinal de pacientes con EVIH y demencia asociada a VIH (Kelder y cols., 1998; McManus y cols., 2000).

Los astrocitos activados por las citoquinas inflamatorias liberadas (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) pueden contribuir al daño neuronal. Su exposición al ácido araquidónico liberado por los macrófagos y citoquinas da como resultado un deterioro en la recaptura de glutamato y un aumento en los niveles de Ca²⁺ intracelular y glutamato, por lo que la concentración en el cerebro de glutamato y otras neurotoxinas aumenta y provoca la muerte neuronal por excitotoxicidad (Kaul y cols., 2001; González-Scarano y Martín-García, 2005).

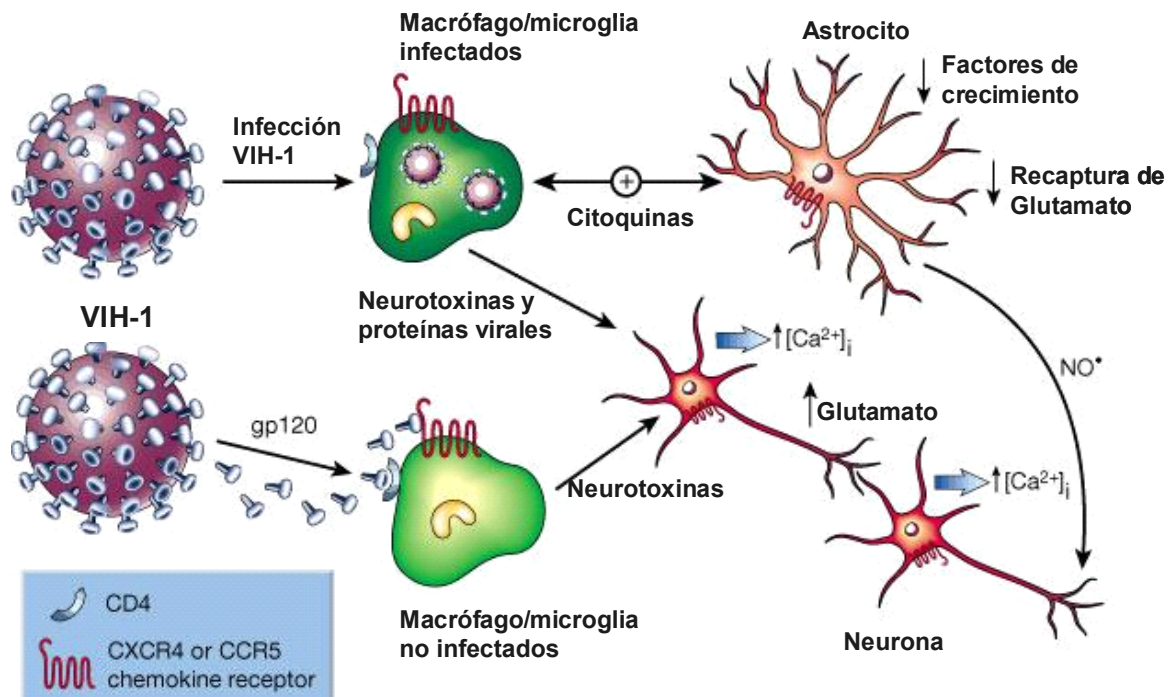


Figura 8. Esquema del daño y muerte neuronal inducida por la infección del VIH en el SNC (adaptación de Kaul y cols. 2001). Los macrófagos y microglia infectados por VIH que infiltran el cerebro liberan sustancias potencialmente tóxicas que contribuyen al daño neuronal, daño de la sinapsis y dendritas, la apoptosis y la astrocitosis. La entrada del VIH en la microglia/macrófagos se produce a través de la unión de gp120. Esta proteína viral es capaz de activar microglia/macrófagos no infectados para que liberen factores similares a los secretados en respuesta a la infección por VIH.

A pesar del prominente papel neurotóxico de macrófagos/microglia y astrocitos en la patogénesis de la encefalitis por VIH, ambos son neuroprotectores y por ello su activación también desencadena la liberación de β -quimioquinas (MIP-1 β y CCL5), CX₃CL1 y factores de crecimiento, todos ellos conocidos por regular la homeostasis de Ca²⁺ en neuronas, para promover rutas de señalización anti-apoptóticas y disminuir la excitotoxicidad y muerte neuronal mediada por la proteína vírica gp120 (González-Scarano y Martín-García, 2005). Además los astrocitos también juegan un papel regulador en EVIH amortiguando la sobre-expresión de eicosanoides, el factor de activación plaquetario y TNF- α por monocitos VIH-1 activados (Minagar y cols., 2002).

1.c. Modelos animales de encefalitis

En 1995, Narayan y cols. caracterizaron el modelo de neuroSIDa en *macacos rhesus* infectados por el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), considerado como el mejor modelo para el estudio de la patogénesis de EVIH. VIS también infecta linfocitos T-CD4⁺, células de la línea

monocito/macrófago y macrófagos del cerebro (Zink y cols., 1998). Cuando VIS se introduce en monos rhesus, los animales infectados siguen el mismo patrón de progresión de la enfermedad que los humanos infectados por VIH, aunque a ritmo acelerado (Nesbit y Schwartz, 2002). Sin embargo, de forma similar a lo que ocurre en los pacientes infectados, el bajo porcentaje de animales que desarrollan encefalitis por VIS (EVIS), aproximadamente el 25%, y la dilatada progresión hasta que desarrollan SIDA (1 a 3 años), limitan la utilidad de este modelo (Westmoreland y cols., 1998).

Más recientemente, se han desarrollado dos modelos de SIDA en macacos que muestran una progresión más rápida y una incidencia mayor de EVIS. Un modelo utiliza una combinación de virus, uno de los cuales provoca la deplección de linfocitos T-CD8⁺, y así, con la supresión del sistema inmune, en combinación con un segundo virus, que tiene tropismo por macrófagos, permite una replicación eficiente del virus dentro de los macrófagos del SNC (Zink y Clementes, 2002). El otro modelo emplea un anticuerpo monoclonal para depleccionar los linfocitos CD8⁺, lo que provoca una acumulación temprana y significativa de monocitos/macrófagos, una progresión rápida de la enfermedad y una incidencia elevada de EVIS (Schmitz y cols., 1999; Williams y cols., 2001). Ambos modelos y otros estudios realizados con *macacos rhesus* infectados por VIS, sostienen un papel indirecto del sistema inmune periférico en la contribución a la progresión y severidad de la enfermedad en el SNC (Sopper y cols., 1998).

Otros modelos incluyen ratas transgénicas VIH y ratones transgénicos VIH-gp120, que muestran los efectos crónicos de la enfermedad. También existen modelos que inyectan las proteínas gp120 o Tat en el cerebro de ratones, que imitan los efectos tóxicos agudos de la enfermedad. Estos modelos se están utilizando para la comprensión de la patogénesis de la enfermedad y los mecanismos de neurodegeneración, así como para testar tratamientos potencialmente neuroprotectores.

1.d. La proteína viral Tat

Tat es una proteína no estructural del VIH de 86-101 aminoácidos que se forma a partir de dos exones. El primer exón contribuye a los primeros 72 aminoácidos y actúa como proteína reguladora de la transactivación nuclear esencial para la replicación viral (Schwarze y cols., 1999). Durante la fase inicial de la infección, grandes cantidades de Tat, junto con otras proteínas reguladoras, son sintetizadas y secretadas de forma activa al medio

extracelular (principalmente por astrocitos, microglía y macrófagos), y recogidas por células vecinas no infectadas como las neuronas (Sabatier y cols., 1991; Chang y cols., 1997). En estas células no infectadas, Tat puede translocarse al núcleo, a través de la membrana nuclear, e inducir la replicación del virus (Watson y Edwards, 1999).

En cerebros de pacientes con EVIH (Hudson y cols., 2000) y pacientes con demencia asociada a VIH (Nath y Geiger, 1998) se han detectado niveles de ARNm de Tat. También se observó expresión de esta proteína viral en cerebros de macacos rhesus con EVIS (Hudson y cols., 2000), y en astrocitos y microglía dentro de las lesiones nodulares características de EVIH (Bonwetsch y cols., 1999).

Tat también modula la expresión de algunos genes celulares, incluyendo citoquinas, proteínas de la matriz extracelular y proteínas relacionadas con el ciclo celular, y regula funciones relacionadas con el crecimiento, la migración y la angiogénesis (Chang y cols., 1995).

Evidencias *in vitro* e *in vivo* indican que Tat es un mediador de neurotoxicidad, tanto de forma directa, a través de mecanismos excitotóxicos que implican Ca^{2+} y estrés oxidativo (revisado en King y cols., 2006), como de forma indirecta, posiblemente estimulando la producción de factores neurotóxicos y/o neuroinflamatorios por parte de astrocitos y microglía (Nath y cols., 1999; McManus y cols., 2000; revisado en King y cols., 2006). Concretamente, Tat es capaz de inducir: i) la expresión de TNF- α fundamentalmente en macrófagos pero también en células astrocíticas vía NF- κ B (Chen y cols., 1997), ii) la producción de NO y la expresión de iNOs en astrocitos (Chen y cols., 1997; Liu y cols., 2002) y macrófagos (Chen y cols., 1997; Nath y cols., 1999), y iii) la producción de citoquinas como IL-6 (Nath y cols., 1999), MCP-1, MIP-1 α y MIP-1 β (McManus y cols., 2000) en ambos tipos de células gliales.

Esta proteína viral, crucial para la replicación del VIH, está involucrada en la patogénesis de las enfermedades asociadas al SIDA, se secreta y su dominio básico está muy conservado. Estas características hacen de Tat un buen candidato para el desarrollo de fármacos y/o vacunas anti-SIDA (revisado en Rusnati y Presta, 2002).

1.e. Potencial terapéutico de los cannabinoides

La marihuana y dronabinol (la forma sintética del Δ^9 -THC) se han utilizado con éxito para el tratamiento de la anorexia y pérdida excesiva de peso en pacientes con SIDA. Ambos consiguen estimular el apetito de estos pacientes y que ganen peso sin producir efectos adversos (Beal y cols., 1995; Haney y cols., 2005). En cuanto a la encefalitis o demencia asociada al VIH y la utilidad terapéutica de los cannabinoides existen muy pocos estudios.

Parece que los cannabinoides podrían ejercer efectos beneficiosos en la demencia asociada a VIH, a través de la activación de CB₂, debido a su capacidad para modular la activación microglial (Ehrhart y cols., 2005) e inhibir la expresión del virus en microglía y células CD4⁺ (Peterson y cols., 2004; Rock y cols., 2007). Además, los agonistas cannabinoides también son capaces de inhibir el flujo de Ca²⁺ inducido por la proteína viral gp120 y la trans migración de monocitos a través de la BHE (Lu y cols., 2008). Maccarrone y cols., (2004) sugieren que el aumento de la actividad de la enzima FAAH confiere neuroprotección en un modelo *in vivo* de inyección de la proteína gp120 en corteza.

También se ha descrito que los cannabinoides pueden proteger a las neuronas del daño citotóxico inducido por Tat, inhibiendo la expresión de iNOS y la sobreproducción de NO vía CB₁ (Esposito y cols., 2002). Este efecto neuroprotector de los cannabinoides, exógenos y endógenos, se describe en varios modelos de daño neuronal *in vivo* e *in vitro* (Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Galve-Roperh y cols., 2008).

2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)

La esclerosis múltiple es la principal causa de discapacidad neurológica entre gente joven en América del Norte y Europa (Noseworthy y cols., 2000). Su etiología es desconocida, pero muchos estudios epidemiológicos sugieren que factores genéticos y medioambientales pueden tener un papel importante en la susceptibilidad a sufrir EM, sin descartar la acción de agentes infecciosos, probablemente infecciones virales (Frohman y cols., 2006).

La neuropatología de esta enfermedad inflamatoria y desmielinizante del SNC incluye degeneración axonal, pérdida de oligodendrocitos y la subsiguiente inducción de áreas desmielinizadas e hipocelulares bien delimitadas (Frohman y cols., 2006). El proceso inflamatorio supone la activación y reclutamiento de células T, macrófagos y microglía a las zonas de lesión. De este modo, los

linfocitos T activados entran en el SNC destruyendo la mielina y dañando los oligodendrocitos, de forma directa por liberación de citoquinas tales como IFN- γ o de forma indirecta induciendo la liberación de TNF- α y NO por parte de macrófagos activados y microglía (revisado en Minagar y cols., 2002). La pérdida de mielina en las lesiones activas provoca la destrucción gradual de oligodendrocitos y el daño axonal (Trapp y cols., 1998). Finalmente, las células de origen monocítico son responsables de eliminar la mielina a través de procesos de fagocitosis y contribuir al proceso inflamatorio (para revisión, ver Noseworthy y cols., 2000). Los síntomas característicos de la enfermedad (espasmos musculares dolorosos, temblores, ataxia, debilidad o parálisis), se piensa que son el resultado tanto de la formación de nuevas lesiones, como de la expansión de lesiones más maduras a nivel del SNC (para revisión, ver Noseworthy y cols., 2000).

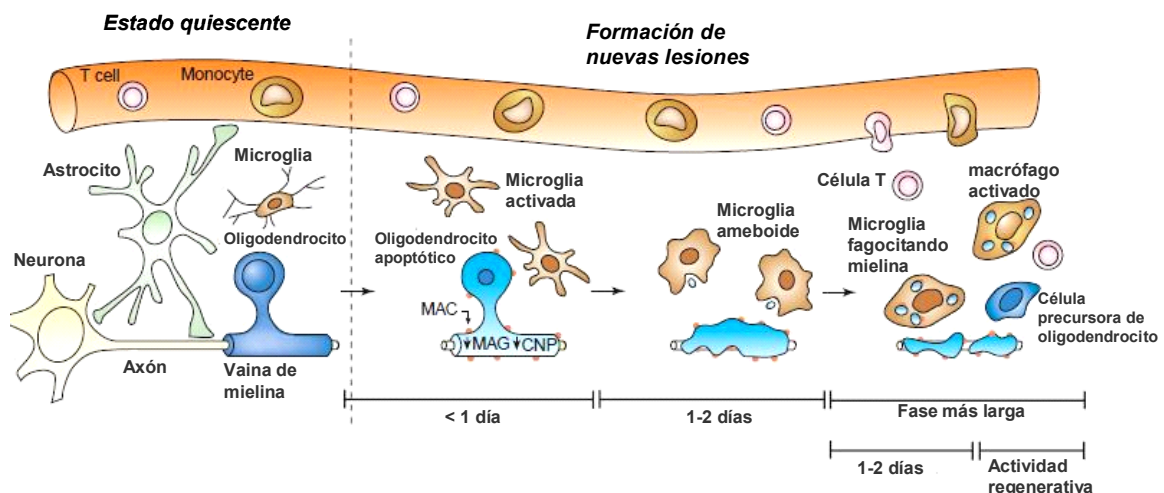


Figura 9. Cronología de la formación de lesiones nuevas en EM (adaptación de Matute y Pérez-Cerdá, 2005). Las alteraciones patológicas que tienen lugar en las primeras horas incluyen la aparición de numerosos oligodendrocitos apoptóticos al tiempo que descienden los niveles de MAG (glicoproteína asociada a mielina) y CNP (2',3' Nucleótido Cíclico Fosfodiesterasa), la deposición de factores del complemento activado (MAC) en los oligodendrocitos y la membrana de la mielina, y la activación de la microglía. Los oligodendrocitos dañados son eliminados 1-2 días después, posiblemente fagocitados por la microglía ameboide, y las vainas de mielina se vacuolizan. A estos cambios que tienen lugar en un periodo de tiempo corto, le siguen otros que tienen lugar en una fase más larga y que incluyen: infiltración de células T, digestión de las vainas de mielina dañadas por los macrófagos y migración de las células precursoras de oligodendrocitos hacia las áreas desmielinizadas. Los cambios en neuronas y astrocitos no son visibles en todo el proceso de formación de las lesiones.

Para el tratamiento de la EM, hace más de una década que se introdujeron nuevos agentes tales como IFN- β , acetato de glatiramer y el anticuerpo monoclonal Natalizumab, entre otros, que han demostrado su eficacia y tolerancia en numerosos ensayos clínicos. Sin embargo, se necesitan nuevas terapias más efectivas, y por ello se están abordando nuevas estrategias que incluyen terapias orales, anticuerpos monoclonales, tratamientos sintomáticos así como de neuroprotección y re-mielinización (revisado en DeAngelis y Lublin, 2008).

2.a. Modelos animales de esclerosis múltiple y SCE

La respuesta inmune contra los péptidos de mielina que se desencadena en la EM se ha reproducido en modelos animales, tales como la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) y la enfermedad desmielinizante inducida por el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV-IDD). Numerosos estudios realizados en estos modelos animales sugieren, que los cannabinoides pueden mejorar ciertos síntomas y aspectos de la enfermedad, por ello el SCE constituye una diana prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos efectivos para el tratamiento de la EM (Pryce y Baker, 2005):

2.a.1. EAE y cannabinoides

La administración de Δ^9 -THC retrasa el inicio de la enfermedad y reduce la inflamación del SNC (Lyman y cols., 1989). Además, el tratamiento con cannabinoides sintéticos (Baker y cols., 2000), endocannabinoides, PEA (Baker y cols., 2001), o inhibidores de la recaptura de endocannabinoides (Baker y cols., 2001; de Lago y cols., 2004, 2006) reduce la espasticidad y mejora el temblor en el modelo de recaída crónica de EAE (CREAE), a través de un mecanismo mediado por el receptor CB₁ (Baker y cols., 2000; Pryce y Baker, 2007). También a través de CB₁, la administración crónica de cannabinoides puede inhibir el proceso neurodegenerativo en este modelo (Pryce y cols., 2003; Croxford y cols., 2008). Estudios recientes revelan un efecto inmunosupresor, vía CB₁, a través del cual los agonistas cannabinoides consiguen reducir la respuesta de células T específicas de mielina, la infiltración del SNC y los síntomas clínicos (Maresz y cols., 2007; Croxford y cols., 2008).

Estudios recientes señalan al receptor CB₂ como una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la EM y otras enfermedades

desmielinizantes. Además, su activación está desprovista de los efectos psicoactivos indeseables mediados por CB₁. El tratamiento con el agonista mixto WIN55,212-2 consigue mejorar los síntomas clínicos, reducir la infiltración celular e inducir la apoptosis de células T, lo que podría contribuir a su acción anti-inflamatoria, a través de un efecto mediado, en parte, por CB₂ (Sánchez y cols., 2006). En ratones *knock-out* para CB₂ la patogénesis de EAE se exagera y los niveles de mensajero de varias citoquinas y sus principales receptores aumentan. Sin embargo, el tratamiento con el agonista selectivo de CB₂, HU-308, en ratones *wild type* mejora la progresión de la enfermedad y reduce los niveles de estas citoquinas y sus receptores, confirmando así el papel protector de CB₂ (Palazuelos y cols., 2008).

2.a.2. TMEV-IDD y cannabinoides

En este modelo, los resultados también defienden una terapia no psicoactiva, adecuada para un uso prolongado en el tiempo, a través de la posible implicación del receptor CB₂ (revisado en Docagne y cols., 2008). Los cannabinoides sintéticos WIN55,212-2, ACEA y JWH-015, mejoran los déficits neurológicos reduciendo la inflamación del SNC y extendiendo el proceso de remielinización, a través de la activación de ambos receptores (Arévalo-Martín y cols., 2003). A nivel histológico, reducen los infiltrados perivascuales de linfocitos T-CD4⁺ y la activación microglial (Arévalo-Martín y cols., 2003; Mestre y cols., 2009). El cannabinoide sintético HU-210, reduce el daño axonal también a través de la activación de CB₁ y CB₂ (Docagne y cols., 2007).

El tratamiento con inhibidores selectivos del transportador de endocannabinoides, OMDM-1 y OMDM-2, mejora los síntomas motores y reduce la respuesta inflamatoria inhibiendo la expresión de la óxido nítrico sintasa-2 y disminuyendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Mestre y cols., 2005). La administración de PEA, también reduce la discapacidad motora y tiene un efecto anti-inflamatorio (Loría y cols., 2008).

2.b. Ensayos clínicos con extractos medicinales basados en Cannabis

En los últimos años, y respaldados por los resultados obtenidos en los modelos animales de EM, muchos ensayos clínicos han evaluado el potencial

terapéutico de extractos medicinales basados en *cannabis* para el tratamiento de los síntomas asociados a la enfermedad (revisado en Smith, 2007).

En los primeros ensayos que se llevaron a cabo se evaluó la eficacia de los cannabinoides en la espasticidad asociada a EM. Estos estudios incluían un número pequeño de pacientes (el más numeroso 16) y sus resultados sugerían que los cannabinoides producían una mejoría sintomática subjetiva, pero no se proporcionaban evidencias objetivas de su eficacia (Killestein y cols., 2002; revisado en Pertwee, 2002). Posteriormente, en el año 2001, en el Reino Unido se inició el estudio “Cannabinoids and Multiple Sclerosis (CAMS)” en el que participaron 630 pacientes con EM y espasticidad muscular (Zajicek y cols., 2003). En este ensayo, randomizado y controlado con placebo, los pacientes se trataron durante 15 semanas con un extracto de cannabis oral, Δ^9 -THC o placebo. Los resultados revelaron que los cannabinoides no exhibían un efecto beneficioso sobre la espasticidad, medida con la escala de Ashworth, sin embargo estos pacientes relataron una mejoría en la movilidad y dolor (Zajicek y cols., 2003). Los pacientes que continuaron el tratamiento con Δ^9 -THC, hasta alcanzar los 12 meses, notaron una mejoría leve en su espasticidad, confirmada de forma objetiva por la escala de Ashworth, y pocos efectos adversos (Zajicek y cols., 2005).

Vaney y cols. (2004) realizaron un estudio con un extracto estandarizado de *Cannabis sativa* en cápsulas (2,5 mg Δ^9 -THC y 0.9 mg CBD), en 50 pacientes de EM con poco control de la espasticidad. Tras 14 días de tratamiento, los resultados mostraban una frecuencia menor de espasmos y una mejoría en la movilidad en estos pacientes, que además toleraban los efectos secundarios del tratamiento.

El spray sublingual Sativex (que contiene Δ^9 -THC y cannabidiol en igual proporción), testado en otro ensayo clínico, provocó una reducción significativa del dolor y alteraciones del sueño en pacientes con síndrome de dolor neuropático central, debido a EM, que se trataron durante 4 semanas (Rog y cols., 2005). El 98% de los pacientes tratados con Sativex durante dos años no toleraron el fármaco, siendo los efectos adversos más comunes que experimentaban mareos y náuseas (Rog y cols., 2007).

Sin embargo, en otro ensayo clínico con dosis más bajas de Sativex, se demostró una reducción significativa en espasticidad pero sin efectos adversos en el conocimiento o en el estado de humor, y un grado de intoxicación leve tras 6 semanas de tratamiento (Wade y cols., 2004). El uso

de Sativex a largo plazo (4 semanas más de tratamiento y una evaluación periódica cada 8 semanas hasta alcanzar una media de 434 días tras el inicio el tratamiento) parece que mantiene su efecto en aquellos pacientes que percibían mejorías desde el inicio, siendo necesarios más estudios a largo plazo para analizar la naturaleza y la clase de los efectos adversos que produce este fármaco (Wade y cols., 2006).

A la vista de los resultados, parece que los cannabinoides proporcionan efectos beneficiosos en espasticidad y dolor, basándose, principalmente, en medidas subjetivas (Wade y cols., 2006). Sin embargo, existe la preocupación sobre los efectos secundarios a largo plazo, particularmente, los efectos psiquiátricos y los relacionados con el desarrollo fetal, a pesar de que los efectos adversos son leves, comparados con los producidos por otros fármacos utilizados para el dolor y la espasticidad (Smith, 2007).

De manera que, aunque las evidencias proporcionadas por los ensayos clínicos sobre la eficacia terapéutica de los cannabinoides en el tratamiento de EM van en aumento, todavía no son convincentes (Wade y cols., 2004; Zajicek y cols., 2005; Wade y cols., 2006; Smith, 2007).

2.c. Estatus del SCE en esclerosis múltiple

A pesar de las numerosas evidencias del posible efecto beneficioso de los cannabinoides en EM, existen pocos datos del estatus del receptor CB₁ y CB₂, las principales dianas moleculares para la acción de los cannabinoides.

En EAE y el modelo de recaída crónica, se ha descrito un descenso en la densidad de receptores CB₁, principalmente en regiones motoras, y más acusado durante la fase aguda y crónica de la enfermedad (Berrendero y cols., 2001; Cabranes y cols., 2006), que podría relacionarse con la mejoría en algunos signos motores después del tratamiento con agonistas del receptor (Baker y cols., 2000).

Por el contrario, la densidad de receptores CB₂ aumenta como consecuencia de su inducción en células gliales. Yiangou y cols. (2006) detectaron en muestras de médula espinal de donantes de EM expresión del receptor en microglía/macrófagos en áreas de sustancia blanca, normalmente dentro de placas activas y en la periferia de lesiones crónicas. Más recientemente, en médula espinal de ratones AEA y cerebros de donantes de EM, se ha detectado expresión de CB₂ en células progenitoras mieloides capaces de diferenciarse a microglía (Palazuelos y cols., 2008). También se

ha descrito expresión del receptor CB₂ en el modelo animal TMEV-IDD (Loría y cols., 2008).

En cuanto a los niveles de endocannabinoides parece que no existe consenso. En ratones CREAE, Baker y cols. (2001) describieron un incremento de AEA, 2-AG y PEA en áreas asociadas a daño nervioso. Años más tarde, en el modelo animal EAE, Cabranes y cols. (2005) observaron un descenso de AEA y 2-AG en regiones motoras, y en línea con este estudio, Witting y cols. (2006) no encontraron un aumento significativo de endocannabinoides en respuesta al daño celular inducido por EAE. Sin embargo, Centonze y cols. (2007) describieron un incremento de AEA en cerebro de ratones EAE y en el fluido cerebroespinal de pacientes con EM. En muestras de tejido de donantes de EM, también se ha descrito un aumento en los niveles de dicho endocannabinoide en lesiones activas (Eljaschewitsch y cols., 2006). Recientemente, en el modelo TMEV-IDD, se observó que los niveles de 2-AG y PEA habían aumentado mientras que AEA permanecía sin cambios (Loría y cols., 2008).

3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

Es la forma más frecuente de demencia en ancianos y uno de los desafíos sanitarios más importantes en los países occidentales. Esta enfermedad afecta a 37 millones de personas en todo el mundo, y se espera un incremento del 100% en regiones desarrolladas para el año 2040 (Ferri y cols., 2005). Los primeros síntomas que presentan los pacientes de EA normalmente incluyen pérdida leve de la memoria, desórdenes del lenguaje, cambios de humor o comportamiento y desorientación de tiempo y lugar. El deterioro cognitivo y, también motor, progresan hasta alcanzar una incapacidad total para controlar las funciones básicas del cuerpo (Selkoe, 1997).

La enfermedad de Alzheimer debe su nombre a su descubridor, Alois Alzheimer, quién en 1906 describió dos alteraciones patológicas en el cerebro de una paciente que sufría demencia. Estas dos lesiones, placas neuríticas y ovillos neurofibrilares, además de pérdida neuronal, deterioro de las conexiones sinápticas y gliosis reactiva, representan los rasgos patológicos característicos de esta enfermedad (Giulian, 1999; Wyss-Coray y Mucke, 2002). Los cambios neuropatológicos más severos tienen lugar en el hipocampo, corteza y estructuras

subcorticales, incluyendo la amígdala y los núcleos basales de Meynert (Arnold y cols., 1991).

La mayoría de los casos de EA son esporádicos, tan sólo un 5% de los casos tienen un patrón de herencia autosómico dominante, con una edad de inicio de los síntomas por debajo de los 65 años (Alzheimer familiar). En la mayoría de los casos de EA familiar subyacen mutaciones de los genes de presenilina 1 (PSEN1), de presenilina 2 (PSEN2) y de la proteína precursora amiloide (APP), así como polimorfismos específicos en la apolipoproteína E (apoE), que se asocian con la EA de inicio tardío más común (revisado en Williamson y cols., 2009). Las mutaciones en estos genes tienen un rasgo común y es que afectan al metabolismo y procesamiento del péptido amiloide (A β).

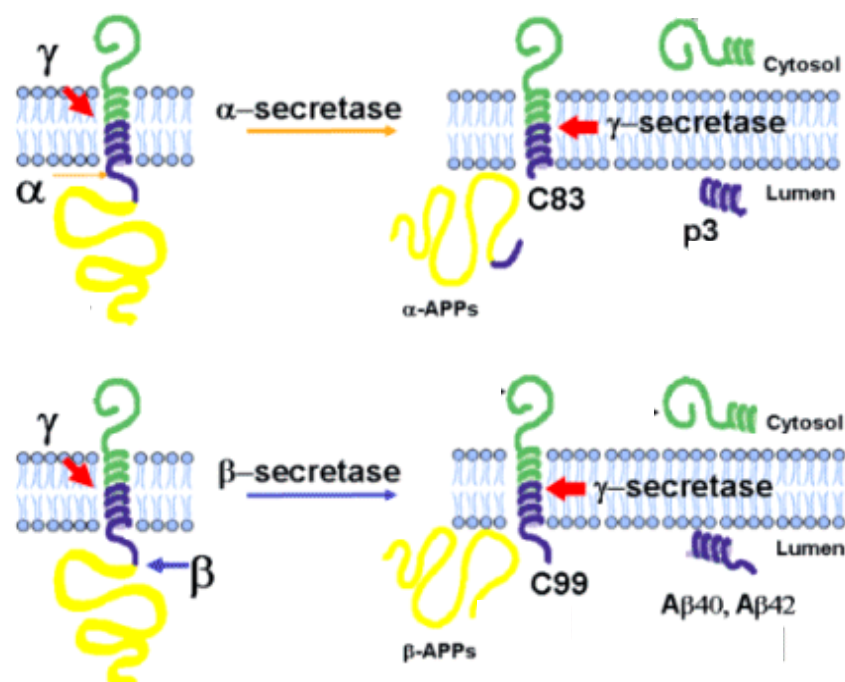
Los tratamientos actuales para EA sólo proporcionan alivio sintomático y, por ello, se está realizando un gran esfuerzo en la búsqueda de la cura y/o tratamientos preventivos (Lleó y cols., 2006). Las terapias anti-A β , que pretenden reducir la agregación y acumulación de A β mediante vacunas y anticuerpos, se consideran una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento de la EA. Se han llevado a cabo ensayos clínicos con vacunas contra este péptido, aunque la aparición de meningoencefalitis en aproximadamente el 6% de los pacientes ha provocado la interrupción prematura de este tratamiento (Goni y Sigurdsson, 2005). También se debate la posible aplicación de componentes anti-inflamatorios y anti-oxidantes tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, inhibidores de la ciclooxigenasa-2 y ligandos de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) como agentes neuroprotectores del estrés inflamatorio y oxidativo asociado a dicha enfermedad (Rafii y Aisen, 2009).

3.a. Procesamiento del péptido A β

El péptido A β proviene de la proteólisis secuencial de la proteína precursora amiloide (APP) por complejos de enzimas denominadas α -, β - y γ -secretasas (PSEN1 y PSEN2). Una vez sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, la APP, pasa por el aparato de Golgi donde se glicosila y empaqueta en vesículas de transporte, atraviesa el citoplasma y, por último, se inserta en la membrana celular. Allí es procesada mediante la acción de diversas proteasas, siguiendo dos rutas (revisado en LaFerla y cols., 2007). En la vía más común, una α -secretasa corta la APP liberando un fragmento extracelular, soluble, de unos 695 aminoácidos. El fragmento C-

terminal de 83 aminoácidos que queda integrado en la membrana es procesado después por una γ -secretasa, produciendo un fragmento corto denominado p3. Esta vía es conocida como ruta no amiloidogénica, porque la acción de la α -secretasa previene la formación de la forma patogénica del péptido amiloide constituido por 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$), con lo que se impide la formación de depósitos. Sin embargo, existe una ruta alternativa conocida como ruta amiloidogénica, que conduce a la generación del péptido $A\beta$. En este caso, la proteólisis inicial es mediada por la β -secretasa, que deja un fragmento carboxilo terminal más largo, de 99 aminoácidos, dentro de la membrana, que tras ser procesado por la γ -secretasa, libera el péptido $A\beta_{42}$.

Figura 10. Procesamiento del péptido β -amiloide. Ruta no amiloidogénica y amiloidogénica. (Adaptación de Xia y Xu, 2004).



3.b. El péptido $A\beta$

La mayoría de los péptidos producidos tienen 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$), mientras que tan sólo una pequeña proporción (aproximadamente el 10%) son de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$). La variante $A\beta_{42}$ es más insoluble y propensa a formar fibrillas que $A\beta_{40}$, y es la isoforma predominante en las placas cerebrales (Younkin, 1998).

El péptido A β se produce como monómero, pero puede agregarse formando complejos multiméricos (monómero, oligómeros, protofibrillas y fibrillas). En su estado monomérico, A β parece no resultar neurotóxico. Sin embargo, las especies oligoméricas y protofibrillas son más patológicas y se consideran bloqueadores potentes de la potenciación a largo-plazo, una forma de plasticidad sináptica (Walsh y cols., 2002).

La acumulación de fibrillas del péptido A β es el origen de las “placas neuríticas o amiloides” que se observan en el parénquima cerebral de los pacientes de EA y parece que las responsables de desencadenar una cascada de sucesos que conducen a la muerte neuronal masiva (Giulian, 1999). Entre esos sucesos, los depósitos amiloides, i) estimulan la hiperfosforilación del citoesqueleto de la proteína tau, provocando su precipitación y la formación de “ovillos neurofibrilares” intraneuronales; ii) desencadenan una reacción inflamatoria local y potente, que implica a las células microgliales y astrocitarias que tratan de encapsular y degradar los depósitos amiloides; iii) provocan un cúmulo masivo de citoquinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (“ciclo de las citoquinas”; Mrak y Griffin, 2005) y iv) a largo plazo, provocan muerte neuronal, pérdida de la sinapsis, y por tanto alteraciones en la neurotransmisión (Wyss-Coray y Muckie, 2002).

Abundantes estudios también proponen que el péptido A β se puede acumular dentro de las neuronas como monómero, para posteriormente agregarse y formar oligómeros. Este A β intraneuronal puede contribuir a la patología facilitando la hiperfosforilación de tau, la fragmentación del proteosoma, y la función de la mitocondria, y desencadenando la disfunción sináptica y de la homeostasis del Ca²⁺ (revisado en LaFerla y cols., 2007).

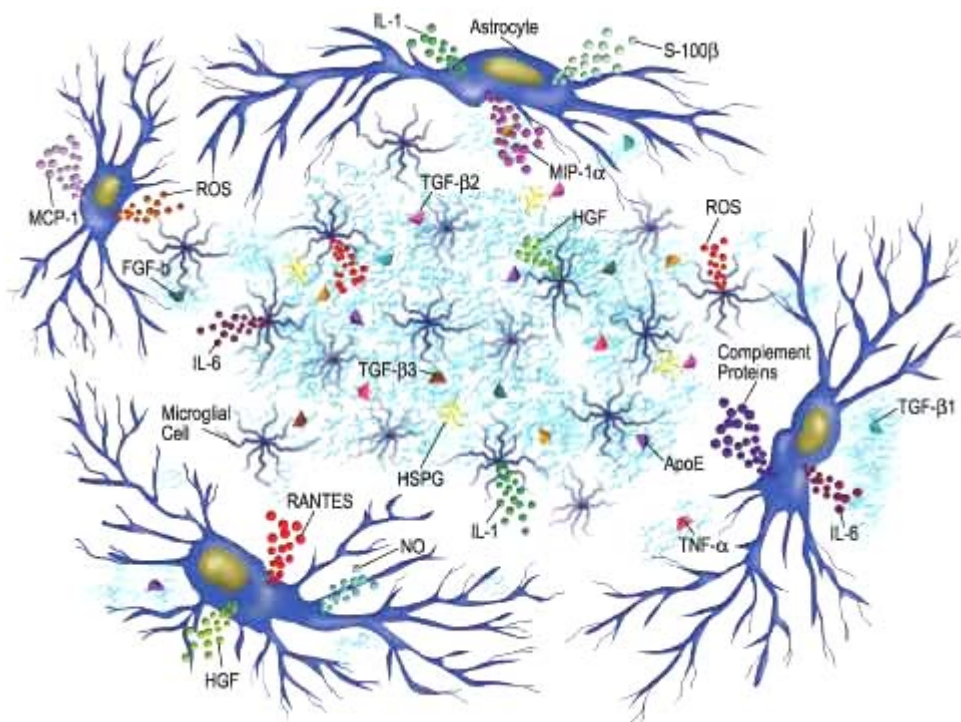
3.c. Papel de las células gliales en EA

La formación de agregados del péptido de A β induce una respuesta inflamatoria que conduce a la activación de microglía y astrocitos. Estas células son conocidas por jugar un papel patofisiológico importante porque producen abundantes sustancias pro-inflamatorias que inician un segundo proceso dañino (Strohmeyer y Rogers, 2001).

La microglía parece desempeñar un papel doble en la patología de EA: i) por un lado, puede ser neuroprotectora y promover la retirada de A β (Majumdar y cols., 2007; Takata y cols., 2007), aunque esta actividad

fagocítica parece ser atenuada por las citoquinas pro-inflamatorias, lo que implica que la microglía que está entregada a la respuesta inflamatoria tiene una capacidad fagocítica menor (Koenigsnecht-Talboo y Landreth, 2005); ii) pero también puede resultar perjudicial para las neuronas, puesto que la microglía activada en respuesta al péptido A β produce especies reactivas de oxígeno, TNF- α , IL-1 β e IL-6 (El Khoury y cols., 1996) y secreta quimioquinas tales como MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 y CCL5 (El Khoury y cols., 1996; revisado en Meda y cols., 2001), que pueden contribuir a la inflamación asociada a las placas amiloides y la neurodegeneración.

Figura 11. Citoquinas y otros factores liberados por los astrocitos y microglía asociados a las placas A β . (“ciclo de las citoquinas”; Mrak y Griffin, 2005)



Las citoquinas y especies reactivas de oxígeno liberadas por la microglía también pueden activar los astrocitos que rodean las placas neuríticas. Estos astrocitos reactivos son componentes integrantes de las placas neuríticas (Shao y cols., 1997) y su activación parece ser particularmente destacada en el parénquima y vasculatura cerebral (Meda y cols., 2001). En EA, los astrocitos también pueden participar en la degradación y retirada de A β , y estas funciones parecen depender de la expresión de apoE3 (Wyss-Coray y cols., 2003; Koistinaho y cols., 2004). Los

astrocitos también pueden ser estimulados de forma directa por el péptido A β y producir NO, IL-1 β (Hu y cols., 1998), MCP-1 y CCL5 (Johnstone y cols., 1998).

3.d. Modelos animales de EA

Los modelos transgénicos de EA han supuesto un gran avance en el entendimiento de la patogénesis de EA, y además han resultado muy valiosos en el desarrollo de test preclínicos de algunos de los más prometedores enfoques terapéuticos de la enfermedad. Algunos de estos modelos se mencionan a continuación (revisado en Wyss-Coray, 2006):

- Los ratones transgénicos Tg2576 y APP23 expresan la APP humana con la mutación suiza (APP695sw) asociada con la EA familiar. Estos ratones que desarrollan la patología lentamente, a los 8-10 meses de edad, presentan depósitos de A β difusos y abundante activación microglial y astrocitaria.
- Los ratones bigénicos co-expresan el transgen APP695sw y el transgen PSEN1 mutado (PSEN/dE9) predominantemente en neuronas. Estos ratones desarrollan una patología más acelerada que comienza a los 6 meses.
- El modelo 3xTg-AD, que presenta tres genes mutados (tau^{P301L}, APP^{K670N,M671L} y PSEN1^{M146V}), desarrolla placas y ovillos y muestra déficits en la transmisión sináptica.
- Recientemente, se ha desarrollado un modelo que co-expresa un total de cinco mutaciones de la EA familiar, 5xFAD (APP^{K670N,M671L} (Suiza) + APP^{I716V} (Florida) + APP^{V717I} (Londres) y PSEN1^{M146V+L286V}). Estos ratones desarrollan placas amiloides y gliosis a los dos meses de edad, y presentan pérdida neuronal y deterioro de la memoria. Además, y de forma sorprendente, se observa acumulación de A β intraneuronal antes de la formación de placas (Oakley y cols., 2006).

3.e. Enfermedad de Alzheimer y SCE

Los cannabinoides han demostrado ser neuroprotectores en diferentes modelos de daño neuronal (revisado en Benito y cols., 2007), y también en EA, como demuestran algunos estudios realizados *in vivo* e *in vitro*:

3.e.1. Estudios *in vitro*

AEA y noladín éter han demostrado ser potentes inhibidores de la toxicidad de A β , a través de un mecanismo mediado por MAPK y

dependiente de CB₁ (Milton, 2002). La activación de CB₁ también inhibe la expresión de iNOS y producción de NO inducida por Aβ (Esposito y cols., 2006c), y previene los cambios morfológicos que sufren las células microgliales por exposición a Aβ₁₋₄₀ (Ramírez y cols., 2005).

Por su parte, el receptor CB₂ parece jugar un papel destacado en la función microglial. Su activación inhibe de forma significativa la producción microglial de TNF-α y NO inducida por Aβ (Ramírez y cols., 2005; Ehrhart y cols., 2005) y potencia la fagocitosis microglial (Ehrhart y cols., 2005). De modo que, la acción neuroprotectora frente a Aβ que ejercen los cannabinoides *in vitro* parece ser solamente a través de la microglía, y no de forma directa sobre las neuronas (Ramírez y cols., 2005).

Los cannabinoides también parecen mediar la respuesta celular contra Aβ a través de un mecanismo independiente de los receptores CB₁ y CB₂. Así el cannabidiol, un cannabinoide natural no psicotrópico, parece que confiere neuroprotección en células PC12 por combinación de mecanismos anti-oxidantes y anti-apoptóticos, y también a través de la modulación de las rutas p38MAPK, NF-κB y Wnt/β-catenina (Iuvone y cols., 2004; Esposito y cols., 2006a, 2006b).

3.e.2. Estudios *in vivo*

Hasta ahora, los pocos estudios que han explorado el SCE en EA *in vivo*, han usado la administración de Aβ directamente en el SNC como paradigma experimental.

El bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716A es capaz de prevenir la amnesia inducida por dos tipos de péptidos amiloides, Aβ₁₋₄₂ y Aβ₂₅₋₃₅, administrados i.c.v. en ratones. Este efecto beneficioso podría producirse por un aumento de la transmisión colinérgica en el hipocampo (Mazzola y cols., 2003). Sin embargo, un estudio reciente muestra que Δ⁹-THC es capaz de inhibir la acetilcolinesterasa y prevenir la agregación del péptido Aβ inducida por dicha enzima (Eubanks y cols., 2006).

En un modelo de EA, con administración del péptido soluble Aβ₁₋₄₂ en ratones y ratas, se ha descrito que, como consecuencia del daño tóxico al cerebro, los niveles de 2-AG son significativamente elevados y que la expresión del receptor CB₁ permanece sin cambios 12 días

después de la inducción del daño, mientras que la expresión de CB₂ aumenta de forma significativa. La potenciación del tono endocannabinoide en dicho modelo, usando el inhibidor de la recaptura VDM-11, previene la pérdida neuronal y la respuesta anti-inflamatoria (descenso en la expresión de COX-2 e iNOS), y reduce la pérdida de memoria (Van der Stelt y cols., 2006). La administración de WIN55,212-2 también previene el deterioro cognitivo y la activación microglial en ratas Wistar con i.c.v. de A β ₂₅₋₃₅ (Ramírez y cols., 2005).

3.e.3. SCE y EA en humanos

La administración de dronabinol (la forma sintética del Δ^9 -THC) en pacientes con EA, consigue aumentar el peso corporal en estos pacientes y mejorar algunos desórdenes del comportamiento (Volicer y cols., 1997). Otro estudio piloto con 5 pacientes de EA, describe que dosis bajas de dronabinol son capaces de mejorar de forma significativa varios parámetros clínicos como la actividad motora nocturna y la agitación, sin efectos secundarios no deseados (Walther y cols., 2006).

El análisis de muestras de cerebro post-mortem de pacientes EA ha proporcionado información a cerca de la neuropatología del SCE y ha permitido formular nuevas hipótesis sobre el posible papel de este sistema en la prevención y/o tratamiento de EA (revisado en Pazos y cols., 2005). En cerebros de EA, los niveles del receptor CB₁ disminuyen en hipocampo y estructuras de los ganglios basales (Westlake y cols., 1994) pero no en el neocórtex o córtex frontal (Westlake y cols., 1994; Ramirez y cols., 2005). También se observa un descenso en los niveles de receptores CB₁ acoplados a proteínas G en la corteza frontal de estos pacientes (Ramírez y cols., 2005). Sin embargo, el receptor CB₂ y la enzima FAAH se sobre-expresan selectivamente en microglía y astrocitos, respectivamente, que se encuentran asociados a las placas neuríticas, donde la actividad hidrolasa de la enzima también es elevada (Benito y cols., 2003). Este aumento de la expresión de CB₂ y FAAH parece ser un fenómeno ligado a la acumulación del péptido A β como se sugiere en el estudio realizado en muestras de pacientes de síndrome de Down, un modelo natural de EA (Nuñez y cols., 2008).

La importancia del SCE en enfermedades neurodegenerativas ha ido en aumento durante los últimos años, y este interés se debe en parte a la alta densidad y amplia distribución de los receptores CB₁ en el

SNC. Sin embargo, y a la vista de los resultados *in vivo* e *in vitro*, otros elementos del SCE tales como, el receptor CB₂ y la enzima FAAH, se han convertido en dianas farmacológicas prometedoras, permitiendo incorporar nuevos cannabinoides sin efectos psicotrópicos como herramientas terapéuticas.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en la presente tesis doctoral son:

1. Realizar un estudio exhaustivo del patrón de expresión de los receptores CB₁ y CB₂, y la enzima FAAH en muestras de tejido cerebral en diferentes patologías neuroinflamatorias:
 - a. un modelo animal de encefalopatía asociada a SIV-1
 - b. pacientes afectados de encefalitis asociada a VIH-1.
 - c. pacientes afectados de esclerosis múltiple.

2. Explorar la relevancia funcional del aumento de los niveles de endocannabinoides en la respuesta astrocitaria frente al péptido patogénico Aβ₁₋₄₂.

3. Explorar la relevancia funcional del aumento de los niveles de endocannabinoides en la respuesta glial frente a la proteína viral Tat.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL SCE EN PATOLOGÍAS NEUROINFLAMATORIAS

1. TEJIDOS

1.a. Modelo animal de EVIS (Encefalitis inducida por el Virus de la Inmunodeficiencia en Simios)

Para el estudio de esta patología se utilizó tejido procedente de necropsias cerebrales de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) asociado a EVIS ($n=4$), animales infectados con VIS y con SIDA pero sin encefalitis ($n=2$), y un animal no infectado como control del estudio.

El procedimiento experimental que se detalla a continuación se realizó en el *New England Regional Primate Research Center* del *Harvard Medical School* (MA, EEUU). Los animales se inocularon por inyección intravenosa con SIVmac251 (20ng de p27SIV) (Williams y cols., 2001). Posteriormente, a todos los animales infectados se les administró el anticuerpo monoclonal cM-T807 (5mg/kg, i.v) en los días 6, 8 y 10 después de la infección, para depleccionar células CD8, y de este modo inducir una encefalitis más severa y con una incidencia mayor. Cuando los animales desarrollaron SIDA, se anestesiaron con ketamina-HCl, y se sacrificaron por sobredosis intravenosa de pentobarbital. El tejido cerebral se fijó en formalina tamponada neutra al 10% y se embebió en parafina para después ser cortado en secciones de 5 μ m. Las áreas elegidas para la realización de técnicas inmunohistoquímicas y *western-blot* incluían corteza frontal y parietal, regiones conocidas por presentar los cambios característicos por EVIS, específicamente la sustancia blanca subcortical. Estas muestras de tejido fueron proporcionadas por el Dr Kenneth Williams (*Division of Comparative Pathology*, Harvard Medical School, MA, EEUU).

1.b. Muestras de EVIH (Encefalitis inducida por el Virus de la Inmunodeficiencia en Humanos)

Las secciones de tejido humano embebido en parafina fueron proporcionadas por el *Manhattan HIV Brain Bank*, un miembro del *National NeuroAIDS Tissue Consortium* de EEUU. Se emplearon muestras de tejido de tres grupos diferentes: control (definido como ausencia en la historia

clínica de enfermedad neurológica y ningún hallazgo patológico en el análisis postmortem de la muestra), VIH (historial clínico de SIDA pero sin encefalitis, confirmado por examen postmortem del tejido) y EVIH (historial clínico de SIDA combinado con encefalitis, confirmado por examen patológico postmortem). Se utilizaron tres casos por grupo, con un rango de edad de 41-48 años y se eligió la corteza frontal como área de interés. Con las secciones de tejido de 4µm se llevaron a cabo técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

1.c. Muestras de EM (Esclerosis Múltiple)

En este estudio se utilizaron tejidos de cerebro post-mortem de donantes con ES (n=6; rango de edad, 54-72 años) e individuos control sin antecedentes de enfermedad neuropsiquiátrica (n=2; 60 y 72 años) (**Tabla 1**). Los tejidos fueron proporcionados por el *Multiple Sclerosis Tissue Bank* del Reino Unido (fundado por la *Multiple Sclerosis Society of Great Britain and Northern Ireland*, registro de institución benéfica 207495). Las áreas corticales y periventriculares seleccionadas para realizar técnicas inmunohistoquímicas y tinciones se fijaron en formalina, se embebieron en parafina y después se cortaron en secciones de 4µm.

TABLA 1: Muestras de cerebro usadas en los estudios inmunohistoquímicos e histopatológicos

Paciente	Edad (años) /Sexo	Diagnóstico	Intervalo postmortem (horas)	Número de bloques examinados	Número de lesiones de EM	Actividad de las lesiones*		
						Activa	Crónica	Inactiva
EM96	58/F	EMSP	36	5	7	4	3	
EM110	54/F	EMSP	18	5	33	15	9	9
EM123	63/M	EMSP	12	5	9	6	1	2
EM132	72/F	EMSP	23	5	4	1	3	
EM152	55/F	EMSP	36	5	2	1		1
EM177	60/F	EMSP	24	5	11	4	6	1
C17	76/F	Normal	74	2	ND	ND	ND	ND
C18	60/F	Normal	44	2	ND	ND	ND	ND
Total				34	66	31	22	13

F, femenino; M, masculino; EM, esclerosis múltiple; EMSP, esclerosis múltiple secundaria progresiva, ND, no detectado.

* La actividad de las lesiones se determinó por examen histológico y se dividieron en tres categorías: activa, crónica e inactiva según se describe en el Material y Métodos.

1.c.1. Clasificación de las placas de EM

Para identificar regiones de desmielinización en las muestras de tejido de EM, se utilizó la tinción de solocromocianina. Las lesiones se clasificaron según lo descrito por Trapp y cols. (1999) por marcaje inmunohistoquímico de la región D del antígeno leucocitario humano (HLA-DR), un miembro del complejo de histocompatibilidad de clase II (MHC-II).

Definimos entonces tres categorías de lesiones desmielinizantes o “placas” en función de la distribución y densidad de células inflamatorias y microglía activada (MHC-II positivo). Las placas “activas” muestran abundantes células HLA-DR positivas distribuidas uniformemente. Las células dentro del área de la lesión son mayoritariamente macrófagos grandes y redondos que contienen mielina. Se piensa que estas lesiones son relativamente recientes (2-3 meses) (Trapp y cols., 1999). A la inversa, las placas “crónicas” se caracterizan por un enriquecimiento de macrófagos HLA-DR positivos, que también contienen mielina, en el borde de la lesión. Finalmente, las lesiones “inactivas” serían las que contienen muy pocas células HLA-DR positivas.

2. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

El protocolo empleado fue descrito previamente por Tsou y cols. (1998a) y Benito y cols. (2003). Las secciones de tejido se desparafinaron, por inmersión en orden sucesivo en xilol, etanol 100°, etanol 96° y agua. Posteriormente, para obtener un marcaje inmunohistoquímico más eficiente, las muestras se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico (Shi y cols., 2001). En dicho proceso, las secciones de tejido se sometieron a alta Tª y alta presión durante 2 min en una solución de desenmascaramiento antigénico a pH.8. Después las muestras se atemperaron, se lavaron en PBS-potásico (KPBS) 50mM y se incubaron en una solución de bloqueo de la peroxidasa (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) a Tª ambiente durante 30 min para bloquear la peroxidasa endógena. Tras varios lavados en KPBS, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C (**Tabla 2**). Los anticuerpos se diluyeron en KPBS que contenía 1% de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, MO) y 1% Triton X-100 (Sigma). Después de la incubación, las secciones se lavaron en KPBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo biotinilado (1:200) (para anticuerpos policlonales) o de caballo anti-ratón

biotinilado (1:200) (para anticuerpos monoclonales) durante 1h a T^a ambiente. Para obtener el producto visible de la reacción se utilizó el complejo Avidina-Biotina para amplificar la señal (Vector Elite; Vector Laboratories, Burlingame, CA) y la diaminobenzidina como sustrato (DakoCytomation), siguiendo las instrucciones del fabricante.

TABLA 2: Anticuerpos empleados en los estudios

<u>Anticuerpo</u>	<u>Diana</u>	<u>Dilución (IHC)</u>	<u>Dilución (IF)</u>	<u>Clase</u>	<u>Fabricante</u>
HLA-DR	Microglía/macrófagos (MHCII)	-----	1:100	M	Dako
CD68	Macrófagos	1:100	1:100	M	Dako
CD3	Linfocitos T	1:50	1:50	M	Dako
CD8	Linfocitos T CD8 ⁺	-----	1:50	M	Dako
GFAP	Astrocitos	-----	1:200	M	Sigma
MAP-2	Neuronas	-----	1:200	M	Calbiochem
PDGFR- α	Células precursoras de oligodendrocitos	-----	1:100	M	BD Pharmingen
MBP	Oligodendrocitos adultos / mielina	-----	1:500	M	Sternberger Monoclonals
CB ₁	Residuos 1-99 de N-terminal de proteína CB ₁ humana	1:1000 (EVIS) 1:300 (EVIH, EM)	1:100	P	Affinity Bioreagents
CB ₂	Residuos 1-33 de N-terminal de proteína CB ₂ humana	1:500 (EVIS, EVIH) 1:300 (EM)	1:100	P	Affinity Bioreagents
FAAH	Residuos 561-579 de C-terminal de proteína FAAH rata	1:500 (EVIS) 1:100 (EVIH) 1:50 (EM)	1:50	P	Prof. C.J. Hillard

IHC: inmunohistoquímica; IF: inmunofluorescencia; M: monoclonal; P: policlonal

Los controles incluyeron pre-absorción y co-incubación de los anticuerpos con las proteínas inmunogénicas correspondientes (cuando estaban disponibles) (CB₁, proteína de fusión contra los aminoácidos 1-100 de CB₁ humano a 5 μ g/ml; CB₂, proteína de fusión contra los aminoácidos 1-33 de CB₂ humano a 5 μ g/ml; FAAH, proteína de fusión contra los aminoácidos 561-579 de FAAH de rata a 1.25 μ g/ml) e incubación en ausencia del anticuerpo primario. Las secciones adyacentes a las utilizadas en IHQ se usaron para tinciones de Hematoxilina y Nissl.

Las secciones se deshidrataron y sellaron con un cubreobjetos. Para las observaciones y toma de fotografías se emplearon un microscopio Nikon Eclipse 90i (Tokio, Japón) y una cámara DXM1200F, respectivamente.

3. **INMUNOFLUORESCENCIA (IF)**

Para identificar poblaciones celulares específicas se realizaron estudios de colocalización con inmunofluorescencia utilizando marcadores específicos para macrófagos, microglía, astrocitos, neuronas, linfocitos-T y oligodendrocitos (**Tabla 2**).

Tras el proceso de desenmascaramiento antigénico, las secciones de tejido se lavaron con tampón Tris-salino (TBS) antes de ser incubadas a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal específico para un tipo celular (**Tabla 2**). Tras lavados con TBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa-546 (10µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 2 horas a 37°C, obteniendo marcaje rojo fluorescente.

A continuación, tras abundantes lavados con TBS, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios para CB₁, CB₂ o FAAH. Posteriormente, las secciones se lavaron de nuevo con TBS y se incubaron con el anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa-488 (10µg/ml) (Invitrogen), obteniendo marcaje verde fluorescente. FAAH se visualizó por incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado, seguida por el conjugado streptavidina-Alexa488 (10µg/ml) (Invitrogen), como se describió anteriormente (Nuñez y cols., 2004).

En el estudio con muestras EVIS, para las colocalizaciones CB₂/CD68 y CB₂/CD3 el protocolo incluía dos pasos consecutivos: inmunomarcaje de CD3 o CD68 utilizando el sistema EnVision (Dako) y reacción con el cromógeno diaminobenzidina (DAB), obteniendo marcaje marrón, seguido por las incubaciones con el anticuerpo anti-CB₂ y el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado, para finalizar con el conjugado streptavidina-Alexa 488 (Molecular Probes), y obtener marcaje verde fluorescente.

En este mismo estudio, la colocalización FAAH/GFAP se llevó a cabo usando un anticuerpo secundario biotinilado para el marcaje de FAAH, seguido por el sistema de amplificación avidina-biotina y DAB como cromógeno. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-GFAP 24h a 4°C, seguido de la incubación con el anticuerpo anti-ratón conjugado con Alexa488, obteniendo marcaje verde fluorescente.

Para restar la autofluorescencia endógena, las secciones de tejido se trataron con 1% de Negro Sudán en etanol al 70% durante 5 min, y se diferenciaron con etanol al 70% (Schnell y cols., 1999).

Las secciones se sellaron con un cubreobjetos utilizando una solución acuosa (Vectashield; Vector Laboratories). Se emplearon un microscopio Nikon Eclipse 90i (Tokio, Japón) y una cámara DXM1200F, para las observaciones y fotografías de los cortes, respectivamente.

4. WESTERN-BLOT DE MUESTRAS EVIS

Los extractos proteicos se prepararon a partir de corteza frontal de dos monos con EVIS y un control no infectado, utilizados también en el estudio inmunohistoquímico. Los tejidos se homogenizaron en buffer de lisis (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas 1x (Roche Products, Welwyn Garden City, Reino Unido). El homogenado se incubó en hielo durante 30 min y luego se centrifugó a 10,000 X g durante 30 min a 4°C. Después se aisló el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas en el extracto utilizando el kit *BCA protein assay* (Pierce, Rockford, IL, EEUU). 25 µg de extracto de proteína de cada muestra se desnaturalizó, y se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente 4-15%. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana *Immuno-blot PVDF* (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) que se lavó en TBS con 0.1% de Tween 20 (TBST) y posteriormente se bloqueó con leche de cabra en polvo al 5% en TBST (buffer de bloqueo).

El anticuerpo primario se diluyó en el buffer de bloqueo a 1:2000 para CB₁ y a 1:500 para CB₂ y FAAH, y se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente, la membrana se lavó cuatro veces con TBST y se incubó con el anticuerpo anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (1:1000; Dako) durante 1h a T^a ambiente. Finalmente, tras cuatro lavados en TBST, el complejo inmune se visualizó usando el kit *ECL Western Blotting* (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, EEUU). La especificidad de la señal se confirmó por preincubación con el péptido inmunizante para CB₁ (1:900).

II. ESTUDIOS IN VITRO EN CULTIVOS PRIMARIOS

A. Péptido β -amiloide

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales *knock-out* para la enzima FAAH (FAAH^{-/-}) fueron cedidos por el Dr. Benjamin F. Cravatt (*The Scripps Research Institute*, La Jolla, CA, EEUU) (Cravatt y cols., 2001). La colonia se amplificó mediante el cruce de estos animales con animales *wild type* de la misma cepa (C57BL/6J). Con el fin de igualar los fondos genéticos, los animales heterocigotos (FAAH^{+/-}) se cruzaron sucesivamente, y a partir de la sexta generación los animales FAAH^{+/+} (FAAH-wt) y FAAH^{-/-} (FAAH-ko) se utilizaron para experimentos *in vitro*.

Los animales dispusieron de agua y comida *ad libitum*, y fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22±1°C) y humedad con un ciclo diario de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo la normativa europea, para el correcto manejo de animales de experimentación (directiva 86/609/EEC).

1.a. Genotipado de la colonia de ratones FAAH

El genotipado de los ratones se realizó a partir del ADN genómico de la cola de los ratones. Un fragmento pequeño de cola se digirió en 500 μ l de tampón de lisis (20mM Tris-HCl pH.8, 2.5mM EDTA pH.8, 200mM NaCl y 0.1% SDS) que contenía 200 μ g/ml de Proteinasa K (Sigma) a 55°C durante 3 horas. Tras el proceso de digestión, se precipitó del ADN con isopropanol (en proporción 1.5:1) y se lavó en etanol 70% para eliminar las sales residuales.

El ADN se resuspendió en H₂O milliQ, y 50-75 ng de este ADN se utilizaron para la reacción de PCR que se describe a continuación:

Tampón 10x + Cl ₂ Mg 2mM (Biotools)	3 μ l
Oligonucleótidos (10 μ M) (TIB MOLBIOL)	1.5 μ l
dNTPs mix 10mM (Biotools)	0.75 μ l
Enzima Taq polimerasa 1u/ μ l (Biotools)	1 μ l
H ₂ O milliQ	19.75 μ l aprox
DNA de cada muestra	1 μ l aprox

El programa de reacción que se usó fue el siguiente:

95°C	3min	}	35 ciclos
94°C	1min		
53°C	1min		
72°C	1min		
72°C	7min		
4°C	∞		

Los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los animales fueron:

- FAAH1: 5' TAA CTA GGC AGT CTG ACT CTA G 3'
- FAAH2: 5' ACT CAA GGT CAG CCT GAA ACC 3'
- NEO3 : 5' TTT GTC ACG TCC TGC ACG ACG 3'

Los productos de PCR (10µl) se resolvieron en geles de agarosa/TBE 0.5X al 1.5% y se visualizaron con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta. Los animales FAAH-ko presentaban un fragmento de 300 bp y los animales FAAH-wt uno de 200 bp. Los animales heterocigotos presentaban ambos fragmentos.

2. CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS DE RATÓN

Los cultivos de astrocitos se obtuvieron a partir del cerebro de ratones FAAH-wt y FAAH-ko de entre 0-2 días postnatales, de acuerdo a un protocolo descrito previamente con pequeñas modificaciones (McCarthy y de Vellis, 1980; Molina-Holgado y cols., 2002a). Las células se plaquearon en frascos de 75 cm² recubiertos con poli L-ornitina (5 µg/ml, Sigma) y se dejaron crecer en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de suero fetal bovino (FBS), 2.5 mM de L-Glutamina y antibióticos (50 U/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomycin). Los frascos de cultivo se mantuvieron en un incubador a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y 95% de humedad. El medio de cultivo se renovó una vez por semana. Tras 13-15 días de cultivo, los frascos se agitaron durante 4 horas a 240 rpm para eliminar los progenitores de oligodendrocitos y microglía. La monocapa de astrocitos remanente, se tripsinizó y se sembró de nuevo en placas de cultivo tratadas

previamente con poli L-ornitina para realizar los experimentos descritos posteriormente en el Diseño Experimental.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio de la respuesta astrocitaria frente al péptido amiloide se realizó en cultivos primarios de astrocitos wt y knock out para la enzima FAAH en los que se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

3.a. Tiempo-respuesta de exposición al péptido A β

Los experimentos se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos con una densidad aproximada de 100.000 células/cm². Las células se dejaron adherir durante toda la noche en medio con suero. A la mañana siguiente, tras un lavado con PBS, las células se expusieron a 5 μ M de A β ₁₋₄₂ en medio sin suero durante 8, 24 y 48 horas. Transcurrido ese tiempo, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y almacenaron a -80°C para posteriores determinaciones. Las células se lavaron con PBS y se guardaron a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN.

3.b. Tratamiento con antagonistas de los receptores CB₁ y CB₂

Siguiendo las condiciones descritas para los experimentos de tiempo-respuesta, los astrocitos primarios se trataron 30 min antes de la exposición al péptido A β con SR141716A (SR1), y SR144528 (SR2), antagonistas selectivos de CB₁ y CB₂, respectivamente, proporcionados amablemente por *Sanofi Recherche* (Montpellier, Francia). Las concentraciones finales utilizadas fueron 5nM, 100 nM y 1 μ M para SR1, y 5nM y 100 nM para SR2. Transcurridas 8 horas de exposición al péptido amiloide A β ₁₋₄₂ (5 μ M), las células se lavaron con PBS y se guardaron a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN.

3.c. Activación de las vías ERK1/2 y p38 MAPK

Para estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 60 mm de diámetro (p60) donde se sembraron 100.000 astrocitos por cm². Las células se preincubaron durante 24 horas en medio DMEM sin suero y a continuación se expusieron a A β ₁₋₄₂ (5 μ M) durante los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos. El procesamiento de las células y el

análisis de las proteínas quinasas por Western blot se llevó a cabo según se describe en el apartado 8.a.

3.d. Activación de NF- κ B

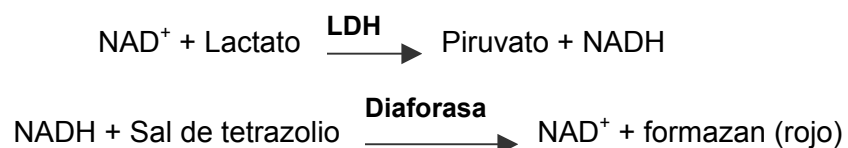
Las células, sembradas a una densidad de 50.000 células/cm² en placas de cultivo de 100 mm de diámetro (p100), se preincubaron en medio sin suero durante 24 horas antes de la exposición al péptido A β ₁₋₄₂ durante 1, 3 y 6 horas. El procesamiento de las células y su análisis por Western blot se llevó a cabo según se describe en el apartado 8.b.

4. EL PÉPTIDO A β ₁₋₄₂

El péptido A β ₁₋₄₂ se compró a American Peptide (Sunnyvale, CA, EEUU). Este péptido, correspondiente a los aminoácidos 1-42, se disolvió en agua destilada (1mg/ml) y se incubó durante 7 días a 37°C para favorecer la formación de fibrillas, aunque no se puede excluir la posible formación de oligómeros (Burdick y cols., 1992; Lorenzo y Yankner, 1994; Koenigsknecht-Talboo y Landreth, 2005). La concentración elegida para llevar a cabo los experimentos de exposición al péptido β -amiloide fue 5 μ M. Esta concentración es la cantidad aproximada de A β que encontramos en el cerebro de un paciente de Alzheimer, y que previamente se ha utilizado en otros estudios *in vitro* (Näslund y cols., 2000; Koenigsknecht-Talboo y Landreth, 2005).

5. MUERTE CELULAR

Para determinar la muerte celular por exposición al péptido A β en los experimentos de tiempo-respuesta, se cuantificó la cantidad de enzima LDH liberada al medio, utilizando el kit *CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega, Madison, WI, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Cuando las células mueren, esta enzima citosólica se libera al medio y, entonces a partir de la reacción enzimática catalizada por la LDH acoplada a una reacción colorimétrica se determina de forma semi-cuantitativa la proporción de células muertas con respecto al control.



6. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS

6.a. Paneles de citoquinas

Para identificar las principales citoquinas afectadas por la exposición al péptido A β , se emplearon paneles comerciales de citoquinas inflamatorias (Mouse Inflammation Antibody Array; RayBiotech, Norcross, GA, EEUU). Para ello se incubó el sobrenadante de los astrocitos FAAH-wt y FAAH-ko expuestos durante 24 horas al péptido A β con las membranas y se continuó con el protocolo descrito por el fabricante.

6.b. Cuantificación de los niveles por ELISA

Una vez identificadas las principales citoquinas afectadas por la acción del péptido A β , se cuantificaron los niveles de estas citoquinas en el sobrenadante de los cultivos. Para determinar los niveles de las citoquinas CCL5 y MCP-1, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se utilizaron kits de ELISA específicos para ratón siguiendo instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU). La sensibilidad de los kits de CCL5 y MCP-1 era de 2 pg/ml y para TNF- α de 5.1 pg/ml. Para las interleuquinas IL-6 e IL-1 β se utilizaron kits de ELISA para ratón con una sensibilidad de 2 pg/ml y 5 pg/ml, respectivamente (RayBiotech).

7. ANÁLISIS DEL ARNm

7.a. Extracción del ARN y transcripción inversa

La extracción del ARN total de las células se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del kit *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification* (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, EEUU). En el proceso de extracción, las muestras se trataron con DNasa I libre de ribonucleasas durante 30 min a 37°C para eliminar posibles restos de ADN genómico. Una vez purificado el ARN, se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en 23 μ l de H₂O-DEPC y se almacenó a -80°C hasta su utilización. Para verificar su integridad, las muestras se resolvieron en un gel de agarosa/TBE 0.5X al 1%. La concentración (μ g/ μ l) y pureza del ARN se determinó midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro.

La reacción de transcripción inversa (RT) se realizó a partir 1 μ g de ARN siguiendo las condiciones descritas en el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Este método incluye un primer paso para asegurar la desnaturalización del ARN de estructura secundaria a 65°C durante 10 min, y un segundo paso de síntesis del ADN complementario (cDNA). La mezcla contenía tanto *random primer* como oligo-dT y las condiciones de la reacción fueron: 10 min a 25°C, 60 min a 50°C, 5 min a 85°C.

7.b. PCR cuantitativa a tiempo real

Para cuantificar la expresión de los mensajeros de COX-2, iNOS, TNF- α , PPAR α , PPAR γ y CB₂ se realizaron ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real utilizando la tecnología LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para la amplificación se utilizó el kit QuantiMix Easy Probes (Biotools, Madrid, España). Para cada PCR se usaron 2 μ l del cDNA y la concentración de los primers y sondas fue 0.5 μ M y 0.2 μ M, respectivamente. Como control de carga se utilizó la expresión del gen 18S y en cada carrera de PCR se incluyó un control negativo sin molde.

Los primers y sondas Taqman y FRET utilizados en los estudios (**Tabla 3**) fueron diseñados por TIB MOLBIOL (Berlin, Alemania). Para la cuantificación se usaron curvas estándar de diluciones seriadas de diez en diez del cDNA de astrocitos primarios. La cantidad de transcrito se calculó usando el método de la segunda derivada y cuantificación relativa con corrección de eficiencias utilizando la versión 4.0 del software de LightCycler (Roche).

TABLA 3. Primers y sondas utilizados en la PCR a tiempo real

GENES	PRIMER/SONDA	SECUENCIAS PRIMERS Y SONDAS
18S	sense	AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTC
	antisense	GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA
	Sonda #55	Use universal ProbeLibrary, Roche Applied Science
iNOS	sense	GTCCTCCCAGGACCACA
	antisense	GCTGGAAGCCACTGACACTT
	Sonda TaqMan	6FAM-CACCTACCGCACCCGAGATGG--BBQ
COX-2	sense	TGACCCACTTCAAGGGAGTCT
	antisense	CTGTCAATCAAATATGATCTGGATGTC
	Sonda TaqMan	6FAM-AACAACATCCCCTTCTGCGAAGTT--BBQ
TNF- α	sense	GCCTATGTCTCAGCCTCTTCTCATT
	antisense	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA
	Sonda TaqMan	6FAM-CCATAGAAGTATGATGAGAGGGAGGCCATTT--BBQ
PPAR- α	sense	ACTGAAAGCAGAAATCTTACCTGTG
	antisense	AAGCGTCTTCTCGGCCATA
	Sonda FRET	GGGCCTTGACCTTGTTTCATGTTGAA-FL 640-TTCTTCAGGTAGGCTTCGTGGATTCTCTTG P
PPAR- γ	sense	CCAGATCTTCTGAACTTGACCT
	antisense	CCAGTGTCTCTGTGAGGACCG
	Sonda TaqMan	FAM-ACAGACAGCTTTCTGGGTGGATTGAA-TMR
FAAH	sense	TCCAAGAGCCCAGGAGGTTC
	antisense	AAGCTGCACTGCCGTCTGTC
	No Sonda	SYBR Green
CB ₂	sense	GCGGCTGACAAATGACAC
	antisense	CGGGAGGACAGGATAATATAGAG
	Sonda FRET	TTCTGTCTCCCGGCATCCCTCCA-FL 640-GGATGGGCTTTGGCTTCTTCTACTGGAGCT P
Tat	sense	ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTA
	antisense	GCTTTGATAGAGAAGCTTGATGAG
	No Sonda	SYBR Green

8. WESTERN-BLOT

8.a. Análisis de proteínas quinasas

Para estudiar la activación de las rutas ERK1/2 y p38 MAPK en respuesta al péptido A β , se llevaron a cabo ensayos de *western-blot*. Tras la exposición al péptido β amiloide, los astrocitos primarios se lavaron con

PBS, se recogieron en 100 μ l de tampón de lisis (100mM Tris-HCl pH.7.5, 2mM EGTA, 2mM EDTA , 20mM NaF, 540mM sacarosa, 0.2mM PMSF, 2% Triton X-100, 1mM Na₃VO₄, 0.1% 2-mercaptoetanol y 10 μ g/ml de los inhibidores de proteasas aprotinina, pepstatina y leupeptina) con ayuda de un rascador de células, se incubaron 3 min en hielo y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se guardó a -80°C hasta su utilización.

Para determinar la concentración de proteína total en los extractos, se utilizó *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad) y BSA para construir la curva patrón. La absorbancia a 595 nm se midió en un espectrofotómetro Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra).

Posteriormente, 50 μ g del extracto proteico/muestra se desnaturalizó durante 5 min a 100°C y se separó en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU) durante 1 hora a 100 voltios con una *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad).

A continuación se procedió a la detección de las proteínas quinasas mediante el uso de anticuerpos específicos. Para ello, primero se incubaron las membranas durante 1 hora a 37°C con una solución de bloqueo que contenía 5% leche desnatada (Fluka) en TBST. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo, que correspondía a la proteína que reconoce las formas fosforiladas. El anticuerpo que reconoce las formas fosforiladas de p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204), también conocido como ERK1/2, se diluyó a 1:2500 en la solución de bloqueo y el anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de p38 MAPK (Thr180/tyr182) se diluyó 1:1000 en 5% BSA en TBST. Ambos anticuerpos fueron suministrados por Cell Signalling Technology, Beverly, MA, EE.UU. Tras esta incubación se realizaron tres lavados de 10 min en TBST, y seguidamente se incubaron las membranas con el anticuerpo anti-conejo-HRP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) diluido 1:2500 en la solución de bloqueo

durante 2 horas a T^a ambiente. Finalmente, tras cuatro lavados en TBST, el complejo inmune se visualizó por quimioluminiscencia, utilizando para ello el kit Amersham ECLTM Western Blotting Analysis System (GE Healthcare).

A continuación, para detectar la cantidad total de proteína kinasa (fosforilada y no fosforilada), y de esta forma confirmar que los cambios en los niveles de la proteína fosforilada no se deben a una diferencia de carga proteica, las membranas se lavaron durante 30 min a 50°C en *stripping buffer* (62.5mM de Tris-HCl pH.6.7, 2%SDS y 100mM de 2-mercaptoetanol) con objeto de eliminar los anticuerpos fosforilados. Tras dos lavados de 10 min en TBST a T^a ambiente, las membranas se incubaron de nuevo con la solución de bloqueo durante 1h a 37°C. Seguidamente, se realizó una incubación durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos que reconocían específicamente las formas fosforiladas y no fosforiladas de las proteínas quinasas ERK1/2 (Cell Signalling Technology, Beverly, MA, EE.UU) y p38 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, EE.UU), ambos diluidos 1:2500 en la solución de bloqueo. Después de tres lavados en TBST, la incubación de las membranas con el anticuerpo anti-conejo-HRP y la detección de las proteínas con ECL se llevó a cabo según se describe anteriormente.

Después de revelar las películas de radiografía (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare), las bandas correspondientes a las proteínas específicas se digitalizaron y la intensidad de cada banda se cuantificó mediante su análisis densitométrico con el programa informático Quantity One (Bio-Rad).

8.b. Análisis de la activación de NF-κB

Para el estudio de la activación de NF-κB por exposición al péptido Aβ se analizó la translocación de NF-κB (p65) al núcleo mediante ensayos de *western-blot*. Los astrocitos primarios expuestos al péptido se lavaron con PBS y siguiendo las instrucciones del fabricante de *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Pierce) se obtuvieron extractos proteicos del citosol y del núcleo. Para determinar la concentración de proteína en los extractos se utilizó el kit *BCA protein assay* (Pierce).

Las proteínas nucleares (30 μg) y los extractos citosólicos (20 μg), desnaturalizados durante 5 min a 100°C, se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12% con SDS. La transferencia de las proteínas a una membrana de Immobilon-P (Millipore) y el bloqueo de la membrana se realizaron según las condiciones descritas en el apartado 8.a.

Las membranas que contenían los extractos citosólicos y las que contenían las proteínas nucleares se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) diluido 1:500 en la solución de bloqueo. Tras lavados con TBST, la incubación con el anticuerpo anti-conejo-HRP y la visualización de las bandas de proteína se realizó según lo descrito en el apartado anterior.

A continuación, tras lavar la membrana con el *stripping buffer* como se describía en el apartado 8.a, las membranas se bloquearon y posteriormente se incubaron con sus correspondientes controles de carga, para normalizar la expresión de NF- κ B. Para las membranas con extractos citosólicos se utilizó como control de carga la β -actina (1:2500; Sigma) y para las membranas con extractos nucleares, la Histona H3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Abcam, Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos se diluyeron en la solución de bloqueo y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Tras los lavados en TBST, las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-ratón-HRP (1:2500) durante 2 horas a T^a ambiente. Finalmente, la detección del complejo inmune con ECL y el análisis densitométrico de las bandas correspondientes se realizó como se describió en el apartado 8.a.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM). Para hacer comparaciones entre dos grupos se empleó la prueba paramétrica T de Student, seguida por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. También se empleó el análisis de la varianza (ANOVA), con el test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Los resultados de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. El análisis estadístico se llevó a cabo con la versión 11.0.0 del software SPSS (SPSS, Inc) y la versión 5.00 del software GraphPad Prism. El

tipo de análisis utilizado en cada caso se mencionará en la correspondiente leyenda de cada figura.

B. Proteína viral Tat

1. TRANSFORMACIÓN, CRECIMIENTO BACTERIANO Y EXTRACCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

El vector de expresión de la proteína Tat (CMV1-Tat) fue cedido amablemente por el Dr. José Alcamí (Unidad de Inmunopatología del SIDA, Instituto de Salud Carlos III, Madrid). Como control de la transfección de Tat se utilizó un plásmido LTR-Luc, que contiene las secuencias de respuesta a Tat en la región reguladora del VIH y el gen que codifica para la enzima luciferasa. Para normalizar los datos obtenidos, se cuantificó por PCR cuantitativa a tiempo real la expresión del ARNm de la proteína Tat en cada experimento.

Antes de comenzar con la transfección transitoria de la proteína viral Tat, se amplificaron los vectores. Para ello, se transformaron células bacterianas competentes (*E. Coli* DH5 α) en presencia de 100 ng de vector durante 10 min en hielo. Pasado ese tiempo, se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 1 min, incubándose de nuevo en hielo durante 1,5 min. A continuación se añadió a cada muestra 800 μ l de medio LB (Triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 5g/l, Sigma) y se dejó durante 1 hora a 37°C en agitación, para que las bacterias se recuperaran y replicaran.

Posteriormente, se procedió a la selección de bacterias que habían incorporado el vector y que por tanto serían resistentes a ampicilina. Las células se sembraron en placas de LB suplementadas con ampicilina (50 μ g/ml, Sigma) y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se picó una colonia de cada plásmido y se procedió a su crecimiento. En primer lugar se hizo un inóculo en 10 ml de medio LB suplementado con ampicilina, durante 5-6 horas a 37°C en agitación hasta apreciar turbidez en el medio de cultivo y obtener una densidad óptica de 0.4-0.5 a una longitud de onda de 550 nm. Una vez crecido el minicultivo, se añadió en 200 ml de LB suplementado con ampicilina y se incubó durante toda la noche a 37°C y en agitación para permitir el crecimiento de las bacterias.

Al día siguiente, la extracción del ADN plasmídico se realizó por lisis alcalina siguiendo el protocolo indicado en el kit *E.Z.N.A Plasmid Maxi* (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, EEUU).

2. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA MEDIADA POR LIPOSOMAS CATIONICOS

La transfección de los diferentes vectores se realizó en cultivos mixtos de glía (astrocitos y microglía) de ratones FAAH-wt y FAAH-ko. El cultivo primario de glía a partir del cerebro de dichos ratones se realizó según el método descrito anteriormente. Tras 13-15 días de cultivo, las células gliales se sembraron el día anterior a la transfección al 80% de confluencia (60.000 células/cm²) en placas de cultivo p60 para la transfección y en placas de 24 pocillos para el control de eficiencia.

La transfección por liposomas catiónicos se llevó a cabo siguiendo el protocolo indicado en el kit *TransFast™ Transfection Reagent* (Promega, Madison, WI, EEUU). Las células se transfectaron con 8 µg de CMV-Tat y 2 µg del plásmido reportero pLTR-Luc. Como control negativo de la transfección se utilizó el plásmido pCMV-500. Transcurrida 1 hora de transfección, se añadió medio fresco conteniendo 10% de FBS. Dos días después de la transfección, las células se lavaron con PBS y, o bien, se guardaron a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN, o bien se lisaron para la medida de la actividad luciferasa.

3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

La medida de la actividad luciferasa se realizó según el protocolo descrito en el manual de *Dual Luciferase assay system* (Promega). Tras finalizar el experimento de transfección, las células se lavaron con PBS y se lisaron con el tampón Passive lysis (Promega) a temperatura ambiente. Tras agitar los tubos en vortex durante un par de segundos, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C., y los sobrenadantes se recogieron para la cuantificación de la actividad luciferasa.

El ensayo de luciferasa se realizó tomando de cada muestra un volumen de 20 µl al que se añadió 30 µl de luciferina. A continuación, el pulso de luz emitido en cada muestra durante 30 segundos se midió en el fluorímetro Victor³ (Perkin Elmer, Boston, Ma, EE.UU).

4. ANÁLISIS DEL ARNm

La extracción del ARN de las células y la cuantificación de los niveles de expresión del ARNm de COX-2, iNOS, TNF- α , CB₂, FAAH y Tat por PCR cuantitativa a tiempo real se realizó según se describe en el apartado 4 del estudio *in vitro* con el péptido β -amiloide.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba paramétrica T de Student. Los resultados con una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. El análisis estadístico se llevó a cabo con la versión 5.00 del software GraphPad Prism.

RESULTADOS

1. LOCALIZACIÓN DEL SCE EN UN MODELO ANIMAL DE EVIS

El modelo de macaco infectado por VIS se considera un buen modelo para el estudio de la demencia asociada a VIH (Rausch y cols., 1999). Dicho modelo presenta cierto paralelismo con la infección inducida por VIH, y sigue el mismo patrón de progresión de la enfermedad que en humanos, aunque a ritmo acelerado (Nesbit y Schwartz, 2002). También presenta deterioros motores y cognitivos (Murray y cols., 1992) y rasgos neurológicos, que coinciden con los observados en humanos. El 50% de los macacos en estado terminal de la enfermedad presentan infiltrados de macrófagos/monocitos, CGMs y nódulos de microglía y astrocitos.

Por tanto, este modelo puede servir de herramienta para estudiar los posibles cambios del SCE en respuesta a la encefalitis inducida por el virus de la Inmunodeficiencia en Simios (EVIS), como modelo animal de neuroinflamación y neurodegeneración.

Las tinciones con hematoxilina confirmaron la presencia de infiltrados perivasculares de macrófagos/microglía y CGMs en cortezas parietal y frontal de los macacos que habían desarrollado EVIS (**Figura 1**).

No se apreciaron cambios significativos entre los animales control y los animales infectados con VIS que desarrollaron SIDA pero no encefalitis, por esta razón los datos relativos a los animales control y animales infectados con VIS se toman como uno y se comparan con muestras de animales con EVIS. Los resultados mostraron entonces claras diferencias en el patrón de expresión de algunos componentes del SCE, especialmente en el patrón de expresión del receptor CB₂ y la enzima FAAH. Sin embargo, no se encontraron cambios en el patrón de expresión del receptor CB₁.

1.a. Receptores CB₁

Los receptores CB₁ se distribuyen homogéneamente por todo el neuropilo de la corteza de macacos control y EVIS (**Figura 2**). Los cuerpos celulares de las neuronas piramidales se tiñen moderadamente. En áreas de sustancia blanca o en infiltrados perivasculares no se observa expresión de CB₁ (**Figura 2B**). Tampoco, se aprecian cambios significativos en el patrón

de expresión y/o en la cantidad de proteína CB₁ entre las muestras control y EVIS (**Figura 3A,B**).

1.b. Receptores CB₂

No se observa marcaje significativo para el receptor CB₂ en las muestras de tejido de animales control (**Figura 4A**). Por el contrario, en animales EVIS se puede observar un marcaje intenso para dicho receptor (**Figura 4B**), así como un aumento del nivel de expresión de la proteína (**Figura 3C**). La señal se restringe a poblaciones celulares concretas. Específicamente, las células perivasculares son las que exhiben los niveles más altos de tinción (**Figura 4B**), aunque también algunas células en áreas de sustancia blanca se tiñen de forma notable. Estas células CB₂ positivas rodean la superficie externa de casi todos los vasos sanguíneos, independientemente del diámetro de los vasos (**Figura 4B-D**). Además, puede observarse marcaje positivo para CB₂ en células localizadas dentro de infiltrados celulares (**Figura 4E,F**). Esta señal corresponde a células agrupadas y está limitada a los infiltrados celulares que circundan las paredes de los vasos sanguíneos, y que son un rasgo característico en cerebros EVIS.

Para definir el(los) tipo(s) celular(es) específico(s) que expresan receptores CB₂ en las secciones de tejido de animales EVIS, se llevaron a cabo experimentos de doble marcaje. Para tal fin, se emplearon dos marcadores fenotípicos bien conocidos: el receptor CD3 (un marcador de linfocitos T) y el antígeno CD68 (un marcador de macrófagos/microglía). Los resultados que se obtuvieron a partir de estos experimentos nos permitieron identificar microglía perivascular y linfocitos T como las células que expresaban el receptor CB₂. De modo que, las células CD68 positivas localizadas en la superficie externa de los vasos sanguíneos así como en los infiltrados celulares perivasculares expresan receptores CB₂ (**Figura 5A-D**). Por otra parte, los grupos celulares que incluyen numerosas células CD3 positivas en las lesiones características en EVIS eran también positivos para CB₂, indicando la presencia de este subtipo de receptor cannabinoide en linfocitos T (**Figura 5E,F**). Tras llevar a cabo un estudio inmunohistoquímico de doble marcaje, encontramos que la mayoría de las células T-CD3 en el SNC son del subgrupo de células T-CD8 (Kim y cols., 2004), sugiriendo que esas células CD8 positivas también expresan receptores CB₂.

1.c. Enzima FAAH

Las regiones de sustancia gris cortical de los macacos control y EVIS mostraron un nivel de marcaje para FAAH de moderado a intenso (**Figura 6**). Las neuronas piramidales presentaban una señal fuerte en los cuerpos celulares. Además, se podía observar un reforzamiento perinuclear claro, mientras que las dendritas y axones se encontraban teñidos débilmente; este marcaje se asemeja al obtenido previamente en muestras humanas (Romero y cols., 2002).

Los cambios más llamativos se detectaron en áreas de sustancia blanca de la corteza, un área conocida por sufrir una extensa astrogliosis en EVIS. Así, aunque no se observó marcaje para FAAH en sustancia blanca de animales control, sí se detectó fuerte inmunoreactividad en animales EVIS (**Figura 6B-F**). Esta señal estaba presente en astrocitos, como se demostró por doble marcaje con GFAP (**Figura 6E,F**). Específicamente, los astrocitos que rodean los infiltrados celulares perivasculares muestran un marcaje para FAAH más intenso, en contraste con aquellos que rodean los vasos, a falta de infiltrados patológicos, que mostraban una tinción moderada (**Figura 6C**). En cuanto al nivel de proteína, en el *western-blot* no se detectaron diferencias entre las muestras control y EVIS (**Figura 3**).

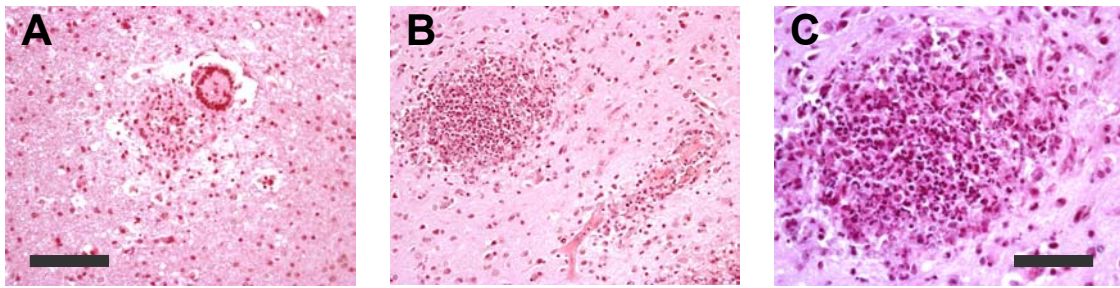


Figura 1. Infiltrados en EVIS. Tinción con Hematoxilina. **A,B**, 800 μm ; **C**, 200 μm .

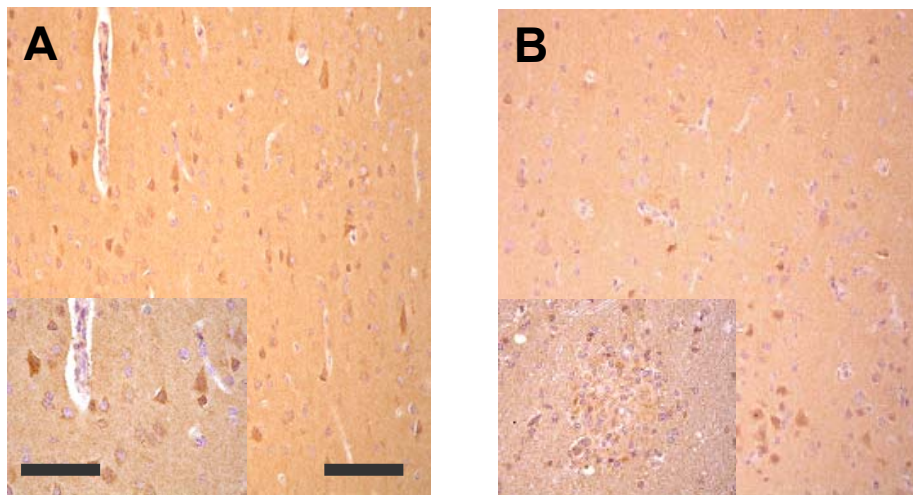


Figura 2. Expresión del receptor CB₁ en corteza frontal de animales control (A) y EVIS (B). En ambos grupos, se puede observar una señal moderada en neuronas piramidales (**A**, detalle) y un marcaje neuropílico difuso. No se observan cambios significativos en el interior de los infiltrados celulares presentes en áreas de sustancia blanca en animales EVIS (**B**, detalle). Escala de las barras: **A,B**, 400 μm ; detalles, 200 μm .

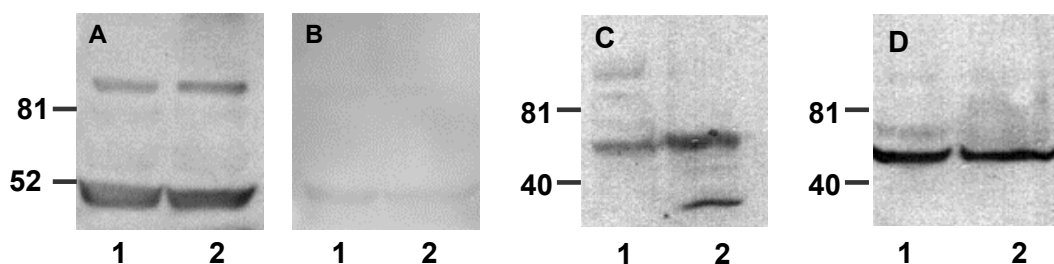


Figura 3. Western blot de CB₁, CB₂ y FAAH en homogeneizado de corteza de animales control (calles 1) y EVIS (calles 2). Para el receptor CB₁ se detectaron dos bandas de 85 y 52 kDa (**A**). La señal desaparece en las muestras control (**B**, calle 1) y EVIS (**B**, calle 2) tras la pre-incubación con el péptido de bloqueo. Banda de 60 kDa correspondiente al receptor CB₂ (**C**) y aumento de su expresión en las muestras EVIS (**C**, calle 2) con respecto a las muestras control (**C**, calle 1). Para FAAH, se detecta una banda de 50kDa (**D**). No se aprecian diferencias en el nivel de expresión de la enzima entre las muestras control (**D**, calle1) y EVIS (**D**, calle 2).

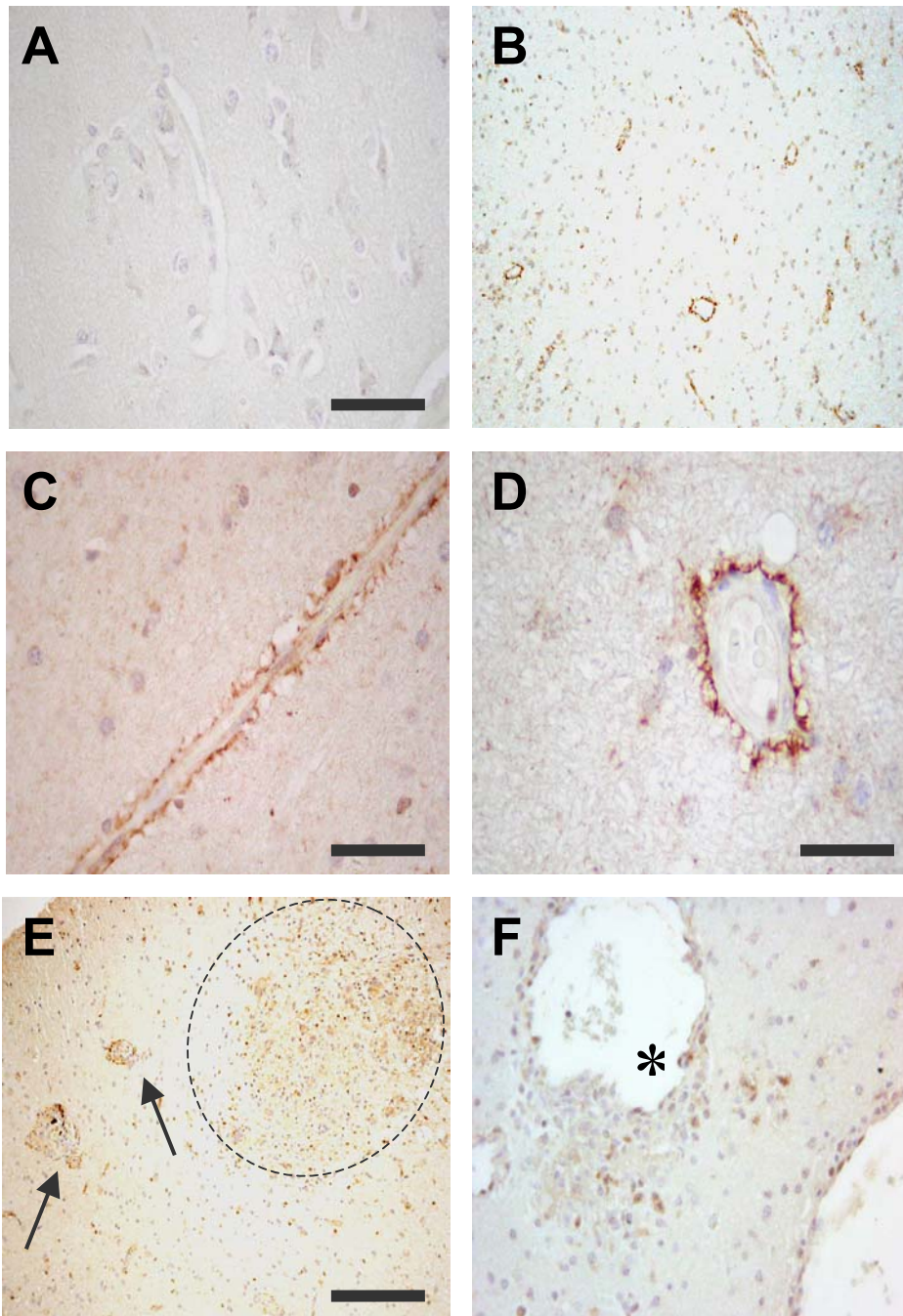


Figura 4. Marcaje de CB₂ en muestras de tejido de corteza frontal de animales control (A) y EVIS (B-F). **A**, Ausencia de señal en secciones de tejido de animales control en comparación con animales EVIS (**B**). **B**, Células perivasculares que muestran un marcaje intenso para el receptor CB₂. Secciones de vasos sanguíneos longitudinales (**C**) y transversales (**D**) que muestran una señal intensa en la superficie exterior de las paredes de los vasos. **E**, Células positivas para CB₂ dentro de los infiltrados celulares que comúnmente se encuentran en áreas perivasculares de cerebros EVIS. Las células localizadas en nódulos microgliales incipientes (flechas) y los ya formados, infiltrados maduros (trazado circular), muestran marcaje para CB₂. **F**, Imagen a mayor aumento de un infiltrado incipiente en la proximidad de la pared de un vaso sanguíneo (asterisco) que muestra inmunoreactividad frente a CB₂ (color marrón). Escala de las barras: **E**, 800 μm ; **A,B**, 400 μm ; **C**, 200 μm ; **D,F**, 100 μm .

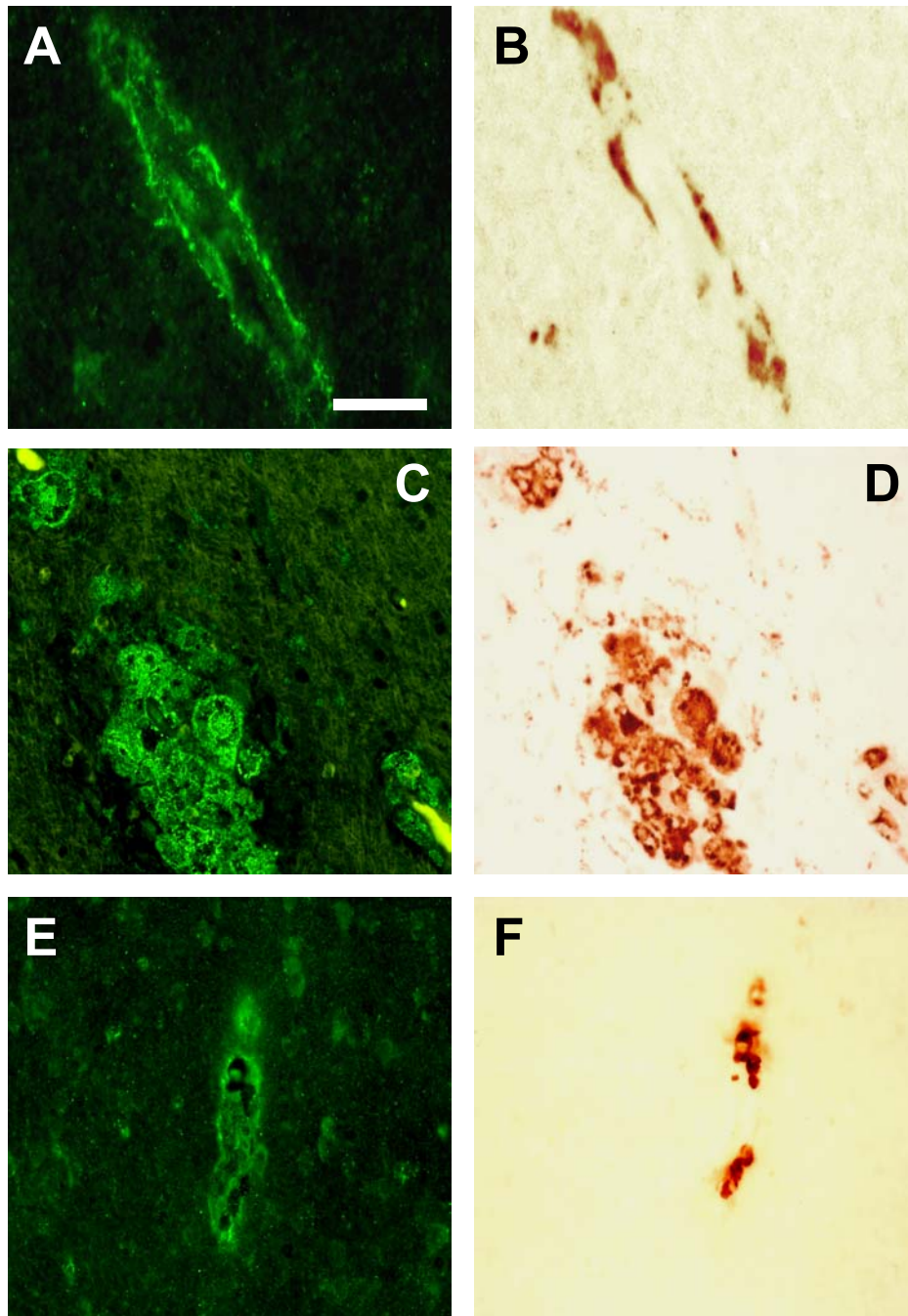


Figura 5. Los receptores CB_2 se expresan en células microgliales asociadas a los vasos sanguíneos (A, B) así como en infiltrados celulares patológicos (C, D) y linfocitos T (E, F). A, La señal inmunofluorescente para CB_2 se localiza en la porción más externa de los vasos sanguíneos. **B,** Marcaje de CD68 (marcador común de macrófagos/microglía) en el mismo vaso que **A**. Se observa un solapamiento parcial del marcaje de CB_2 y CD68. **C,** Señal fluorescente para CB_2 en grupos de células perivasculares. **D,** Esos mismos grupos de células son positivos para CD68. **E,F,** Infiltrados celulares que muestran marcaje intenso para CB_2 (**E**) y CD3 (**F**). Los patrones de ambos marcajes se ajustan casi por completo. Escala de las barras, 50 μ m.

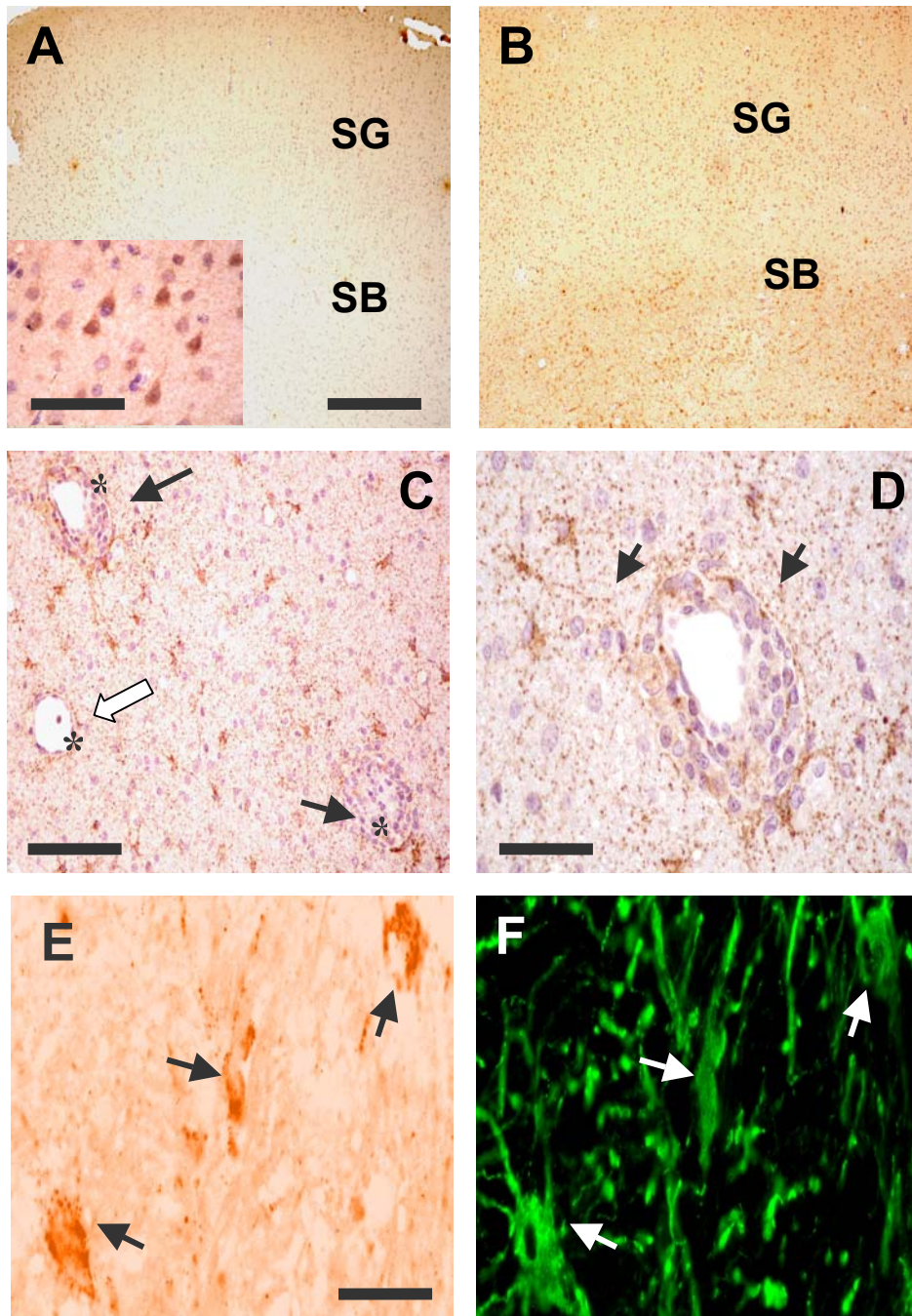


Figura 6. Distribución de FAAH en corteza frontal de animales control (A) y EVIS (B-F). **A**, El marcaje de FAAH en los animales control se limitaba a porciones de sustancia gris (**SG**) de la corteza, específicamente a neuronas piramidales (detalle). Se puede observar la casi completa ausencia de marcaje en áreas de sustancia blanca (**SB**). **B**, En animales EVIS, la expresión de la enzima aumentaba de forma llamativa en áreas de sustancia blanca de la corteza. Este incremento en la señal de FAAH se correlacionaba con el proceso de astrogliosis característico de EVIS. **C,D**, FAAH se expresa de forma masiva en astrocitos presentes en sustancia blanca y, de forma notable, en aquellos asociados a vasos sanguíneos (**C**, asteriscos) que tienen infiltrados perivasculares (flechas). Parece que existe una menor expresión de FAAH alrededor de los vasos que no presentan esas estructuras patológicas (**C**, flecha blanca). FAAH está presente en los somas y procesos astrocíticos. **E,F**, La señal de FAAH (flechas negras) colocaliza con células positivas para GFAP (flechas blancas), confirmando su naturaleza astrocitaria. Escala de las barras: **A,B**, 800 μm ; **C**, 200 μm ; detalles en **A,D**, 100 μm ; **E,F**, 50 μm .

2. LOCALIZACIÓN DEL SCE EN CEREBRO DE PACIENTES AFECTADOS DE EVIH

Una porción significativa de pacientes infectados por VIH, y de forma menos extendida, VIH-2, sufren una demencia subcortical conocida como demencia asociada a VIH. La forma más severa de esta demencia se caracteriza por la presencia de CGMs, y se corresponde con la Encefalitis Inducida por VIH (EVIH), cuya histopatología también incluye activación de macrófagos cerebrales y astrocitos, y formación de acúmulos inflamatorios de astrocitos activados, linfocitos T-CD8 inflamatorios y monocitos/macrófagos, algunos de los cuales están infectados.

A la vista de los cambios observados en algunos elementos del SCE en el modelo animal de encefalitis, abordamos el estudio de esta misma patología en muestras de donantes afectados de encefalitis por VIH para determinar si los resultados previos son reproducibles, y sí concuerdan con los ya descritos en otra patología neuroinflamatoria como es la enfermedad de Alzheimer (Benito y cols., 2003).

La expresión de CB₁ era elevada en las neuronas presentes por todo el córtex y casi indetectable en células gliales. Las neuronas piramidales de la capa IV presentaban un claro marcaje citoplasmático para el receptor CB₁ así como las neuronas de menor tamaño de la capa VI. No se detectó expresión del receptor CB₂ y la distribución de la enzima FAAH sólo era evidente en elementos neuronales del córtex. Este patrón de expresión fue prácticamente idéntico al que observamos en las muestras VIH. Por esta razón, y al igual que hicimos en el modelo animal de EVIS, los datos relativos a los pacientes control y pacientes VIH se toman como uno y se comparan con los obtenidos en los pacientes EVIH.

Las muestras EVIH presentan grandes cambios comparados con las muestras control y VIH, que incluían astrogliosis, nódulos microgliales e infiltrados perivasculares, todos ellos rasgos característicos de la patología.

2.a. Receptores CB₁

En las secciones de tejido EVIH el marcaje de CB₁ en elementos neuronales, principalmente en neuronas piramidales de la corteza, era menos intenso y menos abundante que en las muestras control (**Figura 7A,B**). Por el contrario, la señal moderada de CB₁ en células gliales sólo era evidente en

las muestras con encefalitis (**Figura 7C,D**). Estos grupos de células gliales CB₁ positivas (la mayoría localizadas próximas a vasos sanguíneos) se identificaron como astrocitos y microglía/macrófagos por técnicas de inmunofluorescencia con marcadores específicos (**Figura 7E-J**). En astrocitos la señal de CB₁ era intensa en los cuerpos celulares y más tenue en los procesos (**Figura 7E-G**) mientras que los infiltrados microgliales perivasculares mostraban un nivel de marcaje medio-alto (**Figura 7H-J**).

2.b. Receptores CB₂

En muestras control y VIH no se detectó señal de CB₂ (**Figura 8A**). No obstante, la presencia de CB₂ era evidente en microglía perivascular (**Figura 8B**) así como en nódulos microgliales e infiltrados de linfocitos (**Figura 8C**) en las secciones de tejido EVIH. Tanto la microglía (**Figura 8D-F**) como los linfocitos T (**Figura 8G-I**) mostraban niveles altos de inmunoreactividad frente a CB₂ y para su identificación se utilizaron los marcadores específicos HLA-DR y CD3, respectivamente. En los infiltrados de linfocitos T que rodean los vasos sanguíneos, y que son característicos de este tipo de patología, también pudimos detectar expresión de CB₂ en el subtipo CD8⁺ (**Figura 8J-L**). Por otra parte, no se detectó señal astrocítica para CB₂ en ninguna sección de tejido.

2.c. Enzima FAAH

Como en el caso de los receptores CB₁, la expresión de FAAH en neuronas en muestras de tejido EVIH mostraba un descenso acusado al compararse con las secciones control y VIH (**Figura 9A,B**). En las muestras con encefalitis, también se observó que grupos de astrocitos localizados alrededor de vasos sanguíneos presentaban una señal fuerte para FAAH (**Figura 9C,D,E-G**); además, este marcaje era más evidente y abundante en los vasos que presentaban infiltrados celulares (**Figura 9D**) que en aquellos no patológicos (**Figura 9C**). Esta señal era más fuerte en el cuerpo celular de los astrocitos que en los procesos. Cabe destacar que ningún otro tipo de células gliales mostraba un nivel de expresión significativo para FAAH.

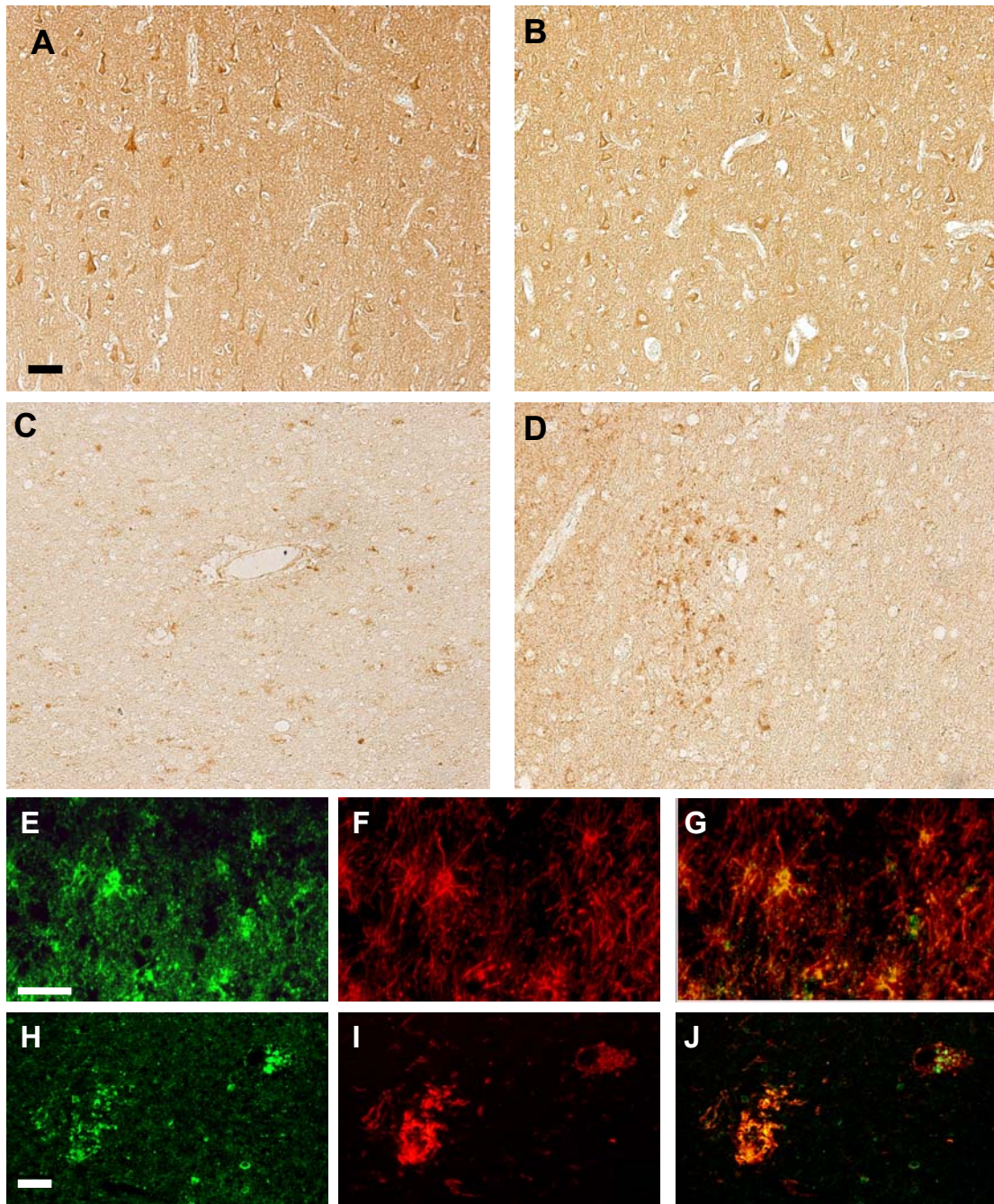


Figura 7. Distribución del receptor CB_1 en corteza de pacientes control (A) y EVIH (B). Expresión de CB_1 en neuronas piramidales de la corteza en muestras EVIH (B) y secciones de tejido de pacientes control (A). C,D Células gliales positivas para CB_1 en sustancia blanca de muestras con encefalitis. El uso de los marcadores GFAP (F) y HLA-DR (I) en técnicas de inmunofluorescencia, determinó la presencia del receptor en astrocitos (C,E) e infiltrados de microglia (D,H), respectivamente. Escala de las barras: A-D, 500 μm ; E-G, 100 μm ; H-J, 200 μm .

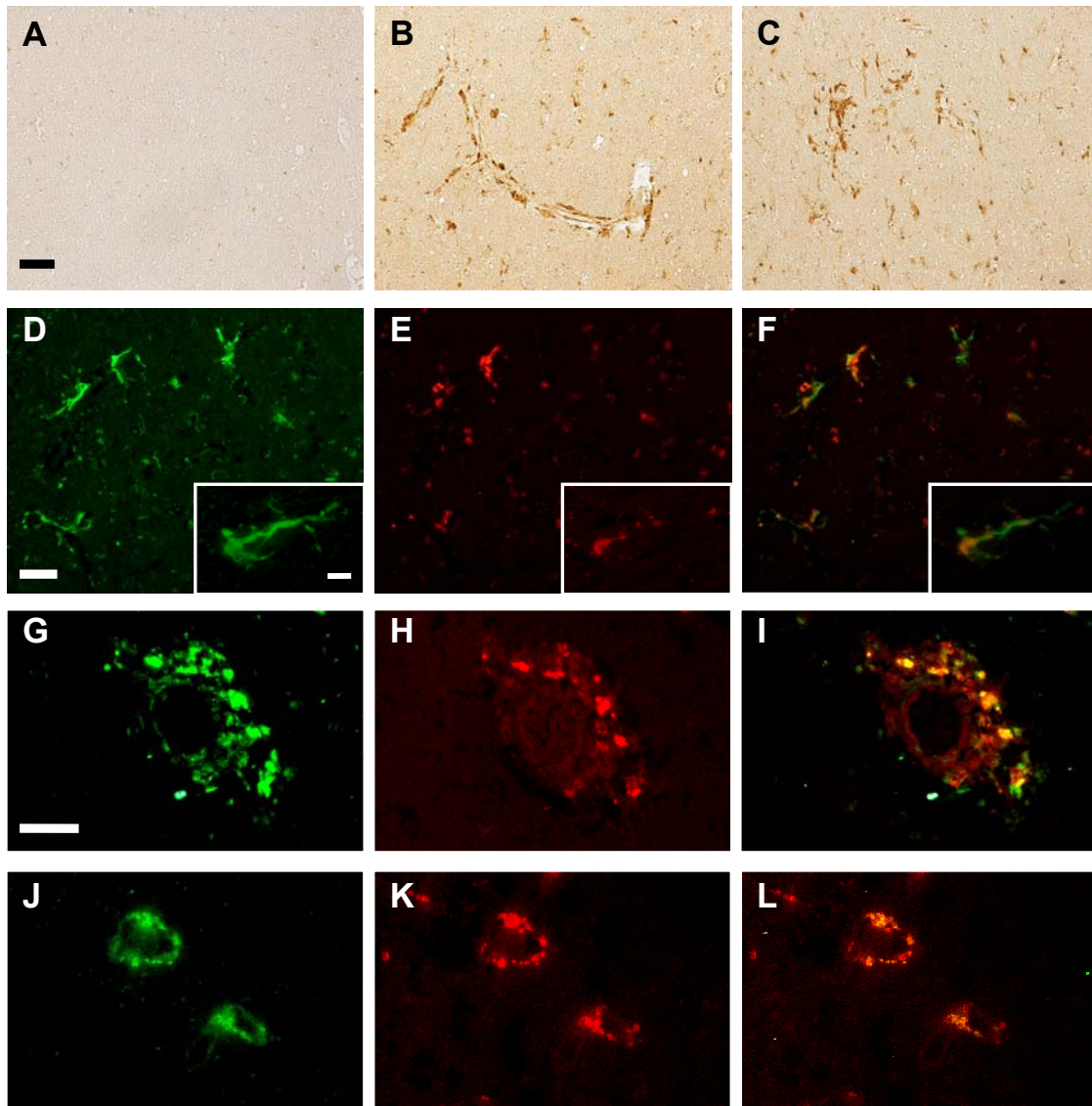


Figura 8. Expresión del receptor CB_2 en células microgliales y linfocitos T en muestras de tejido EVIH. **A**, ausencia de marcaje para el receptor CB_2 en muestras control. En muestras de pacientes con encefalitis se detectó expresión del receptor en zonas perivasculares (**B**) y áreas de infiltración celular (**C**). La colocalización de CB_2 (**D**) y HLA-DR (**E**) confirma la expresión de este receptor en microglía. También los linfocitos T (CD3 positivos, **H**) que forman infiltrados perivasculares expresan CB_2 (**I**). La mayoría de estos linfocitos CB_2 positivos (**J**) corresponden al subtipo $CD8^+$ (CD8 positivos, **K**). Escala de las barras: **A,B,C**, 500 μm ; **D-F** y **J-L**, 200 μm ; detalles en **D-F**, 20 μm ; **G-I**, 100 μm .

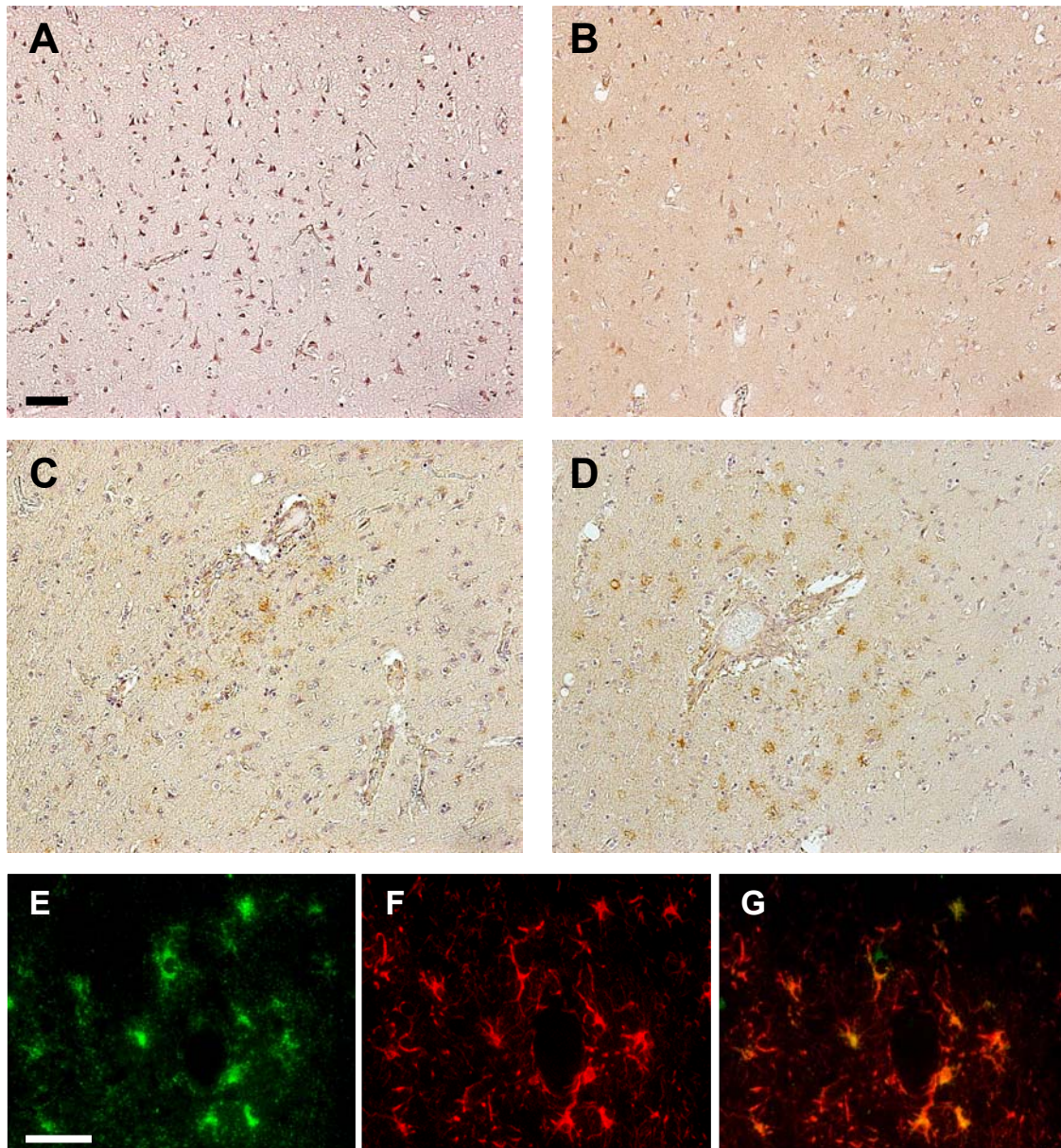


Figura 9. Expresión de FAAH en cerebro de pacientes control (A) y EVIH (B). Se detectó expresión de la enzima en neuronas, principalmente neuronas piramidales de la corteza, tanto en las muestras control (A) como en las muestras con VIH y encefalitis (B). Astrocitos FAAH positivos en muestras EVIH, alrededor de un vaso sanguíneo sin infiltración celular (C) y con infiltraciones perivasculares patológicas (D). El doble marcaje de FAAH (E) y GFAP (F) confirmó la naturaleza astrocitaria de estas células. Escala de las barras; A-D, 500 μm ; E-G, 100 μm .

3. LOCALIZACIÓN DEL SCE EN CEREBRO DE PACIENTES CON EM

La esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del SNC, y una de las causas más importantes de incapacidad neurológica en la población juvenil (Noseworthy y cols., 2000). La neuropatología de EM incluye degeneración axonal, pérdida de oligodendrocitos y la subsiguiente inducción de áreas de desmielinización.

Como objetivo del presente estudio nos hemos propuesto identificar y clasificar dichas áreas de desmielinización y estudiar los posibles cambios que pueden experimentar algunos elementos del SCE en función del grado de actividad celular de las placas. Para ello hemos utilizado muestras de tejido de donantes de EM, que también nos permitirán establecer si el patrón común de respuesta del SCE se mantiene en EM.

3.a. Características de las placas de EM y composición celular

Como cabría esperar, en las muestras control no se observaron áreas de desmielinización, y la expresión de CB₁ y FAAH se limitaba a elementos neuronales de la corteza, mientras que la presencia de receptores CB₂ era prácticamente inexistente (datos no mostrados).

Por el contrario, en las muestras de pacientes con EM se identificaron un total de 66 placas, como se describe en la **Tabla 1**. Usando como criterio la densidad y distribución de células HLA-DR positivas, según se detalla en el Material y métodos, se clasificaron 31 placas como “activas”, 22 como “crónicas” y 13 como “inactivas”.

Para realizar un análisis semicuantitativo de la expresión de CB₁, CB₂ y FAAH (**Tabla 4**) en dichas placas, se determinó el número de células positivas por sección y se agrupó en el subtipo celular correspondiente, de acuerdo a la expresión de marcadores fenotípicos específicos: neuronas [positivas para la proteína asociada a microtúbulos tipo 2, (MAP-2⁺)], astrocitos [positivos para la proteína glial fibrilar ácida, (GFAP⁺)], células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) [identificadas como positivas para el receptor del factor α de crecimiento derivado de plaquetas, (PDGFR- α ⁺)], oligodendrocitos adultos [positivos para la proteína básica de mielina, (MBP⁺)], microglía [positiva para HLA, (HLA⁺)], macrófagos (CD68⁺) y linfocitos T (CD3⁺). Se observó expresión de CB₁ y CB₂ en placas de EM activas y crónicas, mientras que FAAH se detectó solamente en placas

activas. Las placas inactivas no presentaban inmunomarcaje para esos marcadores, en concordancia con la extremada baja densidad celular de estas estructuras patológicas (**Tabla 4**).

TABLA 4: Abundancia relativa de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ y FAAH en subpoblaciones celulares específicas en lesiones activas y crónicas de EM

	<i>Lesiones activas</i>							<i>Lesiones crónicas</i>						
	HLA-DR	CD68	GFAP	PDGFR- α	MBP	CD3	MAP-2	HLA-DR	CD68	GFAP	PDGFR- α	MBP	CD3	MAP-2
CB ₁	++	++	ND	+	+	++	++	ND	ND	ND	ND	ND	++	++
CB ₂	++++	++++	+	ND	+	++	ND	++++	ND	ND	ND	ND	++	ND
FAAH	ND	ND	+++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Los datos muestran el número de células positivas para dos marcadores en al menos tres secciones por caso. +, <10 células/sección de tejido; ++, 10-25 células/sección de tejido; +++, 25-50 células/sección de tejido; +++++, >50 células/sección de tejido; ND, no detectado.

3.b. Receptores CB₁

El receptor CB₁ se expresa abundantemente en neuronas corticales y, específicamente, en las células piramidales de casos control y EM (datos no mostrados). Además, también se detectó inmunoreactividad para este receptor en neuronas localizadas en áreas de sustancia blanca (**Figura 10A,B**), como revela el doble marcaje con MAP-2 (**Figura 10D-F**). Este marcaje es más evidente en áreas demielinizadas, probablemente debido al descenso de la interferencia por marcaje axonal. También se observa marcaje intenso para el receptor CB₁ en tipos celulares no neuronales. Cabe destacar, que tanto oligodendrocitos adultos como OPCs en placas activas, identificados con los marcadores específicos MBP y PDGFR- α , respectivamente, también expresan CB₁ (**Figura 10G-I,J-L**). No todas las lesiones activas contienen oligodendrocitos adultos y OPCs positivos para dicho receptor cannabinoide. Además, los experimentos de doble marcaje con CD68 mostraron abundantes macrófagos positivos para CB₁ dentro de placas activas (**Figura 10C,M-O**). Finalmente, los linfocitos T perivasculares también exhibían marcaje para el receptor CB₁ (**Figura 10P-R**).

3.c. Receptores CB₂

La expresión del receptor CB₂ se encuentra restringida a células localizadas dentro de placas activas (**Figura 11A,B**) y células localizadas en la periferia de lesiones crónicas (**Figura 11C,D**). Las placas inactivas no presentaban marcaje para CB₂ (**Figura 11E,F**). Las células CB₂ positivas eran morfológicamente similares y mostraban idéntica distribución en las placas que las células de microglía HLA-DR positivas (**Figura 11**). Esta coincidencia se confirmó por doble inmunomarcaje con HLA-DR (**Figura 12A-C**). Además, también se detectaron macrófagos (CD68⁺) que expresaban el receptor CB₂ (**Figura 12D-F**). Cabe destacar que una fracción de los macrófagos CB₂ positivos también contenían MBP (**Figura 12G-I**), indicando reciente actividad fagocítica y sugiriendo que la expresión del receptor CB₂ en macrófagos asociados a placas es un suceso temprano en la evolución de las placas de EM. El marcaje fluorescente con GFAP también reveló que astrocitos CB₂ positivos estaban presentes en áreas de sustancia blanca (**Figura 12J-L**). Finalmente, los linfocitos T perivasculares mostraban intensa inmunoreactividad para CB₂ (**Figura 12M-O**). No se detectaron receptores CB₂ en elementos neuronales de la corteza.

3.d. Enzima FAAH

Se detectó expresión de la enzima en neuronas corticales de casos control y EM (datos no mostrados). Contrariamente al patrón de expresión del receptor CB₁, FAAH no se detectó en neuronas de la sustancia blanca subcortical. En las muestras de tejido de EM, la expresión de FAAH también fue evidente en placas activas (**Figura 13A**). Estas células FAAH positivas mostraban un marcaje más intenso en los cuerpos celulares, mientras que en los procesos el marcaje era débil (**Figura 13B**). Las imágenes a mayor aumento revelan una morfología astrocitaria (**Figura 13B**) que se confirmó por doble marcaje con GFAP (**Fig. 13C-E**).

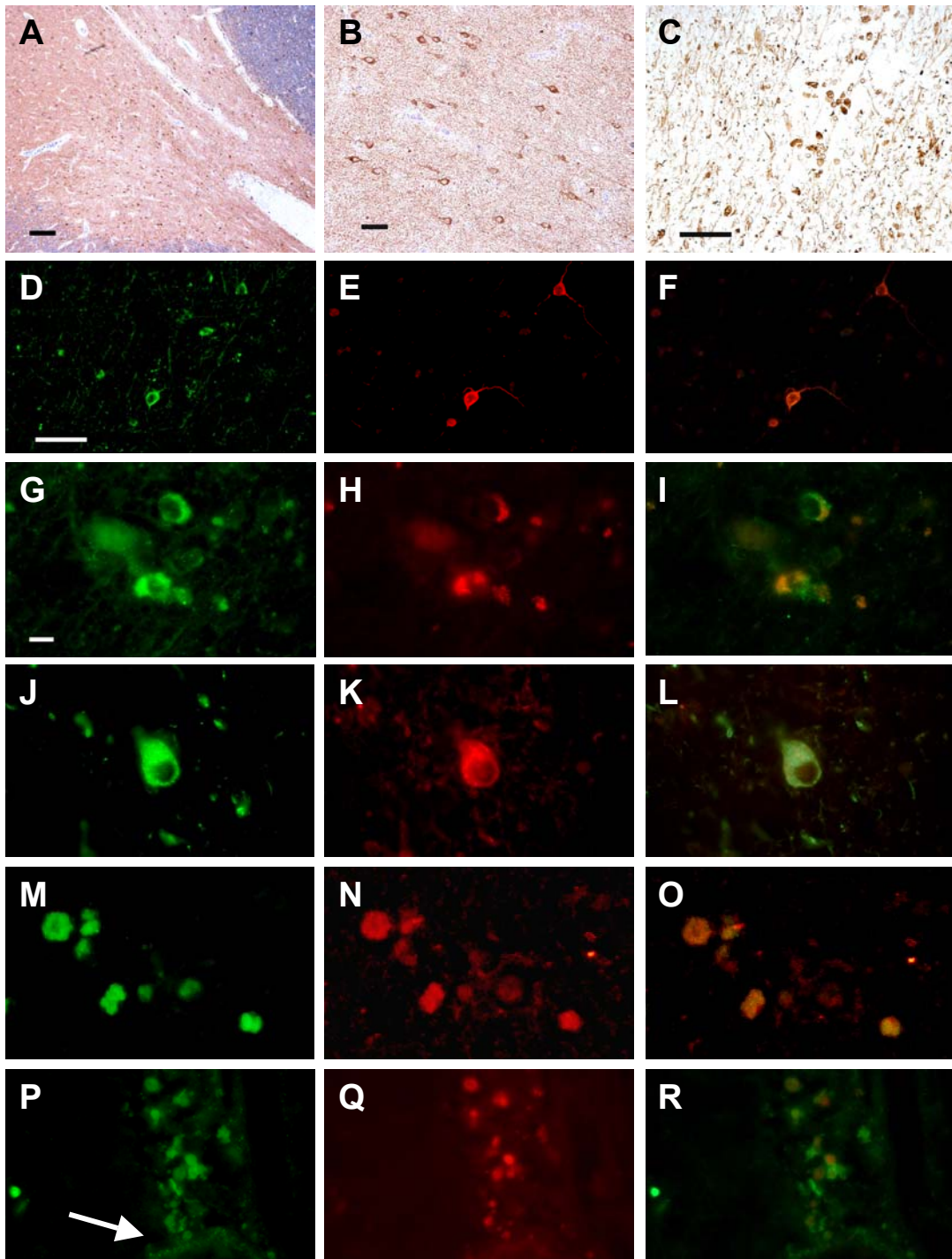


Figura 10. Distribución de CB₁ en muestras de EM. A,B,C, Las células de la sustancia blanca subcortical expresaban CB₁ (A,B); estas células CB₁ positivas (D) se identificaron por doble marcaje con MAP-2 como neuronas (E). G-I, Oligodendrocitos maduros que muestran marcaje citoplasmático para CB₁. J,K, Escasos OPCs en placas activas fueron positivos para CB₁ (J) y PDGFR- α (K). Macrófagos de forma redondeada (CD68 positivos; N) también mostraban inmunomarcaje para CB₁ (C,M). Linfocitos T perivascular (Q, ver la pared del vaso, flecha en P) expresaban receptores CB₁ (P). Escala de las barras: A, 500 μ m; B, 200 μ m; C-F, 100 μ m; G-R, 20 μ m.

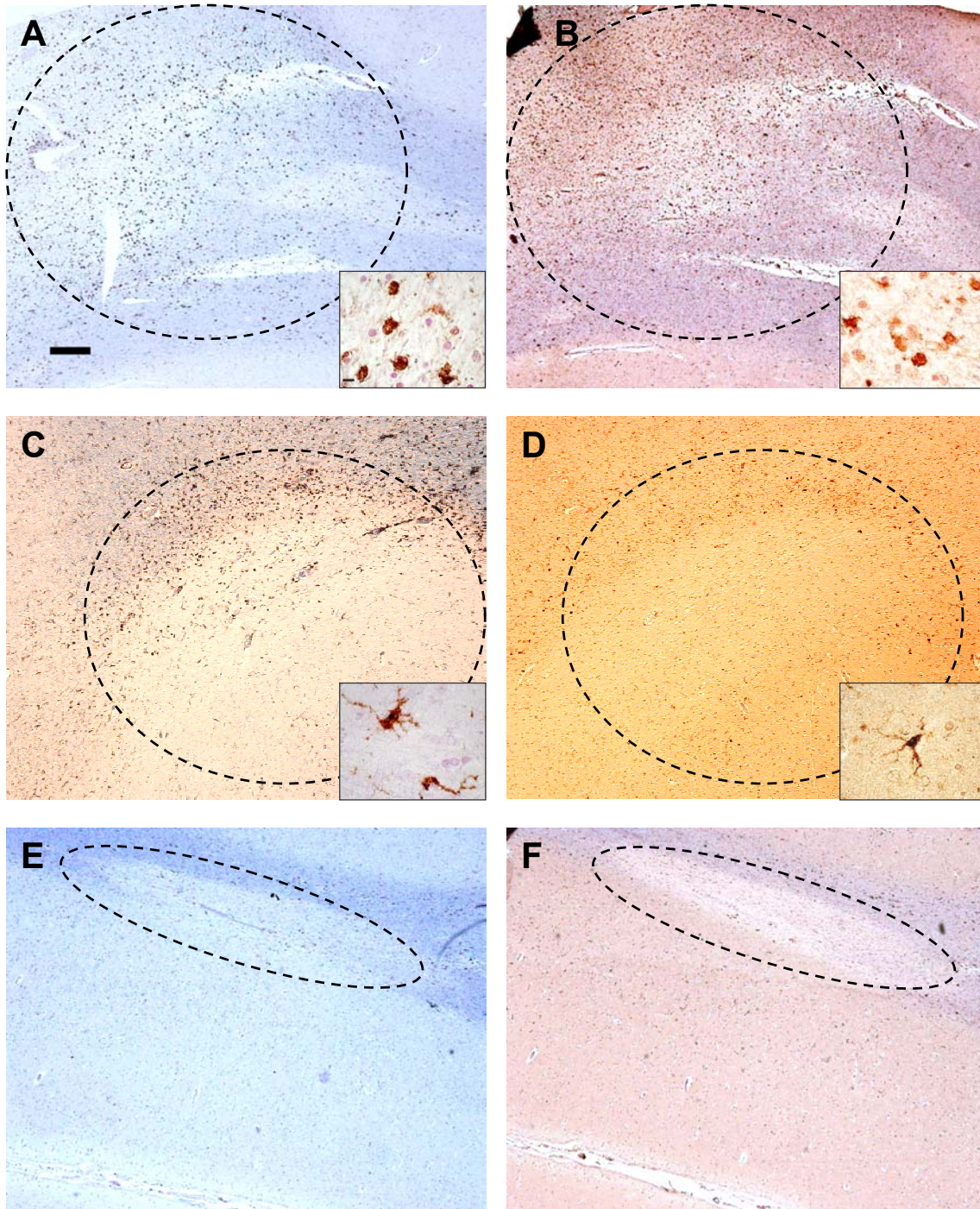


Figura 11. Distribución de células CB_2 positivas (columna derecha) comparadas con células HLA-DR positivas (columna izquierda) en tres tipos diferentes de placas de EM (delimitadas con trazados circulares). A-F, La morfología y distribución de las células CB_2 positivas en placas activas (B) y crónicas (D) son prácticamente idénticas a la de microglía HLA-DR positiva (ver detalles; A,C). La ausencia de células CB_2 positivas en placas inactivas es evidente (E,F). La tinción de solocromocianina (azul) se combina con el marcaje inmunohistoquímico de CB_2 (marrón). Escala de las barras: A-F, 500 μm ; detalles, 20 μm .

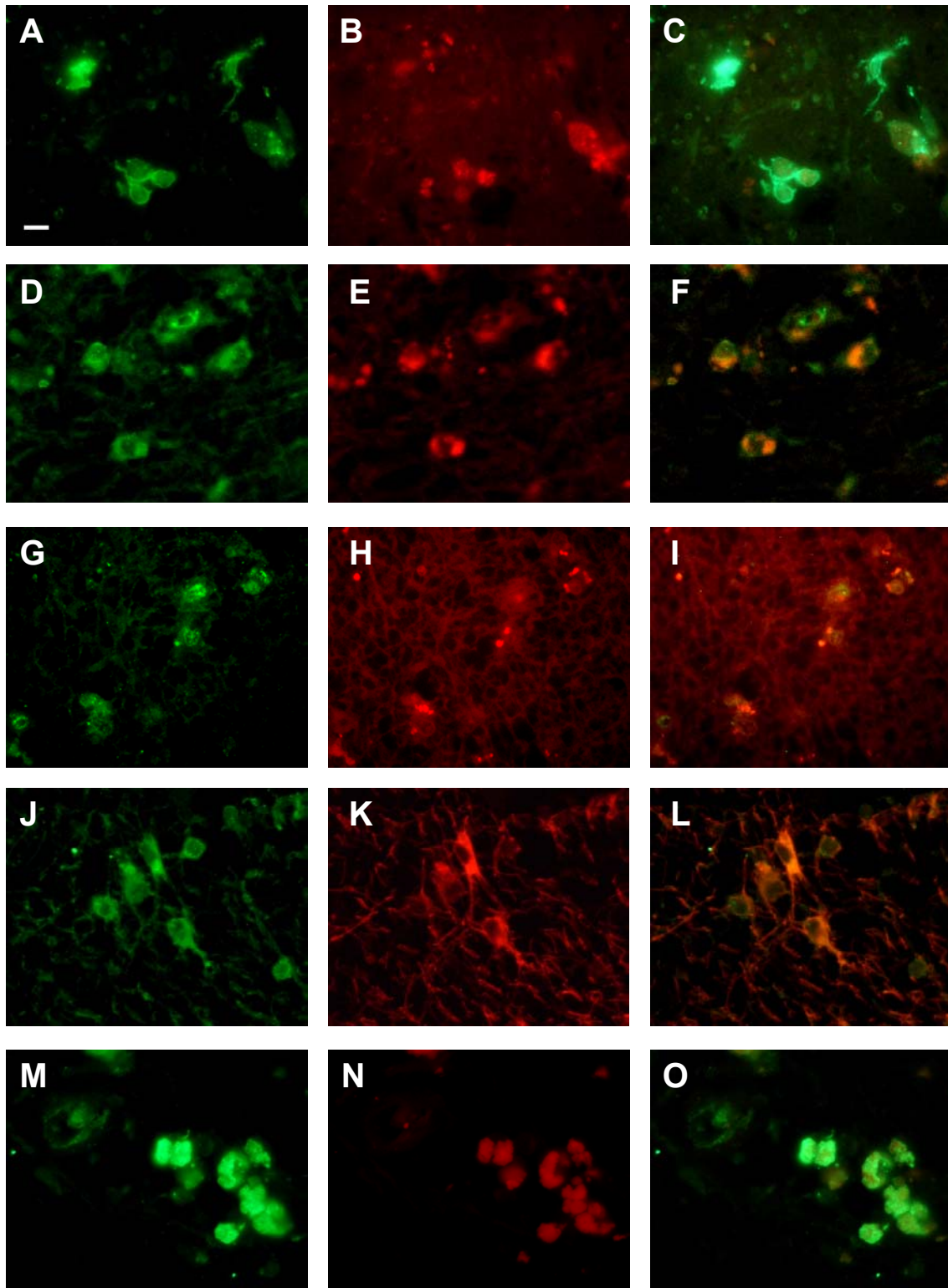


Figura 12. Ensayos de doble inmunofluorescencia de células CB_2 positivas (columna izquierda) y marcadores fenotípicos (columna central). A-O, Se detectó expresión de CB_2 en microglía HLA-DR positiva (A-C), macrófagos CD68 positivos (D-F), macrófagos que contenían MBP (G-I), astrocitos (GFAP positivos; J-L) y linfocitos T (M-O). Escala de la barra: 20 μ m.

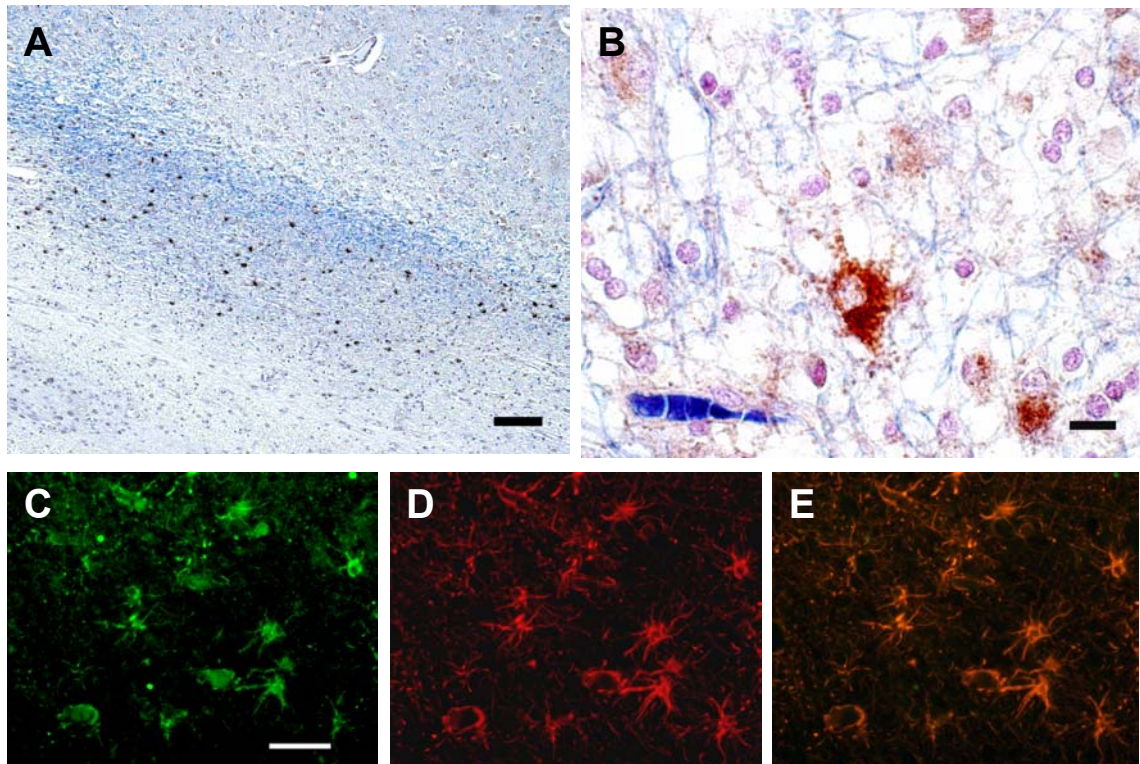


Figura 13. FAH se expresa en astrocitos hipertróficos en placas de EM activas. A-E, Las células FAH positivas eran abundantes en placas activas (A) y mostraban características morfológicas (B) y fenotípicas de astrocitos (GFAP positivos; C-E). Escala de las barras: A, 500 μm ; B, 20 μm ; C-E, 100 μm .

4. RESPUESTA AL PÉPTIDO β -AMILOIDE DE ASTROCITOS PRIMARIOS FAAH-wt Y FAAH-ko

El péptido A β es una de las proteínas clave que subyace a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. La agregación de este péptido y su deposición extracelular en áreas específicas del cerebro, formando placas neuríticas, conduce a la muerte neuronal y desencadena una respuesta inflamatoria glial.

Los resultados obtenidos en los estudios de distribución del SCE en muestras de EM y encefalopatía por VIH o VIS, revelan que la expresión de FAAH es selectiva y que se induce principalmente en astrocitos reactivos que participan en procesos inflamatorios del SNC. Estudios previos, también mostraron un aumento selectivo de la expresión de la enzima en los astrocitos hipertróficos que se localizan alrededor de las placas neuríticas características de la enfermedad de Alzheimer y Síndrome de Down (Benito y cols., 2003; Núñez y cols., 2008). Además, en estas placas enriquecidas en A β la actividad hidrolasa de la enzima era significativamente superior (Benito y cols., 2003).

Con estos antecedentes, nos propusimos estudiar el papel que FAAH puede desempeñar en la respuesta astrocitaria frente a un estímulo inflamatorio como el péptido β -amiloide (A β).

Para tal fin, utilizamos astrocitos primarios procedentes de cerebros de ratones *wt* y knock-out para FAAH, que fueron expuestos al péptido sintético A β ₁₋₄₂ fibrilar (forma más patogénica del A β) según se describe en el diseño experimental. Transcurrido el tiempo de exposición, se recogieron las muestras en las que se determinaron diferentes parámetros inflamatorios, así como posibles rutas de señalización celular involucradas en la respuesta astrocitaria frente a A β .

4.a. Muerte celular

Los datos de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa revelan que la falta de FAAH hace a los astrocitos más sensibles a la exposición a A β (5 μ M) (**Figura 14**). A las 8 y 24 horas de exposición al péptido, los astrocitos ko para la enzima presentan un mayor grado de muerte celular con respecto a los *wt*. Este incremento se hace significativo a las 48 horas de exposición al péptido amiloide.

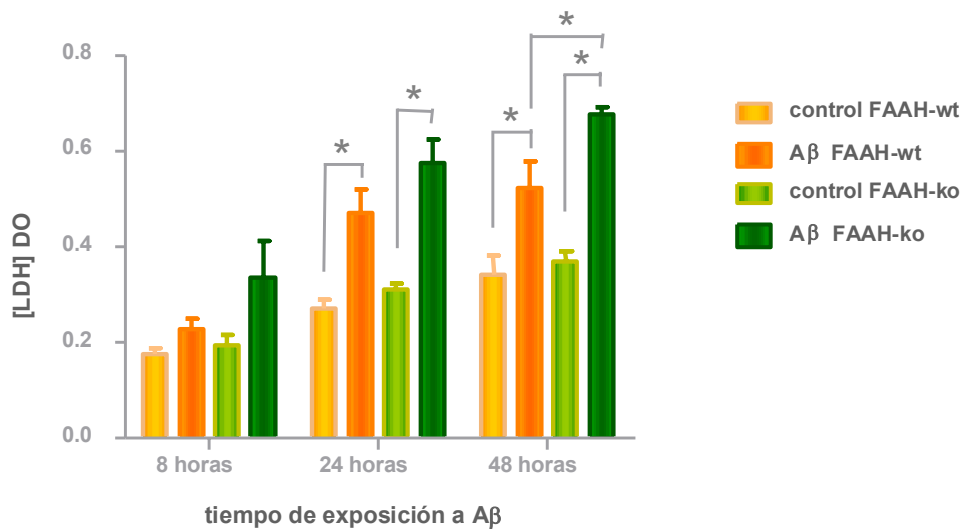


Figura 14. Los astrocitos FAAH-ko son más sensibles a la exposición al péptido β -amilode. Los astrocitos primarios procedentes de ratones FAAH-wt y FAAH-ko fueron expuestos al péptido A β (5 μ M) durante 8, 24 y 48 horas. Transcurrido ese tiempo, la muerte celular se midió por la liberación de la enzima LDH al medio de cultivo. Los datos representan la media de seis experimentos \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (* p <0.015).

4.b. Parámetros inflamatorios

La glia reactiva que rodea las placas amiloides, o la que es estimulada por exposición a A β *in vitro*, secreta citoquinas pro-inflamatorias, eicosanoides y especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden conducir al daño neuronal (El Khoury y cols., 2003). Además, el péptido β -amilode también es capaz de inducir la expresión de enzimas como iNOS y COX-2 en células gliales (Hu y cols., 1998; Hüll y cols., 2006).

Mediante el uso de arrays de citoquinas se identificaron CCL5, MCP-1, TNF- α , IL-1 β e IL-6 como las principales citoquinas afectadas por la exposición al péptido amilode (datos no mostrados). Posteriormente se determinó la concentración de estas citoquinas utilizando ELISAs específicos (**Figura 15**).

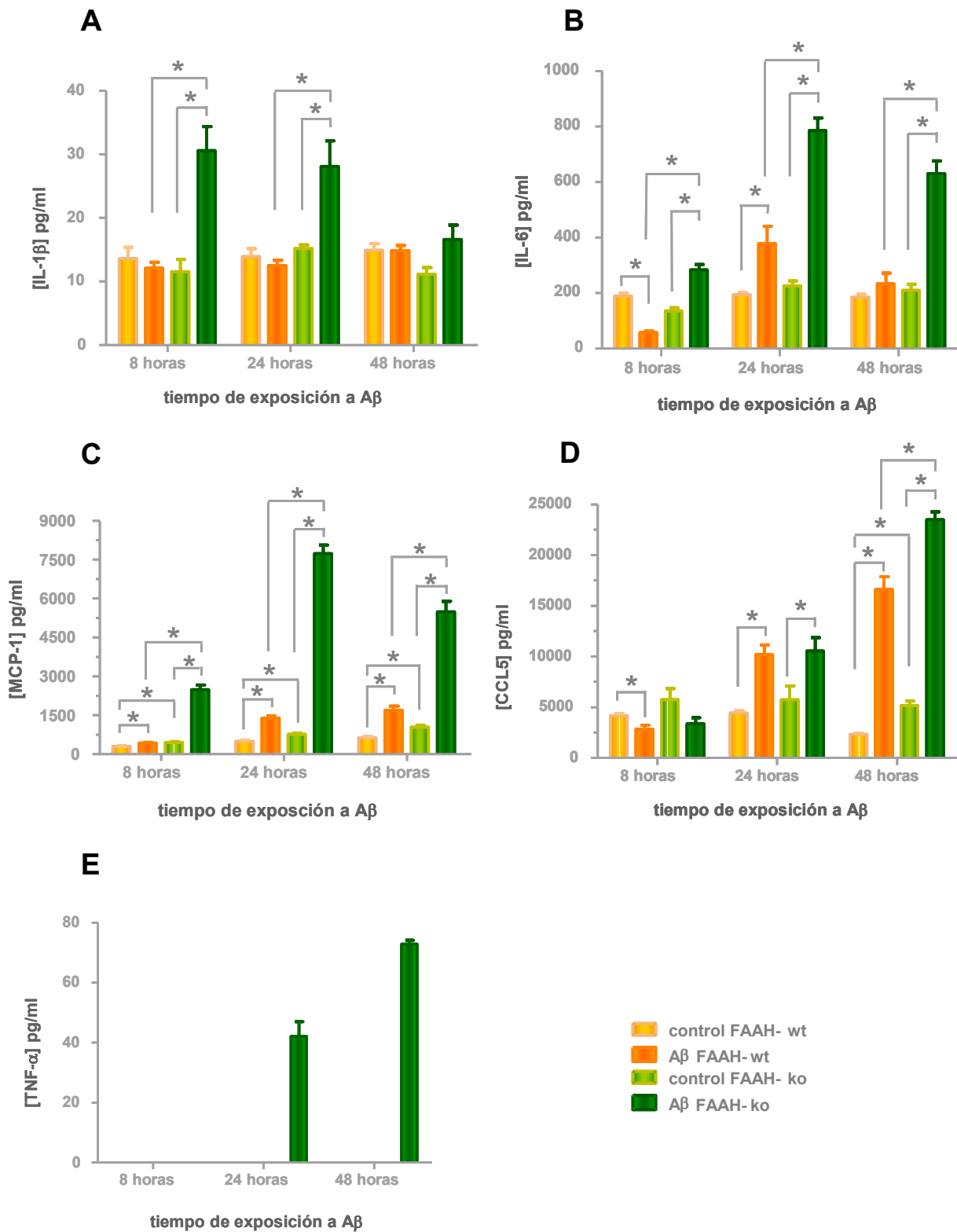


Figura 15. La falta de la enzima FAAH incrementa la producción de citoquinas en astrocitos expuestos al péptido β -amiloide. Tras 8, 24 y 48 horas de exposición de astrocitos FAAH-wt y FAAH-ko al péptido A β (5 μ M), se cuantificaron los niveles de las principales citoquinas afectadas por la exposición al péptido mediante ELISAS específicos para IL-1 β (A), IL-6 (B), MCP-1 (C), CCL-5 (D) y TNF- α (E). Los datos representan la media de seis experimentos \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (* $p < 0.015$).

Como se puede observar en la **Figura 15** los astrocitos FAAH-ko expuestos al péptido A β producían mayor cantidad de citoquinas y más rápidamente que los wt. En las primeras 8 horas de exposición al péptido los niveles de IL-1 β (**A**), IL-6 (**B**) y MCP-1(**C**) eran significativamente superiores en los astrocitos carentes de FAAH con respecto a los wt. En el caso de IL-6 y MCP-1 este incremento se acentuaba todavía más a las 24 horas, y seguía siendo significativo tras 48 horas de exposición a A β . En el caso de CCL5 (**D**), su perfil de producción era algo diferente, ya que en las primeras 8 horas no se detectaba liberación al medio de la citoquina en respuesta a A β . A las 24h los niveles de CCL5 eran mayores en los astrocitos tratados con el péptido pero no existían diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, a las 48 horas la producción de CCL5 era significativamente superior en los astrocitos ko expuestos a A β con respecto a los FAAH-wt. Finalmente, sólo se encontraron niveles detectables de TNF- α (**E**) en los astrocitos FAAH-ko tratados durante 24 y 48 horas con el péptido amiloide fibrilar.

Por otra parte, la determinación de los niveles de ARNm de las enzimas inducibles iNOS y COX-2 así como de la citoquina TNF- α confirmó que en los astrocitos FAAH-ko tratados con el péptido amiloide se desencadenaba una respuesta inflamatoria exacerbada con respecto a los astrocitos wt. En la **Figura 16** donde se representan las veces de inducción del mensajero con respecto a su control, se observa que en las 8 primeras horas de exposición al péptido, la inducción de la expresión de COX-2 (**A**), iNOS (**B**) y TNF- α (**C**) era significativamente superior en los ko que en los wt. En las horas siguientes, los niveles de COX-2 en los astrocitos ko se mantenían por encima de los wt, aunque el incremento no era significativo, mientras que para TNF- α e iNOS las diferencias entre ambos grupos se hacían mínimas.

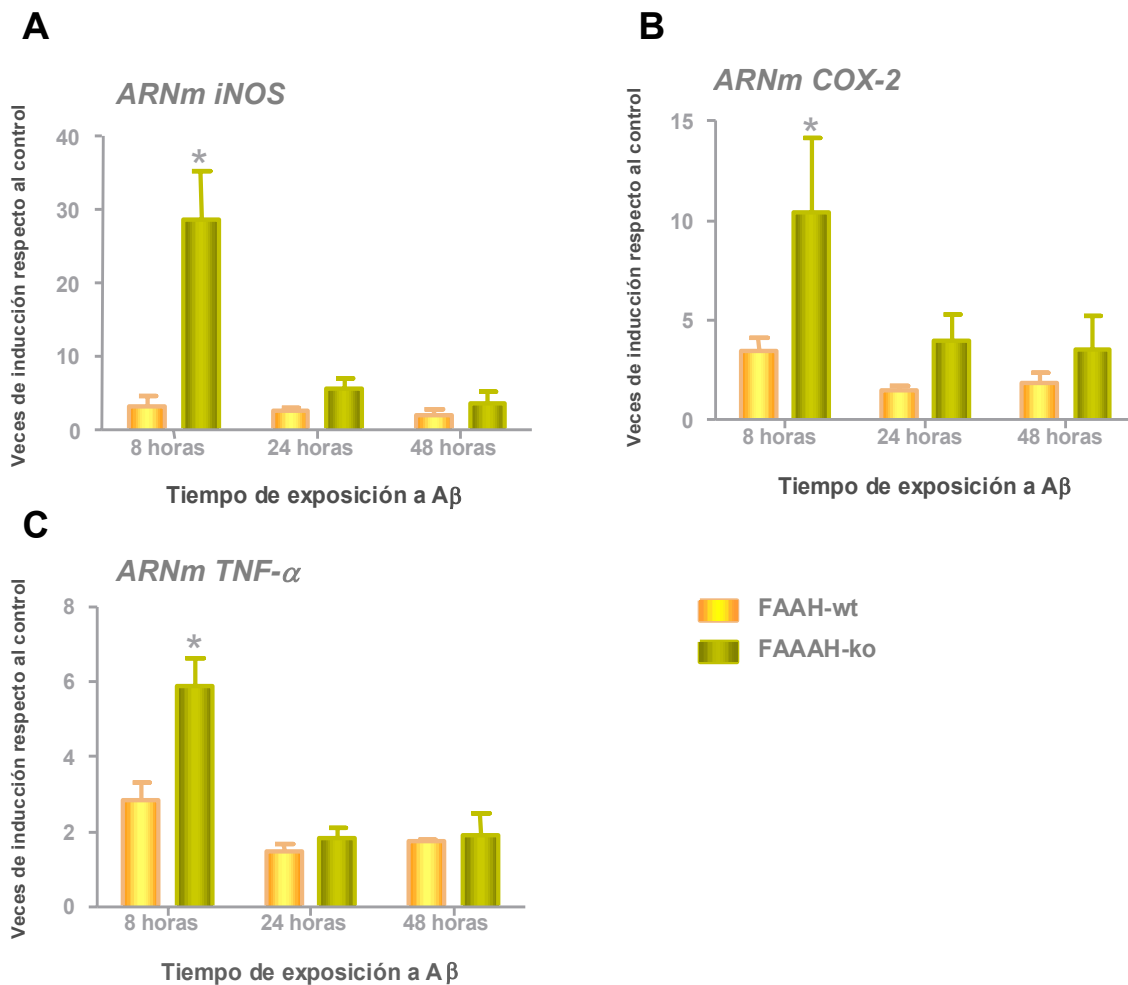


Figura 16. La expresión del ARNm de iNOS, COX-2 y TNF- α es significativamente superior en los astrocitos FAAH-ko a las 8h de exposición al péptido A β . Las gráficas representan las veces de inducción de la expresión del ARNm de iNOS (A), COX-2 (B) y TNF- α (C) en los astrocitos expuestos al péptido A β (5 μ M) con respecto a su control. Los datos representan la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (*p<0.05 vs FAAH-wt).

4.c. Activación de las vías ERK1/2 y p38 MAPK

Estudios *in vitro* han demostrado que el péptido A β fibrilar induce la activación de p38 y ERK1/2 MAPK en astrocitos (Matos y cols., 2008). Por ello decidimos estudiar si estas vías de señalización celular se encuentran involucradas en estos efectos y si la carencia de la enzima FAAH afecta al nivel de activación/fosforilación de ERK y p38 kinasas.

Para ello realizamos western-blot usando anticuerpos dirigidos contra las formas fosforiladas y total de ERK1/2 (Figura 17) y p38 kinasas (Figura 18).

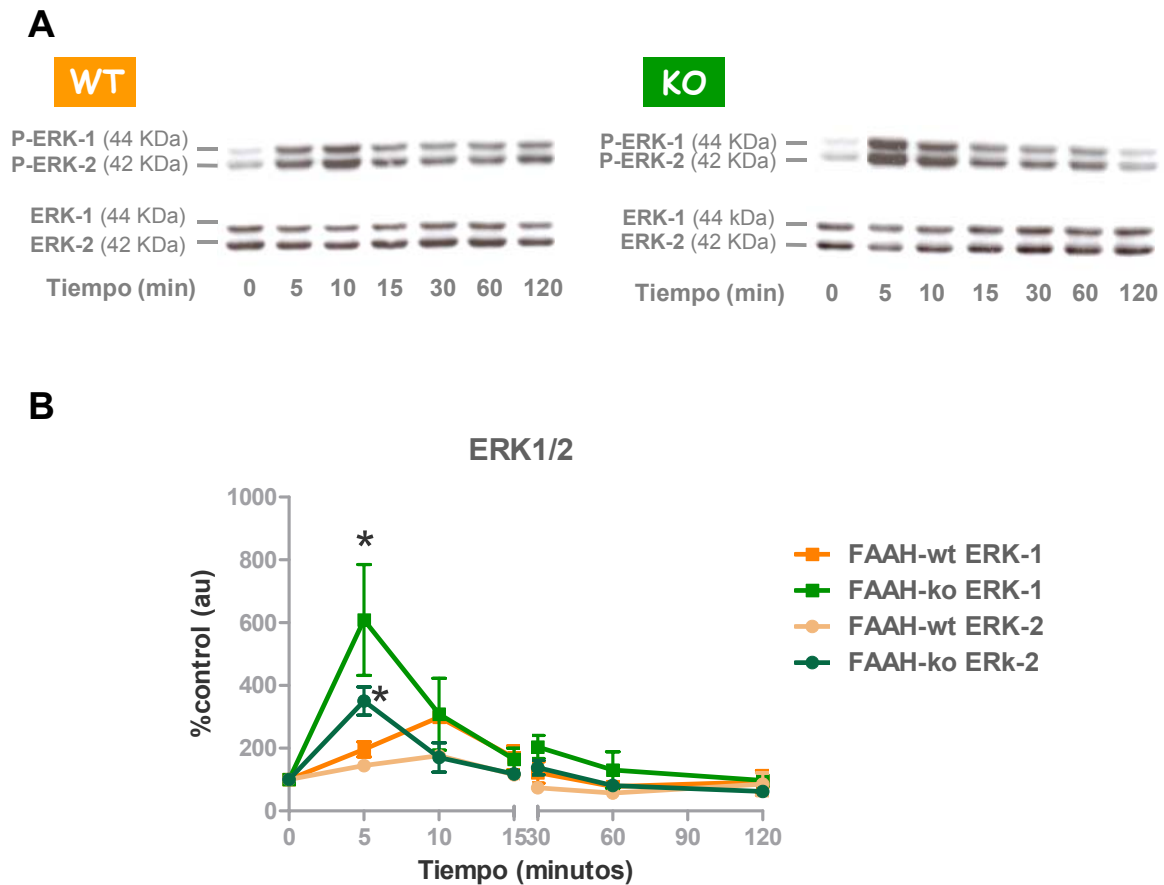


Figura 17. La activación de la vía ERK1/2 por el péptido β -amiloide en astrocitos carentes de FAAH es más intensa y temprana que en los wt. Los astrocitos primarios obtenidos a partir de cerebro de ratones wt y ko para la enzima FAAH fueron expuestos al péptido $A\beta$ ($5\mu M$) durante 5, 10, 15, 30, 60 y 120 min. **A.** *Western-blot* representativo de la fosforilación de ERK1/2 por estimulación del péptido β -amiloide. Debajo se muestra un *western-blot* representativo del control de carga, obtenido mediante el empleo de un anticuerpo que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa. **B.** Cuantificación densitométrica de ERK1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control ($t=0$). Los datos representan la media de tres experimentos \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples (* $p < 0.05$ vs FAAH-wt).

A los 5 min de incubación con el péptido $A\beta$ se observó un incremento significativo en los niveles de fosforilación de los astrocitos FAAH-ko de ERK1 (ko: $609 \pm 177\%$ del control; wt: $196 \pm 24\%$ del control) y ERK2 (ko: $350 \pm 45\%$ del control; wt: $144 \pm 9\%$ del control) con respecto a los wt. A partir de este punto, los niveles de fosforilación de ERK1/2 en los astrocitos FAAH-ko decaen progresivamente hasta igualarse con el control. Por su parte, los astrocitos FAAH-wt alcanzan el máximo nivel de fosforilación de ERK1/2 respecto a su control a los 10 min de incubación con el péptido,

coincidiendo en ese punto con el nivel de fosforilación en los astrocitos ko. De modo que la activación por A β de ERK1/2 en los astrocitos FAAH-ko es más temprana e intensa que en el grupo wt.

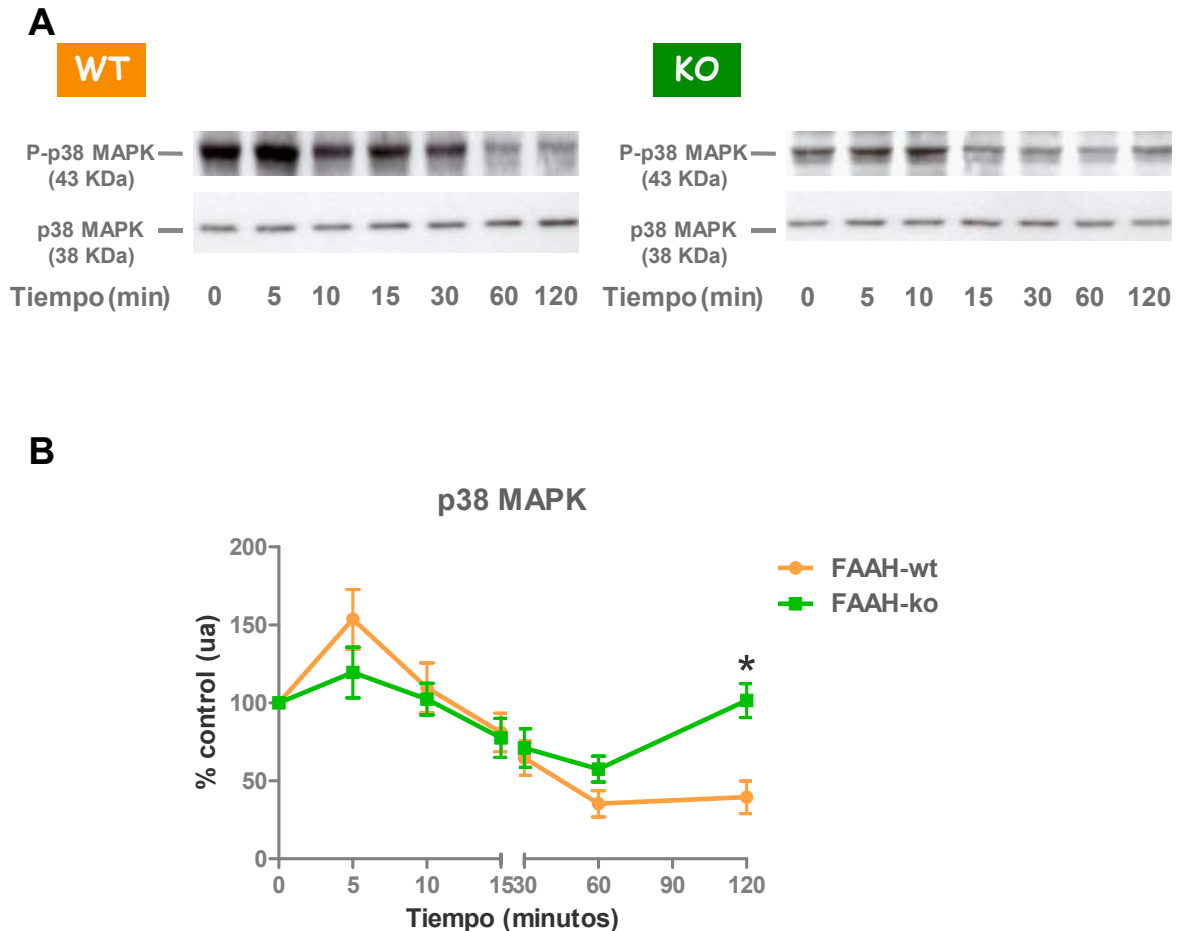


Figura 18. Los niveles de fosforilación de p38 en los astrocitos FAAH-ko son significativamente superiores respecto a wt a los 120 min de exposición al péptido β -amiloide. Para estudiar la activación de la vía p38 MAPK se utilizaron extractos celulares de astrocitos primarios expuestos al péptido β -amiloide (5 μ M) durante 5, 10, 15, 30, 60 y 120 min. **A.** *Western-blot* representativo de la fosforilación de p38 MAPK por estimulación del péptido β -amiloide. Debajo se muestra el control de carga, un *western-blot* representativo de p38 MAPK total (proteína fosforilada y no fosforilada). **B.** Cuantificación densitométrica de p38 MAPK, corregida por el control de carga y en porcentaje con respecto al grupo control (t=0). Los datos representan la media de tres experimentos \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples (*p<0.05 vs FAAH-wt).

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los niveles de fosforilación de p38 entre astrocitos wt y ko en los primeros minutos de exposición al péptido. En los astrocitos FAAH-ko se observa un ligero aumento en los niveles de fosforilación de p38 respecto a su control

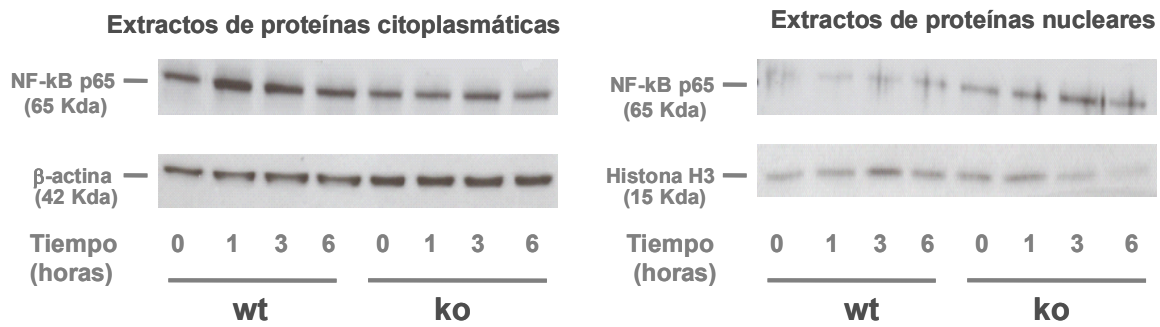
(119±16% del control) a los 5 min de exposición, que es superado por los astrocitos wt (153±19% del control). Seguidamente los niveles de fosfo-p38 decaen en ambos grupos de forma progresiva hasta los 60 min de exposición. A partir de este punto, en los astrocitos ko el nivel de fosforilación de p38 aumenta de forma significativa respecto a wt, igualándose con el control a las dos horas de tratamiento con el péptido.

4.d. Activación de NF-κB

NF-κB es un factor de transcripción esencial que juega un papel clave en la regulación de genes involucrados en respuestas inflamatorias e inmunes, crecimiento, diferenciación, muerte celular y enfermedades neurodegenerativas (revisado en Hayden y Ghosh, 2008). En las células gliales del SNC el complejo NF-κB está compuesto, principalmente, por las subunidades p65 y p50 que permanecen secuestradas en el citoplasma de las células no estimuladas asociadas a una familia de proteínas inhibitoras IκB. La activación celular por una variedad de estímulos patogénicos o fisiológicos provoca la fosforilación, ubiquitinación y la subsiguiente degradación de estas proteínas IκB (Chen y cols., 1995; Karin, 1999). Como consecuencia de esta degradación, NF-κB se transloca al núcleo para unirse a secuencias de DNA específicas para κB, promoviendo la expresión de genes diana generalmente involucrados en respuestas inflamatorias, tales como COX-2 e iNOS (Ghosh y cols., 1998).

Por esta razón, decidimos estudiar si este factor de transcripción estaba involucrado en la potente respuesta inflamatoria desencadenada por la exposición al péptido Aβ en los astrocitos FAAH-ko. Para ello, determinamos la proporción de NF-κB translocada al núcleo por medio de *western-blots*, usando el anticuerpo dirigido contra la subunidad p65 (**Figura 19**).

A



B

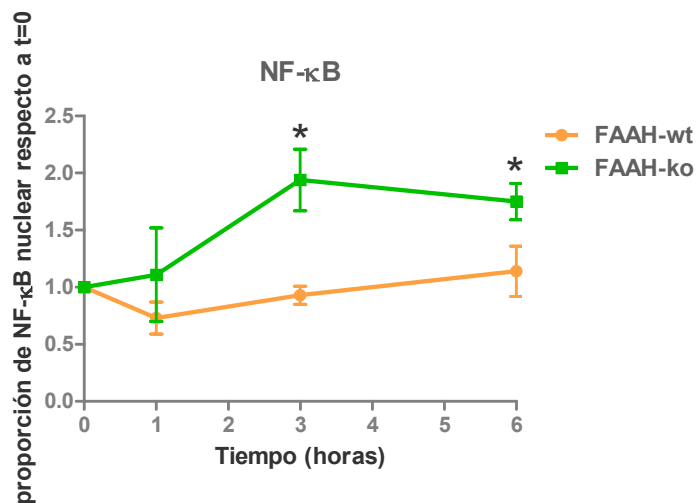


Figura 19. La proporción de NF-κB translocada al núcleo es significativamente superior en los astrocitos FAAH-ko expuestos al péptido β-amiloide durante 3 y 6 horas. Para estudiar la activación de NF-κB y por consiguiente su translocación al núcleo, se utilizaron extractos citoplasmáticos y nucleares de astrocitos primarios expuestos al péptido β-amiloide (5μM) durante 1, 3 y 6 horas. **A.** *Western-blot* representativo de la subunidad p65 de NF-κB en extractos citosólicos y nucleares. Debajo se muestra un *western-blot* representativo del control de carga correspondiente para cada tipo de extracto celular. **B.** Cuantificación densitométrica de p65, corregida por el control de carga y en tanto por uno con respecto a t=0, a partir de la cual se determinó la proporción de NF-κB translocada al núcleo. Los datos representan la media de tres experimentos ± SEM. Para el análisis estadístico se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples (*p<0.05 vs FAAH-wt).

En los astrocitos FAAH-wt se observa un aumento progresivo de la cantidad de proteína p65 translocada al núcleo durante las 6 horas de exposición al péptido β-amiloide. Sin embargo, en los astrocitos FAAH-ko, tras la primera hora de tratamiento con Aβ, la proporción de NF-κB translocada al núcleo aumenta de forma acusada. Este incremento es

significativamente superior con respecto a los astrocitos wt a las 3 y 6 horas de tratamiento con el péptido amiloide. De modo, que en los astrocitos FAAH-ko se produce una activación del factor de transcripción NF- κ B más potente que en los astrocitos wt, lo que podría explicar el incremento significativo de los mediadores inflamatorios determinados anteriormente con respecto a los astrocitos wt.

4.e. Expresión de PPARs

En los ratones knock-out para la enzima FAAH los niveles de AEA y otras N-aciletanolamidas, como PEA y OEA, son 10 veces superiores que en animales wt (Cravatt y cols., 2001). Estos ligandos cannabinoides pueden activar las isoformas α y γ de los receptores nucleares PPAR y mediar respuestas anti-inflamatorias (revisado en O'Sullivan, 2007), por esta razón decidimos explorar los niveles basales de expresión de PPAR α y PPAR γ en los astrocitos wt y ko para FAAH (**Figura 20**).

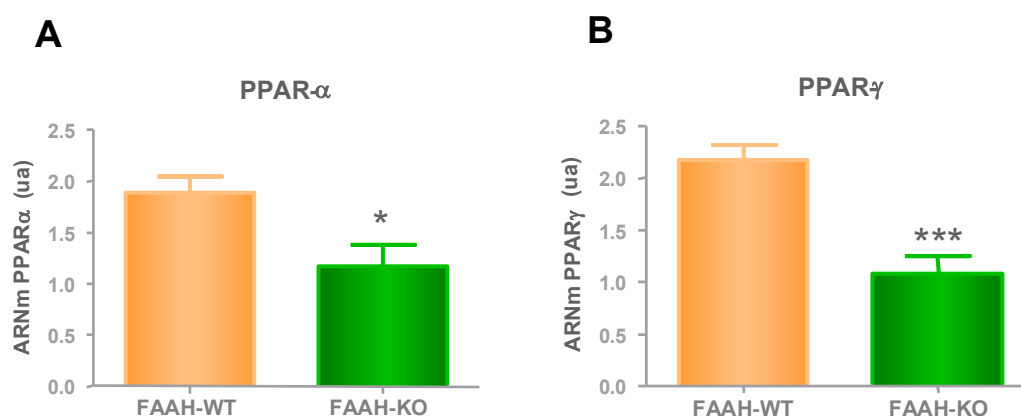


Figura 20. Disminución en los niveles de expresión de PPAR- α y PPAR- γ en los astrocitos FAAH-ko respecto a los wt en condiciones basales. Las gráficas muestran la expresión del ARNm de los receptores nucleares PPAR- α (A) y PPAR- γ (B) en astrocitos wt y ko para FAAH mantenidos 8 horas en medio sin suero y sin exposición a A β . Los datos representan la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (* p <0.05; *** p <0.001).

En las gráficas se observa cómo el aumento del tono endocannabinoide en los astrocitos FAAH-ko produce un descenso significativo en los niveles de expresión del ARNm de PPAR α (wt:1.89 \pm 0.22; ko:1.13 \pm 0.37; **Figura 20 A**) y PPAR γ (wt:2.17 \pm 0.16; ko:1.08 \pm 0.18; **Figura 20 B**) respecto a wt en condiciones basales.

También decidimos explorar si la respuesta pro-inflamatoria desencadenada por la exposición al péptido A β podía inducir cambios en los niveles de expresión del receptor CB₂ (**Figura 21**).

4.f. Expresión del receptor CB₂

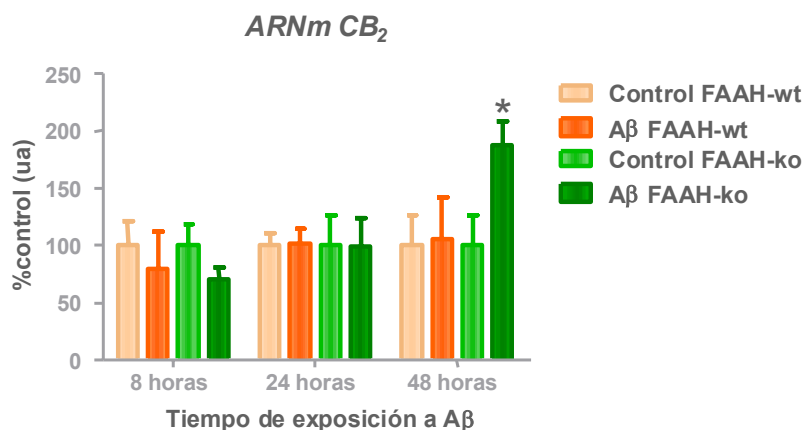


Figura 21. Tras 48 horas de exposición al péptido A β se induce la expresión del receptor CB₂ en los astrocitos FAAH-ko. La expresión del ARNm del receptor CB₂ se determinó en astrocitos FAAH-wt y FAAH-ko expuestos durante 8, 24 y 48 horas al péptido A β fibrilar (5 μ M). Los datos representan la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (* p <0.05 vs A β FAAH-wt).

En los astrocitos wt para FAAH no se detectaron cambios en los niveles de expresión del ARNm del receptor CB₂ por exposición a A β . Sin embargo, la estimulación de los astrocitos ko por A β desencadena una respuesta pro-inflamatoria más intensa que en los wt capaz de inducir de forma significativa la expresión de CB₂ a las 48 horas de exposición al péptido.

4.g. Tratamiento con SR1 y SR2

Para determinar si la mayor sensibilización de los astrocitos carentes de FAAH al péptido β -amiloide era un efecto mediado por alguno de los receptores cannabinoides, se trató con SR1 (**Figura 22**) y SR2 (**Figura 23**), antagonistas selectivos de los receptores CB₁ y CB₂, respectivamente. Los astrocitos FAAH-ko se coincubaron con SR1 o SR2 y el péptido A β durante 8 horas, tiempo en el que la inducción de la expresión de COX-2, iNOS y TNF- α era significativamente superior respecto a los astrocitos wt (**Figura 16, A-C**).

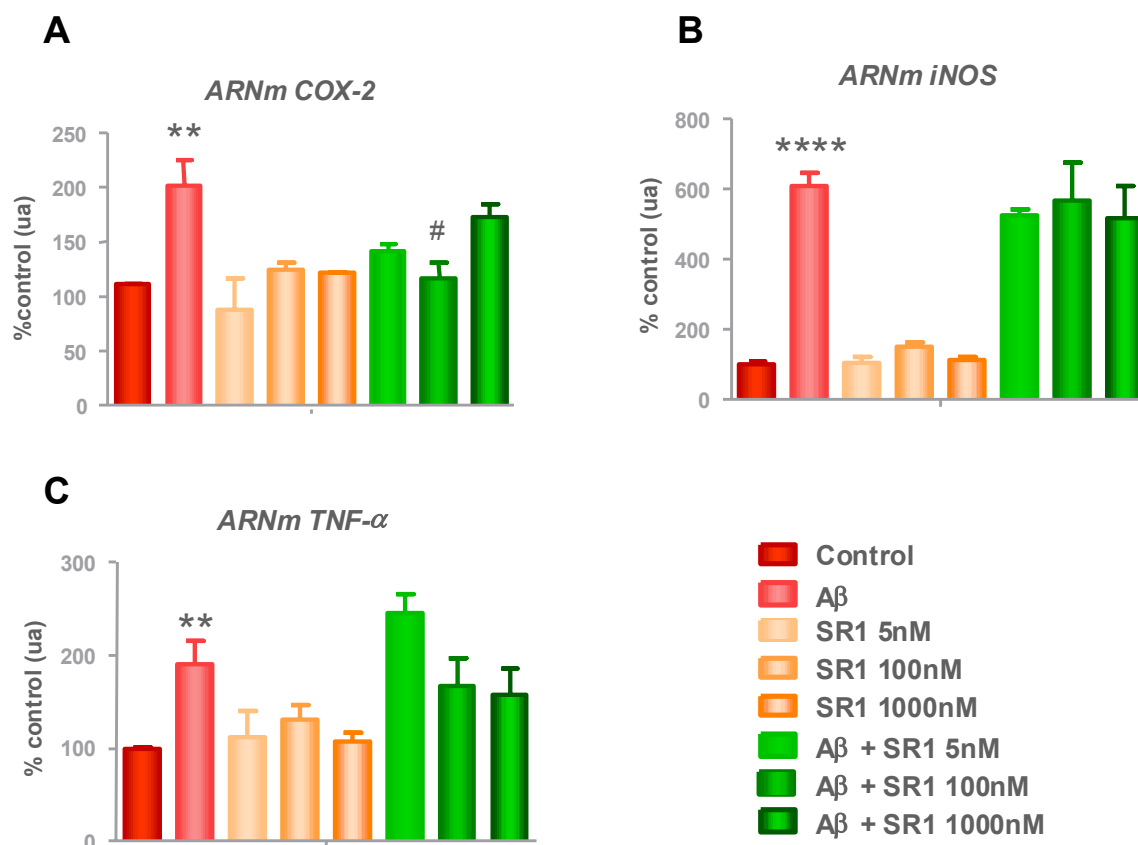


Figura 22. El tratamiento con el antagonista SR1 inhibe la expresión de COX-2 en astrocitos FAAH-ko estimulados con Aβ. Los astrocitos FAAH-ko fueron pre-tratados con un antagonista selectivo del receptor CB₁, SR1, 30 min antes de la exposición a Aβ (5μM). La incubación con SR1 y el péptido amiloide se mantuvo durante 8 horas. Las concentraciones finales a las que se utilizó SR1 fueron 5nM, 100nM, 1000nM. Posteriormente, se determinó la expresión del ARNm de COX-2 (**A**), iNOS (**B**) y TNF-α (**C**). Los datos representan la media de tres experimentos realizados por duplicado ± SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (#p<0.05 vs Aβ; **p<0.01 vs control; ****p<0.0001 vs control).

El tratamiento con el antagonista SR1 impide que aumenten los niveles elevados del ARNm de COX-2, pero no de iNOS y TNF-α, en los astrocitos FAAH-ko estimulados por Aβ. A la dosis inicial de 5nM, SR1 inhibe el nivel de expresión de la enzima inducible COX-2. Este efecto inhibitorio se hace significativo a la dosis de 100nM, pero desaparece cuando la dosis de SR1 es 10 veces superior. De modo que el aumento significativo de los niveles de iNOS y TNF-α por exposición al péptido amiloide en los astrocitos FAAH-ko parece no ser mediado por el receptor CB₁, pero sí la expresión de COX-2.

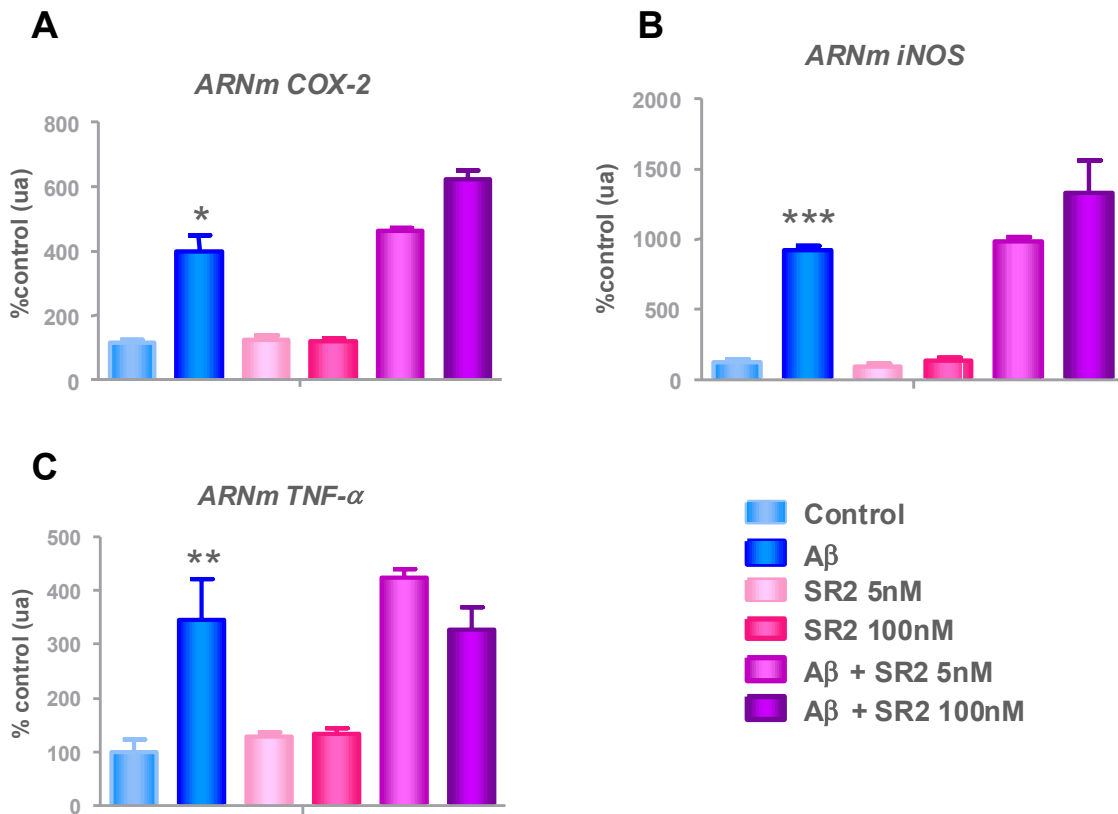


Figura 23. El tratamiento con el antagonista SR2 no inhibe la expresión de COX-2, iNOS y TNF- α en astrocitos FAAH-ko estimulados con A β . Los astrocitos FAAH-ko fueron pre-tratados con SR2 (5nM y 100nM), un antagonista selectivo del receptor CB₂, 30 min antes de la exposición a A β (5 μ M). La incubación con SR2 y el péptido amiloide se mantuvo durante 8 horas. Transcurrido este tiempo se extrajo el ARN de las células y se determinó la expresión del ARNm de COX-2 (A), iNOS (B) y TNF- α (C). Los datos representan la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (*p<0.05 vs control; **p<0.01 vs control; ***p<0.001 vs control).

Los niveles de expresión de las enzimas inducibles COX-2 e iNOS y la citoquina TNF- α , aumentados significativamente tras la exposición al péptido β -amiloide (Figura 23, A-C), no son bloqueados por el tratamiento con SR2. El antagonista selectivo del receptor CB₂, a las concentraciones de 5nM y 100nM, no inhibe el aumento de los niveles de mensajero de las moléculas inflamatorias analizadas. Por tanto, el receptor CB₂ parece no estar involucrado en la respuesta pro-inflamatoria exacerbada que se desencadena en los astrocitos carentes de FAAH por exposición a A β .

5. RESPUESTA A LA PROTEÍNA VIRAL Tat DE CÉLULAS GLIALES FAAH-wt Y FAAH-ko

La proteína Tat es una proteína trans-activadora esencial para la replicación del VIH (Fisher y cols., 1986), además de un importante mediador de la toxicidad inducida por el virus, ya que es la única proteína viral secretada activamente al medio extracelular, desde donde puede actuar de forma autocrina o paracrina (Chang y cols., 1997).

Los resultados obtenidos en los estudios inmunohistoquímicos ponen de manifiesto la importancia del papel que el SCE parece desempeñar en la encefalopatía por VIH y VIS. En respuesta al proceso inflamatorio desencadenado por la entrada del virus en el SNC, observamos un aumento selectivo de la expresión del receptor CB₂ en microglía, y de la enzima FAAH en astrocitos. Por este motivo, decidimos estudiar el papel del SCE en la toxicidad producida por la proteína Tat en cultivos gliales.

Para ello utilizamos cultivos primarios de células gliales (microglía y astrocitos) de ratón, transfectadas con el vector de expresión de la proteína Tat (pCMV-Tat). Las células control se transfectaron con el vector pCMV-500 (pCMV-Control). Además, como control de la eficiencia de transfección un grupo de células se cotransfectaron con el plásmido reportero pLTR-LUC (datos no mostrados).

Como podemos observar en la **Figura 24**, la transfección con pCMV-Tat es capaz de estimular la expresión de varios mediadores inflamatorios por parte de astrocitos y microglia. La proteína viral Tat induce de forma significativa la expresión del ARNm de las enzimas iNOS (**A**) y COX-2 (**B**), y la citoquina TNF- α (**C**) respecto a las células gliales transfectadas con pCMV-Control.

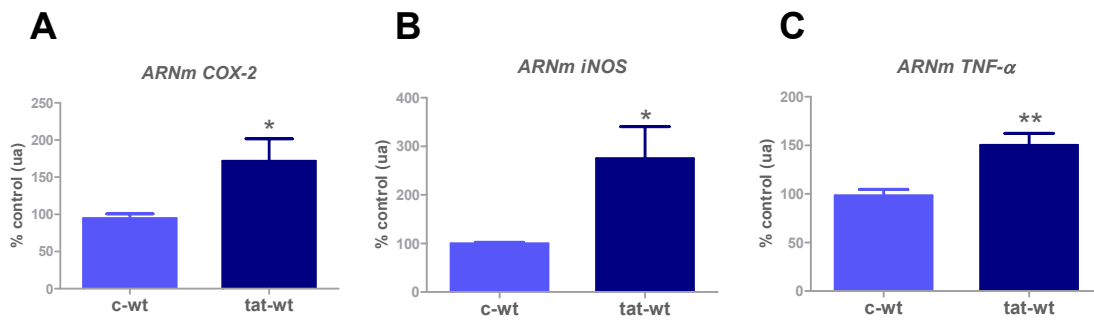


Figura 24. En las células gliales que expresan Tat se induce la expresión de diferentes parámetros inflamatorios. La expresión del ARNm de iNOS (A), COX-2 (B) y TNF- α (C) se determinó por PCR cuantitativa a tiempo real, en cultivos primarios de células gliales *wt* transfectadas durante 48 horas con los vectores CMV-Control y CMV-Tat. Los datos están en porcentaje respecto a su grupo control y representan la media de tres experimentos por duplicado \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (* p <0.05; ** p <0.01).

Tras comprobar que las células gliales transfectadas con pCMV-Tat son estimuladas por la proteína viral, decidimos analizar la expresión del receptor CB₂ y la enzima FAAH, los dos elementos del SCE cuya expresión en células gliales se ve incrementada en las muestras de encefalitis por VIH y VIS.

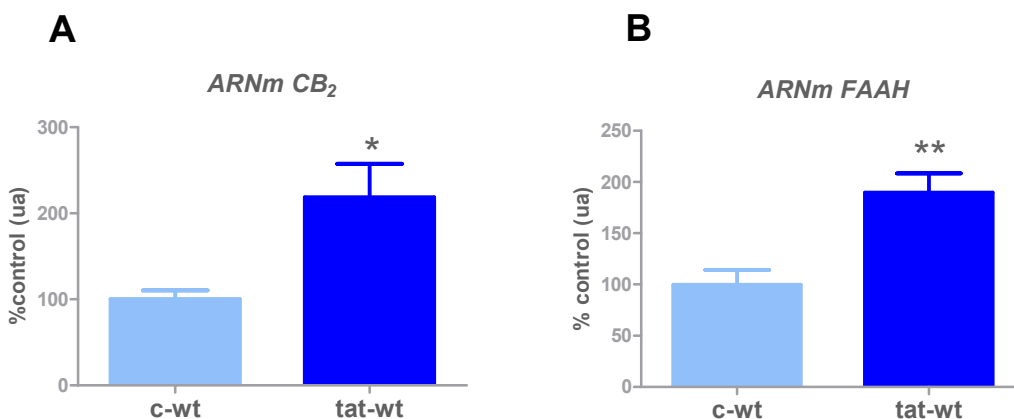


Figura 25. La expresión del receptor CB₂ y la enzima FAAH se induce en las células gliales que expresan la proteína viral Tat. Los cultivos primarios de células gliales procedentes de ratones *wt* se transfectaron durante 48 horas con 8 μ g del vector CMV-control y CMV-Tat. Posteriormente, se determinó la expresión del ARNm del receptor CB₂ (A) y la enzima FAAH (B). Los datos están en porcentaje respecto a su grupo control y representan la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (* p <0.05; ** p <0.01).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 25** donde se observa que las células transfectadas con pCMV-Tat presentan niveles mayores de expresión del ARNm de CB₂ (A) y FAAH (B) con respecto a las células gliales

transfectadas con el vector cero, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. De modo que en respuesta al proceso inflamatorio desencadenado por la expresión de Tat, se induce de forma significativa la expresión del receptor CB₂ y la enzima FAAH en células gliales.

Estudios previos *in vitro* en células gliales estimuladas describen una disminución de los niveles de expresión de diferentes mediadores inflamatorios a través de la potenciación del tono endocannabinoide (Molina-Holgado y cols., 2002a; Mestre y cols., 2005; Ortega-Gutiérrez y cols., 2005b; Tham y cols., 2007). Por esta razón, decidimos explorar si en cultivos primarios procedentes de ratones *knock-out* para la enzima FAAH estimulados por Tat, los niveles elevados de AEA consiguen debilitar la respuesta inflamatoria desencadenada por la proteína viral.

Para ello, transfectamos cultivos de glía procedente de cerebro de ratones ko para FAAH con pCMV-Tat y pCMV-Control, y posteriormente determinamos por PCR cuantitativa a tiempo real los niveles de ARNm de los parámetros inflamatorios determinados anteriormente, así como del receptor CB₂.

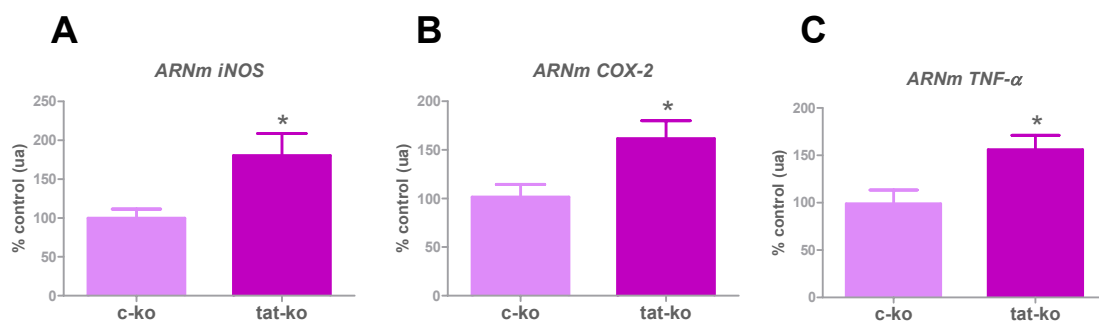


Figura 26. En las células FAAH-ko la transfección con pCMV-Tat también induce la expresión de iNOS, COX-2 y TNF-α. Los cultivos primarios de células gliales procedentes de ratones FAAH-ko se transfectaron durante 48 horas con pCMV-control y pCMV-Tat. Posteriormente, se determinó la expresión del ARNm de iNOS (A), COX-2 (B) y TNF-α (C). Los datos están en porcentaje respecto a su grupo control y representan la media de tres experimentos por duplicado ± SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (*p<0.05).

Como se observa en la **Figura 26**, en las células FAAH-ko transfectadas con pCMV-Tat los niveles de expresión de iNOS (A), COX-2 (B) y TNF-α (C) también aumentan significativamente con respecto a las células que no expresan la proteína viral. Por otra parte, en las células FAAH-ko que expresan Tat la expresión del ARNm del receptor CB₂ (**Figura 27**) también es mayor con respecto a las células transfectadas con el plásmido control. De modo que la transfección

con el vector de expresión de Tat, también induce una respuesta inflamatoria en las células gliales que carecen de FAAH capaz de estimular la expresión del receptor CB₂.

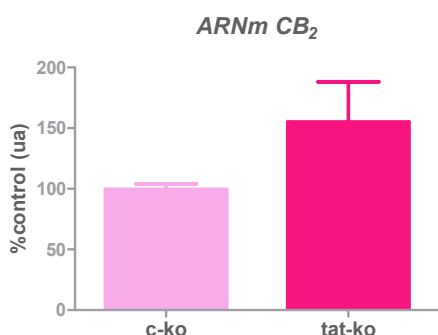


Figura 27. La expresión de CB₂ se induce en células gliales FAAH-ko que expresan la proteína Tat. En la gráfica se representan los niveles del ARNm del receptor CB₂ en cultivos primarios de células gliales FAAH-ko transfectadas con el vector de expresión de Tat y pCMV-Control. Los datos están en porcentaje respecto a su grupo control y representan la media de tres experimentos por duplicado \pm SEM.

Posteriormente, para poder comparar si la expresión de la proteína viral Tat afecta de forma diferente a las células *wt* y *ko* para la enzima FAAH, se normalizó la expresión del ARNm de iNOS, COX-2, TNF- α y el receptor CB₂ en función de la expresión del ARNm de la proteína Tat. En la **Figura 28** se comparan los niveles de expresión de iNOS (**A**), COX-2 (**B**) y TNF- α (**C**) entre células gliales *wt* y FAAH-ko transfectadas con pCMV-Tat.

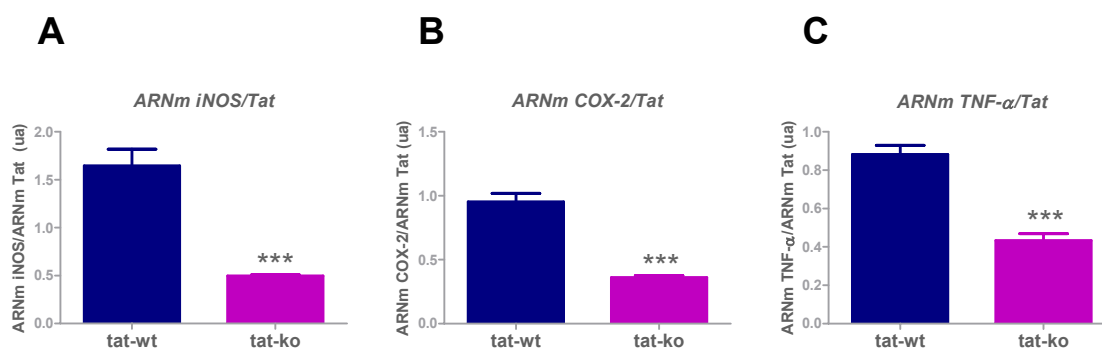


Figura 28. En los astrocitos FAAH-ko se reduce de forma significativa la expresión de los mediadores inflamatorios inducidos por Tat con respecto a *wt*. Los niveles de ARNm de iNOS (**A**), COX-2 (**B**) y TNF- α (**C**) se determinaron en cultivos primarios de células gliales *wt* y FAAH-ko que expresan la proteína Tat. Los datos están referidos a sus respectivos grupos control y normalizados por la expresión del ARNm de la proteína Tat. Los datos representan la media de tres experimentos por duplicado \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (***) p <0.001).

La falta de la enzima FAAH, y por tanto, los niveles elevados de endocannabinoides en los cultivos gliales que expresan Tat, provoca un descenso significativo con respecto a las células wt en los niveles de expresión de iNOS (wt: 1.65 ± 0.17 vs ko: 0.49 ± 0.01), COX-2 (wt: 0.95 ± 0.06 vs ko: 0.36 ± 0.01) y TNF- α (wt: 0.88 ± 0.05 vs ko: 0.43 ± 0.04). En cuanto a la expresión inducida del receptor CB₂ por la proteína viral Tat, las células FAAH-ko también presentan un descenso significativo de los niveles del ARNm de dicho receptor con respecto a las células wt, como se puede apreciar en la **Figura 29**. De modo que la activación del SCE reduce significativamente la respuesta inflamatoria desencadenada por la proteína Tat en las células gliales, provocando también una disminución en los niveles de expresión del receptor CB₂.

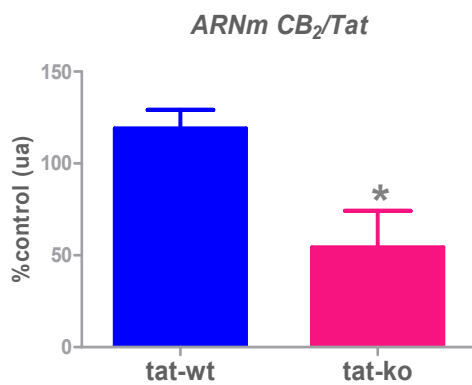


Figura 29. La falta de la enzima FAAH disminuye los niveles de expresión del receptor CB₂. La gráfica representa los niveles de ARNm del receptor CB₂ en cultivos primarios de células gliales que expresan la proteína Tat. Los datos están referidos a sus respectivos grupos control y normalizados por la expresión del ARNm de la proteína Tat. Los datos representan la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (* $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

1. **CAMBIOS EN ELEMENTOS DEL SCE EN CEREBRO AFECTADO POR EVIS Y EVIH.**

En humanos, los pacientes infectados por VIH y con demencia, muestran cambios neuropatológicos, característicos de la llamada encefalitis por VIH, en los que las células microgliales y astrogliales juegan un papel fundamental (Kolson y González-Scarano, 2000; Kaul y cols., 2001). EVIH es causada por la entrada del virus en el SNC a través de monocitos infectados, siendo los macrófagos perivasculares y no la microglía del parénquima el primer tipo celular en ser infectado (Williams y cols., 2001). Las neuronas no se ven afectadas de forma directa, por lo que se cree que el daño neuronal ocurre vía mecanismos indirectos, principalmente como consecuencia de la liberación de factores por parte de macrófagos/microglía y astrocitos activados, y/o a través del daño directo de proteínas virales neurotóxicas (Kaul y cols., 2001).

En el presente trabajo hemos detectado profundos cambios en el patrón de distribución del receptor cannabinoide CB₂ y la enzima FAAH en regiones corticales de cerebros de macacos infectados por EVIS y cerebros de pacientes afectados de EVIH. Estos resultados concuerdan con datos previos obtenidos en muestras de tejido de pacientes con EA (Benito y cols., 2003) y síndrome de Down (Nuñez y cols., 2008), ya que (1) se aprecia un cambio dramático en la distribución de varios componentes del SCE, (2) que afecta principalmente a FAAH y al receptor CB₂, (3) los cambios observados parecen estar relacionados con el proceso inflamatorio, y (4) presentan una evidente selectividad celular, puesto que FAAH se sobre-expresa en astrocitos, y los receptores CB₂ se expresan de forma abundante en células microgliales perivasculares, así como en nódulos microgliales e infiltrados linfocitarios. Estos resultados nos permiten postular que algunos elementos del SCE podrían actuar como marcadores de inflamación del SNC. La expresión glial de FAAH y CB₂ en distintas neuropatologías humanas (Benito y cols., 2007), sugiere un patrón común de respuesta, independiente del estímulo inflamatorio primario, y demuestra la existencia de un sistema endocannabinoide glial hiper-activo *in vivo* bajo condiciones inflamatorias (Pazos y cols., 2005).

Los resultados obtenidos indican que la expresión de CB₁ permanece sin cambios en cerebros EVIS con respecto a cerebros control, y que su presencia se limita, como ya se había descrito con anterioridad en EA (Benito y cols., 2003), a

elementos neuronales del cortex. En EVIH, CB₁ también se expresa en neuronas piramidales de la corteza, aunque de forma menos abundante que en las muestras control, probablemente como resultado de la significativa muerte neuronal por apoptosis que se produce en cerebros infectados por VIH (Petito y Roberts, 1995; Gray y cols., 2000). Es bien conocido que VIS y VIH infectan productivamente células microgliales y macrófagos perivasculares que producen sustancias neurotóxicas. Estas sustancias acaban matando a las neuronas a través de una serie de mecanismos que incluyen excitotoxicidad, estrés oxidativo e incremento en los niveles de Ca²⁺ (Kaul y cols., 2001). Se sabe que todos estos efectos nocivos podrían ser neutralizados parcialmente por la activación de CB₁ (Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Fernández-López y cols., 2006). Su estimulación confiere neuroprotección y promueve la supervivencia neuronal bajo diferentes paradigmas experimentales (Mechoulam y cols., 2002; Martínez-Orgado y cols., 2007; Galve-Roperh y cols., 2008), lo que nos permite postular un posible papel protector para este receptor cannabinoide en respuesta a la encefalitis producida por VIH y VIS, y excluir su participación en la reacción inflamatoria desencadenada por el virus. Macarrone y cols. (2004) han observado que el descenso de los niveles de AEA (un agonista parcial de CB₁), puede estar asociado con la neurotoxicidad causada por la proteína gp120, una de las principales virotoxinas de VIH.

Por otra parte, y de forma sorprendente, detectamos expresión de CB₁ en astrocitos y microglía en pacientes con encefalitis, pero no así en el modelo animal. Es la primera observación, hasta el momento, de expresión glial de este subtipo de receptor cannabinoide *in situ* en el SNC humano. En un trabajo previo, Sheng y cols., (2005) habían descrito expresión de CB₁ *in vitro* en astrocitos humanos, donde puede promover respuestas anti-inflamatorias inhibiendo la expresión de iNOS y la producción de mediadores pro-inflamatorios (Esposito y cols., 2001; Molina-Holgado y cols., 2002a; Ortega-Gutierrez y cols., 2005b; Sheng y cols., 2005). Su activación en microglía también parece inhibir, al menos en parte, la producción de NO (Cabral y cols., 2001; Waksman y cols., 1999).

La presencia de receptores CB₂ en microglía/macrófagos perivasculares así como en nódulos microgliales y linfocitos del tipo T sugiere su participación en varios aspectos de EVIS y EVIH, y un papel crucial en la inflamación del SNC.

Los datos inmunohistoquímicos revelan que la expresión de CB₂ se induce en microglía perivascular como consecuencia de la infección viral, ya que en los

cerebros control no se detecta inmunoreactividad frente a este tipo de receptor cannabinoide. La expresión selectiva de CB₂ en este tipo específico de células microgliales sugiere un papel relevante para este receptor en la entrada del virus en el SNC, ya que los macrófagos perivasculares parecen estar involucrados de forma significativa en este proceso (Williams y cols., 2001; revisado en González-Scarano y Martín-García, 2005). En este sentido, recientemente se ha demostrado que el tratamiento con el cannabinoide sintético WIN55,212-2, un agonista mixto CB₁/CB₂, consigue frenar la replicación de VIH-1 en células microgliales en cultivo, y que este efecto antiviral es mediado por CB₂ (Rock y cols., 2007).

Por otro lado, la presencia de CB₂ en los nódulos microgliales característicos de EVIS y EVIH no es sorprendente, ya que este receptor presenta una aparente naturaleza inducible en este tipo celular durante procesos neuroinflamatorios en los que, además, podría jugar un papel importante como diana terapéutica (Ashton y Glass, 2007; Cabral y Griffin-Thomas, 2008). La activación de CB₂ promueve la migración y proliferación microglial (Walter y cols., 2003; Carrier y cols., 2004), así como la producción de sustancias quimiotácticas, un factor clave para el reclutamiento de monocitos dentro del cerebro (Palazuelos y cols., 2008). Su estimulación también aumenta la migración de monocitos sanguíneos periféricos y macrófagos humanos (Derocq y cols., 2000; Kishimoto y cols., 2003). Sin embargo, CB₂ también es capaz de mediar efectos anti-inflamatorios en células microgliales disminuyendo la producción de sustancias pro-inflamatorias (Klegeris y cols., 2003).

Este trabajo también es el primero en mostrar, que los receptores CB₂ están presentes en células periféricas que se han infiltrado en el SNC humano como consecuencia de un proceso patológico. Aquí demostramos que los linfocitos T expresan este receptor en cerebros EVIS y EVIH como respuesta a la infección viral del SNC. La infiltración linfocitaria en tejidos es una característica común en algunas formas de inflamación, y específicamente en encefalitis viral, donde se ha demostrado una acumulación significativa de linfocitos T CD8⁺ que serían, probablemente, específicos para el antígeno VIS y VIH (Kim y cols., 2004). Aunque no existen datos concluyentes acerca del papel de los receptores CB₂ en la función linfocitaria (Gundy y cols., 2001), la falta de este subtipo de receptor cannabinoide incrementa la infiltración de células T (Palazuelos y cols., 2008). Estos receptores son conocidos por expresarse en linfocitos T periféricos, aunque a niveles bajos. Su presencia en estas células en cerebros de animales EVIS y pacientes EVIH

sugiere, de forma favorable, un papel visible en la infiltración del SNC y podría ser consecuencia de un proceso de sobre-regulación ligado a la invasión del cerebro por estas células. En este sentido, la regulación de la expresión de CB₂ bajo diferentes condiciones patológicas se ha descrito previamente en otros paradigmas experimentales (Sánchez y cols., 2001a). Experimentos adicionales podrían clarificar este punto.

En cuanto a la distribución de FAAH hay que destacar su abundante expresión en los astrocitos hipertróficos en las muestras con encefalitis. Estos astrocitos FAAH positivos se encuentran predominantemente en regiones perivasculares y específicamente en áreas de infiltración celular. En los animales y pacientes control, sin embargo, FAAH se detecta principalmente en neuronas del cortex (en su mayoría neuronas piramidales). La expresión de FAAH en astrocitos reactivos ya se ha descrito con anterioridad en otros procesos neuroinflamatorios (Benito y cols., 2003; Nuñez y cols., 2008). Generalmente, se cree que los astrocitos se convierten en hipertróficos e hiperplásicos en aquellas regiones del cerebro en las que tiene lugar el proceso inflamatorio. Los procesos astrocíticos infiltran densamente estas áreas como parte de una respuesta anti-inflamatoria endógena (Wyss-Coray y Mucke, 2002). La presencia de FAAH en estas células sugiere de forma notable una participación directa de la enzima en el proceso inflamatorio ligado a EVIS y EVIH. Además, los astrocitos son conocidos por jugar un papel regulador en la encefalitis por VIH-1 amortiguando la sobre-expresión de eicosanoides, factores de activación plaquetaria, y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por monocitos VIH-1 activados (Minagar y cols., 2002).

Con estos trabajos describimos la existencia de alteraciones importantes en el patrón de expresión de los receptores CB₂ y FAAH en el cerebro de macacos con EVIS y pacientes con EVIH. Estos cambios están ligados al proceso inflamatorio y sugieren un papel relevante para el SCE en la activación glial bajo condiciones patológicas.

2. CAMBIOS EN ELEMENTOS DEL SCE EN CEREBRO HUMANO AFECTADO POR EM.

En los últimos años, numerosos estudios señalan al SCE como diana para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de EM. Sin embargo, a pesar de la relevancia de los datos pre-clínicos, el estatus del SCE en pacientes de EM permanecía sin estudiar. Además, como se desprende de los resultados obtenidos en la encefalopatía por VIH y, previamente, en EA y Síndrome de Down, el perfil de expresión de algunos elementos del SCE sufre profundas alteraciones como consecuencia del proceso inflamatorio asociado al SNC. Por esta razón, llevamos a cabo un extenso análisis inmunohistoquímico del patrón de expresión de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, y la enzima FAAH en muestras de tejido de donantes de EM. Estos resultados muestran que en esta patología neuroinflamatoria y desmielinizante el patrón de expresión de dichos elementos también sufre cambios en comparación con los casos control. Este dato apoya la hipótesis sugerida previamente por Pazos y cols. (2005) acerca de los cambios que experimenta el SCE bajo condiciones neuroinflamatorias, ya que pierde su función predominantemente neuronal para adoptar un papel más destacado en la participación glial.

La expresión neuronal, en neuronas piramidales principalmente, fue evidente tan sólo para CB₁ y FAAH. Los receptores CB₁, pero no FAAH, también se detectaron en neuronas de la sustancia blanca subcortical, como revela el doble marcaje inmunofluorescente con MAP-2. Esta observación sugiere una segregación regional en el patrón de expresión de CB₁ y FAAH. Los receptores CB₁ localizados en neuronas glutamatérgicas, podrían ejercer un efecto neuroprotector directo, amortiguando los daños excitotóxicos característicos que se desencadenan en condiciones neuroinflamatorias, así como modulando la actividad de los canales iónicos (Mechoulam y cols., 2002; Croxford y cols., 2008).

Los resultados también muestran expresión del receptor CB₁ en oligodendrocitos maduros y OPCs localizados dentro de las placas de EM. Estas células son conocidas por jugar un papel crítico en los procesos de remielinización que tienen lugar durante el curso de la enfermedad (Levine y cols., 2001). En un estudio previo, Molina-Holgado y cols. (2002b) describieron la expresión de CB₁ y CB₂ en diferentes subpoblaciones de oligodendrocitos de rata *in vitro* e *in vivo*. A través de mecanismos dependientes e independientes de ambos receptores, los

cannabinoides parecen promover la supervivencia de los oligodendrocitos, vía un mecanismo dependiente de IP3/Akt, y aumentar la remielinización axonal en un modelo animal de EM (Molina-Holgado y cols., 2002b; Arévalo-Martín y cols., 2003).

Nuestros datos indican que tanto CB₁ como CB₂ están presentes en microglía/macrófagos localizados en placas de EM. Estas células participan en procesos inflamatorios así como en la retirada de mielina y restos de células dañadas (Bruck y cols., 1996). La presencia de la PBM en el interior de macrófagos CB₂ positivos, apunta a un proceso fagocítico reciente. Puesto que el marcaje inmunohistoquímico de lesiones de EM con anticuerpos anti-mielina para estimar la edad de la lesión se acepta de forma generalizada (Bruck y cols., 1995, Noseworthy y cols., 2000; Chang y cols., 2002), podemos sugerir que la inducción de la expresión del receptor CB₂ en macrófagos asociados a placas, podría ser un episodio temprano en la maduración de las placas de EM. Poco se sabe a cerca de los efectos de los cannabinoides en la fagocitosis de mielina, sin embargo recientemente Tolón y cols. (2009) han descrito la mediación del receptor CB₂ en el proceso fagocítico del péptido A β por macrófagos humanos. Los receptores CB₁ y CB₂ también parecen estar involucrados en el descenso de la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos, de modo que su activación podría potenciar una respuesta anti-inflamatoria y neuroprotectora (Mestre y cols., 2005; Ortega-Gutierrez y cols., 2005a). Croxford y Yamamura (2005), también revelan que varias características de los macrófagos, tales como la migración, la presentación de péptidos antigénicos o la fagocitosis de partículas extrañas, son influenciadas de forma significativa por cannabinoides.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las muestras con encefalitis, los niveles más elevados del receptor CB₂ se detectaron en microglía. Este incremento ya se había descrito previamente en secciones de médula espinal de donantes de EM (Yiangou y cols., 2006), en muestras de tejido cerebral de otras patologías con un componente neuroinflamatorio (Benito y cols., 2003; Nuñez y cols., 2008), así como en un modelo animal de EAE (Maresz y cols., 2005). Recientemente, se ha demostrado que la delección genética de este subtipo de receptor cannabinoide exacerba el proceso inflamatorio asociado a EAE, por aumento de la pérdida axonal y de la activación microglial (Palazuelos y cols., 2008). Además, los resultados muestran que la distribución de células CB₂ positivas se correlaciona con las células MCH-II positivas, cuya localización y abundancia se utilizan como

marcadores para definir el subtipo de placa de EM (Trapp y cols., 1999). Así, las células MHC-II positivas que son abundantes por toda la extensión de las placas más agudas, se restringen a la periferia de las placas activas crónicas. La co-localización de receptores CB₂ con HLA-DR nos lleva a proponer a los receptores CB₂ como un nuevo marcador de diagnóstico para la identificación de placas de EM de tipo activo.

También se detectó expresión de CB₂ en astrocitos de la sustancia blanca. Poco se sabe acerca del papel que dichos receptores juegan en astrocitos, aunque datos previos sugieren que podrían modular la producción de moléculas pro-inflamatorias *in vitro* (Ortega-Gutierrez y cols., 2005b; Sheng y cols., 2005), y datos más recientes inducen a pensar que podrían estar involucrados en neuroprotección como resultado de su activación concomitante con receptores CB₁ neuronales (Docagne y cols., 2007).

Por otra parte, se sabe que las células T participan en la patogénesis de EM (Frohman y cols., 2006). En particular, los linfocitos T específicos de mielina se piensa que están directamente involucrados en los procesos de desmielinización y que son responsables del proceso de inflamación. Un estudio previo describe que los cannabinoides, actuando a través de CB₁ y CB₂, reducen la infiltración de células CD4⁺ en la médula espinal en el modelo TMEV-IDD (Arévalo-Martín y cols., 2003). En este mismo modelo, Mestre y cols. (2009) también observan una reducción en la infiltración de linfocitos T CD4⁺ perivasculares y la respuesta microglial tras el tratamiento con el agonista cannabinoide WIN55,212-2. Recientemente, se ha demostrado que la ausencia del receptor CB₂ incrementa la infiltración linfocitaria (Palazuelos y cols., 2008), y que, por tanto, su expresión en células T es crítica para controlar dicho proceso inflamatorio (Maresz y cols., 2007; Sánchez y cols., 2006). Además, los datos coinciden con lo observado en las muestras EVIS y EVIH, en las que también se detectó expresión del receptor CB₂ en linfocitos T infiltrados en el SNC, particularmente en áreas perivasculares. Estos datos sugieren un posible papel anti-inflamatorio del SCE en la neuroinflamación mediada por células T ligada al proceso de EM.

En las muestras de EM, la expresión de la enzima FAAH es mayor en los astrocitos que se localizan dentro de las placas de EM. La expresión de FAAH en astrocitos reactivos parece ser una constante como demuestran los estudios realizados en muestras de pacientes de Alzheimer (Benito y cols., 2003), síndrome

de Down (Nuñez y cols., 2008) y encefalitis vírica. Es importante mencionar que otras enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido araquidónico, tales como la ciclooxigenasa-2 y la fosfolipasa-A₂, son también conocidas por sobre-expresarse selectivamente en astrocitos después de un estímulo inflamatorio (Sun y cols., 2005). La inhibición de FAAH podría tener efectos beneficiosos durante el proceso de inflamación, debido al descenso de la producción local de ácido araquidónico y el aumento del tono endocannabinoide (Benito y cols., 2003; Karanian y cols., 2005).

Aunque nuestro estudio no incluye una aproximación cuantitativa, atribuible al bajo número de casos y disponibilidad de tejido, la presencia de diferentes elementos del SCE en tipos celulares selectivos y específicos, proporciona un sustrato neuroanatómico para explicar los efectos de cannabinoides en los síntomas y progresión de EM en humanos. De entre las posibles dianas del SCE que podrían proporcionar beneficios para el tratamiento de EM, hasta el momento, la atención se ha centrado casi únicamente en la activación de CB₁. Los resultados presentes nos permiten postular que otros elementos del SCE, tales como los receptores CB₂ y FAAH, son potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de EM.

3. RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS FAAH-ko AL PÉPTIDO A β

A raíz de los resultados obtenidos en los estudios inmunohistoquímicos parece evidente que la enzima FAAH juega un papel fundamental en la respuesta astrocitaria frente a diferentes estímulos inflamatorios. En la reacción inflamatoria que acompaña a la deposición del péptido A β en EA, la función principal de los astrocitos es la producción de moléculas pro-inflamatorias (Tuppo y Arias, 2005). La producción y liberación de citoquinas induce daño de forma directa y aumenta los efectos nocivos del estrés oxidativo y excitotoxicidad (entre otros), contribuyendo al proceso neurodegenerativo (Allan y Rothwell, 2001).

Los resultados del estudio de la relevancia funcional de FAAH en los astrocitos implicados en procesos inflamatorios del SNC, y concretamente el desencadenado por el péptido A β , nos muestra que los astrocitos carentes de la enzima FAAH son más sensibles a A β_{1-42} y presentan un perfil pro-inflamatorio más pronunciado que los astrocitos wt. Esta respuesta exacerbada es evidente tras determinar la producción de algunas de las citoquinas más relevantes en EA, tales como MCP-1, IL-6, IL-1 β , CCL5 y TNF- α (Strohmeier y Rogers, 2001; Wyss-Coray y cols., 2006). Además, en respuesta a este proceso inflamatorio, se induce la expresión del receptor CB₂ en los astrocitos FAAH-ko, pero no en los wt. Las rutas de señalización ERK1/2, NF κ B y p-38 MAPK participan en estos efectos ya que su activación es más potente en los astrocitos FAAH-ko expuestos a A β_{1-42} . Estos astrocitos también presentan una expresión exacerbada de las enzimas COX-2 e iNOS, que es revertida por un antagonista selectivo del receptor CB₁ en el caso de COX-2. Por último, sugerimos que el descenso de los niveles de expresión de PPAR- α y PPAR- γ , probablemente como consecuencia de los niveles constantemente elevados de algunos endocannabinoides, subyace a estos efectos.

Los cannabinoides pueden aumentar o disminuir la producción de citoquinas, dependiendo de la naturaleza del estímulo y del tipo de cannabinoide (Klein, 2005). Además, AEA tiene efectos citotóxicos y pro-apoptóticos (Maccarrone y Finazzi-Agró, 2003), propiedades que podrían explicar la respuesta pro-inflamatoria de los astrocitos FAAH-ko estimulados por el péptido A β_{1-42} . Estos resultados coinciden con datos previos que destacan la importancia de la ruta ERK en la muerte celular mediada por cannabinoides en astrocitos. De modo que estas cascadas podrían ser dianas de ceramidas, en el proceso apoptótico

desencadenado por los cannabinoídes en cultivos de astrocitos primarios (Blázquez y cols., 2000; Guzmán y cols., 2001). Además, el aumento de los niveles de fosforilación de p38 MAPK también coincide con estudios previos que relacionan esta ruta con la muerte celular inducida por endocannabinoídes (Rueda y cols., 2000).

Por otra parte, también observamos que los niveles de algunas citoquinas como IL-1 β y TNF- α no aumentan después del tratamiento con A β_{1-42} en astrocitos wt, mientras que en FAAH-ko su producción es exacerbada. La razón para esta falta de efecto en la estimulación de los astrocitos wt por A β_{1-42} no está clara, aunque puede estar relacionado con la mezcla de especies presentes en nuestra preparación del péptido β -amiloide. Se ha descrito la existencia de diferencias en la capacidad de los astrocitos para secretar citoquinas específicas en respuesta a A β_{1-42} fibrilar u oligomérico, y se ha sugerido que la forma fibrilar podría activar a los astrocitos mientras que la forma oligomérica podría actuar principalmente sobre la microglia (White y cols., 2005). Ya que la composición de nuestro péptido A β_{1-42} es una mezcla de ambas formas (Bamberger y cols., 2003; Burdick y cols., 2002), podemos especular que pueden existir ligeras diferencias en la sensibilidad de los astrocitos wt y FAAH-ko a las diferentes formas patogénicas del péptido.

Estudios previos defienden la idea del efecto neuroprotector del SCE en condiciones de daño crónico y agudo (para revisión ver Fernández-Ruiz y cols., 2005), incluyendo EA (Ramírez y cols., 2005). Entre otras posibilidades, el bloqueo de la enzima FAAH, responsable de la degradación de endocannabinoídes, se ha considerado como una diana terapéutica prometedora (Karanian y cols., 2005; Hwang y cols., 2009) y tanto la inactivación farmacológica como la delección genética de FAAH proporcionan neuroprotección (Karanian y cols., 2005). La inhibición de FAAH podría disminuir el proceso inflamatorio desencadenado por A β_{1-42} , basándonos principalmente en dos consideraciones: i) el bloqueo de FAAH podría implicar un descenso de la producción local de ácido araquidónico, a partir del cual se generan moléculas estructuralmente semejantes y que producen efectos pro-inflamatorios; y ii) este bloqueo podría también aumentar los niveles de AEA y otros endocannabinoídes, considerados neuroprotectores en diferentes modelos de daño crónico y agudo *in vivo*. De hecho, Van der Stelt y cols. (2006) describen que el aumento del tono endocannabinoide con el inhibidor de la recaptura VDM11, mejora el estado

patológico en un modelo animal de AD durante los primeros días, y no en los posteriores. Nuestros resultados, sin embargo, describen una situación diferente, ya que la delección genética de FAAH exagera la respuesta inflamatoria ligada al péptido A β_{1-42} en astrocitos. Cabe destacar que nuestros datos corresponden a un modelo *in vitro* de exposición aguda a A β_{1-42} y que el resultado puede ser diferente del obtenido en animales vivos sometidos crónicamente a niveles de A β cada vez mayores. Próximos experimentos podrían aclarar si este efecto pro-inflamatorio asociado al bloqueo de FAAH y el posterior aumento de los niveles de AEA y otras aciletanolaminas de ácidos grasos, también tiene lugar *in vivo*.

Los efectos beneficiosos o dañinos de AEA y otros endocannabinoides en enfermedades relacionadas con el péptido amiloide, parecen apuntar a un papel directo de los lípidos en la patogénesis de EA. Como es sabido, también existe una relación entre los niveles excesivos de colesterol y la acumulación de A β (Grimm y cols., 2007), y por ello se está estudiando a través ensayos clínicos, la posible relevancia terapéutica de los lípidos y sus propiedades anti-inflamatorias y neuroprotectoras, con resultados preliminares prometedores (Freund-Levi y cols., 2006).

Además, nuestros datos sugieren que únicamente los receptores CB₁ parecen participar en la respuesta exacerbada de los astrocitos FAAH-ko contra A β_{1-42} , y que excluyen la mediación de CB₂. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que esta participación es sólo evidente para COX-2 y no para iNOS y TNF- α sugiriendo que otros receptores pueden estar involucrados. El complejo papel del SCE, y específicamente de los receptores CB₁ y CB₂, en células de astrocitoma de rata estimuladas por A β ha sido descrito recientemente por Esposito y cols. (2007). Por tanto, la implicación de receptores vanilloides (a través de los cuales se median los efectos citotóxicos de AEA) u otros “receptores no CB₁ no CB₂” no puede descartarse (Maccarrone y Finazzi-Agró, 2003).

Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio también sugieren una posible modulación de la expresión de PPARs por el SCE, ya que los astrocitos FAAH-ko presentan menores niveles de expresión de PPAR- α y PPAR- γ . Esta disminución de los niveles de PPAR podría explicar la mayor sensibilización de los astrocitos FAAH-ko a la exposición al péptido amiloide. Durante los últimos años se han descrito efectos anti-inflamatorios derivados de la activación de los PPAR (Luna-Medina y cols., 2005; Drew y cols., 2006). Entre estos efectos se observó

una disminución en la expresión neuronal de iNOS y muerte celular (Heneka y cols., 2000), así como una menor respuesta pro-inflamatoria frente a A β por parte de la microglía (Combs y cols., 2000). Recientemente, Xu y cols. (2006) han descrito que la activación de PPAR inhibía la producción inducida por LPS de varias moléculas pro-inflamatorias (incluyendo IL-1 β , IL-6, MCP-1, NO y TNF- α) en astrocitos primarios. Es importante destacar que el LPS y el péptido A β ₁₋₄₂ activan rutas pro-inflamatorias comunes, tales como el receptor CD14 (Liu y cols., 2005). Varios endocannabinoides incluyendo AEA, PEA y OEA pueden actuar como agonistas de PPAR, y por tanto la delección genética de FAAH puede inducir una activación continua de estos receptores por estos endocannabinoides o por metabolitos relacionados estructuralmente (Kozak y cols., 2002). Esto podría explicar el descenso de los niveles del ARNm de PPAR observado en los astrocitos FAAH-ko.

Como conclusión proponemos que la delección genética de FAAH y el subsiguiente incremento de los niveles de endocannabinoides, durante un periodo prolongado de tiempo, modifica rutas de señalización críticas (ERK1/2, NF κ B y p38 MAPK) cuando la célula es sometida a un estímulo inflamatorio como el péptido A β ₁₋₄₂. Además, la expresión de los PPARs podría también verse afectada por el incremento sostenido de los niveles de endocannabinoides, que podrían regular a la baja la expresión de estos receptores, conocidos por ser importantes mediadores de las respuestas celulares anti-inflamatorias. Junto al esperado descenso en la producción de ácido araquidónico, como consecuencia de la incapacidad para degradar, entre otros endocannabinoides, AEA y el posterior descenso de los niveles de prostaglandinas, el nivel de actividad de PPAR podría verse seriamente afectado, siendo incapaz de contrarrestar el incremento de moléculas pro-inflamatorias inducido por A β ₁₋₄₂.

En resumen, nuestros resultados muestran un efecto pro-inflamatorio como consecuencia de la delección de FAAH en astrocitos. Teniendo en cuenta los conocidos efectos anti-inflamatorios de los endocannabinoides, estos datos sugieren que un aumento del tono endocannabinoides excesivamente prolongado en el tiempo, puede tener consecuencias perjudiciales, como por ejemplo, la regulación a la baja de otros mecanismos celulares anti-inflamatorios, tales como los mediados por PPARs.

4. RESPUESTA GLÍAL A LA PROTEÍNA VIRAL Tat y SCE

La infección del SNC por VIH, frecuentemente causa demencia y trastornos neurológicos caracterizados por pérdida neuronal (Price y cols., 1988). Sin embargo, los principales tipos celulares infectados por el virus son macrófagos perivasculares y microglía y, en menor proporción, astrocitos. Puesto que las neuronas no son infectadas de forma directa, se cree que la pérdida neuronal se produce a través de mecanismos indirectos, que incluyen factores solubles secretados por macrófagos/microglía y astrocitos infectados por el virus. Entre estos factores se encuentra la proteína Tat, una proteína trans-activadora, esencial para la replicación del virus, además de un importante mediador de neurotoxicidad. Tat puede actuar directamente sobre las neuronas causando excitotoxicidad y muerte celular por apoptosis. Pero también puede estimular la producción de sustancias neurotóxicas en células gliales y macrófagos, que son liberadas al medio extracelular causando procesos degenerativos y apoptosis en neuronas (revisado en King y cols., 2006).

En este estudio mostramos cómo pCMV-Tat pero no pCMV-500 (el plásmido control) induce de forma significativa la expresión del ARNm de diversos mediadores inflamatorios, concretamente, iNOS, COX-2 y TNF- α , en cultivos primarios de células gliales de ratón wt y FAAH-ko. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que Tat se muestra como un potente inductor de la producción de TNF- α en cultivos de astrocitos y macrófagos/microglía (Chen y cols., 1997; Mayne y cols., 1998). La expresión inducida de iNOS y COX-2 por Tat en células gliales también se ha descrito en varios estudios (Polazzi y cols., 1999; Liu y cols., 2002; Flora y cols., 2006; Blanco y cols., 2008). Además, en los cerebros de pacientes con demencia asociada a la infección por VIH, también se han encontrado niveles elevados del ARNm de TNF- α (Wesselingh y cols., 1993) e iNOS (Adamson y cols., 1996).

Al igual que Tat, TNF- α puede ejercer neurotoxicidad de forma directa a través de la activación de caspasas y apoptosis (Segui y cols., 2001), pero también de forma indirecta, a través de la activación de NF- κ B y por consiguiente la *up-regulation* de algunos genes pro-inflamatorios (Han y cols., 2001). Además, TNF- α puede elevar los niveles de glutamato incrementando su liberación e inhibiendo su

recaptación en astrocitos (Fine y cols., 1996), de modo que los efectos neurotóxicos de Tat podrían ser amplificados por su capacidad para inducir TNF- α .

El aumento de la expresión de COX-2 en respuesta a Tat podría explicar los niveles elevados de PGE₂, el principal producto de COX-2, detectados en el fluido cerebroespinal de pacientes afectados por demencia asociada a la infección por VIH (Griffin y cols., 1994). COX-2 y otras enzimas relativas como la fosfolipasa A2, se sobreexpresan de forma selectiva en astrocitos activados por estímulos inflamatorios (Sun y cols., 2005). Bagetta y cols. (1998) sugieren la implicación de COX-2 en los mecanismos de apoptosis desencadenados por la inyección de gp 120, otra neurotoxina del VIH, en el neocortex de rata.

La inducción de iNOS en células gliales en respuesta a Tat puede ser una importante fuente de NO y por tanto contribuir al daño neuronal. Niveles elevados de NO pueden resultar neurotóxicos por estimulación de los receptores NMDA, provocando necrosis y apoptosis (Hewett y cols., 1994). Además, Adamson y cols., (1999) correlacionan los niveles elevados de iNOS, gp 41 (proteína del VIH) y la activación inmune, con la severidad y velocidad de progresión de la demencia por VIH. La expresión de iNOS en astrocitos también puede contribuir a la ruptura de la BHE, debido a sus potentes propiedades vasodilatadoras, permitiendo la extravasación de moléculas perjudiciales y contribuyendo a la disfunción del SNC asociada a la infección por VIH (Mollace y cols., 2001; Strelow y cols., 2001).

Por otra parte, en las células gliales wt transfectadas con pCMV-Tat, se estimula de forma significativa la expresión del receptor CB₂ y la enzima FAAH, con respecto a las células que no expresan Tat. También en las células FAAH-ko, el nivel del ARNm de CB₂ es más elevado que en las células transfectadas con pCMV-Control. En los trabajos inmunistoquímicos previos, realizados en muestras de pacientes con encefalitis por VIH y en el modelo animal de encefalitis por VIS, ya observamos niveles altos de expresión de CB₂ y FAAH en células gliales. En ésta y otras patologías degenerativas asociadas a procesos inflamatorios se detectó sobre-expresión selectiva de la enzima FAAH en astrocitos en estudios *in situ* (Benito y cols., 2007; Núñez y cols., 2008), inducción de la expresión del receptor CB₂ en microglía reactiva (revisado en Fernández-Ruiz y cols., 2008) y aumento de los niveles de CB₂ en astrocitos activados (Sagredo y cols., 2009). Puesto que la microglía reactiva expresa niveles bajos de FAAH (Tham y cols., 2007), y de acuerdo con los resultados de los estudios *in situ*, podríamos

considerar que los astrocitos son los principales responsables del aumento significativo de la expresión de FAAH inducida por la expresión de Tat. Estos resultados *in vitro* apoyan la hipótesis de un SCE glial sobre-regulado bajo condiciones inflamatorias (Benito y cols., 2007). La expresión del receptor CB₂ en células de microglía por acción de Tat podría ayudar a contrarrestar los efectos neurotóxicos de la proteína viral, inhibiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias y óxido nítrico, y estimulando la migración y proliferación celular (Franklin y Stella, 2003; Klegeris y cols., 2003; Carrier y cols., 2004; Ehrhart y cols., 2005). Además, el receptor CB₂ también parece estar involucrado en el efecto antiviral del cannabinoide WIN55,212-2 en microglia (Rock y cols., 2007). No existen datos del papel que el receptor CB₂ puede ejercer en la respuesta astrocitaria frente a estímulos inflamatorios, pero podría contribuir al efecto neuroprotector de CB₂ en microglía generando factores pro-supervivencia y sustratos metabólicos para las neuronas (Fernández-Ruiz y cols., 2007). En cuanto al papel de FAAH en astrocitos, a falta de más estudios y como ya sugerimos previamente y ahora constatamos en este estudio, la inhibición de FAAH parece tener efectos beneficiosos en el proceso de inflamación atribuibles al descenso de la producción local de ácido araquidónico y el aumento del tono endocannabinoide (Benito y cols., 2003; Karanian y cols., 2005). Previamente, Maccarrone y cols., (2004) también describieron un efecto neuroprotector por inhibición de FAAH en un modelo *in vivo* de inyección de la proteína gp120 en corteza.

En el presente estudio también se muestra que en las células gliales transfectadas con pCMV-Tat, la carencia de la enzima FAAH provoca un descenso significativo en los niveles de expresión del ARNm de iNOS, COX-2 y TNF- α con respecto a células wt. Estudios previos han mostrado la implicación del SCE en la regulación de la forma inducible de NOS y la producción de NO. Waksman y cols. (1999) y Molina-Holgado y cols., (2002) describieron un descenso de los niveles de NO en células gliales estimuladas por LPS y tratadas con el cannabinoide CP55940, a través de un mecanismo que implicaba al receptor CB₁. La expresión de iNOS y la producción de NO inducida por la proteína Tat, también se inhibió en células de glioma C6 por tratamiento con WIN55,512-2 vía CB₁ (Espósito y cols., 2002). Este mismo compuesto cannabinoide también inhibió la producción de NO y citoquinas pro-inflamatorias por astrocitos humanos estimulados con IL-1 β (Sheng y cols., 2005). Sin embargo, los posibles efectos psicotrópicos y el deterioro de la memoria asociados a la activación del receptor CB₁ por compuestos cannabinoides externos, ha potenciado la búsqueda de otras alternativas basadas

en la activación del sistema endocannabinoide que evitarían estos efectos no deseados (Mechoulam y Lichtman, 2003). Estudios *in vitro* también describen un descenso en los niveles de expresión de iNOS y la producción de NO a través de la potenciación farmacológica del tono endocannabinoide en células gliales estimuladas. Además, otros parámetros pro-inflamatorios como COX-2, TNF- α e IL-1 β también experimentan una reducción en sus niveles de expresión y/o producción como consecuencia de los niveles elevados de AEA (Molina-Holgado y cols., 2002; Mestre y cols., 2005; Ortega-Gutiérrez y cols., 2005a y b; Tham y cols., 2007). Los datos obtenidos en este estudio, con el modelo genético de delección de la enzima FAAH, corroboran resultados previos y confirman el efecto beneficioso de la activación del SCE en la respuesta inflamatoria mediada por las células gliales. Sin embargo, en los astrocitos expuestos al péptido A β se desencadena un proceso inflamatorio exacerbado como consecuencia de la delección de FAAH, en el que los niveles de iNOS, COX-2 y TNF- α son significativamente superiores con respecto a las células wt. De modo que los efectos de la potenciación del tono endocannabinoide en células gliales estimuladas, parecen ser dependientes del estímulo inflamatorio y quizá por ello no observamos un patrón de respuesta común en los estudios con células gliales FAAH-ko. Por otra parte, cabe destacar que en el presente estudio se utilizan cultivos mixtos de glía, pudiendo existir diferencias en los procesos desencadenados en función de si uno o ambos tipos de células gliales participan en la respuesta inflamatoria.

Además, los niveles de expresión del ARNm del receptor CB₂ inducidos por la expresión de Tat, también descienden significativamente en las células gliales FAAH-ko con respecto a las wt. Probablemente el debilitamiento de la respuesta inflamatoria por delección de FAAH, esté asociado a este descenso de los niveles de CB₂. De igual modo, conviene recordar que en respuesta al potente proceso pro-inflamatorio desencadenado por la exposición de los astrocitos FAAH-ko al péptido β -amiloide durante 48 horas, se induce un incremento significativo de los niveles de CB₂. Además, estudios *in vitro* previos, también señalan que los niveles de expresión del receptor CB₂ en las células gliales dependen del estado de activación celular (Carlisle y cols., 2002; Facchinetti y cols., 2003; Klegeris y cols., 2003; Walter y cols., 2003; Cabral y Marciano-Cabral, 2005). Por tanto, podemos especular con que la expresión glial del receptor CB₂ depende de la magnitud de la respuesta inflamatoria, y por tanto, del nivel de activación celular.

En conclusión, los datos obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto que los niveles de expresión del receptor CB₂ y la enzima FAAH en células gliales *in vitro* aumentan en respuesta al proceso inflamatorio desencadenado por la proteína viral Tat. El aumento de los niveles de expresión de estos dos elementos del SCE parece ser una constante en procesos inflamatorios del SNC e independiente del estímulo inflamatorio primario. Además, el aumento de los niveles de endocannabinoides por delección de la enzima FAAH reduce significativamente la expresión inducida por Tat de varios mediadores pro-inflamatorios. De modo que la potenciación del tono endocannabinoide podría reducir la neurotoxicidad producida por la proteína Tat en el SNC, siendo necesarios más experimentos que evalúen este efecto positivo.

CONCLUSIONES

1. El SCE experimenta profundos cambios en procesos neuroinflamatorios crónicos en el cerebro humano.
2. Estos cambios afectan de forma diferencial a los componentes del SCE estudiados, los receptores CB₁ y CB₂, y la enzima FAAH.
3. Estos cambios sugieren un desplazamiento de la influencia del SCE sobre procesos neuronales en condiciones fisiológicas hacia una modulación de la actividad glial en condiciones patológicas (ver **Figura 30**)
4. La ausencia de FAAH mediante delección génica, y el consiguiente aumento de los niveles de endocannabinoides modifica la respuesta astrocitaria frente al péptido amiloide. Los astrocitos carentes de FAAH son más sensibles a la forma patogénica del péptido A β posiblemente debido a la potenciación de cascadas de señalización (ERK1/2, p38 MAPK, NF κ B) y a un descenso en los niveles de expresión de PPAR- α y PPAR- γ (ver **Figura 31**).
5. La ausencia de FAAH mediante delección génica, y el consiguiente aumento de los niveles de endocannabinoides modifica la respuesta glial frente a la proteína viral Tat, disminuyendo la reacción inflamatoria (ver **Figura 32**).
6. En función del tipo de estímulo inflamatorio y/o del tipo de cultivo (puro o mixto), la potenciación del tono endocannabinoide induce diferentes respuestas en las células gliales.

Figura 30: Esquema general del papel del SCE bajo condiciones normales (panel superior) y patológicas (panel inferior). En cerebro sano, el SCE modula la actividad neuronal, principalmente inhibiendo la excitabilidad neuronal así como la liberación de neurotransmisores y su posterior recaptación. Los astrocitos también pueden estar involucrados en estas acciones. Sin embargo, cuando el SNC es dañado (y especialmente cuando tiene lugar una reacción inflamatoria), la excitotoxicidad induce daño neuronal y algunos elementos del SCE aumentan su expresión en células gliales. Este SCE glial implica a astrocitos (la actividad de FAAH aumenta, y por tanto, la generación de AA, ácido araquidónico) y microglía (con un papel dual para el receptor CB₂, puesto que por un lado media la disminución de la producción de sustancias pro-inflamatorias y, al mismo tiempo, desencadena la proliferación y migración microglial). Además, la inhibición de la liberación presináptica de glutamato, mediada por el receptor CB₁, amortigua parcialmente la excitotoxicidad.

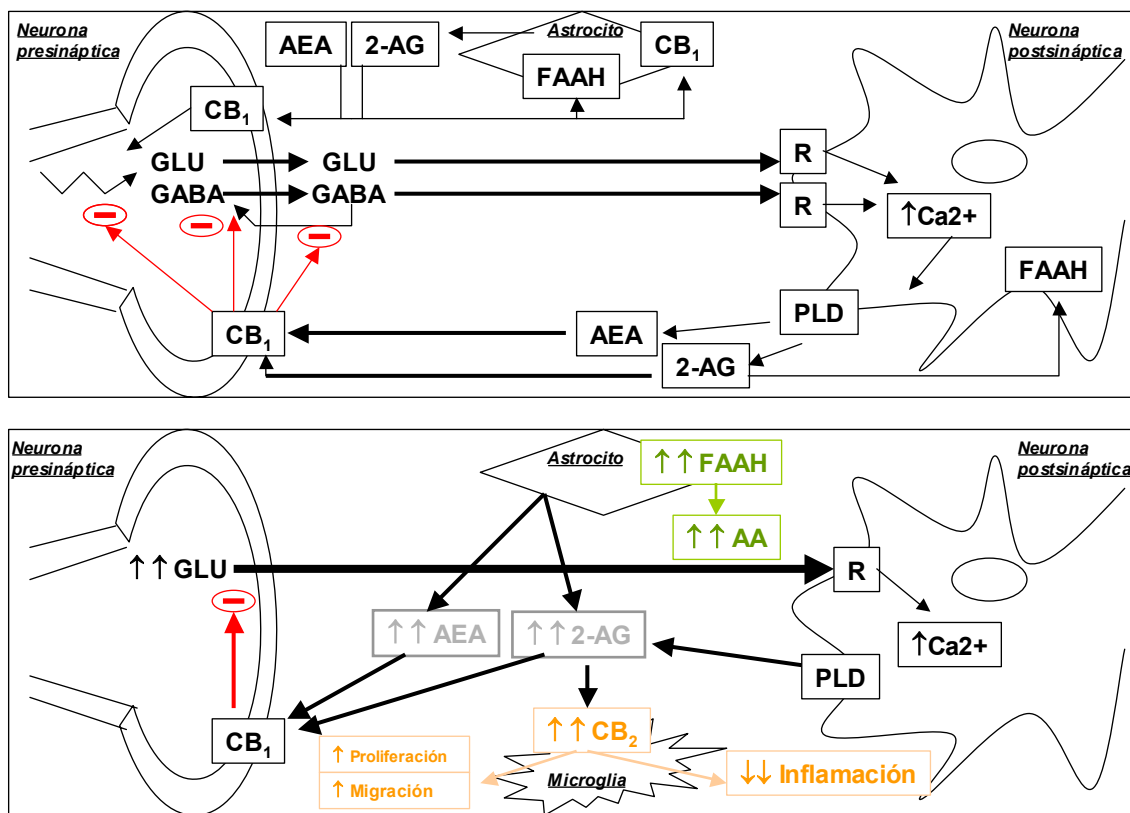


Figura 31: Esquema general de los efectos de la ausencia de FAAH en la respuesta astrocitaria frente al péptido $A\beta_{1-42}$. De acuerdo a la hipótesis que proponemos, en los astrocitos *wt*, el péptido $A\beta_{1-42}$ interaccionando con distintos tipos de receptores celulares activaría diversas cascadas de señalización que llevarían asociada una inducción de la expresión y producción de diversos parámetros inflamatorios. Por otra parte, la activación de receptores PPAR, por endocannabinoides y prostaglandinas, trataría de amortiguar la inducción de estos mediadores inflamatorios. Sin embargo, la delección genética de FAAH y el subsiguiente incremento de los niveles de endocannabinoides (ECs), durante un periodo de tiempo prolongado, potencia rutas de señalización críticas (ERK1/2, p38 MAPK y $NF\kappa B$) cuando la célula es sometida a un estímulo inflamatorio como el péptido $A\beta_{1-42}$. Además el incremento sostenido de los niveles de ECs regula a la baja la expresión de los receptores PPARs. Junto al descenso en la producción de ácido araquidónico (AA), como consecuencia de la incapacidad de degradar AEA, entre otros ECs, y la menor producción de prostaglandinas (PGs), el nivel de actividad de PPAR podría verse afectado, siendo incapaz de contrarrestar el incremento de moléculas pro-inflamatorias inducido por $A\beta_{1-42}$ con la misma eficacia que en los astrocitos *wt*.

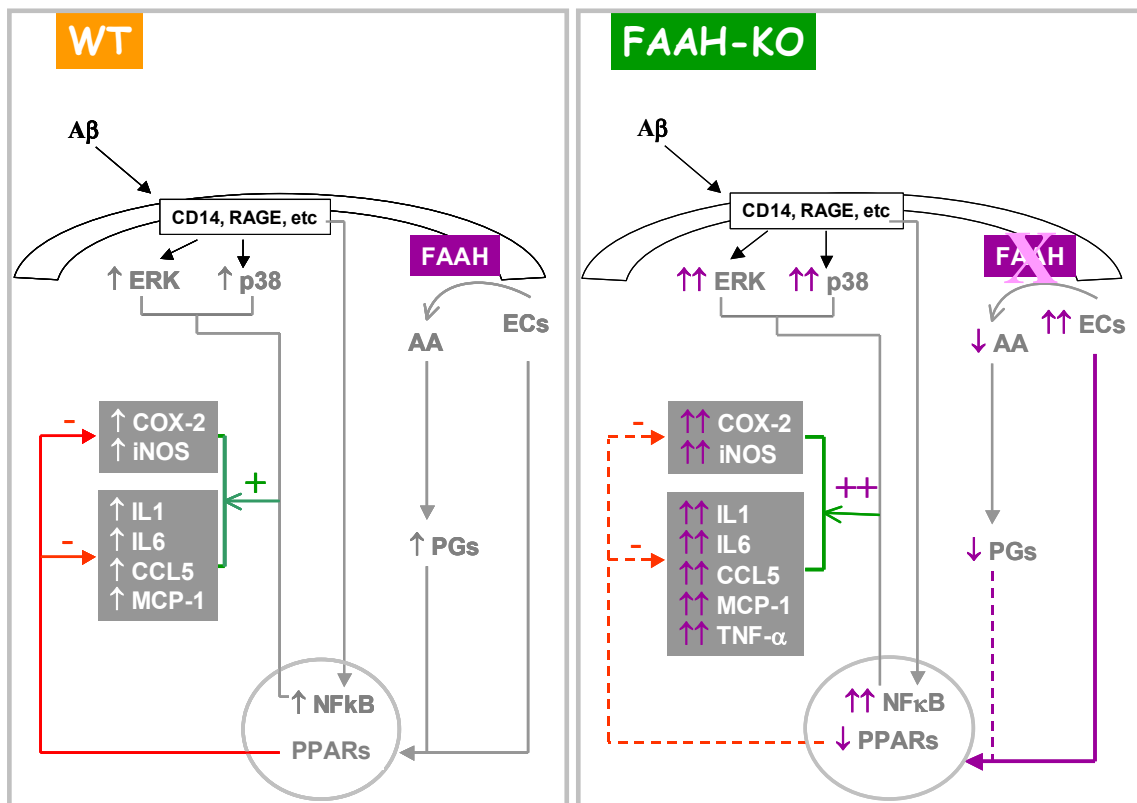
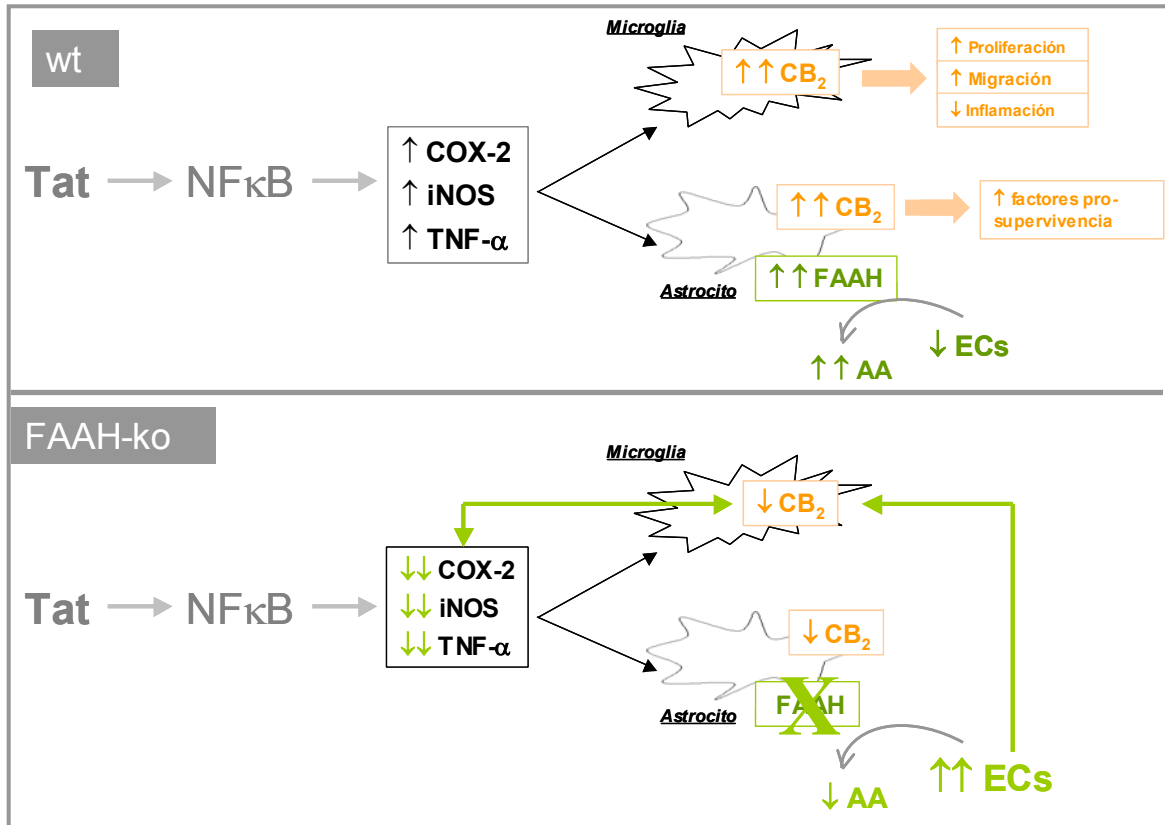


Figura 32: Esquema general de los efectos de la ausencia de FAAH en la respuesta glial frente a la proteína viral Tat. En las células gliales wt, los niveles de expresión del receptor CB₂ y la enzima FAAH aumentan en respuesta al proceso inflamatorio desencadenado por la proteína viral Tat. Sin embargo, los niveles de expresión de CB₂ así como de diversos parámetros pro-inflamatorios son menores como consecuencia de la potenciación del tono endocannabinoide en las células gliales carentes de FAAH.



BIBLIOGRAFÍA

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7(1):41-53.

Abood ME, Ditto KE, Noel MA, Showalter VM, Tao Q. (1997) Isolation and expression of a mouse CB₁ cannabinoid receptor gene. Comparison of binding properties with those of native CB₁ receptors in mouse brain and N18TG2 neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*, 53(2):207-14.

Abood ME, Rizvi G, Sallapudi N, McAllister S. (2001) Activation of the CB₁ cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neurosci Lett*, 309:197-201.

Adamson DC, Wildemann B, Sasaki M, Glass JD, McArthur JC, Christov VI, Dawson TM, Dawson VL. (1996) Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science*, 274(5294):1917-21.

Adamson DC, McArthur JC, Dawson TM, Dawson VL. (1999) Rate and severity of HIV-associated dementia (HAD): correlations with Gp41 and iNOS. *Mol Med*, 5(2):98-109.

Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. (2005) The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J*, 19(12):1704-6.

Allan SM, Rothwell NJ (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2:734-744.

Appendino G, Cascio MG, Bacchiega S, Moriello AS, Minassi A, Thomas A, Ross R, Pertwee R, De Petrocellis L, Di Marzo V. (2006) First "hybrid" ligands of vanilloid TRPV1 and cannabinoid CB₂ receptors and non-polyunsaturated fatty acid-derived CB₂-selective ligands. *FEBS Lett*, 580(2):568-74.

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

Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, 1(1):103-16.

Ashton JC, Glass M. (2007) The Cannabinoid CB₂ Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*, 5(2):73-80.

Bagetta G, Corasaniti MT, Paoletti AM, Berliocchi L, Nisticò R, Giammarioli AM, Malorni W, Finazzi-Agrò A. (1998) HIV-1 gp120-induced apoptosis in the rat neocortex involves enhanced expression of cyclo-oxygenase type 2 (COX-2). *Biochem Biophys Res Commun*, 244(3):819-24.

Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L. (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*, 404: 84-87.

Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di Marzo V. (2001) Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J*, 5(2):300-2.

- Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. (2003) A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci*, 23(7):2665-74.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, 70:31-46.
- Basu-Modak S, Braissant O, Escher P, Desvergne B, Honegger P, Wahli W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J Biol Chem*, 274(50):35881-8.
- Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. (1995) The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett*, 375(1-2):143-7.
- Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV. (1995) Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage*, 10(2):89-97.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277:1094-1097.
- Ben Amar M. (2006) Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol*, 105(1-2):1-25.
- 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.
- Benito C, Tolón RM, Núñez E, Pazos MR, Romero J (2007). Neuroinflammation and the glial endocannabinoid system. In *Cannabinoids and the Brain*, Koffalvi A, ed., Springer Verlag, pp. 314-334.
- Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R. (1998) An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*, 353(1):23-31.
- Berrendero F, Sánchez A, Cabranes A, Puerta C, Ramos JA, García-Merino A, Fernández-Ruiz J. (2001) Changes in cannabinoid CB(1) receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Synapse*, 41(3):195-202.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V. (2000) N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J*, 351 Pt 3:817-24.
- Bisogno T, Maccarrone M, De Petrocellis L, Jarranian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C, Di Marzo V. (2001) The uptake by cells of 2-arachidonylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 268:1982-1989.

Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol.* 2003;163:463-468.

Blanco A, Alvarez S, Fresno M, Muñoz-Fernández MA. (2008) Extracellular HIV-Tat induces cyclooxygenase-2 in glial cells through activation of nuclear factor of activated T cells. *J Immunol*, 180(1):530-40.

Blázquez C, Galve-Roperh I, Guzmán M. (2000) De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J*, 14(14):2315-22.

Boje KM., Arora PK. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res*, 587:250-6.

Bonwetsch R, Croul S, Richardson MW, Lorenzana C, Del Valle L, Sverstiuk AE, Amiri S, Morgello S, Khalili K, Rappaport J. (1999) Role of HIV-1 Tat and CC chemokine MIP-1alpha in the pathogenesis of HIV associated central nervous system disorders. *J Neurovirol*, 5(6):685-94.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB₁. *Biochem J*, 312 (Pt 2):637-41.

Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. (2005) Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol*, 11;517(3):174-81.

Brown SM, Wager-Miller J, Mackie K. (2002) Cloning and molecular characterization of the rat CB₂ cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1576(3):255-64.

Bruck W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, Lassmann H (1995) Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 38: 788-796.

Bruck W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel HH, Kretzschmar HA, Lassmann H (1996) Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology*, 195: 588-600.

Buckey NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A. (2000) Mice Deficient for the Peripheral Cannabinoid receptor were developed and demonstrated an immunomodulatory role for cannabinoids. *Eur J Pharmacol*, 396, 141-149.

Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C. (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem*, 267(1):546-54.

Butt AM, Ransom BR (1993) Morphology of astrocytes and oligodendrocytes during development in the intact rat optic nerve. *J Comp Neurol*, 338:141-158.

Cabral GA, Harmon KN, Carlisle SJ. (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.

Cabral GA, Marciano-Cabral F. (2005) Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol*, 78(6):1192-7.

Cabral GA, Griffin-Thomas L. (2008) Cannabinoids as therapeutic agents for ablating neuroinflammatory disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 8(3):159-72.

Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, Sánchez A, Mestre L, Valenti M, García-Merino A, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J. (2005) Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*, 20(2):207-17.

Cabranes A, Pryce G, Baker D, Fernández-Ruiz J. Cabranes A, Pryce G, Baker D, Fernández-Ruiz J. (2006) Changes in CB₁ receptors in motor-related brain structures of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis mice. *Brain Res*, 1107(1):199-205.

Carlisle S.J., Marciano-Cabral F., Staab A., Ludwick C., & Cabral G.A. (2002) Differential expression of the CB₂ cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol*, 2 :69-82.

Carracedo A, Geelen MJ, Diez M, Hanada K, Guzman M, Velasco G (2004) Ceramide sensitizes astrocytes to oxidative stress: protective role of cannabinoids. *Biochem J*, 380:435-440.

Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB₂ receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, 65: 999-1007.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653):816-24.

Centonze D, Bari M, Rossi S, Prosperetti C, Furlan R, Fezza F, De Chiara V, Battistini L, Bernardi G, Bernardini S, Martino G, Maccarrone M. (2007) The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 130(Pt 10):2543-53.

Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002) Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 346: 165-173.

Chang HC, Samaniego F, Nair BC, Buonaguro L, Ensoli B. (1997) HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS*, 11(12):1421-31.

Chang HK, Gallo RC, Ensoli B. (1995) Regulation of Cellular Gene Expression and Function by the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein. *J Biomed Sci*, 2(3):189-202.

Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. (1995) Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, 9(13):1586-97.

Chen P, Mayne M, Power C, Nath A. (1997) The Tat protein of HIV-1 induces tumor necrosis factor-alpha production. Implications for HIV-1-associated neurological diseases. *J Biol Chem*, 272(36):22385-8.

Chen Y, Swanson RA. (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 137-149.

Childers SR, Deadwyler SA. (1996) Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 52(6):819-27.

Combs CK, Johnson DE, Karlo JC, Cannady SB, Landreth GE. (2000) Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci*, 20(2):558-67.

Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, 112(3):423-31.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384(6604):83-7.

Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16):9371-6.

Cravatt BF, Saghatelian A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH, Lichtman AH. (2004) Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29):10821-6.

Cristiano L, Bernardo A, Cerù MP. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *J Neurocytol*, 30(8):671-83.

Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, 139(4):1405-15.

Croxford JL, Yamamura T (2005) Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol*, 166: 3-18.

Croxford JL, Pryce G, Jackson SJ, Ledent C, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Baker D. (2008) Cannabinoid-mediated neuroprotection, not immunosuppression, may be more relevant to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 193(1-2):120-9.

- Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB. (1998) Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem*, 70(4):1366-75.
- Daaka Y, Friedman H, Klein TW (1996) Cannabinoid receptor proteins are increased in Jurkat, human T-cell line after mitogen activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 276:776-783.
- Davoust N, Vuillat C, Androdias G, Nataf S. (2008) From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol*, 29(5):227-34.
- DeAngelis T, Lublin F. (2008) Multiple sclerosis: new treatment trials and emerging therapeutic targets. *Curr Opin Neurol*, 21(3):261-71.
- de Lago E, Ligresti A, Ortar G, Morera E, Cabranes A, Pryce G, Bifulco M, Baker D, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V. (2004) In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *Eur J Pharmacol*, 484(2-3):249-57.
- de Lago E, Fernández-Ruiz J, Ortega-Gutiérrez S, Cabranes A, Pryce G, Baker D, López-Rodríguez M, Ramos JA. (2006) UCM707, an inhibitor of the anandamide uptake, behaves as a symptom control agent in models of Huntington's disease and multiple sclerosis, but fails to delay/arrest the progression of different motor-related disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*, 16(1):7-18.
- Del Rio-Hortega P. (1932). Microglia. *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. Volume 2. Edited by W Penfield, Hoeber, New York, pp. 482-534.
- Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA. (2001) Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB₁ receptors in hippocampus. *J Neurochem*, 77(3):957-60.
- Derocq JM, Jbilo O, Bouaboula M, Séqui M, Clère C, Casellas P. (2000) Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB₂ in the promyelocytic cells HL-60. Possible involvement of the CB₂ receptor in cell differentiation. *J Biol Chem*, 275(21):15621-8.
- Deutsch, D.G., Glaser, S.T., Howell, J.M., Kunz, J.S., Puffenbarger, R.A., Hillard, C.J., & Abumrad, N. (2000) The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty acid amide hydrolase (FAAH). *J Biol Chem*, 276:6967-6973.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, 34(5):605-13.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Shimelli S, Cimino G, Schwart JC, Piommelli D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372:686-619.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A. (1996) Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J*, 316 (Pt 3):977-84.

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner JA, Kunos G. (1999) Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem*, 264(1):258-67.

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Brandi I, Jefferson RG, Winckler RL, Davis JB, Dasse O, Mahadevan A, Razdan RK, Martin BR. (2001) Highly selective CB(1) cannabinoid receptor ligands and novel CB(1)/VR(1) vanilloid receptor "hybrid" ligands. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(2):444-51.

Di Marzo V, Griffin G, De Petrocellis L, Brandi I, Bisogno T, Williams W, Grier MC, Kulasegram S, Mahadevan A, Razdan RK, Martin BR. (2002) A structure/activity relationship study on arvanil, an endocannabinoid and vanilloid hybrid. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3):984-91.

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(16):10819-24.

Docagne F, Muneton V, Clemente D, Ali C, Loria F, Correa F, Hernangomez M, Mestre L, Vivien D, 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.

Docagne F, Mestre L, Loria F, Hernangómez M, Correa F, Guaza C. (2008) Therapeutic potential of CB₂ targeting in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*, 12(2):185-95.

Drew PD, Xu J, Storer PD, Chavis JA, Racke MK. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor agonist regulation of glial activation: relevance to CNS inflammatory disorders. *Neurochem Int*, 49(2):183-9.

Eddleston M, Mucke L. (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54(1):15-36.

Egertová M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. (1998) A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci*, 265(1410):2081-5.

Egertová M, Cravatt BF, Elphick MR (2003) Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*, 119:481-496.

Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle RD (2005). Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB₂) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation*, 2:29-39.

Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O (2006). The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*, 49: 67-79.

El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. (1996) Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature*, 382(6593):716-9.

Esposito G., Izzo A.A., Di Rosa M., and Iuvone T. (2001) Selective cannabinoid CB₁ receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells. *J Neurochem*, 78, 835-841.

Esposito G, Ligresti A, Izzo AA, Bisogno T, Ruvo M, Di Rosa M, Di Marzo V, Iuvone T. (2002) The endocannabinoid system protects rat glioma cells against HIV-1 Tat protein-induced cytotoxicity. Mechanism and regulation. *J Biol Chem*, 277(52):50348-54.

Esposito G, De Filippis D, Carnuccio R, Izzo AA, 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*, 84(3):253-8.

Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC, De Stefano D, Carnuccio R, 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(1-2):91-5.

Esposito G, De Filippis D, Steardo L, Scuderi C, Savani C, Cuomo V, Iuvone T. (2006c) CB₁ receptor selective activation inhibits beta-amyloid-induced iNOS protein expression in C6 cells and subsequently blunts tau protein hyperphosphorylation in co-cultured neurons. *Neurosci Lett*, 404(3):342-6.

Esposito G, Iuvone T, Savani C, Scuderi C, De Filippis D, Papa M, Di Marzo V, Steardo L. (2007) Opposing control of cannabinoid receptor stimulation on amyloid-beta-induced reactive gliosis: in vitro and in vivo evidence. *J Pharmacol Exp Ther*, 322(3):1144-52.

Eubanks LM, Rogers CJ, Beuscher AE 4th, Koob GF, Olson AJ, Dickerson TJ, Janda KD. (2006) A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Mol Pharm*, 3(6):773-7.

Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A. (2003) Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia*, 41(2):161-168.

Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A, Piomelli D. (2004) Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(23):8756-61.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol Pharmacol*, 48(3):443-50.

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*, 393:231-235.

Fernandez PA, Tang DG, Cheng L, Prochiantz A, Mudge AW, Raff MC (2000) Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron*, 28:81-90.

Fernandez-Lopez D, Martinez-Orgado J, Nunez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2006) Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res*, 60(2):169-73.

Fernandez-Ruiz J.J., Gonzalez S., Romero J., Ramos J.A. (2005) Cannabinoids in neurodegeneration and neuroprotection. In *Cannabinoids as Therapeutics*, Mechoulam R., ed., Birkhäuser Verlag/Switzerland, pp. 79-109.

Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. (2007) Cannabinoid CB₂ receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci*, 28(1):39-45.

Fernández-Ruiz J, Pazos MR, García-Arencibia M, Sagredo O, Ramos JA. (2008) Role of CB₂ receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2 Suppl 1):S91-6.

Ferré P. (2004) The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 53 Suppl 1:S43-50.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, 366:2112-2117.

Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S, Gelbard HA. (1996) Tumor necrosis factor alpha inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J Biol Chem*, 271(26):15303-6.

Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A, Debouk C, Gallo RC, et al. (1986) The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature*, 320(6060):367-71.

Flora G, Pu H, Hennig B, Toborek M. (2006) Cyclooxygenase-2 is involved in HIV-1 Tat-induced inflammatory responses in the brain. *Neuromolecular Med*, 8(3):337-52.

Franklin A & Stella N (2003). Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB₂ and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol*, 474: 195-198.

Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jönhagen M, Cederholm T, Basun H, Faxén-Irving G, Garlind A, Vedin I, Vessby B, Wahlund LO, Palmblad J. (2006) Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Arch Neurol*, 63(10):1402-8.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple Sclerosis. The plaque and its pathogenesis. *New Eng J Med*, 354:942-955.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. (2003).

Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature*, 425(6953):90-3.

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

Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés M, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M. (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat. Med.* 6:313-319.

Galve-Roperh I, Rueda D, Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. (2002) Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol*, 62(6):1385-92.

Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M. (2008) Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr Pharm Des*, 14(23):2279-88.

Gaoni Y, Mechoulam R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*, 86:1646-1647.

Gard AL, Burrell MR, Pfeiffer SR, Rudge JS, Williams II WC. (1995) Astroglial control of oligodendrocyte survival mediated by PDGF and leukemia inhibitory factor-like protein. *Development*, 121:2187-2197.

Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 20(3):269-87.

Gelfand EV, Cannon CP. (2006) Rimonabant: a selective blocker of the cannabinoid CB₁ receptors for the management of obesity, smoking cessation and cardiometabolic risk factors. *Expert Opin Investig Drugs*, 15(3):307-15.

Gérard GM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J*, 279 (Pt 1):129-34.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16:225-60.

Giulian D. (1999) Microglia and the immune pathology of Alzheimer's disease. *Am. J. Hum. Genet*, 65:13-18.

Glass M, Dragunow M, & Faull RL. (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.

Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Mor M, Trezza V, Goldberg SR, Cuomo V, Piomelli D. (2005) Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(51):18620-5.

Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. (2000) The CB₁ cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J*, 347(Pt 2):369-73.

Gómez del Pulgar T, de Ceballos ML, Guzmán M, Velasco G. (2002a) Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase B pathway. *J Biol Chem*, 277:36527-36533.

Gómez del Pulgar T, Velasco G, Sánchez C, Haro A, Gumán M. (2002b) De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* 363:183-188.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. (2006) Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*, 1071: 10-23.

Goni F, Sigurdsson EM (2005). New directions towards safer and effective vaccines for Alzheimer's disease. *Curr Opin Mol Ther*, 7: 17-23.

Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*, 57(5):1045-50.

González-Scarano F, Martín-García J. (2005) The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*, 5(1):69-81.

Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S. (1998) Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett*, 422(1):69-73.

Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW. (1989) Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res*, 22(1):103-6.

Gray F, Adle-Biassette H, Brion F, Ereau T, le Maner I, Levy V, Corcket G. (2000) Neuronal apoptosis in human immunodeficiency virus infection. *J Neurovirol*, 6 Suppl 1:S38-43.

Griffin DE, Wesselingh SL, McArthur JC. (1994) Elevated central nervous system prostaglandins in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*, 35(5):592-7.

Griffin G, Tao Q, Abood ME. (2000) Cloning and pharmacological characterization of the rat CB₂ cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 292(3):886-94.

Grimm MO, Grimm HS, Hartmann T. (2007) Amyloid beta as a regulator of lipid homeostasis. *Trends Mol Med*, 13(8):337-44.

Grotenhermen F. (2005) Cannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4(5):507-30.

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

Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agro A, Maccarrone M (2002) Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci*, 22:6900-6907.

- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boschia F, Freund TF. (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*, 20(2):441-58.
- Guzmán M, Sanchez C, Galve-Roperh I. (2001) Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J Mol Med*, 78: 613-625.
- Guzmán M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. (2004) Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem*, 279(27):27849-54.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 8268-8273.
- Han Y, He T, Huang DR, Pardo CA, Ransohoff RM. (2001) TNF-alpha mediates SDF-1 alpha-induced NF-kappa B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *J Clin Invest*, 108(3):425-35.
- Haney M, Rabkin J, Gunderson E, Foltin RW. (2005) Dronabinol and marijuana in HIV(+) marijuana smokers: acute effects on caloric intake and mood. *Psychopharmacology (Berl)*, 181(1):170-8.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7):3662-5.
- Hanus LO. (2007) Discovery and isolation of anandamide and other endocannabinoids. *Chem Biodivers*, 4(8):1828-41.
- Hayden MS, Ghosh S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132(3):344-62.
- Heneka MT, Klockgether T, Feinstein DL. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *J Neurosci*, 20(18):6862-7.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR, Rice KC. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, 11:563-583.
- Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW. (1994) Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron*, 13(2):487-94.
- Hickey WF, Kimura H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*, 239(4837):290-2.
- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahan A, Campbell WB. (1997) Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem*, 69(2):631-8.
- Hillard CJ, Jarrahan A. (2003) Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br J Pharmacol*, 140(5):802-8.

Hillard CJ, Shi L, Tuniki VR, Falck JR, Campbell WB. (2007) Studies of anandamide accumulation inhibitors in cerebellar granule neurons: comparison to inhibition of fatty acid amide hydrolase. *J Mol Neurosci.*, 33(1):18-24.

Howlett AC. (1984) Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantadol compounds. *Life Sci*, 35(17):1803-10.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R and Pertwee RG. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.*, 54, 161-202.

Howlett AC. (2004) Efficacy in CB₁ receptor-mediated signal transduction. *Br J Pharmacol*, 142(8):1209-18.

Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ. (1998) Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res*, 785(2):195-206.

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12):8400-5.

Hudson L, Liu J, Nath A, Jones M, Raghavan R, Narayan O, Male D, Everall I. (2000) Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues. *J Neurovirol*, 6(2):145-55.

Hwang J, Adamson C, Butler D, Janero DR, Makriyannis A, Bahr BA. (2009) Enhancement of endocannabinoid signaling by fatty acid amide hydrolase inhibition: A neuroprotective therapeutic modality. *Life Sci*, 2009 Jun 13.

Hüll M, Müksch B, Akundi RS, Waschbisch A, Hoozemans JJ, Veerhuis R, Fiebich BL. (2006) Amyloid beta peptide (25-35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. *Neurochem Int*, 48(8):663-72.

Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA. (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem*, 89(1):134-41.

Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM. (1998) A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol*, 93(1-2):182-93.

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427(6971):260-5.

Kaczocha M, Hermann A, Glaser ST, Bojesen IN, Deutsch DG. (2006) Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *J Biol Chem*, 281(14):9066-75.

Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. (2009) Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(15):6375-80.

Karanian DA, Brown QB, Makriyannis A, Kosten TA, Bahr BA (2005) Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. *J Neurosci*, 25: 7813-7820.

Karin M. (1999) How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18(49):6867-74.

Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornquist H, Holm C. (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Bio Chem*, 272(43):27218-23.

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*, 9(1):76-81.

Kaul M, Garden GA, Lipton SA (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, 19;410: 988-994.

Kaur C, Ling EA. (1991) Study of the transformation of amoeboid microglial cells into microglia labelled with the isolectin Griffonia simplicifolia in postnatal rats. *Acta Anat (Basel)*, 142(2):118-25.

Kelder W, McArthur JC, Nance-Sproson T, McClernon D, Griffin DE. (1998) Beta-chemokines MCP-1 and RANTES are selectively increased in cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*, 44(5):831-5.

Killestein J, Hoogervorst EL, Reif M, Kalkers NF, Van Loenen AC, Staats PG, Gorter RW, Uitdehaag BM, Polman CH. (2002) Safety, tolerability, and efficacy of orally administered cannabinoids in MS. *Neurology*, 58(9):1404-7.

Kim WK, Corey S, Chesney G, Knight H, Klumpp S, Wüthrich C, Letvin N, Koralknik I, Lackner A, Veasey R, Williams K. (2004) Identification of T lymphocytes in simian immunodeficiency virus encephalitis: distribution of CD8⁺ T cells in association with central nervous system vessels and virus. *J Neurovirol*, 10(5):315-25.

King JE, Eugenin EA, Buckner CM, Berman JW. (2006) HIV tat and neurotoxicity. *Microbes Infect*, 8(5):1347-57.

Kishimoto S, Gokoh M, Oka S, Muramatsu M, Kajiwara T, Waku K, Sugiura T. (2003) 2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB₂ receptor-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 278(27):24469-75.

Klegeris A, Bissonnette, McGeer PL (2003). Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB₂ receptor. *Br J Pharmacol*, 139: 775-786.

Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H. (2000) The cannabinoid system and cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med*, 225: 1-8.

Klein TW. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol*, 5(5):400-11.

Koenigsknecht-Talboo J, Landreth G. (2005) Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci*, 25: 8240-8249.

Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM. (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med*, 10(7):719-26.

Kozak KR, Rowlinson SW, Marnett LJ. (2000) Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 275(43):33744-9.

Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, DuBois RN, Brash AR, Marnett LJ. (2002) 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem*, 277(26):23278-86.

Kozak KR, Marnett LJ. (2002) Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66(2-3):211-20.

Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Rowlinson SW, Prudhomme DR, Marnett LJ. (2003) Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid anandamide. *Biochemistry*, 42(30):9041-9.

Köfalvi A, Pereira MF, Rebola N, Rodrigues RJ, Oliveira CR, Cunha RA. (2007) Anandamide and NADA bi-directionally modulate presynaptic Ca²⁺ levels and transmitter release in the hippocampus. *Br J Pharmacol*, 151(4):551-63.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 8(7):499-509.

Lambert DM, Fowler CJ. (2005) The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem*, 48(16):5059-87.

Lauckner JE, Hille B, Mackie K. (2005) The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB₁ receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52):19144-9.

Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(7):2699-704.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1):151-70.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. (1999)

Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB₁ receptor knockout mice. *Science*, 283(5400):401-4.

Lee Hk, Choi EB, Pak CS. (2009) The current status and future perspectives of studies of cannabinoid receptor 1 antagonists as anti-obesity agents. *Curr Top Med Chem*, 9(6):482-503.

Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW (2001) The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci*, 24: 39-47.

Lichtman AH, Leung D, Shelton CC, Saghatelian A, Hardouin C, Boger DL, Cravatt BF. (2004a) Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther*, 311(2):441-8.

Lichtman AH, Shelton CC, Advani T, Cravatt BF. (2004b) Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain*, 109(3):319-27.

Ling EA, Wong WC. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7(1):9-18.

Lipton SA, Gendelman HE. (1995) Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, 332(14):934-40.

Liu B, Hong JS. (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*, 304:1-7.

Liu J, Li H, Burstein SH, Zurier RB, Chen JD. (2003a) Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol Pharmacol*, 63(5):983-92.

Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B, Kunos G. (2003b) Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem*, 278(45):45034-9.

Liu X, Jana M, Dasgupta S, Koka S, He J, Wood C, Pahan K. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat induces nitric-oxide synthase in human astroglia. *J Biol Chem*, 277(42):39312-9.

Liu Y, Walter S, Stagi M, Cherny D, Letiembre M, Schulz-Schaeffer W, Heine H, Penke B, Neumann H, Fassbender K. (2005) LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*, 128(Pt 8):1778-89.

Lleó A, Greenberg SM, Growdon JH (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med*, 57: 513-533.

Lorenzo A, Yankner BA. (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(25):12243-7.

- Loría F, Petrosino S, Mestre L, Spagnolo A, Correa F, Hernangómez M, Guaza C, Di Marzo V, 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(4):633-41.
- LoVerme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. (2005) The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci*, 77(14):1685-98.
- Lu TS, Avraham HK, Seng S, Tachado SD, Koziel H, Makriyannis A, Avraham S. (2008) Cannabinoids inhibit HIV-1 Gp120-mediated insults in brain microvascular endothelial cells. *J Immunol*, 181(9):6406-16.
- Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Alonso M, Santos A, Martínez A, Perez-Castillo A. (2005) Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by thiadiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *J Biol Chem*, 280(22):21453-62.
- Lyman WD, Sonett JR, Brosnan CF, Elkin R, Bornstein MB (1989) Delta 9-tetrahydrocannabinol: a novel treatment for experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 23: 73-81.
- Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A. (2000) Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem*, 275(18):13484-92.
- Maccarrone M, Finazzi-Agrò A. (2003) The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death Differ*, 10(9):946-55.
- Maccarrone M, Piccirilli S, Battista N, Del Duca C, Nappi G, Corasaniti MT, Finazzi-Agrò A, Bagetta G. (2004) Enhanced anandamide degradation is associated with neuronal apoptosis induced by the HIV-1 coat glycoprotein gp120 in the rat neocortex. *J Neurochem*, 89(5):1293-300.
- Mackie K, Hille B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 3825-3829.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, 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(10):6552-61.
- Majumdar A, Cruz D, Asomoah N, Buxbaum A, Sohar I, Lobel P, Maxfield FR. (2007) Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol Biol Cell*, 18(4):1490-6.
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. (2005) Modulation of the cannabinoid CB₂ receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem*, 95: 437-445.
- Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, Ledent C, Cheng X, Carrier EJ, Mann MK, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Buckley NE, Hillard CJ, Lutz B, Baker D, Dittel BN. (2007) Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB₁ on neurons and CB₂ on autoreactive T cells. *Nat Med*, 13(4):492-7.

- Martínez-Orgado J, Fernández-López D, Lizasoain I, Romero J. (2007) The seek of neuroprotection: introducing cannabinoids. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2(2):131-9.
- Matos M, Augusto E, Oliveira CR, Agostinho P. (2008) Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience*, 156(4):898-910.
- Matute C, Pérez-Cerdá F. (2005) Multiple sclerosis: novel perspectives on newly forming lesions. *Trends Neurosci*, 28(4):173-5.
- Matute C, Alberdi E, Domercq M, Sánchez-Gómez MV, Pérez-Samartín A, Rodríguez-Antigüedad A, Pérez-Cerdá F. (2007) Excitotoxic damage to white matter. *J Anat*, 210(6):693-702.
- Mayne M, Bratanich AC, Chen P, Rana F, Nath A, Power C. (1998) HIV-1 tat molecular diversity and induction of TNF-alpha: implications for HIV-induced neurological disease. *Neuroimmunomodulation*, 5(3-4):184-92.
- Mazzola C, Micale V, Drago F. (2003) Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *Eur J Pharmacol*, 477(3):219-25.
- McCarthy KD, de Vellis J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85(3):890-902.
- McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA, Barker EL. (2004) A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem*, 279(40):41991-7.
- McManus CM, Weidenheim K, Woodman SE, Nunez J, Hesselgesser J, Nath A, Berman JW. (2000) Chemokine and chemokine-receptor expression in human glial elements: induction by the HIV protein, Tat, and chemokine autoregulation. *Am J Pathol*, 156(4):1441-53.
- Mechoulam R, Varconi H, Ben-Zvi Z, Edery H, Grunfeld Y. (1972) Mechoulam R, Varconi H, Ben-Zvi Z, Edery H, Grunfeld Y. *J Am Chem Soc*, 94(22):7930-1.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50:83-90.
- Mechoulam R, Hanus L. (2000) A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*, 108(1-2):1-13.
- Mechoulam R, Panikashvili A, Shohami E. (2002) Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trend Mol Med* 8:58-61.
- Mechoulam R, Lichtman AH (2003) Neuroscience. Stout guards of the central nervous system. *Science*, 302: 65-67.
- Mechoulam R. (2005) Plant cannabinoids: a neglected pharmacological treasure trove. *Br J Pharmacol*, 146(7):913-5.
- Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodríguez E, Hanus LO. (2007) Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers*, 4(8):1678-92.

Meda L, Baron P, Scarlato G. (2001) Glial activation in Alzheimer's disease: the role of Abeta and its associated proteins. *Neurobiol Aging*, 22(6):885-93.

Mestre L, Correa F, Arevalo-Martin A, Molina-Holgado E, Valenti M, Ortar G, Di Marzo V, Guaza C (2005) Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis. *J Neurochem*, 92(6):1327-1339.

Mestre L, Docagne F, Correa F, Loria F, Hernangómez M, Borrell J, 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(2):258-66.

Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(7):3655-60.

Milman G, Maor Y, Abu-Lafi S, Horowitz M, Gallily R, Batkai S, Mo FM, Offertaler L, Pacher P, Kunos G, Mechoulam R. (2006) N-arachidonoyl L-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7):2428-33.

Milton NG. (2002) Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide. *Neurosci Lett*, 332(2):127-30.

Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 202: 13-23.

Mo FM, Offertaler L, Kunos G. (2004) Atypical cannabinoid stimulates endothelial cell migration via a Gi/Go-coupled receptor distinct from CB₁, CB₂ or EDG-1. *Eur J Pharmacol*, 489(1-2):21-7.

Moldrich G, Wenger T. (2000) Localization of the CB₁ cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*, 21:1735-1742.

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

Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C (1998) The endogenous cannabinoid anandamide potentiates interleukin-6 production by astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway. *FEBS Lett*, 433(1-2):139-142.

Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell NJ. (2002a) Role of CB₁ and CB₂ receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocytes cultures. *J Neurosci Res*, 67:829-836.

Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. (2002b) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci*, 22(22):9742-9753.

- Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM, Rothwell NJ (2003) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci*, 23: 6470-6474.
- Mollace V, Nottet HS, Clayette P, Turco MC, Muscoli C, Salvemini D, Perno CF. (2001) Oxidative stress and neuroAIDS: triggers, modulators and novel antioxidants. *Trends Neurosci*, 24(7):411-6.
- Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*, 110(3):371-85.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP. (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 123(1):131-45.
- Mrak RE, Griffin WS. (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging*, 26(3):349-54.
- Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA. (1999) Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther*, 291(2):893-902.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441):61-5.
- Murray EA, Rausch DM, Lendvay J, Sharer LR, Eiden LE. (1992) Cognitive and motor impairments associated with SIV infection in rhesus monkeys. *Science*, 255(5049):1246-9.
- Nackley AG, Makriyannis A, Hohmann AG. (2003) Selective activation of cannabinoid CB(2) receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience*, 119(3):747-57.
- Nadler V, Mechoulam R, Sokolovsky M (1993) Blockade of 45Ca²⁺ influx through the N-methyl-D-aspartate receptor ion channel by the non-psychoactive cannabinoid HU-211. *Brain Res*, 622:79-85.
- Narayan O, Joag SV, Stephens EB. (1995) Selected models of HIV-induced neurological disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 202:151-66.
- Nath A, Geiger J. (1998) Neurobiological aspects of human immunodeficiency virus infection: neurotoxic mechanisms. *Prog Neurobiol*, 54(1):19-33.
- Nath A, Conant K, Chen P, Scott C, Major EO. (1999) Transient exposure to HIV-1 Tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes. A hit and run phenomenon. *J Biol Chem*, 274(24):17098-102.
- Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. (2000) Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*, 283(12):1571-1577.
- Ndubaku U, de Bellard ME. (2008) Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem*, 110(3):182-95.

Nesbit CE, Schwartz SA. (2002) In vitro and animal models of human immunodeficiency virus infection of the central nervous system. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(3):515-24.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308:1314-1318.

Noe SN, Newton C, Widen R, Friedman H, Klein TW (2000). Anti-CD40, anti-CD3, and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes. *J Neuroimmunol*, 110:161-167.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 343: 938-952.

Nottet HS, Jett M, Flanagan CR, Zhai QH, Persidsky Y, Rizzino A, Bernton EW, Genis P, Baldwin T, Schwartz J, et al. (1995) A regulatory role for astrocytes in HIV-1 encephalitis. An overexpression of eicosanoids, platelet-activating factor, and tumor necrosis factor-alpha by activated HIV-1-infected monocytes is attenuated by primary human astrocytes. *J Immunol*, 154(7):3567-81.

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

Núñez E, Benito C, Tolón RM, Hillard CJ, Griffin WS, 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(1):104-10.

Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 26(40):10129-40.

Offertáler L, Mo FM, Bátka S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G. (2003) Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol*, 63:699-705.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasent L, Uhl GR. (2006) Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci USA*, 1074:514-36.

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

Ortega-Gutierrez S, Molina-Holgado E, Guaza C (2005b) Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia*, 52: 163-168.

Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátka S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. (2005) Endocannabinoid activation at

hepatic CB₁ receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 115(5):1298-305.

O'Sullivan SE. (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*, 152(5):576-82.

Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Liu J, Harvey-White J, Brassai A, Járai Z, Cravatt BF, Kunos G. (2005) Hemodynamic profile, responsiveness to anandamide, and baroreflex sensitivity of mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(2):H533-41.

Pacher P, Bátkai S, Kunos G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58(3):389-462.

Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. (2006) Non-psychoactive CB₂ cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J*, 20(13):2405-7.

Palazuelos J, Davoust N, Julien B, Hatterer E, Aguado T, Mechoulam R, Benito C, Romero J, Silva A, Guzmán M, Nataf S, Galve-Roperh I. (2008) The CB₂ cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. *J Biol Chem*, 283(19):13320-9.

Palmer SL, Thakur GA, Makriyannis A. (2002) Cannabinergic ligands. *Chem Phys Lipids*, 121(1-2):3-19.

Parkkari T, Savinainen JR, Raitio KH, Saario SM, Matilainen L, Sirviö T, Laitinen JT, Nevalainen T, Niemi R, Järvinen T. (2006) Synthesis, cannabinoid receptor activity, and enzymatic stability of reversed amide derivatives of arachidonoyl ethanolamide. *Bioorg Med Chem*, 14(15):5252-8.

Patrick MK, Johnston JB, Power C. (2002) Lentiviral neuropathogenesis: comparative neuroinvasion, neurotropism, neurovirulence, and host neurosusceptibility. *J Virol*, 76(16):7923-31.

Pazos M. R., Nunez, E., Benito, C., Tolon, R. M., and Romero, J. (2004) Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. *Life Sci*, 75(16):1907-15.

Pazos MR, Nunez E, Benito C, Tolon RM, Romero J (2005). Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav*, 81: 239-247.

Pazos MR, Tolón RM, Benito C, Rodríguez CF, Gorgojo JJ, Nevado M, Alvarez M, Arias F, Almodóvar F, Fernández MT, Lledó JL, González S, Fernández-Ruiz JJ, Romero J. (2008) Cannabinoid CB₁ receptors are expressed by parietal cells of the human gastric mucosa. *J Histochem Cytochem*, 56(5):511-6.

Perea G, Araque A. (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, 317(5841):1083-6.

Persidsky Y, Ghorpade A, Rasmussen J, Limoges J, Liu XJ, Stins M, Fiala M, Way D, Kim KS, Witte MH, Weinand M, Carhart L, Gendelman HE. (1999) Microglial and astrocyte chemokines regulate monocyte migration through the blood-brain barrier in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol*, 155(5):1599-611.

Persidsky Y, Gendelman HE. (2003) Mononuclear phagocyte immunity and the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol*, 74: 691-701.

Pertwee RG. (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem*, 6(8):635-64.

Pertwee RG. (2002) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther*, 95(2):165-74.

Pertwee R. (2004) Receptors and pharmacodynamics: natural and synthetic cannabinoids and endocannabinoids. Guy G.W., Whittle B.A, Robson P.J, editors. The medicinal uses of cannabis and cannabinoids. London: *Pharmaceutical Press*; p. 103-117.

Pertwee RG. (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB₁ receptors. *Life Sci*, 76(12):1307-24.

Pertwee RG. (2008) Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol*, 13(2):147-59.

Peterson PK, Gekker G, Hu S, Cabral G, Lokensgard JR. (2004) Cannabinoids and morphine differentially affect HIV-1 expression in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. *J Neuroimmunol*, 147(1-2):123-6.

Petito CK, Roberts B. (1995) Evidence of apoptotic cell death in HIV encephalitis. *Am J Pathol*, 146(5):1121-30.

Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A. (1999) Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10):5802-7.

Polazzi E, Levi G, Minghetti L. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein stimulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in microglial cultures. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(8):825-31.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felderr CC. (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(3):1020-4.

Price RW, Brew B, Sidtis J, Rosenblum M, Scheck AC, Cleary P. (1988) The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science*, 239(4840):586-92.

Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJ, Jackson SJ, Croxford JL, Pocock JM, Ledent C, Petzold A, Thompson AJ, Giovannoni G, Cuzner ML, Baker D. (2003) Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain*, 126(Pt 10):2191-202.

Pryce G, Baker D (2005) Emerging properties of cannabinoid medicines in management of multiple sclerosis. *Trends Neurosci*, 28: 272-276.

Pryce G, Baker D. (2007) Control of spasticity in a multiple sclerosis model is mediated by CB₁, not CB₂, cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, 150(4):519-25.

Puffenbarger RA, Boothe AC, Cabral GA (2000) Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia*, 29:58-69.

Rafii MS, Aisen Ps. (2009) Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics. *BMC Med*, 19;7:7.

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*, 30(1):77-105.

Ramirez B.G., Blazquez C., Gomez d.P., Guzman M., and De Ceballos M.L. (2005) Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci*, 25:1904-1913.

Rausch DM, Murray EA, Eiden LE. (1999) The SIV-infected rhesus monkey model for HIV-associated dementia and implications for neurological diseases. *J Leukoc Biol*, 65(4):466-74.

Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. (1998) Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*, 71(4):1525-34.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*, 350(2-3):240-4.

Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, 17(4):942-64.

Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cabral GA, Martin BR, Peterson PK. (2007) WIN55,212-2-mediated inhibition of HIV-1 expression in microglial cells: involvement of cannabinoid receptors. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2(2):178-83.

Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE. (2006) Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol*, 70(1):101-11.

Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001). Ultrastructural localization of the CB₁ cannabinoid receptor in μ opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus. *J Neurosci*, 21:823-833.

Rog DJ, Nurmikko TJ, Friede T, Young CA. (2005) Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology*, 65(6):812-9.

Rog DJ, Nurmikko TJ, Young CA. (2007) Oromucosal delta9-tetrahydrocannabinol/cannabidiol for neuropathic pain associated with multiple sclerosis: an uncontrolled, open-label, 2-year extension trial. *Clin Ther*, 29(9):2068-79.

Romero J., Hillard C.J., Calero M., & Rabano A. (2002) Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res*, 100:85-93.

Ross RA, Coutts AA, McFarlane SM, Anavi-Goffer S, Irving AJ, Pertwee RG, MacEwan DJ, Scott RH. (2001) Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology*, 40(2):221-32.

Ross RA. (2003) Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*, 140(5):790-801.

Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzmán M. (2000) The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol*, 58(4):814-20.

Rusnati M, Presta M. (2002) HIV-1 Tat protein and endothelium: from protein/cell interaction to AIDS-associated pathologies. *Angiogenesis*, 5(3):141-51.

Russo P, Strazzullo P, Cappuccio FP, Tregouet DA, Lauria F, Loguercio M, Barba G, Versiero M, Siani A. (2007) Genetic variations at the endocannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) are associated with obesity phenotypes in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(6):2382-6.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152(7):1092-101.

Sabatier JM, Vives E, Mabrouk K, Benjouad A, Rochat H, Duval A, Hue B, Bahraoui E. (1991) Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 65(2):961-7.

Sagan S, Venance L, Torrens Y, Cordier J, Glowinski J, Giaume C. (1999) Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci*, 11:691-699.

Sagredo O, González S, Aroyo I, Pazos MR, Benito C, Lastres-Becker I, Romero JP, Tolón RM, Mechoulam R, Brouillet E, Romero J, Fernández-Ruiz J. (2009) Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia*, 57(11):1154-67.

Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M. (2002) Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett*, 329:13-16.

Sánchez AJ, González-Pérez P, Galve-Roperh I, García-Merino A. (2006) R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)-pyrrolo-[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone (WIN-2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces encephalitogenic T cell apoptosis: partial involvement of the CB(2) receptor. *Biochem Pharmacol*, 72(12):1697-706.

Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M. (1998a) Delta 9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in a C6 glioma cells. *FEBS Lett*, 436:6-10.

- Sánchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzmán M. (1998b) Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol* 54:834-843.
- Sánchez C, de Ceballos ML, Gómez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JWH, Ramón y Cajal S, Guzmán M. (2001a) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res*, 61:5784-5789.
- Sánchez C, Rueda D, Seguí B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzmán M. (2001b) The CB₁ cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein FAN. *Mol Pharmacol*, 59:955-959.
- Sánchez MG, Ruiz-Llorente L, Sánchez AM, Díaz-Laviada I. (2003) Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal*, 15(9):851-9.
- Sánchez MG, Sanchez AM, Collado B, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Carmena MJ, Prieto JC, Diaz-Laviada I. (2005) Expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue. *Eur J Pharmacol*, 515(1-3):20-7.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 64(2):193-8.
- Schmid PC, Kuwae T, Krebsbach RJ, Schmid HHO. (1997) Anandamide and other N-acyl ethanolamines in mouse peritoneal macrophages. *Chem Phys Lipids*, 87:103-110.
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. (1999) Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science*, 283(5403):857-60.
- Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW (1999) Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem*, 47: 719-730.
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 285(5433):1569-72.
- Schweitzer P. (2000) Cannabinoids decrease the K(+) M-current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci*, 20(1):51-8.
- Ségui B, Cu villier O, Adam-Klages S, Garcia V, Malagarie-Cazenave S, Lévêque S, Caspar-Bauguil S, Coudert J, Salvayre R, Krönke M, Levade T. (2001) Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest*, 108(1):143-51.
- Selkoe DJ. (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science*, 275(5300):630-1.

Shao Y, Gearing M, Mirra SS. (1997) Astrocyte-apolipoprotein E associations in senile plaques in Alzheimer disease and vascular lesions: a regional immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(4):376-81.

Sheng WS, Hu S, min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson P. (2005) Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia*, 49:211-219.

Sher F, Balasubramaniyan V, Boddeke E, Copray S. (2008) Oligodendrocyte differentiation and implantation: new insights for remyelinating cell therapy. *Curr Opin Neurol*, 21(5):607-14.

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (2001) Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem*, 49: 931-937.

Shina D, Bonner TI, Bhat NR, Matsuda LA. (1998) Expression of the CB₁ cannabinoid receptor in macrophage-like cells from brain tissue: immunochemical characterization by fusion protein antibodies. *J Neuroimmunol*, 82(1):13-21.

Shire D, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Oustric D, Pessègue B, Bonnin-Cabanne O, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. (1996) Molecular cloning, expression and function of the murine CB₂ peripheral cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1307(2):132-6.

Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A. (1996) The ALIamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 93(9):3984-9.

Smart D, Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Fowler CJ. (2002) 'Entourage' effects of N-acyl ethanolamines at human vanilloid receptors. Comparison of effects upon anandamide-induced vanilloid receptor activation and upon anandamide metabolism. *Br J Pharmacol*, 136(3):452-8.

Smith PF. (2007) Symptomatic treatment of multiple sclerosis using cannabinoids: recent advances. *Expert Rev Neurother*, 7(9):1157-63.

Snider NT, Kornilov AM, Kent UM, Hollenberg PF. (2007) Anandamide metabolism by human liver and kidney microsomal cytochrome p450 enzymes to form hydroxyeicosatetraenoic and epoxyeicosatrienoic acid ethanolamides. *J Pharmacol Exp Ther*, 321(2):590-7.

Sopper S, Sauer U, Hemm S, Demuth M, Müller J, Stahl-Hennig C, Hunsmann G, ter Meulen V, Dörries R. (1998) Protective role of the virus-specific immune response for development of severe neurologic signs in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol*, 72(12):9940-7.

Stefano GB, Liu Y, Goligorsky MS. (1996) Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J Biol Chem*, 271: 19238-42.

Stella N. (2004) Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*, 48(4):267-277.

Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. (2007) PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res*, 2007:95974.

Strelow LI, Janigro D, Nelson JA. (2001) The blood-brain barrier and AIDS. *Adv Virus Res*, 56:355-88.

Strohmeyer R, Rogers J. (2001) Molecular and cellular mediators of Alzheimer's disease inflammation. *J Alzheimers Dis*, 3(1):131-157.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215(1):89-97.

Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Nakane S, Kondo H, Waku K, Ishima Y, Watanabe K, Yamamoto I. (1997) Is the cannabinoid CB₁ receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca²⁺ transient in NG108-15 cells. *J Biochem*, 122(4):890-5.

Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*, 45(5):405-46.

Sun GY, Xu J, Jensen MD, Yu S, Wood WG, Gonzalez FA, Simonyi A, Sun AY, Weisman GA. (2005) Phospholipase A2 in astrocytes: responses to oxidative stress, inflammation, and G protein-coupled receptor agonists. *Mol Neurobiol*, 31: 27-41.

Sun Y, Alexander SP, Kendall DA, Bennett AJ. (2006) Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 6):1095-7.

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

Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tsuchiya D, Chishiro S, Saeki M, Taniguchi T, Shimohama S, Tooyama I. (2007) Microglial transplantation increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett*, 581(3):475-8.

Tham CS, Whitaker J, Luo L, Webb M. (2007) Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Lett*, 581(16):2899-904.

Tolón RM, Núñez E, Pazos MR, Benito C, Castillo AI, Martínez-Orgado JA, Romero J. (2009) The activation of cannabinoid CB₂ receptors stimulates *in situ* and *in vitro* beta-amyloid removal by human macrophages. *Brain Res*, 1283: 148-154.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 338(5):278-85.

Trapp BD, Bö L, Mörk S, Chang A. (1999) Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol*, 98(1):49-56.

Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, & Walker JM. (1998a) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83:393-411.

Tsou K., Nogueron M.I., Muthian S., Sanudo-Pena M.C., Hillard C.J., Deutsch D.G., & Walker J.M. (1998b) Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large

neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci. Lett.* 254:137-140.

Tuppo EE, Arias HR. (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(2):289-305.

van der Stelt M, van Kuik JA, Bari M, van Zadelhoff G, Leeflang BR, Veldink GA, Finazzi-Agrò A, Vliegenthart JF, Maccarrone M. (2002) Oxygenated metabolites of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: conformational analysis and interaction with cannabinoid receptors, membrane transporter, and fatty acid amide hydrolase. *J Med Chem*, 45(17):3709-20.

van der Stelt M, Di Marzo V. (2005) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*, 7(1-2):37-50.

van der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Matias I, Petrosino S, De Filippis D, Micale V, Steardo L, Drago F, Iuvone T, Di Marzo V. (2006) Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci*, 63(12):1410-24.

Vaney C, Heinzel-Gutenbrunner M, Jobin P, Tschopp F, Gattlen B, Hagen U, Schnelle M, Reif M. (2004) Efficacy, safety and tolerability of an orally administered cannabis extract in the treatment of spasticity in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Mult Scler*, 10(4):417-24.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science* 310: 329-332.

Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ (1997). Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 12: 913-919.

Wade DT, Makela P, Robson P, House H, Bateman C. (2004) Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients. *Mult Scler*, 10(4):434-41.

Wade DT, Makela PM, House H, Bateman C, Robson P. (2006) Long-term use of a cannabis-based medicine in the treatment of spasticity and other symptoms in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 12(5):639-45.

Waksman Y., Olson J.M., Carlisle S.J., & Cabral G.A. (1999) The central cannabinoid receptor (CB₁) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 288:1357-1366.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880):535-9.

Walter L., Franklin A., Witting A., Moller T., & Stella N. (2002) Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem*, 277 :20869-20876.

- Walter L., Franklin A., Witting A., Wade C., Xie Y., Kunos G., Mackie K., Stella N. (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci*, 23:1398-1405.
- Walter L, Stella N (2003) Endothelin-1 increases 2-arachidonyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia*, 44:85-90.
- Walther S, Mahlberg R, Eichmann U, Kunz D (2006). Delta-9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia, *Psychopharmacology (Berl)*, 185: 524-528.
- Watson K, Edwards RJ. (1999) HIV-1-trans-activating (Tat) protein: both a target and a tool in therapeutic approaches. *Biochem Pharmacol*, 58(10):1521-8.
- Weber A, Ni J, Ling KH, Acheampong A, Tang-Liu DD, Burk R, Cravatt BF, Woodward D. (2004) Formation of prostamides from anandamide in FAAH knockout mice analyzed by HPLC with tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*, 45: 757-763.
- Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. (2006) A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem*, 281(48):36569-78.
- Wesselingh SL, Power C, Glass JD, Tyor WR, McArthur JC, Farber JM, Griffin JW, Griffin DE. (1993) Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. *Ann Neurol*, 33(6):576-82.
- Westlake T.M., Howlett A.C., Bonner T.I., Matsuda L.A., & Herkenham M. (1994) Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience*, 63:637-652.
- Westmoreland SV, Halpern E, Lackner AA. (1998) Simian immunodeficiency virus encephalitis in rhesus macaques is associated with rapid disease progression. *J Neurovirol*, 4(3):260-8.
- White JA, Manelli AM, Holmberg KH, Van Eldik LJ, Ladu MJ. (2005) Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol Dis*, 18(3):459-65.
- Wiley JL, Compton DR, Dai D, Lainton JA, Phillips M, Huffman JW, Martin BR. (1998) Evaluation of cannabimimetic effects of structural analogs of anandamide in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 285(3):995-1004.
- Williams KC, Corey S, Westmoreland SV, Pauley D, Knight H, deBakker C, Alvarez X, Lackner AA. (2001) Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J Exp Med*, 193(8):905-15.
- Williamson J, Goldman J, Marder KS. (2009) Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist*, 2009 Mar;15(2):80-6.
- Witting A, Stella N. (2004) Cannabinoid signaling in glial cells in health and disease. *Current Neuropharmacol*, 2.
- Witting A, Chen L, Cudaback E, Straiker A, Walter L, Rickman B, Möller T, Brosnan C, Stella N. (2006) Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts

endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(16):6362-7.

Wotherspoon G, Fox A, McIntyre P, Colley S, Bevan S, Winter J. (2005) Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience*, 135(1):235-45.

Wyss-Coray T., Mucke L. (2002) Inflammation in neurodegenerative disease-A double-edged sword. *Neuron*, 35:419-432.

Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*, 9(4):453-7.

Wyss-Coray T. (2006) Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med*, 12(9):1005-15.

Xia W, Xu H. (2004) Amyloid precursor protein, a practical approach. CRC Press. Boca Raton, FL.

Xu J, Chavis JA, Racke MK, Drew PD. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of astrocytes. *J Neuroimmunol*, 176(1-2):95-105.

Yang H, Zhang J, Andreasson K, Chen C. (2008) COX-2 oxidative metabolism of endocannabinoids augments hippocampal synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci*, 37(4):682-95.

Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P (2006) COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol*, 6:12.

Younkin SG. (1998) The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris*, 92(3-4):289-92.

Yu M, Ives D, Ramesha CS. (1997) Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 272(34):21181-6.

Zajicek J, Fox P, Sanders H, Wright D, Vickery J, Nunn A, Thompson A (2003) Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 362: 1517-1526.

Zajicek JP, Sanders HP, Wright DE, Vickery PJ, Ingram WM, Reilly SM, Nunn AJ, Teare LJ, Fox PJ, Thompson AJ (2005) Cannabinoids in multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76: 1664-1669.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10):5780-5.

Zink MC, Spelman JP, Robinson RB, Clements JE. (1998) SIV infection of macaques-modeling the progression to AIDS dementia. *J Neurovirol*, 4(3):249-59.

Zink MC, Clements JE. (2002) A novel simian immunodeficiency virus model that provides insight into mechanisms of human immunodeficiency virus central nervous system disease. *J Neurovirol*, 8 Suppl 2:42-8.

Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. (2003) Anandamide initiates Ca(2+) signaling via CB₂ receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 140(8):1351-62.

Zygmunt PM, Peterson J, Anderson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400:452-457.

