



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

“Metabolismo de los endocannabinoides en el sistema nervioso central en procesos de envejecimiento fisiológico y patológico”

Ana Clara Pascual

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014

DIRECTORAS DE TESIS:

Dra. Susana Juana Pasquaré

Dra. Norma María Giusto

PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Lípidos y Transducción de Señales del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 7 de Septiembre de 2010 y el 19 de Noviembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. Susana Juana Pasquaré, Profesora Adjunta de la cátedra de Química Biológica II e Investigadora categorizada de la Universidad Nacional del Sur, y la codirección de la Dra. Norma María Giusto, Profesora Emérita de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Principal del CONICET”.

El presente trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por el CONICET (PIP N° 112-200801-02500 y N° 112-201101-00437), por la UNS (PGI 24/B137 y 24/B207), y por la Fundación Florencio Fiorini. Agradezco a dichas instituciones y al INIBIBB por hacer posible la realización de esta Tesis.

19 de Noviembre de 2014

Ana Clara Pascual

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo
la calificación de (.....)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la UNS, al INIBIBB y al CONICET por brindarme todos los recursos necesarios y darme la posibilidad de formarme profesionalmente.

A mi directora, la Dra. Susana Pasquaré, por enseñarme, guiarme, acompañarme en todo momento, por escucharme y aconsejarme tanto en el ámbito científico como en otros aspectos de la vida. Gracias por todos los momentos compartidos y por darme la posibilidad de crecer profesionalmente.

A mi codirectora, la Dra. Norma Giusto, por su constante predisposición, por su enseñanza y por estar siempre ante cada inquietud.

A la Dra. Mónica Ilincheta, por transmitirme sus consejos y experiencias y además por su constante positivismo.

A la Dra. Virginia Gaveglione porque me enseñó mucho a lo largo de todos estos años, por estar siempre que necesité ayuda, por sus consejos a nivel científico y personal y por su amistad.

A los compañeros del Laboratorio de la Dra. Marta Aveldaño por su ayuda, consejos y charlas durante todos estos años.

A todos los integrantes del INIBIBB, quienes siempre estuvieron dispuestos a brindar su ayuda.

A la Dra. María L. de Ceballos por el aporte de importantísimos reactivos y materiales para la realización de parte de esta Tesis Doctoral. Al Prof. Ricardo Camina por su asesoramiento en los métodos estadísticos empleados en este trabajo y por su constante predisposición ante cualquier duda o consulta.

A mis compañeras de la cátedra de Química Biológica II, Norma, Susana, Idi, Virginia, Romina, y Graciela, por enseñarme a enseñar y por transmitirme su amor por la docencia.

A mi Canastita, Meli, Vir G, Vir B, Pao, Sofi, Vane, Connie y Sandra, por sus consejos y apoyo a nivel científico, pero por sobre todo gracias por su amistad, por su constante aliento y buenos deseos, por ser excelentes personas, y por hacer que el venir a trabajar sea mucho más divertido. También a las nuevas incorporaciones de la canastita Emma y Leandrito porque disfruto mucho verlos crecer.

A mis amigas de la "UNI" y de "Agricu", Romi y Pitu, Vale y Mer, porque más allá de compartir un espacio físico, compartimos muchísimos momentos inolvidables juntas y formamos una gran amistad que perdurará.

A mis amigas de la vida, que yo elegí, las que estuvieron en los momentos lindos pero también en los más difíciles, mis hermanas por elección, Gui, Mari, Nati y Pitu, gracias por todo. A Juli y a Ámbar, mis sobrinas postizas, porque con una sonrisa o una patadita me hacen olvidar de todos los problemas.

A mis papás porque gracias a ellos soy quien soy, por incentivar me, apoyarme y demostrarme su amor incondicional en todo momento, porque fueron son y serán mi sostén. A mi hermano, por su constante presencia en mi vida, por su cariño y por sus abrazos reparadores.

A mi familia, tíos, abuelos, primos, porque de una u otra manera me acompañaron a lo largo de la vida.

A mi novio, por ser mi amor, el compañero que elegí desde hace 10 años, o tal vez un poco más, por tener la palabra justa en el momento preciso, por bancarme y aconsejarme en todos los momentos buenos y malos. A su familia con la cual compartí muchos momentos y que me hizo sentir muy querida.

A todos ellos ¡¡¡muchas gracias!!!

Ana Clara

Dedicado a mis padres que
desde la tierra o desde el cielo
me dan su apoyo y amor
incondicional.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVOS GENERALES.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
1. <i>Modelo experimental</i>	34
2. <i>Obtención de las diferentes fracciones de la corteza cerebral de rata</i>	34
2.1. Aislamiento de las fracciones de membrana y soluble.....	34
2.2. Aislamiento de la fracción sinaptosomal.....	36
3. <i>Obtención de los sustratos lipídicos radioactivos empleados en los ensayos enzimáticos</i>	38
3.1. Obtención de [2- ³ H]fosfatidilcolina, [2- ³ H]diacilglicerol y [2- ³ H]triacilglicerol a partir de la incubación de la retina bovina con [2- ³ H]glicerol.....	38
3.1.1. Incubación de las retinas bovinas con [2- ³ H]glicerol.....	38
3.1.2. Extracción y purificación de los lípidos radiomarcados de las retinas.....	39
3.1.3. Separación de los lípidos por cromatografía en capa fina.....	40
3.1.4. Identificación y visualización de los lípidos.....	41
3.2. Obtención de [2- ³ H]diacilglicerol a partir de la hidrólisis de la [2- ³ H]fosfatidilcolina de la retina bovina.....	42
3.3. Obtención de [2- ³ H]monoacilglicerol a partir de la hidrólisis del [2- ³ H]triacilglicerol de la retina bovina.....	43
4. <i>Análisis de la composición de los ácidos grasos de los [2-³H]diacilgliceroles y de los [2-³H]monoacilgliceroles</i>	44
4.1. Obtención de los metil ésteres de ácidos grasos.....	44
4.2. Análisis de los metil ésteres de ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa.....	45
5. <i>Métodos analíticos</i>	45
5.1. Determinación de fósforo fosfolipídico.....	45
5.2. Determinación de proteínas.....	46
5.3. Determinación de la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido.....	47
6. <i>Determinación de las actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo de los endocannabinoides</i>	47
6.1. Determinación de las actividades enzimáticas que intervienen en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol.....	47
6.1.1. Ensayo de la actividad de la enzima diacilglicerol lipasa.....	47
6.1.2. Ensayo de la actividad de la enzima lisofosfatidato fosfohidrolasa.....	49
6.1.3. Ensayo de la hidrólisis de los monoacilgliceroles con distinta composición en acilos y del 2-araquidonoilglicerol.....	52
6.2. Determinación de la actividad de la enzima ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de la araquidonoiletanolamida.....	54
6.3. Blancos de reacción enzimática.....	55
6.4. Evaluación de la acción de los inhibidores de la monoacilglicerol lipasa y de la ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de los endocannabinoides.....	55

7. Ensayos enzimáticos para evaluar la acción de agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2	56
7.1. Acción de agonistas o antagonistas de los receptores CB1 y CB2 sobre el metabolismo de los endocannabinoides.....	56
7.2. Acción de un agonista mixto en presencia de un antagonista de los receptores CB1 o CB2 sobre el metabolismo de los endocannabinoides.....	57
8. Ensayo de la degradación de los endocannabinoides en los sinaptosomas incubados con diferentes conformaciones del péptido beta amiloide	59
8.1. Preparación del péptido beta amiloide.....	59
8.2. Preincubación de los sinaptosomas con el péptido beta amiloide y realización de los ensayos enzimáticos.....	60
9. Inmunodetección de proteínas por Western Blot	62
9.1. Preparación de las muestras.....	62
9.2. Electroforesis y transferencia de las proteínas.....	62
9.3. Bloqueo, incubaciones con anticuerpos e inmunodetección.....	63
10. Microscopía electrónica de transmisión	66
11. Análisis estadístico de los datos obtenidos	67

CAPÍTULO I: ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL 2-ARAQUIDONOILGLICEROL

Sección 1: El metabolismo del 2-araquidonoilglicerol en el envejecimiento fisiológico	68
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
RESULTADOS	70
1. Expresión de las enzimas que intervienen en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles	70
2. Actividad de la enzima diacilglicerol lipasa en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles	73
2.1. Análisis de la composición en ácidos grasos de los sustratos radioactivos.....	73
2.2. Actividad de la enzima diacilglicerol lipasa en las fracciones de membrana y soluble.....	74
2.3. Actividad de la enzima diacilglicerol lipasa en la fracción sinaptosomal.....	75
3. Actividad de la enzima lisofosfatidato fosfohidrolasa en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles	76
3.1. Evaluación de diferentes inhibidores de la monoacilglicerol lipasa en la degradación del monoacilglicerol generado por acción de la lisofosfatidato fosfohidrolasa	77
3.2. Actividad de la enzima lisofosfatidato fosfohidrolasa en las fracciones de membrana y soluble.....	79
3.3. Actividad de la enzima lisofosfatidato fosfohidrolasa en la fracción sinaptosomal	79
4. Actividad de las enzimas que hidrolizan al 2-araquidonoilglicerol en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles	80
4.1. Composición en ácidos grasos del [³ H]monoacilglicerol obtenido a partir del [³ H]triacilglicerol (sustrato C').....	81
4.2. Hidrólisis de los monoacilgliceroles en las fracciones de membrana y soluble.....	81
4.3. Hidrólisis de los monoacilgliceroles en la fracción sinaptosomal.....	83
4.4. Hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en presencia de inhibidores enzimáticos.....	84
4.4.1. Efecto de los inhibidores enzimáticos de la hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en la fracción de membrana.....	85
4.4.2. Efecto de los inhibidores enzimáticos de la hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en la fracción sinaptosomal.....	86

CAPÍTULO I: ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL 2-ARAQUIDONOILGLICEROL

<i>Sección 2: Regulación del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol por agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.....</i>	87
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	88
RESULTADOS.....	89
1. <i>Expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.....</i>	89
1.1. <i>Expresión del receptor CB1 en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.....</i>	89
1.2. <i>Expresión del receptor CB2 en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.....</i>	90
2. <i>Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre la actividad de la diacilglicerol lipasa en la fracción sinaptosomal de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.....</i>	92
3. <i>Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre la actividad de la lisofosfatidato fosfohidrolasa en la fracción sinaptosomal de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.....</i>	94
4. <i>Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre la hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en la fracción sinaptosomal de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.....</i>	97
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO I.....	100

CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LA ANANDAMIDA

<i>Hidrólisis de la anandamida en el envejecimiento fisiológico y su regulación por agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.....</i>	115
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	116
RESULTADOS.....	117
1. <i>Hidrólisis de la anandamida en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.....</i>	117
1.1. <i>Hidrólisis de la anandamida en la fracción de membrana.....</i>	117
1.2. <i>Hidrólisis de la anandamida en la fracción sinaptosomal.....</i>	118
2. <i>Efecto del inhibidor de la ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de la anandamida en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles</i>	118
2.1. <i>Efecto del inhibidor de la ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de la anandamida en la fracción de membrana.....</i>	118
2.2. <i>Efecto del inhibidor de la ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de la anandamida en la fracción sinaptosomal.....</i>	119
3. <i>Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides en la hidrólisis de la anandamida en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.....</i>	120
3.1. <i>Efecto de agonistas de los receptores CB1 y CB2 en la hidrólisis de la anandamida en la corteza cerebral de rata.....</i>	120
3.2. <i>Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores CB1 y CB2 en la hidrólisis de la anandamida en la fracción sinaptosomal de la corteza cerebral de rata.....</i>	122
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO II.....	125

<u>CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LOS ENDOCANNABINOIDES EN UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</u>	134
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	135
RESULTADOS	137
1. <i>Análisis de las distintas conformaciones de los péptidos beta amiloide</i>	137
1.1. Análisis de las conformaciones del péptido beta amiloide 1-40.....	137
1.2. Análisis de las conformaciones del péptido beta amiloide 1-42.....	139
2. <i>Hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas adultas incubadas con el péptido beta amiloide 1-40</i>	142
3. <i>Hidrólisis de la anandamida en sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas adultas incubadas con el péptido beta amiloide 1-40</i>	144
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO III	146
CONCLUSIONES	152
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
TRABAJOS PUBLICADOS	175
PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS	176
ABREVIATURAS	178

RESUMEN

El sistema endocannabinoide es un sistema de comunicación celular que regula diversas funciones fisiológicas en una amplia variedad de células del organismo. Los principales endocannabinoides son el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y la anandamida (AEA). Los endocannabinoides en el sistema nervioso central (SNC) funcionan como mensajeros retrógrados. Se sintetizan en los terminales postsinápticos a partir de diferentes vías, son liberados al espacio sináptico y ejercen su efecto por unión a receptores ubicados en los terminales presinápticos, principalmente inhibiendo la liberación de neurotransmisores.

Entre las numerosas funciones que tienen los endocannabinoides en el SNC, se destaca su rol neuroprotector frente a enfermedades neurodegenerativas. La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las mayores causas de demencias, cuya etiología se atribuye al péptido beta amiloide (β A) que se agrega formando primeramente oligómeros y luego fibrillas que se depositan en forma de placas amiloides. Las enfermedades neurodegenerativas tienen en común que se presentan generalmente en individuos de edad avanzada por lo que se las relaciona íntimamente con el envejecimiento. Se sabe que los endocannabinoides regulan numerosos procesos celulares y moleculares relacionados con el envejecimiento.

En base a esto, los principales objetivos de esta Tesis Doctoral fueron: determinar el metabolismo de los endocannabinoides en el proceso de envejecimiento fisiológico y patológico, y estudiar la modulación de este metabolismo por agonistas y antagonistas de receptores cannabinoides. Los estudios fueron realizados en fracciones de membrana y soluble, y en sinaptosomas de la corteza cerebral (CC) de rata, una de las regiones del cerebro en la que el sistema endocannabinoide ejerce su rol neuroprotector.

Los resultados del metabolismo del 2-AG y de la AEA en el envejecimiento mostraron que existe una desregulación del mismo tanto en los terminales sinápticos como en las membranas de las células de la CC. Con respecto al 2-AG, se observó que

su síntesis en la CC de rata se produce por la acción de las enzimas lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAasa) y diacilglicerol lipasa (DAGL). A su vez, la hidrólisis de este endocannabinoide en los terminales sinápticos de la CC de ratas adultas y seniles así como en membranas de ratas adultas, se produce principalmente por la acción de la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL). Sin embargo, en membranas de la CC de ratas seniles la enzima serina hidrolasa con dominios α/β (ABHD) sería la principal involucrada. En la CC, la desregulación del metabolismo del 2-AG observada en ratas seniles se inclina hacia una disminución de este endocannabinoide, lo cual comprometería su función neuroprotectora.

En cuanto a la AEA, se determinó que su hidrólisis tanto en los terminales sinápticos como en las membranas de la CC, es a través de la enzima ácido graso amidohidrolasa (FAAH). A su vez, se observó que el envejecimiento ejerce un efecto diferente en la degradación de la AEA ya sea que se tratara de las membranas celulares o de los terminales sinápticos. En las membranas de ratas seniles, se observó que la hidrólisis de este endocannabinoide aumenta, lo cual podría comprometer la función antiinflamatoria de la AEA en la CC. Por otra parte, en los terminales sinápticos se observó que la hidrólisis de la AEA disminuye en el envejecimiento, lo cual podría proteger al cerebro frente a los daños neurodegenerativos propios de la edad.

Al analizar los niveles de los receptores CB1 y CB2, se observó que ambos disminuyen en los terminales sinápticos durante el envejecimiento. Teniendo en cuenta estos resultados además de la alteración observada en el metabolismo de los endocannabinoides, se propuso evaluar la regulación de la síntesis y/o de la degradación de los endocannabinoides mediante el uso de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides. Estos estudios mostraron que los antagonistas de receptores CB1 y CB2 aumentarían la disponibilidad del 2-AG y de la AEA en los terminales sinápticos de la CC de ratas seniles. Por otra parte, los agonistas de estos receptores, especialmente del CB2, aumentarían la disponibilidad de la AEA tanto en terminales sinápticos como en membranas de células de la CC de ratas seniles.

Para estudiar la hidrólisis de los endocannabinoides en estadios tempranos y tardíos de la EA, se preincubaron los sinaptosomas de la CC con el péptido β A1-40 en

sus conformaciones de oligómeros (etapas tempranas de la EA) y fibrillas (etapas tardías de la EA). Estos estudios mostraron que la hidrólisis del 2-AG y de la AEA disminuye en el modelo de EA temprana, por lo que los niveles de ambos endocannabinoides se verían aumentados protegiendo a la célula frente a procesos neurodegenerativos. Sin embargo, en el modelo de EA tardía, se observó que la hidrólisis de la AEA disminuye mientras que la degradación del 2-AG aumenta drásticamente comprometiendo los efectos neuroprotectores atribuidos a este endocannabinoide.

En conclusión, los resultados de esta Tesis Doctoral indican que el metabolismo de los endocannabinoides se encuentra desregulado tanto en el envejecimiento fisiológico como en el patológico, lo cual pone en peligro sus funciones neuroprotectoras, y que la modulación de este metabolismo en la senescencia puede darse a través de agonistas y/o antagonistas de los receptores CB1 y/o CB2.

ABSTRACT

The endocannabinoid system is a cell communication mechanism which regulates several physiological functions in a variety of cells. 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and anandamide (AEA) are the main endocannabinoids known to date. In the central nervous system (CNS) endocannabinoids behave as retrograde messengers. They are synthesized by different pathways in postsynaptic endings, released to the synaptic cleft, and they finally exert their functions by coupling to cannabinoid receptors located in presynaptic endings, thus inhibiting neurotransmitter release.

Among the several functions assigned to endocannabinoids in the CNS, is their role as neuroprotective agents against several neurodegenerative diseases. Alzheimer Disease (AD) is one of the major causes of dementia and its etiology is thought to be due to the aggregation of β -amyloid peptide (β A) which firstly generates oligomers and subsequently fibril deposits known as amyloid plaques. One of the most common factors of neurodegenerative diseases is aging due to the fact that they usually occur in old people. Several studies have in fact shown that endocannabinoids participate in the modulation of numerous cellular and molecular processes related to aging.

In view of this, the main purposes of this Ph. D. Thesis were to: analyze endocannabinoid metabolism in the physiological and pathological aging process, and to study the modulation of this metabolism by cannabinoid receptor agonists and antagonists. These studies were carried out in rat cerebral cortex (CC) membrane and soluble fractions and synaptosomes, a brain area in which endocannabinoids exert their neuroprotective role.

2-AG and AEA hydrolysis and/or synthesis assays in synaptic endings and also in membranes from CC cells during aging showed a deregulation of their metabolism. As to 2-AG, it could be observed that its synthesis in rat CC was carried out by the enzymes lysophosphatidate phosphohydrolase (LPAase) and diacylglycerol lipase (DAGL). Furthermore, its hydrolysis in CC synaptic endings of adult and aged rats and in CC membranes of adult rats was exerted mainly by the enzyme monoacylglycerol

lipase (MAGL). However, in CC membranes of aged rats the main enzyme involved was α/β serine hydrolase domain (ABHD). Deregulation of 2-AG metabolism in CC was observed to favor the decrease of these endocannabinoid levels, though compromising its neuroprotective role.

As to AEA, these studies demonstrated that its hydrolysis either in CC synaptic endings or in CC membranes was carried out by the enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH). In addition, a different effect in AEA breakdown between cell membranes and synaptic endings was observed as a result of aging. In aged CC membranes, its hydrolysis was observed to increase. This could, in turn, compromise AEA antiinflammatory role in CC. On the other hand, AEA hydrolysis in synaptic endings during aging was observed to decrease, possibly protecting the brain against neurodegenerative damages inflicted by aging.

Assays of CB1 and CB2 receptors levels in aged synaptic endings showed they were lower than in adults. Based on these results and on the disarrangement observed in endocannabinoid metabolism, regulation of endocannabinoid hydrolysis and/or synthesis by cannabinoid receptor agonists and antagonists were then assayed. These studies showed an increased 2-AG and AEA availability in CC synaptic endings of aged rats as a result of the presence of CB1 and CB2 receptor antagonists. On the other hand, cannabinoid receptor agonists, particularly through CB2, increased AEA availability either in synaptic endings or cell membranes from CC of aged rats.

Endocannabinoid hydrolysis in early and late AD stages was assayed by preincubating CC synaptosomes with β A1-40 peptide in different conformations: oligomers (mimicking early AD stages) and fibrils (mimicking late AD stages). These studies showed that 2-AG and AEA hydrolysis in the early AD model diminished, thus indicating that both endocannabinoid levels could be increased and therefore protect the cell against neurodegenerative processes. Moreover, in the late AD model AEA hydrolysis decreased while 2-AG breakdown highly increased, thus compromising the neuroprotective role assigned to 2-AG.

Summing up, results from this Ph. D. Thesis show a deregulation in endocannabinoid metabolism either in physiological or pathological aging, which

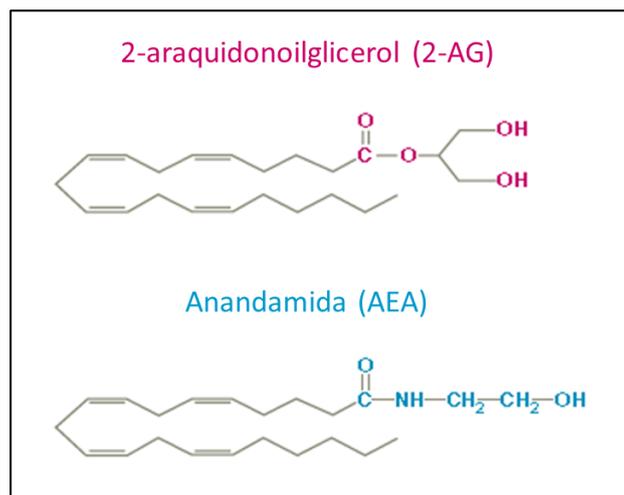
could, in turn, lead to a failure of their neuroprotective functions, and a modulation of this metabolism as a result of aging, which could be exerted by CB1 and/or CB2 receptor agonists and/or antagonists.

INTRODUCCIÓN

El cannabis es un producto natural extraído de la planta *Cannabis sativa* que ha sido utilizado desde hace años con fines recreativos y médicos. En virtud de sus propiedades antieméticas, analgésicas y estimulantes del apetito, se usó en un principio para el tratamiento de distintas enfermedades. Por esta razón, ha sido suministrado en determinados pacientes con el fin de reducir las náuseas y vómitos generados por tratamientos de quimioterapia o radioterapia y la debilidad generalizada causada por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Ha sido utilizado también para tratar el dolor y los espasmos que producen ciertas enfermedades como la esclerosis múltiple y el glaucoma, entre otras (Watson y col., 2000). Su uso es, no obstante, limitado porque produce una serie de efectos colaterales, entre los que se destaca, el riesgo al abuso (Hall y Solowij, 1998).

Muchos años transcurrieron entre la identificación del principio activo del cannabis, el 9-tetrahidrocannabinol (THC) (Mechoulam, 1970), la caracterización (Herkenham y col., 1991; Devane y col., 1988) y el clonado (Matsuda y col., 1990) de su blanco celular, el receptor cannabinoide CB1 (CB1R). Recién en 1992, un grupo de investigadores de la Universidad Hebrea de Jerusalén habló por primera vez de una sustancia que fabrica el cuerpo, la cual es capaz de unirse a los mismos sitios que el THC. A este ligando endógeno o cannabinoide endógeno se lo denominó anandamida o araquidonoiletanolamida (AEA), que significa portador de paz o felicidad interna (Devane y col., 1992). El segundo cannabinoide endógeno o endocannabinoide, el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), fue identificado unos años después (Mechoulam y col., 1995; Sugiura y col., 1995). Entre los años 1994 y 1997, se descubrieron los caminos bioquímicos de síntesis y liberación (Cadas y col., 1996; Di Marzo y col., 1994), de transporte (Beltramo y col., 1997) y de degradación (Cravatt y col., 1996) de los endocannabinoides. También se descubrió otro receptor cannabinoide, conocido como CB2 (CB2R) (Lynn y Herkenham, 1994; Munro y col., 1993). Esto completó el descubrimiento de un nuevo sistema de señalización que se denominó: **“SISTEMA ENDOCANNABINOIDE”**.

Se han identificado varios endocannabinoides, de los cuales la AEA y el 2-AG han sido los más estudiados. Estas moléculas son lípidos derivados del ácido araquidónico (AA) conjugado con etanolamina o glicerol que se encuentran en el cerebro, plasma y tejidos periféricos. De estos dos endocannabinoides, el 2-AG, el cual se encuentra en mayor proporción en el cerebro (Sugiura y col., 2002; Sugiura y col., 1995), es un agonista total de los receptores CB1 (Sugiura y col., 1999a; Sugiura y col., 1997) y CB2 (Gonsiorek y col., 2000; Sugiura y col., 2000). Por su parte, la AEA, si bien se une con mayor afinidad al receptor CB1, es un agonista parcial de este y del CB2 (Hillard, 2000; Sugiura y col., 2000). Además, mientras que el 2-AG es el mayor componente de los 2-monoacilgliceroles (2-MAG) celulares, la AEA representa un 5 % o un porcentaje menor de las N-aciletanolaminas (NAE) celulares (Schmid y col., 2002). La siguiente ilustración muestra las estructuras moleculares de los dos endocannabinoides más importantes:



Estructuras moleculares de los principales endocannabinoides 2-AG y AEA. Ambas moléculas son lípidos derivados del ácido araquidónico conjugado con glicerol, en el caso del 2-AG, o con etanolamina, en el caso de la AEA.

En un principio se demostró que los endocannabinoides eran sintetizados en respuesta a un aumento de la actividad nerviosa o a una actividad física moderada (Sparling y col., 2003). Por otro lado, si bien poseen estructuras moleculares semejantes y ambos se unen a los receptores cannabinoides (CBR), sus precursores y sus rutas biosintéticas son diferentes.

La principal ruta metabólica para la síntesis del 2-AG identificada hasta el momento involucra la acción combinada de una fosfolipasa C (PLC) y una diacilglicerol lipasa (DAGL). La acción de la PLC sobre los fosfolípidos de la membrana que contienen ácido araquidónico (20:4) genera diacilglicerol (DAG), el cual es convertido a 2-AG por acción de la DAGL. Esta enzima, que conduce a la formación de araquidonoil-MAG, fue identificada antes de que el 2-AG fuese reconocido como un componente del sistema endocannabinoide (Prescott y Majerus, 1983). Otra ruta alternativa de formación del DAG es la hidrólisis del fosfatidato (PA) mediante la acción de una PA fosfohidrolasa dependiente de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}). El modelo más ampliamente aceptado en la actualidad es el de la activación de receptores metabotrópicos acoplados a la PLC y a la vía de la DAGL (Stella y col., 1997). Se dispone de abundante literatura sobre las propiedades bioquímicas y la estructura molecular de la PLC de mamífero (Cocco y col., 2006). Sin embargo, a pesar de que la acción de la DAGL en la síntesis del 2-AG ha sido ampliamente aceptada, recién en 2003 se logró clonar las primeras sn1-DAGL específicas. Se identificaron 2 genes que, al ser transfectados en células COS con los cDNA respectivos, hicieron posible la expresión de dos productos: la DAGL α y la DAGL β . Estas dos proteínas en el cerebro adulto mostraron una localización postsináptica (Bisogno y col., 2003).

Otra vía de formación menos estudiada del 2-AG es mediante la acción de una fosfolipasa A de tipo 1 (PLA1) sobre el fosfatidilinositol (PI) que genera un lisofosfolípido, el cual puede hidrolizarse por la acción de una liso-PLC produciendo 2-AG (Tsutsumi y col., 1994; Ueda y col., 1993).

Por último, en 2002, se observó que el 2-AG puede ser sintetizado a partir del 2-araquidonoil lisofosfatidato (2-araquidonoil-LPA) por la acción de una lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAasa) (Nakane y col., 2002). No por haber sido la última en descubrirse, esta vía de síntesis es la menos importante. En efecto, se cree que sería de amplia relevancia en el sistema nervioso debido a que se ha encontrado LPA conteniendo ácido araquidónico en una proporción significativa en cerebro de rata (Sugiura y col., 1999b).

Si bien la AEA se descubrió con anterioridad al 2-AG, esta ha sido mucho menos estudiada. Además, si bien se cree conocer las vías de síntesis de este endocannabinoide, aún hay ciertas controversias no totalmente esclarecidas. La “vía canónica” de síntesis de la AEA fue caracterizada entre 1994 y 1996 en cultivos primarios de cerebro de rata. De acuerdo con este modelo, la AEA es liberada por hidrólisis del precursor fosfolípido N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) mediante la acción de una fosfolipasa D (PLD) exclusiva, denominada N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD), la cual reconoce preferentemente a las fosfatidiletanolaminas (PE) sustituidas con un grupo N-acil por sobre otros fosfolípidos (Okamoto y col., 2004; Cadas y col., 1996; Di Marzo y col., 1994). La NAPE-PLD es una enzima de membrana, de localización presináptica y, si bien ha sido clonada, aún se desconocen sus reguladores fisiológicos (Ueda y col., 2013; Egertova y col., 2008; Okamoto y col., 2004). Las concentraciones del precursor de la AEA, la NAPE, son bajas en condiciones basales o de reposo. Sin embargo, aumentan rápidamente cuando las neuronas están expuestas a un estímulo que produce un incremento de Ca^{2+} intracelular (Cadas y col., 1996). La biosíntesis de la NAPE se produce a través de dos reacciones: primero se transfiere el ácido araquidónico de la posición sn-2 de un fosfolípido (donde reside normalmente este ácido graso) a la posición sn-1 de una lisofosfatidilcolina (LPC). Posteriormente, la fosfatidilcolina (PC) formada cede el ácido graso de la posición sn-1 al grupo amino libre de la PE formando la NAPE. Esta reacción secuencial es dependiente de Ca^{2+} y constituye el paso limitante de la formación de la AEA debido a que la acción subsiguiente, catalizada por la NAPE-PLD, no distingue entre las NAPE que contienen N-acil sustituyentes diferentes (Ueda y col., 2013). Aun así, la o las enzimas responsables de la generación de la PC y de la NAPE todavía no han sido identificadas (Ueda y col., 2013).

Si bien la “vía canónica” descrita recientemente es el camino de síntesis de la AEA más aceptado, se conocen otras vías paralelas. Estas parten de la NAPE pero en lugar de utilizar la NAPE-PLD, actúan diferentes enzimas. Una de las vías fue descrita en macrófagos expuestos a lipopolisacárido e involucra una PLC que convierte a la NAPE en fosfo-anandamida (pAEA) y una fosfatasa que cliva a la pAEA produciendo AEA y fosfato libre (Liu y col., 2006). En otra de las vías alternativas, la NAPE puede ser

desacilada en las posiciones sn-1 y sn-2 por la enzima serina hidrolasa con dominios α/β 4 (ABHD4) para producir glicerofosfo-anandamida. Por último, este intermediario puede ser transformado en AEA por clivaje de su unión fosfodiéster por la glicerofosfodiéster fosfodiesterasa 1 (GDE1) (Simon y Cravatt, 2006). La existencia de múltiples rutas para la síntesis de la AEA refleja la diversidad de estímulos capaces de desencadenar la producción de este endocannabinoides (Liu y col., 2006; Di Marzo y col., 1994). Por último, se ha descrito que la NAPE puede ser hidrolizada a N-araquidonoil-lisoPE por una PLA1 o fosfolipasa A de tipo 2 (PLA2), la cual puede ser sustrato de una liso-PLD para generar AEA (Sun y col., 2004).

Una vez que se sintetizan, los endocannabinoides pueden actuar sobre los receptores en la misma célula en la que se formaron o pueden ser liberados al espacio extracelular donde viajan con la ayuda de ciertas proteínas de transporte hasta encontrar blancos más distantes (Piomelli, 2003). En la actualidad, la mayor parte de los grupos de investigación cree que la síntesis de los endocannabinoides es “a demanda” debido a que sus niveles basales son muy bajos comparados con otros neurotransmisores pero pueden ser incrementados por estimulación de la neurona con agentes despolarizantes de membrana (Stella y col., 1997). Sin embargo, en 2010 Maccarrone y colaboradores proponen revisar este dogma argumentando que existirían depósitos intracelulares de almacenaje de la AEA, conocidos como adiposomas (Maccarrone y col., 2010).

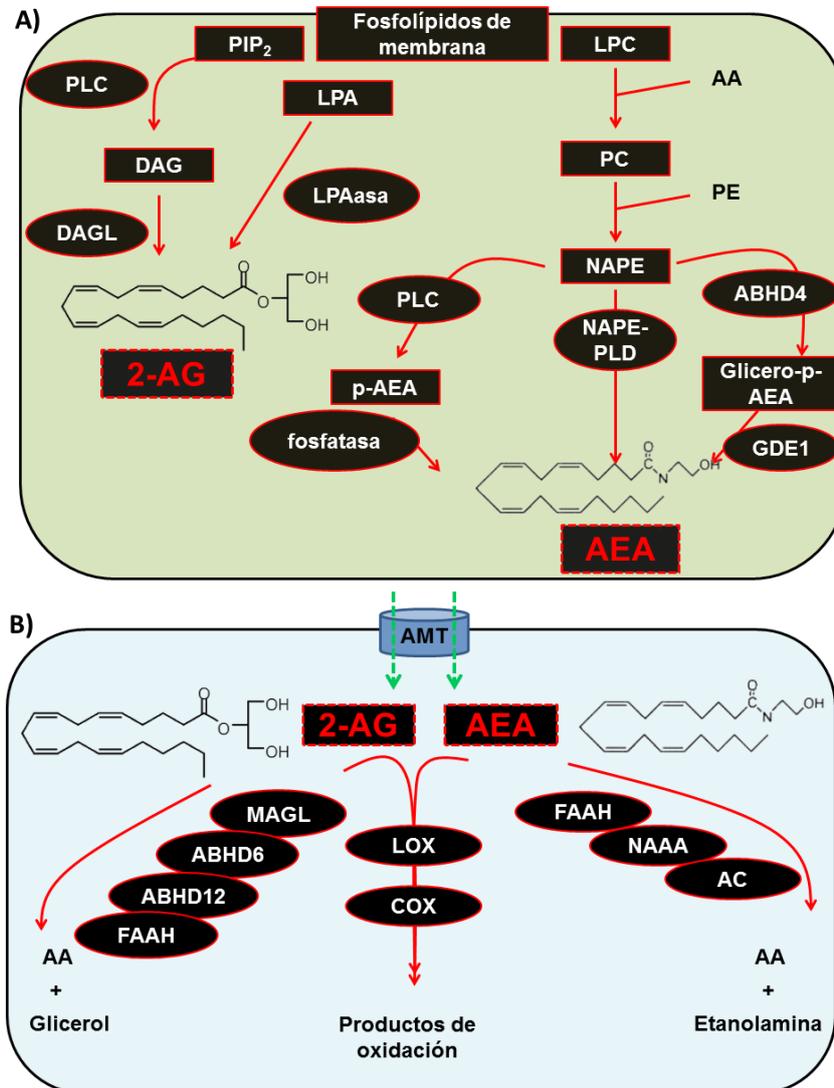
La señalización desencadenada por los endocannabinoides termina con un proceso que comprende dos etapas: 1) el transporte hacia el interior de la célula, y 2) la degradación de la molécula señal. Con respecto a la primera etapa, se han propuesto varios modelos descriptos principalmente para la AEA, a saber: a) transporte facilitado por una proteína transportadora, b) difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración derivado de su catabolismo en el que el endocannabinoides es secuestrado en compartimentos intracelulares antes de su degradación, c) difusión pasiva a favor de un gradiente dado por el propio metabolismo del cannabinoides y su inmediata degradación, y d) endocitosis relacionada con caveolas (Yates y Barker, 2009). De todos ellos, el más aceptado es el modelo de transporte mediado por una proteína transportadora, la cual ha sido denominada “transportador de membrana de

la AEA" (AMT). A pesar de que su nombre parecería indicar que es un transportador exclusivo de la AEA, se sabe que puede mediar el transporte de ambos endocannabinoides (Basavarajappa, 2007; Beltramo y col., 1997).

La degradación del 2-AG puede tomar distintos caminos ya sea a través de la ruptura por hidrólisis que genera AA y glicerol o a través de la oxidación por acción de ciertas enzimas como, por ejemplo, la ciclooxigenasa-2 (COX-2) o la 12-lipooxigenasa (12-LOX) (Moody y col., 2001; Kozak y col., 2000). La principal enzima que hidroliza al 2-AG en el cerebro es la monoacilglicerol lipasa (MAGL) y se encuentra distribuida en los terminales sinápticos entre el soluble y la membrana (Dinh y col., 2004; Dinh y col., 2002). Sin embargo, la serina hidrolasa con dominios α/β 6 (ABHD6) que reside en los terminales postsinápticos y la serina hidrolasa con dominios α/β 12 (ABHD12) que se expresa principalmente en microglía, contribuyen a su hidrólisis en un 4 % y 9 %, respectivamente (Savinainen y col., 2012; Schlosburg y col., 2010). La ácido graso amidohidrolasa (FAAH), que se encuentra en la membrana de espinas dendríticas, también parecería contribuir a la inactivación del 2-AG (Blankman y col., 2007; Gulyas y col., 2004; Goparaju y col., 1999; Di Marzo y col., 1998a). Se han descrito caminos alternativos a la hidrólisis enzimática y a la oxidación como vías catabólicas del 2-AG, aunque no han sido estudiados en profundidad. Ellos son: a) la acción de la MAG quinasa que produce 2-araquidonoil-LPA el cual puede ser metabolizado a PA por una transacilación dependiente de la coenzima A (Simpson y col., 1991), y b) la acilación del 2-AG que forma DAG (Schmid y col., 2002; Sugiura y col., 2002).

La principal vía de degradación de la AEA es mediante la hidrólisis enzimática por la FAAH que genera AA y etanolamina (Cravatt y col., 1996; Maurelli y col., 1995; Ueda y col., 1995), aunque también pueden actuar otras hidrolasas. La amidasa ácida que hidroliza a las N-acetiletanolaminas (NAAA) (Ueda y col., 2001) y la ceramidasa ácida (AC) (Park y Schuchman, 2006; Li y col., 1998) son también capaces de hidrolizar a la AEA. No obstante, en virtud de que sus pH óptimos son menores al de la FAAH y, además, poseen muy poca afinidad por este endocannabinoide, se cree que su rol en la degradación de la AEA no sería relevante (Piomelli, 2014). La AEA, al igual que el 2-AG, también puede ser metabolizada por lipooxigenasas y ciclooxigenasas (Starowicz y col., 2013; Woodward y col., 2008).

La siguiente ilustración muestra las vías metabólicas más importantes de síntesis y degradación del 2-AG y de la AEA:



Principales vías involucradas en la: A) síntesis y B) degradación de los endocannabinoides 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y anandamida (AEA). El 2-AG puede formarse a partir del 1) fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), por acción secuencial de una fosfolipasa C (PLC) y de una diacilglicerol lipasa (DAGL), o 2) lisofosfatidato (LPA) por acción de una lisofosfatidato fosfolipasa (LPAasa). La AEA puede formarse a partir del precursor N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) a través de tres vías: 1) una que involucra la acción de la N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD), 2) otra en la que una PLC genera fosfo-anandamida (pAEA) sobre la cual actúa una fosfatasa, y 3) la vía de la serina hidrolasa con dominios α/β 4 (ABHD4) que genera glicero-pAEA sobre la cual actúa la glicerofosfodiéster fosfodiesterasa 1 (GDE1). La degradación de los endocannabinoides puede darse por su hidrólisis o por su oxidación mediante distintas lipooxigenasas (LOX) o ciclooxigenasas (COX). En la hidrólisis del 2-AG participan la monoacilglicerol lipasa (MAGL), la serina hidrolasa con dominios α/β 6 (ABHD6) o con dominios α/β 12 (ABHD12), y la ácido graso amidohidrolasa (FAAH). La AEA puede ser hidrolizada por la FAAH, por la amidasa ácida que hidroliza N-acetiletanolaminas (NAAA), y por la ceramidasa ácida (AC).

Los principales receptores a los cuales se unen el 2-AG y la AEA, y que median su acción, son los receptores cannabinoides CB1 y CB2. Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a la proteína G (GPCR) (Howlett y col., 2002). El receptor CB1 ha sido identificado como el más prevalente en el cerebro y desde un principio se lo ha relacionado con numerosas funciones a nivel neuronal (Matsuda y col., 1990). Su expresión en distintas zonas del cerebro y en diferentes subpoblaciones neuronales ha sido ampliamente estudiada. Se ha observado que este receptor se localiza principalmente en los axones y en los terminales sinápticos (Mackie, 2005; Marsicano y Lutz, 1999; Matsuda y col., 1993; Herkenham y col., 1991). Por su parte, el receptor CB2 ha estado relacionado desde un primer momento con los tejidos periféricos y principalmente con las células del sistema inmune. Es por esta razón que durante algunos años se refirió a él como receptor CB periférico (Lynn y Herkenham, 1994; Munro y col., 1993), no pudiéndose detectar su expresión en cerebros sanos (Griffin y col., 1999; Galiegue y col., 1995; Munro y col., 1993). Sin embargo, estudios relativamente recientes reportaron la presencia del receptor CB2 funcional en progenitores neuronales, neuronas y células endoteliales (Viscomi y col., 2009; Brusco y col., 2008; Palazuelos y col., 2006; Van Sickle y col., 2005). También se ha podido determinar que este receptor cannabinoide se encuentra presente en el soma y en las dendritas de las neuronas (Brusco y col., 2008). Gong y colaboradores cuantificaron el ARNm para ambos receptores, demostraron que el que codifica para el CB2R se encuentra en menor proporción que el del CB1R, y también establecieron la localización del CB2R en cerebro de rata (Gong y col., 2006). A pesar de los numerosos estudios que indican la presencia del CB2R en el cerebro, su existencia en este tejido sigue siendo tema de controversia.

Los receptores CB1 y CB2 median su señalización principalmente acoplados a las proteínas G_i y G_o . No obstante, bajo ciertas condiciones y con ciertos agonistas se ha demostrado que pueden acoplarse a las proteínas G_s y $G_{q/11}$ (Howlett y col., 2002). La activación del receptor CB1 por unión de un ligando inhibe a la adenilil ciclasa, activa la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), inhibe los canales de Ca^{2+} gatillados por voltaje y activa los canales rectificadores de potasio ligados a las proteínas G (Howlett y col., 2002). La activación del receptor CB2 tiene

consecuencias similares a las del CB1 con la diferencia de que la modulación de los canales iónicos es más variable (Howlett y col., 2002).

Si bien los endocannabinoides median su acción principalmente a través de su unión a los receptores CB, también pueden interactuar con otros receptores del tipo GPCR y con ciertos canales iónicos. Entre los canales iónicos, el más conocido y caracterizado es el receptor vainilloide de tipo 1 (TRPV1), al cual es capaz de unirse la AEA. Los endocannabinoides pueden también interactuar con varios tipos de canales como el de potasio, el de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ y el de los receptores de serotonina 5-HT₃, entre otros (Oz, 2006). Otro receptor perteneciente a la familia de los GPCR al cual se pueden unir el 2-AG y la AEA es el receptor huérfano GPR55 (Henstridge, 2012; Ryberg y col., 2007).

Actualmente se sabe que el sistema endocannabinoide está presente en una gran diversidad de órganos en los que cumple innumerables funciones (Sugiura y col., 2006). Un aspecto interesante de los endocannabinoides que ha sido ampliamente estudiado es su capacidad para actuar como mensajeros retrógrados, modulando la liberación de una gran variedad de neurotransmisores por acción sobre los receptores cannabinoides presinápticos (Hashimotodani y col., 2007; Schlicker y Kathmann, 2001). Estas moléculas son sintetizadas y liberadas al medio extracelular desde sitios postsinápticos por estímulos que se dan en la neurona, y ejercen la mayoría de sus acciones uniéndose a los receptores CB1 que se encuentran presentes en el terminal presináptico (Schlicker y Kathmann, 2001). Estos estímulos pueden ser la despolarización de la membrana postsináptica en la que se ven involucrados canales de Ca²⁺, la activación de receptores acoplados a proteínas G_q como, por ejemplo, el receptor de glutamato, la activación de receptores asistidos por Ca²⁺, la acción conjunta de la elevación de los niveles de Ca²⁺ sumada a la activación de un receptor, y en ciertos casos, puede darse por la misma actividad sináptica (Hashimotodani y col., 2007). La unión del endocannabinoide al receptor desencadena una cascada de señalización la cual culmina en la inhibición de la liberación del neurotransmisor en el terminal presináptico.

Los fosfolípidos precursores del 2-AG y de la AEA pueden sufrir rápidos movimientos laterales en la membrana celular. Esta alta tasa de movilidad llevó a repensar si la generación de los endocannabinoides ocurre realmente en la superficie de la neurona (Piomelli, 2014). Esto no sería inesperado ya que otros moduladores como, por ejemplo, el óxido nítrico (NO) que no se almacena en vesículas, pueden ser liberados de sitios no sinápticos y funcionan como mensajeros de acción autócrina o parácrina. La localización presináptica de la enzima NAPE-PLD que sintetiza AEA lleva a pensar que este endocannabinoide podría actuar por medio de un mecanismo similar al NO (Piomelli, 2014). Este mecanismo de liberación y difusión sería incompatible con la acción de la AEA como mensajero retrógrado en las sinapsis. En la actualidad se cree que este tipo de regulación rápida y controlada que ejercen los endocannabinoides como moduladores retrógrados de la neurotransmisión es mediada preferentemente por el 2-AG (Piomelli, 2014). Esta hipótesis podría ser posible debido a una estructura anatómica definida denominada *signalosome* que se dedicaría a la producción y liberación de este endocannabinoide (Jung y col., 2012b). Esta estructura involucra una porción de las espinas dendríticas que rodea al terminal postsináptico en las sinapsis excitatorias y donde se encuentra toda la maquinaria de producción del 2-AG, a saber: el receptor de glutamato mGluR5 y las enzimas de síntesis del 2-AG (PLC β y DAGL α). Cuando el glutamato es secretado por los terminales axonales excitatorios, se une a su receptor mGluR5 el cual está físicamente muy próximo a la PLC β y a la DAGL α , permitiendo así una rápida hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) para desencadenar la síntesis del 2-AG (Piomelli, 2014; Jung y col., 2012b). De esta manera, el 2-AG atraviesa la membrana plasmática, difunde al espacio sináptico, y se une a los receptores CB1 de los terminales axonales reduciendo la actividad del canal de Ca²⁺ e inhibiendo la liberación de glutamato (Mackie, 2008). En las sinapsis inhibitorias formadas por interneuronas que liberan ácido gamma-aminobutírico (GABA) también se ha observado señalización retrógrada regulada por los endocannabinoides (Hashimotodani y col., 2007).

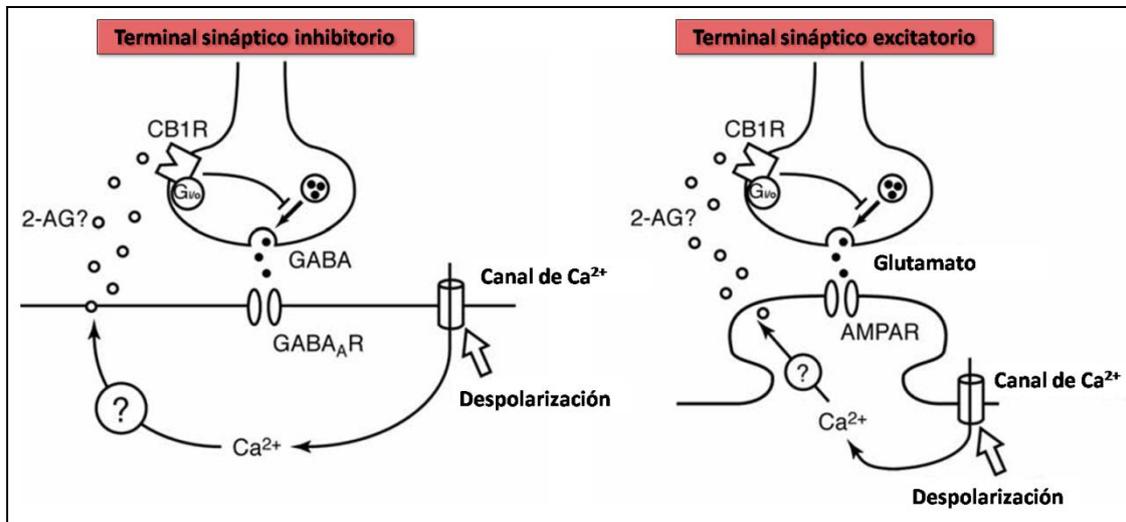
Tras ejercer su acción, el endocannabinoide debe ser degradado para apagar su señal. La MAGL que, tal como se señaló anteriormente, está ubicada en sitios presinápticos (Dinh y col., 2004; Dinh y col., 2002), puede acceder fácilmente al 2-AG

que se encuentra disponible para interactuar con el CB1R y así hidrolizarlo en su principal punto de acción. La ABHD6 también tendría un papel importante en la inactivación de la señal debido a que se observó que su inhibición prolonga el efecto del 2-AG en las sinapsis cerebrales. A diferencia de la MAGL, la ABHD6 presenta una localización postsináptica, por lo que regula el nivel del 2-AG que estaría disponible para migrar al terminal presináptico y actuar sobre sus receptores (Marrs y col., 2010). Por tanto, el 2-AG que llega a los terminales sinápticos puede ser degradado rápidamente por la MAGL en tanto que lo que queda del endocannabinoide en la espina dendrítica podría ser hidrolizado por la ABHD6.

La FAAH, que interviene principalmente en la degradación de la AEA, tiene una localización postsináptica y, además, se encuentra en la membrana de ciertas organelas (Gulyas y col., 2004). Por tal razón, la AEA debería ser transportada hasta llegar a su sitio de degradación (Yates y Barker, 2009). También se ha propuesto la existencia de ciertas proteínas de unión a la AEA que colaborarían en su transporte hacia organelas intracelulares (Maccarrone y col., 2010).

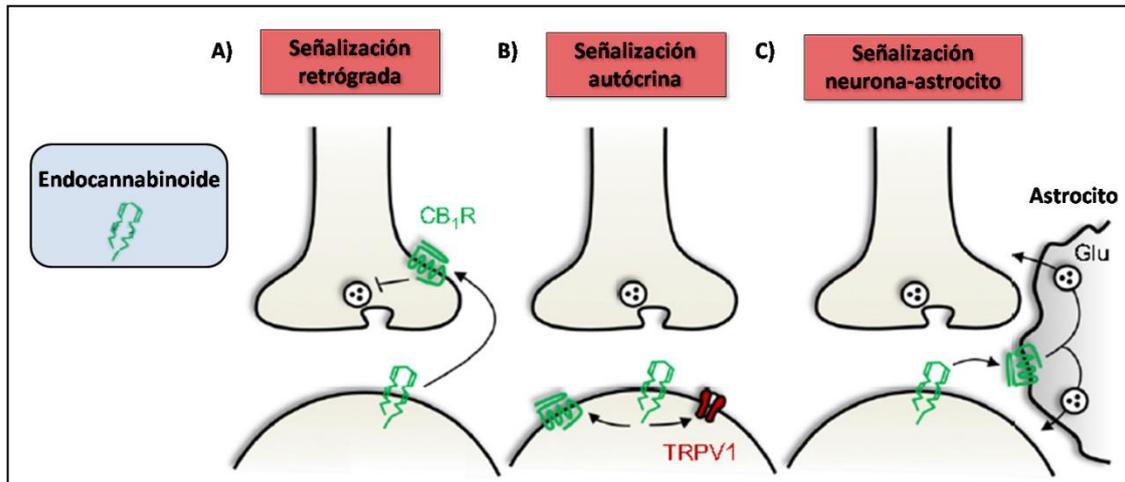
Esta capacidad de los endocannabinoides para inducir la supresión de la liberación de neurotransmisores tanto a largo como a corto plazo en las sinapsis inhibitorias y excitatorias, forma parte de la función de los mismos en la plasticidad sináptica y se da en varias regiones del cerebro, contribuyendo a la función cerebral (Hashimotodani y col., 2007).

La siguiente ilustración muestra un ejemplo de regulación retrógrada de las sinapsis inhibitorias y excitatorias por los endocannabinoides:



Esquema representativo de la regulación ejercida por los endocannabinoides como mensajeros retrógrados en las sinapsis inhibitorias y excitatorias. La despolarización de los terminales postsinápticos induce la activación de los canales de Ca^{2+} gatillados por voltaje, provocando un influjo del mismo. La elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} induce la biosíntesis de endocannabinoides, los cuales son liberados al espacio sináptico para unirse a los receptores CB1 de los terminales presinápticos, suprimiendo la liberación de ácido gamma-aminobutírico (GABA) en los terminales sinápticos inhibitorios y de glutamato en los excitatorios. (Adaptado de Hashimoto et al., 2007)

Si bien la señalización retrógrada sigue siendo el principal mecanismo por el cual los endocannabinoides regulan la función sináptica, se cuenta con evidencia que indica que podrían actuar de manera autócrina (por unión a los receptores vainilloides TRPV1 o a los receptores CB1 localizadas en los terminales postsinápticos), o también podrían modular indirectamente las funciones pre- y postsinápticas por una señalización a través de astrocitos (Castillo et al., 2012). La siguiente ilustración muestra las tres formas descritas por las cuales los endocannabinoides podrían regular la función sináptica:



Esquema representativo de los mecanismos propuestos para la regulación de la actividad sináptica por los endocannabinoides. Los endocannabinoides sintetizados en los terminales postsinápticos pueden: A) ser movilizados hacia los receptores CB₁ de los terminales presinápticos y allí suprimir la liberación de los neurotransmisores (señalización retrógrada), B) activar a los receptores CB₁ o a los TRPV1 presentes en los mismos terminales (señalización autócrina no retrógrada), o C) liberarse y actuar sobre los receptores CB₁ presentes en los astrocitos (señalización neurona-astrocito). Glutamato (Glu). (Adaptado de Castillo y col., 2012)

El sistema endocannabinoide es capaz de ejercer un rol regulatorio a nivel de varios procesos fisiológicos principalmente en el cerebro (Fernandez-Ruiz y col., 2000), aunque también en órganos periféricos. Ejemplos de estos procesos son la regulación de la respuesta inmune (Nagarkatti y col., 2009), del sistema cardiovascular (Mendizabal y Adler-Graschinsky, 2007), del sistema endócrino reproductivo (Meccariello y col., 2014), del metabolismo energético (Osei-Hyiaman y col., 2006), entre otros. En el cerebro los endocannabinoides participan en numerosos procesos, lo que refleja la amplia distribución de los receptores CB en este tejido (Mackie, 2005). Entre las funciones de los endocannabinoides a nivel cerebral se encuentran: el control de la actividad motora, la antinocicepción, la modulación de los procesos de la memoria y potenciación a largo plazo, la modulación de procesos cognitivos, la regulación de la secreción de las hormonas de la glándula pituitaria y la neuroprotección frente a procesos neurodegenerativos (Di Marzo y col., 1998b).

El rol neuroprotector de los endocannabinoides ha sido ampliamente estudiado. Como se señaló anteriormente, el 2-AG es capaz de reducir la neurotransmisión excitatoria previniendo una excitabilidad mayor que generaría

convulsiones epileptiformes (Hashimotodani y col., 2007; Sugiura y col., 2006). La AEA y el 2-AG pueden aumentar la viabilidad neuronal en cultivos expuestos a condiciones de hipoxia y deprivados de glucosa (Sinor y col., 2000). Se ha observado también que la administración del 2-AG reduce el edema cerebral y la muerte de neuronas del hipocampo (Panikashvili y col., 2001). Mechoulam y colaboradores resumen los mecanismos por los cuales el 2-AG puede ejercer un efecto neuroprotector. Estos son: inhibición de la liberación de glutamato, inhibición de citoquinas inflamatorias y de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), mejora en la utilización de la glucosa, e inhibición de los efectos vasoactivos de la endotelina-1 (Mechoulam y col., 2002).

La neuroprotección ejercida por los endocannabinoides ha sido muy estudiada en distintas enfermedades neurodegenerativas. Entre estas, se destacan la esclerosis múltiple, las enfermedades de Huntington, de Parkinson, de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica. Las evidencias indican que la hipofunción o la desregulación del sistema endocannabinoide podrían ser, en parte, responsables de la sintomatología de estas enfermedades. Ciertos componentes del sistema endocannabinoide como, por ejemplo, la densidad de los receptores cannabinoides, los niveles de los endocannabinoides, los niveles y actividades de las enzimas que los metabolizan, se ven modificados en varias enfermedades neurodegenerativas. En efecto, se ha observado que los cannabinoides son capaces de aliviar los síntomas de varios de estos desórdenes (Scotter y col., 2010).

Una de las enfermedades ampliamente estudiadas en la cual los endocannabinoides tendrían un rol muy importante, es la Enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es una de las mayores causas de demencia y es considerada como el desorden neurológico dependiente de la edad más prevalente. En esta enfermedad las regiones cerebrales involucradas en el aprendizaje y la memoria se ven reducidas en su tamaño y, además, hay pérdida de neuronas principalmente en el hipocampo y en ciertas áreas corticales. La etiología de esta enfermedad puede ser tanto idiopática como genética y se caracteriza por la atrofia de neuronas, principalmente colinérgicas aunque también glutamatérgicas, que se proyectan a la corteza cerebral (CC) y al hipocampo (Greenamyre y col., 1985; Whitehouse y col., 1982). Se cree que la

neurodegeneración aparece como consecuencia del depósito extracelular del péptido β -amiloide (β A) en placas y/o por la formación de ovillos de la proteína tau hiperfosforilada (Minati y col., 2009). A pesar de la existencia de varios grupos dedicados a investigar la etiología de la EA, el debate sobre cuál de estas dos proteínas es la principal causa del proceso neurodegenerativo aún continúa (Mudher y Lovestone, 2002). Las evidencias apuntan a favor de la hipótesis de la cascada del β A y a la neuroinflamación. Esta hipótesis propone que el péptido β A mal plegado no solo es deletéreo para las neuronas sino que, además, provoca una respuesta de la microglía que, aunque podría llegar a eliminar las placas amiloides, sería neurotóxica por sí misma (Hickman y col., 2008; Hardy y Higgins, 1992). En los cerebros humanos de edad avanzada también pueden encontrarse placas amiloides, sin embargo, estas se acumulan mayoritariamente en pacientes que padecen la EA. Estos depósitos extracelulares, que se componen principalmente de los péptidos formados por alrededor de 40 (β A1-40) y 42 (β A1-42) aminoácidos, son los agregados del péptido que prevalecen en cerebros con EA. El péptido β A deriva de una proteína denominada proteína precursora de amiloide (APP). La APP es una proteína transmembrana, blanco de enzimas proteolíticas denominadas secretasas. Cuando la APP es atacada por la β -secretasa, que la cliva en la proximidad de su extremo N-terminal, y la γ -secretasa, que lo hace hacia su extremo C-terminal, se forma el péptido β A. Bajo condiciones fisiológicas, la α -secretasa puede clivar a la APP dentro de la secuencia del β A, generando un producto de la APP soluble y un fragmento C-terminal que permanece anclado a la membrana, el cual puede sufrir un clivaje posterior. Ninguno de los fragmentos generados por la acción de la α -secretasa sobre la APP aparenta ser amiloidogénico (Sinha y Lieberburg, 1999; Checler, 1995).

Hay evidencia que sugiere que la sobreproducción de la APP así como el incremento de la actividad de las secretasas asociadas a la formación del péptido β A pueden correlacionarse con el inicio prematuro o con casos agudos de la EA debido a su capacidad de formar placas amiloides (Sinha y Lieberburg, 1999). Si bien son numerosos los estudios que plantean posibles vías por las cuales el péptido β A podría ejercer daño, como, por ejemplo, la capacidad de generar ROS (Brera y col., 2000), la alteración de la homeostasis del calcio (Mattson y col., 1993), entre otros, aún no se

conoce con exactitud el mecanismo por el cual este péptido actúa. Además, existen estudios que demuestran que la unión del β A a otros compuestos, como lo es la enzima acetilcolinesterasa, incrementa su toxicidad (Muñoz e Inestrosa, 1999).

El proceso de formación de fibrillas que se depositan como placas amiloides se conoce como “envejecimiento”. Comienza con la formación de oligómeros a partir del péptido en estado monomérico, y posteriormente se produce la formación de fibrillas amiloides (Klein, 2002; Jarrett y col., 1993). Resultados de estudios anteriores sugieren que la nucleación y deposición del péptido β A en el cerebro humano se correlaciona con la severidad de la demencia observada (Cummings y Cotman, 1995), y que este péptido es capaz de desencadenar la apoptosis (Li y col., 1996; Cummings y Cotman, 1995). Por tanto, desde un principio se creyó que la forma neurotóxica es la correspondiente a los depósitos de fibrillas formadas por el péptido β A (Soto y col., 1998). Sin embargo, otros estudios hacen referencia a una pobre correlación entre la concentración y distribución de los depósitos de amiloide en el cerebro y ciertos parámetros de la EA, como, por ejemplo, el grado de demencia, la pérdida de neuronas y de procesos sinápticos y ciertas anomalías del citoesqueleto (Neve y Robakis, 1998). Esto, sumado al hecho de que las placas amiloides también se encuentran presentes en sujetos sanos (Katzman y col., 1988), llevó a la comunidad científica a replantearse si son realmente las fibrillas amiloides las responsables de la EA. Estudios más recientes proponen a los oligómeros del péptido β A como los causantes del daño. Esta hipótesis parte del principio según el cual la pérdida temprana de la memoria, característica de las primeras etapas de la EA, se debe a los daños a nivel sináptico, más específicamente al deterioro de la plasticidad sináptica, y propone como responsables de estos daños a los oligómeros presentes mayoritariamente en los estadios tempranos de esta patología (Shankar y col., 2008; Townsend y col., 2006; Lacor y col., 2004). Entre los posibles mecanismos del daño neuronal provocado por los oligómeros, se han propuesto por un lado, la posible inserción de estos en la membrana y la posterior generación de poros, y por otro lado, la unión de los oligómeros a blancos específicos presentes en la membrana (Lacor y col., 2004). Sin embargo, el efecto de los oligómeros, a diferencia del producido por las fibrillas, parecería ser específico para ciertas regiones del cerebro (Klein y col., 2001). A

pesar de lo enunciado anteriormente, se sigue apoyando la hipótesis de que son las fibrillas y no, los oligómeros, las formas patogénicas del péptido β A (Minkeviciene y col., 2009). Por esta razón, no hay hasta ahora consenso general sobre cuál es la conformación neurotóxica del péptido.

Los endocannabinoides han demostrado ser neuroprotectores frente al péptido β A, efecto que es mediado por su unión a receptores (CB o no CB) y también por vías independientes de receptores (Harvey y col., 2012). Esto ha sido demostrado tanto en estudios en cultivos celulares (Iuvone y col., 2004; Milton, 2002) como en ensayos *in vitro* (Ramirez y col., 2005). En los cerebros con EA, se han observado varios cambios en el sistema endocannabinoide. La unión ligando-CBR se encontró reducida (Westlake y col., 1994) o no variaba (Lee y col., 2010). Se observó además que disminuían los niveles de la proteína CB1R (Solas y col., 2013; Ramirez y col., 2005) como también el acoplamiento de la proteína G inducido por la activación del CB1R (Ramirez y col., 2005), y que la proteína CB2R aumentaba (Solas y col., 2013) o no se modificaba (Ramirez y col., 2005). También se observó una alteración en el metabolismo del 2-AG con la imposibilidad de reclutar la enzima MAGL a las membranas biológicas, lo cual sugiere que la terminación de la señalización generada por este endocannabinoide se encuentra atenuada (Mulder y col., 2011). Por otro lado, los niveles de la AEA y de su precursor, la NAPE, en el cerebro se vieron disminuidos, lo cual se correlacionaba con los distintos estadios de la enfermedad (Jung y col., 2012a).

Todos estos cambios del sistema endocannabinoide en la EA y en otras enfermedades neurodegenerativas llevan a pensar que la modulación de este sistema podría ser una buena estrategia terapéutica para la atenuación de los procesos involucrados en estas patologías. Es sólida la evidencia que indica que la activación del sistema endocannabinoide en ciertas patologías reduce o anula los efectos no deseados de las mismas o atenúa su progresión (Scotter y col., 2010).

Se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de las enzimas involucradas en el metabolismo de los endocannabinoides, solo se han descrito ciertos sitios regulatorios para algunas de las enzimas (Reisenberg y col., 2012) o regiones promotoras que controlarían su expresión

(D'Addario y col., 2012; Maccarrone y col., 2004; Puffenbarger y col., 2001). Maccarrone y colaboradores observaron que la activación del CB1R provoca la formación de NO por estímulo de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), lo que lleva a un incremento de la actividad del transportador AMT. Por el contrario, la activación del CB2R inhibe la producción de NO por inhibición de la NOS y así reduce la actividad del AMT. De esta manera, el AMT podría ser regulado por ligandos de los receptores cannabinoides (Maccarrone y col., 2006). Esta es una de las pocas evidencias encontradas hasta el momento de acuerdo con la cual se puede observar que la disponibilidad de los endocannabinoides puede ser modificada por ligandos de sus receptores, en este caso, mediante la regulación de la actividad del transportador AMT.

Por otra parte, se ha logrado sintetizar inhibidores que presentan buena selectividad por las diferentes enzimas involucradas en el metabolismo de los endocannabinoides (Pertwee, 2014). Es por esto que una de las estrategias estudiadas en los últimos años es la de inhibir la degradación de los endocannabinoides por medio de fármacos que actúan sobre las enzimas MAGL y FAAH. Estos estudios indicaron que los inhibidores selectivos de estas enzimas administrados solos o con un inhibidor de la COX podrían atenuar los efectos no deseados en ciertas enfermedades (Pertwee, 2014). El problema del uso de estos compuestos lo constituyen los efectos adversos colaterales que pueden causar. En relación con esto se observó que los inhibidores de la FAAH presentan una relación beneficio/riesgo mucho mayor que los inhibidores de la MAGL o que los inhibidores duales de la MAGL y la FAAH. Además, se han obtenido datos preclínicos prometedores con los inhibidores de la captación celular de los endocannabinoides (Pertwee, 2014).

En la actualidad, el uso de ligandos de los receptores cannabinoides es una estrategia menos explorada. Esto es debido a que al ser suministrados repetidamente pueden causar tolerancia, la cual puede darse por disminución de la síntesis del receptor, por la ineficiencia del acoplamiento del mismo a la proteína G, o por su internalización (Pertwee, 2008). El receptor CB1 no solo contiene sitios a los cuales se unen los agonistas y los antagonistas (sitios ortostéricos), sino que también poseen sitios alostéricos a los cuales se pueden unir pequeñas moléculas moduladoras

generando un cambio conformacional del mismo, lo que provoca un cambio de afinidad del agonista por el sitio ortostérico (Price y col., 2005). Esto cobra importancia debido a que se podrían utilizar los moduladores alostéricos para incrementar o inhibir la activación del receptor CB1 por un agonista endógeno o exógeno (Pertwee, 2008).

Aunque es un campo muy amplio y queda mucho por conocer, el rol de los endocannabinoides como neuroprotectores frente a enfermedades neurodegenerativas ha sido ampliamente explorado y es mucho lo que se sabe sobre dicho rol. Las enfermedades neurodegenerativas tienen en común el hecho de que se presentan en pacientes adultos de mayor edad, por lo que el envejecimiento está estrechamente relacionado con estas patologías.

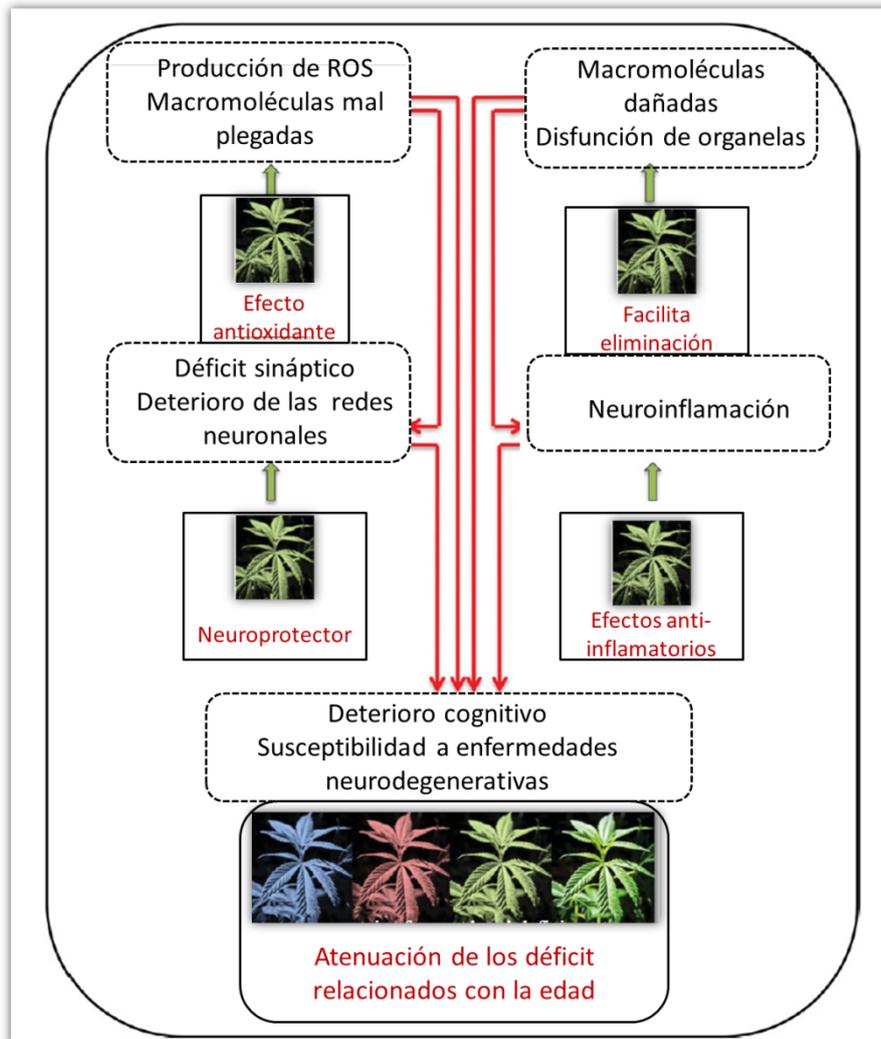
El envejecimiento es un proceso cronológico que puede retrasarse o acelerarse de acuerdo con factores ambientales o procesos patológicos, y se caracteriza por la disminución de la coordinación motora, de las habilidades sensoriales, de la atención y de la cognición, todos estos factores responsables del déficit en la memoria y en el aprendizaje (Seidler y col., 2010; Baltes y Lindenberger, 1997). Durante este proceso se produce un deterioro progresivo en las funciones celulares debido a distintas modificaciones en las propiedades de las moléculas. A nivel cerebral durante el envejecimiento suceden distintos cambios, entre ellos, la disminución de la actividad mitótica (sobre todo de las neuronas) y el encogimiento en tamaño del cerebro donde la corteza frontal y parietal, el putamen, tálamo y acumbens son las áreas más afectadas, reduciéndose mayoritariamente la materia blanca (Jernigan y Gamst, 2005; Kuhn y col., 1996). Al igual que en ciertas enfermedades neurodegenerativas, también hay un cambio en la expresión y composición de los receptores de neurotransmisores, factores tróficos y sus receptores, lo cual afecta a la señalización intracelular que desencadenan. Por ejemplo, la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB), que cumple un rol en la consolidación de la memoria, se ve afectada (Saura y Valero, 2011). También se han observado cambios en la composición de las membranas celulares y en sus propiedades biofísicas. Esto genera modificaciones en las enzimas y en los sistemas de transporte presentes en estas membranas. Los cambios observados en los lípidos ocurrirían por una modulación diferente de las actividades enzimáticas involucradas en su metabolismo (Farooqui y col., 2004; Giusto

y col., 2002). Todos estos cambios provocan una disfunción sináptica progresiva y el deterioro de la plasticidad neuronal, lo cual culmina con alteraciones en la conectividad neuronal (Bano y col., 2011).

Bilkei-Gorzo resume en cinco ítems a los procesos que contribuyen al envejecimiento: el estrés oxidativo, la eliminación de macromoléculas dañadas, la actividad mitocondrial, la regulación de la actividad de la glía y la plasticidad sináptica y la neurogénesis (Bilkei-Gorzo, 2012). El balance entre la generación y la eliminación de productos metabólicos tóxicos y macromoléculas dañadas influye crucialmente sobre la progresión del envejecimiento. Los mecanismos homeostáticos conservados como los antioxidantes, los de mantenimiento del ADN, el sistema del proteosoma y la autofagia, mantienen controlado este proceso. Por otra parte, al ser las neuronas prácticamente células postmitóticas, son especialmente sensibles a la acumulación de macromoléculas dañadas y oxidadas. El cerebro tiene una alta demanda de energía, por lo cual el correcto balance entre la producción de ROS por las mitocondrias y la actividad de los sistemas antioxidantes adquiere importancia (Genova y col., 2004; Serrano y Klann, 2004). En el envejecimiento se observa una disminuida expresión de genes mitocondriales como posible mecanismo compensatorio para reducir la generación de ROS, y una activación de los genes involucrados en los mecanismos de defensa frente a la oxidación y en la reparación del ADN (Lu y col., 2004). A pesar de esto, en el envejecimiento generalmente se observa un aumento de macromoléculas oxidadas, existiendo una correlación entre el estrés oxidativo generado, el deterioro cognitivo y un mayor riesgo a padecer enfermedades neurodegenerativas (Sasaki y col., 2008). El aumento de productos metabólicos tóxicos, macromoléculas malformadas, y organelas no funcionales son características típicas de cerebros seniles y contribuyen significativamente al deterioro cognitivo (Bishop y col., 2010). Como se señaló en el caso de la EA, es común en ciertas patologías neurodegenerativas la acumulación de agregados proteicos. La eliminación de estos agregados por inducción de la autofagia o por la actividad de los proteosomas retarda el envejecimiento y mejora las funciones cognitivas (Rubinsztein y col., 2011; Crowe y col., 2009). El aumento de macromoléculas alteradas y la consecuente liberación de moléculas de señalización por las neuronas dañadas activan el sistema inmune del cerebro, el cual

está compuesto en su mayor parte por astrocitos y células de la microglía (Schuitemaker y col., 2012). Así, el cerebro en el envejecimiento fisiológico está asociado a un aumento en la activación de la microglía y a un nivel mayor de citoquinas proinflamatorias (Hanisch y Kettenmann, 2007). Este ambiente proinflamatorio acelera el proceso de senescencia (Finch, 2010), daña la funcionalidad de la neurona agravando el déficit cognitivo (Katsel y col., 2009) y reduce la neurogénesis (Russo y col., 2011). El fenotipo de los astrocitos y de la microglía cambia durante el envejecimiento. Los primeros son disfuncionales por lo que no proporcionan un buen soporte para las neuronas (García-Matas y col., 2008) y la microglía es menos funcional a causa de fallas en el proceso de autofagia (Nakanishi y Wu, 2009). Ron-Harel y Schwartz sugieren que la reversión de los defectos en la inmunidad provocados por el envejecimiento puede mejorar los déficits cognitivos relacionados con la edad (Ron-Harel y Schwartz, 2009).

La siguiente ilustración esquematiza las vías por las cuales el sistema endocannabinoide es capaz de modular los procesos celulares y moleculares relacionados con el envejecimiento:



Esquema representativo de la regulación del sistema endocannabinoide sobre los procesos celulares y moleculares relacionados con el envejecimiento, que intervendrían en la regulación de la actividad sináptica. La acumulación de macromoléculas dañadas y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) conducen al deterioro de la función neuronal y a la neuroinflamación. Estos procesos, que interactúan entre sí, están involucrados en el envejecimiento del cerebro. La actividad del sistema endocannabinoide es capaz de contrarrestar los cambios observados en el cerebro envejecido y, a su vez, retrasar o frenar el proceso. (Adaptado de Bilkei-Gorzo, 2012)

El sistema endocannabinoide está íntimamente ligado al envejecimiento debido a que es capaz de modular los procesos celulares y moleculares relacionados con la senilidad. Se ha observado que estas moléculas tienen propiedades antioxidantes, por ejemplo, el 2-AG es capaz de inhibir la formación de ROS *in vitro* (Gallily y col., 2000). También se les ha atribuido la capacidad de acomplejar iones metálicos, lo que contribuiría con sus propiedades antioxidantes (Kessiova y col., 2006). Por otra parte, los cannabinoides a concentraciones fisiológicas incrementan la estabilidad e

integridad lisosomal favoreciendo la eliminación de macromoléculas dañadas. (Noonan y col., 2010). Además, se ha demostrado que pueden inducir autofagia en varios tipos de células cancerígenas (Donadelli y col., 2011; Vara y col., 2011). Los cannabinoides regulan la actividad mitocondrial a través del receptor CB1 (Benard y col., 2012). Bajo condiciones de estrés celular, los cannabinoides protegerían a la mitocondria ya que estudios anteriores demuestran que ciertos agonistas atenúan el daño mitocondrial contra el estrés oxidativo inducido por paraquat (Velez-Pardo y col., 2010). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el metabolismo de los endocannabinoides que lleva a la formación de prostaglandinas y leucotrienos resulta en acciones prooxidantes indirectas.

Las células de la glía (astrocitos y microglía) expresan receptores CB1 y CB2 (Atwood y Mackie, 2010; Stella, 2009) y son también capaces de metabolizar a los endocannabinoides (AEA y 2-AG) debido a que tienen toda la maquinaria enzimática de síntesis y de degradación de los mismos (Witting y col., 2004; Walter y col., 2002). La inflamación del sistema nervioso central (SNC) que se da en ciertas patologías (esclerosis múltiple, EA, etc.) cursa generalmente con una estimulación de la actividad del sistema cannabinoide (Mulder y col., 2011). Esta activación es comúnmente de naturaleza antiinflamatoria debido a que un aumento de los niveles de la AEA (Tham y col., 2007) o una activación de los receptores CB por agonistas sintéticos (Sheng y col., 2005) inhibe la producción de mediadores proinflamatorios y reduce la migración de la microglía. Esto contribuiría a los efectos benéficos del sistema endocannabinoide frente a procesos neurodegenerativos (van der Stelt y col., 2002). Por otra parte, la plasticidad sináptica es regulada a través de la señalización que induce el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y precisamente la expresión del mismo disminuye en el envejecimiento (Tapia-Arancibia y col., 2008). A su vez, se ha observado que los agonistas del receptor CB1 aumentan la expresión de este factor (Butovsky y col., 2005; Grigorenko y col., 2002) y que la delección del CB1R disminuye la expresión del mismo (Aso y col., 2008). Los endocannabinoides además de regular la plasticidad sináptica facilitan la neurogénesis. En este aspecto se ha observado que la activación de los CBR por agonistas o por un aumento de los niveles de los

cannabinoides endógenos promueve la proliferación celular, la neurogénesis y la diversificación neuronal (Mulder y col., 2008).

El sistema endocannabinoide sufre diversos cambios durante el envejecimiento, los que podrían contribuir a dicho proceso. Estudios en el SNC de rata han reportado en procesos senescentes fisiológicos una menor capacidad de unión del ligando al CB1R en ciertas áreas del cerebro (cerebelo, hipotálamo y corteza), lo que no siempre se asocia con un menor nivel del ARNm de este receptor (Berrendero y col., 1998; Romero y col., 1998). También se ha observado que los niveles del CB1R varían según el área del cerebro estudiada (Liu y col., 2003), por ejemplo, en sinaptosomas de hipocampo de rata se observó una disminución en la densidad del CB1R (Canas y col., 2009). El hecho de que estos cambios sean específicos de cada región del cerebro es lógico si se piensa que los endocannabinoides cumplen funciones específicas según el área del SNC de la cual se trate.

En base a lo descrito, se puede concluir que la actividad del CB1R jugaría un rol protector muy importante frente al envejecimiento. Lo que resta conocer es si el 2-AG o la AEA son responsables de la actividad antiedad del CB1R. Se ha observado que los animales que no expresan la enzima FAAH presentan una atenuación en el deterioro de la función cardíaca relacionada con la edad y una menor expresión de genes asociados con la inflamación (Batkai y col., 2007). Si bien son muy pocas las publicaciones que se refieren a la influencia de los cannabinoides en las funciones cerebrales de animales seniles sanos, estas demuestran que los agonistas de los CBR son capaces de atenuar el deterioro de la memoria, reducir la activación de la microglía e inducir la neurogénesis (Marchalant y col., 2009; Marchalant y col., 2008).

En síntesis, hasta el momento se sabe que el sistema endocannabinoide tiene funciones neuroprotectoras que regulan varios procesos homeostáticos, y se cuenta con evidencias que indicarían que la señalización por endocannabinoides está disminuida en el envejecimiento (al menos en algunas regiones del cerebro). De esta manera, elevando la actividad de los CBR, ya sea por el aumento de los niveles de los endocannabinoides (inhibiendo su degradación o estimulando su síntesis) o por la

acción directa de ligandos de los receptores, se podría retardar la progresión del envejecimiento y/o aliviar los síntomas de las enfermedades neurodegenerativas.

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es abordar la caracterización y el estudio de la regulación del metabolismo de los endocannabinoides 2-AG y AEA en el SNC en el envejecimiento fisiológico y patológico. En el marco de este objetivo general se determinaron los siguientes tres objetivos particulares:

- Estudiar el metabolismo de los endocannabinoides 2-AG y AEA en cerebros de ratas adultas y seniles, utilizando como material biológico la fracción de membrana (libre de la fracción nuclear), soluble y sinaptosomal de la CC de rata. Esto permitirá establecer similitudes o diferencias en dicho metabolismo así como también analizar su comportamiento entre las diferentes fracciones.

- Determinar si el metabolismo del 2-AG y de la AEA está regulado por agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en sinaptosomas de la CC de ratas adultas y seniles. Esto permitirá establecer una posible autorregulación de estas moléculas por sus propios receptores en el sitio de la sinapsis.

- Estudiar la hidrólisis del 2-AG y de la AEA en un modelo *in vitro* de la EA en sinaptosomas de la CC de ratas adultas preincubados con diferentes conformaciones del péptido β A. Esto permitirá inferir los efectos de este péptido, que se cree causal de esta enfermedad, en los niveles de los endocannabinoides en el terminal sináptico; y a su vez, establecer un posible paralelismo entre el envejecimiento fisiológico y una patología neurodegenerativa (EA).

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se obtuvieron utilizando como modelo biológico la CC de rata. El motivo por el cual se eligió esta región del sistema nervioso en particular obedece a que es altamente vulnerable a los efectos del envejecimiento y principalmente afectada por diferentes enfermedades neurodegenerativas. Además, en la CC se encuentran presentes todos los componentes del Sistema Endocannabinoide.

Primeramente, los estudios se realizaron empleando las fracciones de membrana y soluble de la CC de rata debido a que, si bien las enzimas que intervienen en el metabolismo de los endocannabinoides son proteínas de membrana en su forma activa, la MAGL también se encuentra en el citosol. Por otra parte, se utilizaron sinaptosomas provenientes del mismo tejido. Los sinaptosomas o terminales sinápticos contienen mitocondrias y vesículas que almacenan neurotransmisores, son metabólicamente activos y constituyen una zona de la neurona en la que se encuentran presentes todos los elementos del Sistema Endocannabinoide.

En base a los objetivos anteriormente expuestos, los resultados obtenidos se describen en tres Capítulos, de los cuales el primero incluye dos Secciones:

Capítulo I: Estudio del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol.

Sección 1: El metabolismo del 2-araquidonoilglicerol en el envejecimiento fisiológico.

Sección 2: Regulación del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol por agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

Capítulo II: Estudio de la degradación de la anandamida.

Hidrólisis de la anandamida en el envejecimiento fisiológico y su regulación por agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

Capítulo III: Estudio de la degradación de los endocannabinoides en un modelo *in vitro* de la Enfermedad de Alzheimer.

MATERIALES Y MÉTODOS

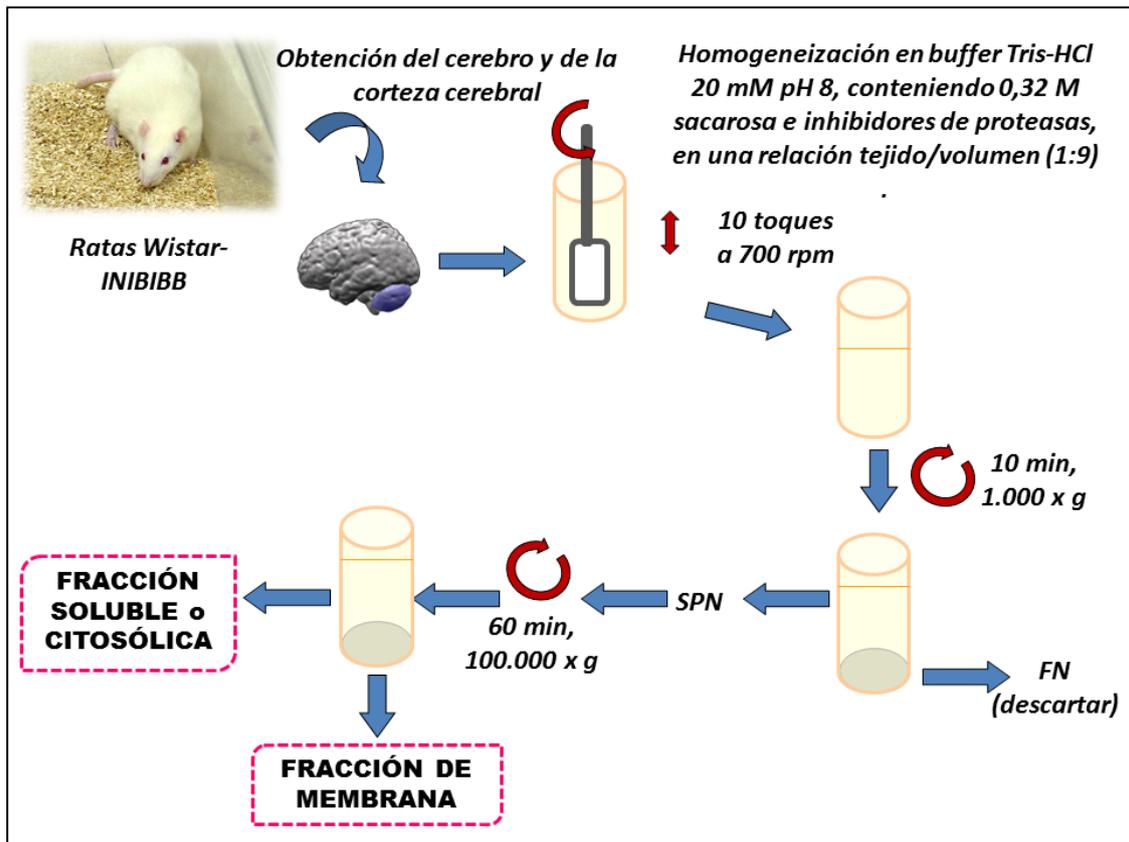
1. Modelo experimental

Como modelo experimental de los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se utilizaron ratas de la cepa Wistar-INIBIBB adultas (4 a 6 meses) y seniles (24 a 28 meses) criadas en condiciones ambientales preestablecidas (temperatura de 24 °C, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas) en el bioterio del mismo instituto (INIBIBB) siguiendo las normas establecidas por el Comité de Animales de Experimentación de la Universidad Nacional del Sur, las cuales se rigen por la Guía de Cuidado y Uso de Animales del ILAR (*Institute for Laboratory Animal Research*) elaborada por la Academia Nacional de Ciencias (Bethesda, MD, Estados Unidos). Los animales fueron alimentados con una dieta en *pellet* estándar y se le suministro agua y comida *ad libitum* hasta el momento de ser sacrificados por decapitación. Inmediatamente después de haber sido sacrificados (2-4 minutos posteriores a la decapitación) se extrajo la CC a partir de la cual se aislaron la fracción de membrana (previo descarte del núcleo), la fracción soluble y el terminal sináptico (sinaptosomas o fracción sinaptosomal). Estas preparaciones fueron utilizadas como fuente enzimática en los diferentes ensayos.

2. Obtención de las diferentes fracciones de la corteza cerebral de rata

2.1. Aislamiento de las fracciones de membrana y soluble:

Las fracciones de membrana y soluble fueron obtenidas como se muestra en el **Esquema 1**, basándose en el protocolo descrito por Blankman y colaboradores (Blankman y col., 2007) con ligeras modificaciones.



Esquema 1: Protocolo de obtención de las fracciones de membrana y soluble de la corteza cerebral de rata según el método previamente descrito por Blankman y colaboradores (Blankman y col., 2007) con ligeras modificaciones. Fracción nuclear (FN) y sobrenadante postnuclear (SPN).

La CC se lavó con solución fisiológica y se homogeneizó al 10 % (p/v o peso/volumen) en el *buffer* Tris 20 mM, pH 8, conteniendo sacarosa 0,32 M e inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, aprotinina 1 mg/ml y leupeptina 2 μ g/ml). La homogeneización se realizó en un homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem con vástago de teflón realizándose 10 toques ascendentes y descendentes a 700 rpm.

El homogenado total (HT) fue sometido a centrifugación a 1.000 x g durante 10 minutos en una centrífuga preparativa Beckman J-6B refrigerada a 4 °C utilizando un rotor JA 21. El *pellet* conteniendo la fracción nuclear (FN) fue descartado y el sobrenadante postnuclear (SPN) fue centrifugado nuevamente a 100.000 x g durante 60 minutos en una ultracentrífuga Beckman Óptima TLX utilizando un rotor TLA 100.4. De la última centrifugación se obtuvo un *pellet* correspondiente a la fracción de membrana celular y el sobrenadante postmicrosomal (SPMic) que contenía la fracción

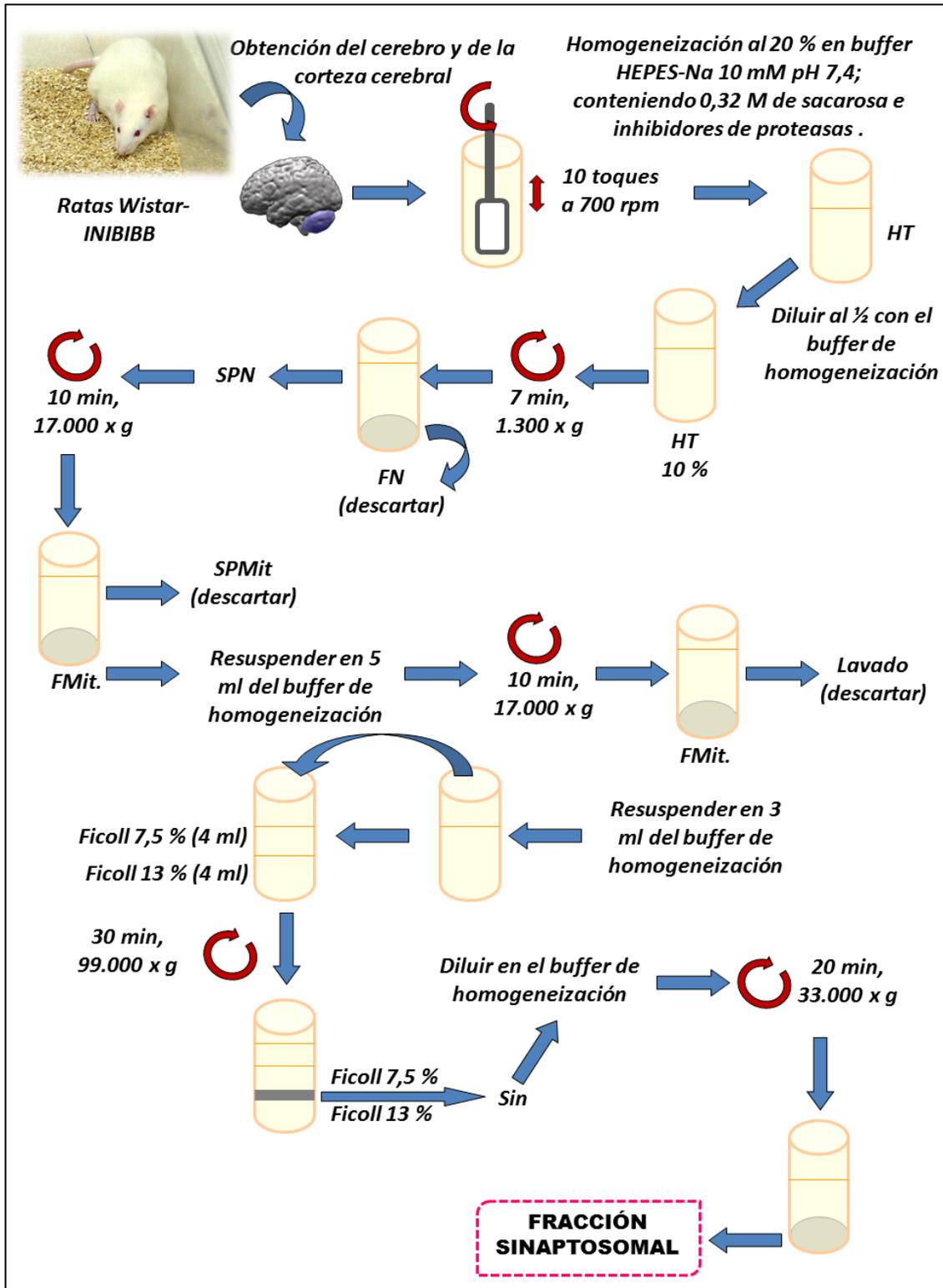
soluble o citosólica de las células. La fracción de membrana fue resuspendida en los *buffers* correspondientes a los distintos ensayos enzimáticos a realizar.

2.2. Aislamiento de la fracción sinaptosomal:

La fracción sinaptosomal (sinaptosomas o Sin) se obtuvo tal como se muestra en el **Esquema 2**, según el protocolo descrito por Cotman (Cotman, 1974) con ligeras modificaciones.

La CC se lavó con solución fisiológica y se homogeneizó al 20 % (p/v) en el *buffer* HEPES 10 mM, pH 7,4, conteniendo EDTA 1 mM, sacarosa 0,32 M e inhibidores de proteasas (DTT 1 mM, leupeptina 2 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF 0,1 mM). La homogeneización se realizó de la misma manera que lo enunciado en **2.1**. El homogenado resultante se diluyó al 10 % en el mismo *buffer*.

El HT se centrifugó a 1.300 x g durante 7 minutos en una centrífuga preparativa Beckman J-6B refrigerada a 4 °C empleando un rotor JA21. La FN fue descartada y el SPN se centrifugó a 17.000 x g durante 10 minutos en una ultracentrífuga Beckman Óptima L-90K refrigerada a 4 °C utilizando un rotor 90Ti, obteniéndose la fracción mitocondrial (FMit) cruda. El sobrenadante postmitocondrial (SPMit) se descartó y la FMit, luego de ser lavada con el *buffer* de homogeneización, se resuspendió en el mismo *buffer* y se sembró en un gradiente discontinuo de Ficoll formado por 4 ml de Ficoll 13 % y 4 ml de Ficoll 7,5 % (las soluciones de Ficoll fueron preparadas en el mismo medio de aislamiento). Este gradiente se centrifugó a 99.000 x g durante 30 minutos en la ultracentrífuga Beckman Óptima L-90K refrigerada a 4 °C, utilizando un rotor SW41. Como resultado de esta ultracentrifugación, los Sin se ubicaron en la interfase entre ambas densidades de Ficoll. La mielina se ubicó en la interfase entre el Ficoll 7,5 y el medio de aislamiento y las mitocondrias se ubicaron en el *pellet* por debajo del Ficoll 13 %. La banda de Sin se resuspendió en el medio de aislamiento y se centrifugó a 33.000 x g durante 20 minutos en la ultracentrífuga Beckman Óptima L-90K refrigerada a 4 °C utilizando un rotor 90Ti. El *pellet* de los Sin purificados se resuspendió en los *buffers* correspondientes a los distintos ensayos enzimáticos a realizar.



Esquema 2: Protocolo de obtención de la fracción sinaptosomal de la corteza cerebral de rata según el método previamente descrito por Cotman (Cotman, 1974) con ligeras modificaciones. Homogenizado total (HT), fracción nuclear (FN), sobrenadante postnuclear (SPN), sobrenadante postmitocondrial (SPMit), fracción mitocondrial (FMit) y sinaptosomas (Sin).

Los reactivos utilizados en la preparación de los *buffers* para el aislamiento y la purificación de las distintas fracciones subcelulares fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

3. Obtención de los sustratos lipídicos radioactivos empleados en los ensayos enzimáticos

3.1. Obtención de [2-³H]fosfatidilcolina, [2-³H]diacilglicerol y [2-³H]triacilglicerol a partir de la incubación de la retina bovina con [2-³H]glicerol:

Los lípidos radiomarcados, [2-³H]fosfatidilcolina ([³H]PC), [2-³H]diacilglicerol ([³H]DAG) y [2-³H]triacilglicerol ([³H]TAG), fueron obtenidos incubando retinas bovinas con [2-³H]glicerol, tal como fue descrito por Pasquaré y Giusto (Pasquaré de Garcia y Giusto, 1986).

3.1.1. Incubación de las retinas bovinas con [2-³H]glicerol:

En este procedimiento las retinas fueron incubadas con [2-³H]glicerol (actividad específica 2 Ci/mmol) (PerkinElmer, Boston, MA, Estados Unidos) en Erlenmeyer de 250 ml a razón de 5 retinas por recipiente. Se utilizaron 10 μ Ci de [2-³H]glicerol y 7 ml del medio de incubación Ames por retina (Ames y Hastings, 1956). Cada Erlenmeyer estaba provisto de un tapón de goma con agujas para la entrada y salida de gas carbógeno (oxígeno-anhídrido carbónico, 95:5, volumen/volumen (v/v)), siendo la aguja de entrada de mayor calibre que la de salida para poder mantener sobre la superficie del líquido una presión conveniente. El gas primeramente se hizo burbujear en una trampa de agua destilada para mantener su humedad.

El medio de incubación consistió en una solución iónica de pH 7,33 con una composición y concentración de electrolitos similar a la del líquido cefalorraquídeo (Ames y Hastings, 1956). A esta solución que estaba compuesta por NaCl 119,5 mM, KCl 3,6 mM, NaH₂PO₄ 0,1 mM, Na₂HPO₄ 0,4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,15 mM y NaHCO₃ 22,6 mM, se le adicionó glucosa 2 mg/ml. Antes de su uso se la gaseó con carbógeno durante 10 minutos, lo que permitió alcanzar un pH de 7,33.

Las retinas fueron extraídas de ojos bovinos de animales sacrificados en un frigorífico local. Inmediatamente después de la muerte del animal, los ojos fueron enucleados y colocados en un recipiente con hielo y de esta manera fueron transportados hasta el laboratorio. Los ojos se seccionaron con un bisturí en un corte sagital (plano antero posterior del globo ocular) de 1 centímetro. Posteriormente, se realizó un corte en una línea paralela al plano antedicho dividiéndose de forma tal que la mitad que contiene las lentes y el humor vítreo (parte anterior del ojo) se descartó. La otra mitad se invirtió cuidadosamente exponiendo la retina. Esta se separó del epitelio pigmentario con una espátula de bordes romos, despegándola suavemente desde el borde externo de la copa hacia la zona del nervio óptico, luego se cortó el nervio permitiendo así la extracción de la retina completa.

La incubación de las retinas con el precursor radioactivo indicado y en el medio iónico mencionado fue realizada en un baño termostatzado a 37 °C con agitación suave y continua durante 2 horas.

3.1.2. Extracción y purificación de los lípidos radiomarcados de las retinas:

Luego de transcurridas las 2 horas, se separaron las retinas del medio y los lípidos fueron extraídos del tejido con una mezcla de cloroformo: metanol (C:M) (2:1, v/v) tal como lo describen Folch y colaboradores (Folch y col., 1957). Las retinas se homogeneizaron en un homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem con vástago de teflón. El homogenado resultante se filtró y se transvasó a un Erlenmeyer con tapón de vidrio esmerilado. Previo gaseado con nitrógeno (N₂), se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas y seguidamente se guardó a 4 °C durante 24 horas.

Posteriormente, el homogenado se filtró y se procedió a purificar los lípidos eliminando las moléculas no lipídicas disueltas en solventes orgánicos. Con este fin, se transvasó a tubos de tapa esmerilada y se particionó con una solución acuosa de CaCl₂ 0,05 % conteniendo glicerol 0,1 % en una proporción de 0,2 veces el volumen del solvente orgánico final. Se agitó y se separaron las fases acuosa-metanólica (fase superior) y clorofórmica (fase inferior) centrifugando a 900 x g durante 5 minutos. Antes de desechar la fase superior, se "marcó" sobre cada tubo el menisco superior. Después de desechar la fase superior, sobre la fase inferior se agregó fase superior

teórica (FST), la cual consiste en una mezcla de C:M:CaCl₂ 0,05 % (3:48:47, v/v/v) conteniendo glicerol 0,1 %, hasta la marca. Los tubos se centrifugaron a 900 x g durante 5 minutos para separar las fases. El lavado con FST se realizó 2 veces. Los lípidos que permanecieron en la fase inferior se concentraron bajo atmósfera de N₂, se resuspendieron en un volumen pequeño de C:M (2:1 v/v), y el extracto lipídico purificado se mantuvo gaseado con N₂ a -20 °C hasta la posterior separación en sus distintas especies lipídicas.

3.1.3. Separación de los lípidos por cromatografía en capa fina:

Para separar la [³H]PC, el [³H]DAG y el [³H]TAG del resto de los lípidos radiomarcados, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC). Como soporte se utilizaron placas de vidrio de 20 cm x 20 cm, la fase estacionaria de 600 µm de espesor, se preparó con una suspensión de sílica gel G o H (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) dependiendo de los lípidos a separar. Antes de ser utilizadas, las placas fueron activadas a 110 °C en estufa durante un período que varió de 30 minutos a 1 hora. La fase móvil, compuesta por la mezcla de solventes adecuada a los lípidos a separar, se preparó y vertió sobre una cuba de vidrio donde se desarrollaron las cromatografías.

Para separar la [³H]PC y los lípidos neutros del resto de los lípidos, se realizó una TLC monodimensional utilizando como fase estacionaria sílica gel H preparada en una solución de acetato de Mg²⁺ 3 %. Como fase móvil se usó cloroformo: metanol: agua (C:M:H₂O) (65:25:4, v/v/v) (**Figura 1 A**). La mancha correspondiente a la [³H]PC y la correspondiente a los lípidos neutros fueron raspadas en tubos de tapa esmerilada y luego se eluyeron de la sílica mediante la técnica de Arvidson (Arvidson, 1968).

La [³H]PC purificada se llevó a sequedad bajo atmósfera de N₂, se resuspendió en un volumen conocido de C:M (2:1, v/v), y se almacenó bajo atmósfera de N₂ a -20 °C. Esta [³H]PC fue empleada para obtener el [³H]DAG. A su vez, de la misma se tomó una alícuota para determinar la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido y otra para determinar el fósforo (Pi) fosfolipídico, y así calcular su actividad específica.

Los lípidos neutros extraídos de la sílica se llevaron a sequedad bajo atmósfera de N₂ y se resuspendieron en un volumen pequeño de cloroformo. Se utilizó este solvente en lugar de C:M (2:1) para evitar la isomerización del DAG. Con el fin de separar los lípidos neutros entre sí, se empleó una TLC monodimensional con sílica gel G preparada en agua destilada como fase estacionaria y el sistema de solventes utilizado como fase móvil fue hexano: éter etílico: ácido acético (H:E:AcAc) (45:55:1,5, v/v/v) (**Figura 1 B**). Las manchas correspondientes al [³H]DAG y al [³H]TAG fueron raspadas en tubos de tapa esmerilada. Seguidamente, los lípidos fueron extraídos de la sílica utilizando una mezcla de n-hexano: 2-propanol (3:2, v/v) para evitar la isomerización del DAG.

El [³H]DAG y el [³H]TAG purificados se llevaron a sequedad bajo atmósfera de N₂ y se resuspendieron en un volumen conocido de cloroformo para poder ser almacenados a -20 °C, previo gaseado con N₂.

Con el fin de calcular la actividad específica de los lípidos neutros, se tomó una alícuota de los mismos para determinar la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido y otra para determinar la masa por cromatografía en fase gaseosa (GLC). El [³H]TAG generado fue empleado para obtener el [³H]monoacilglicerol ([³H]MAG) por la acción enzimática de una lipasa. No se utilizó el [³H]MAG generado a partir de la incubación de las retinas con el [2-³H]glicerol, debido a que su síntesis no rindió suficiente cantidad de dicho lípido. El [³H]DAG, utilizado como sustrato en parte de las reacciones enzimáticas ensayadas en esta Tesis Doctoral, presentó una actividad específica de 2,35 μCi/μmol.

3.1.4. Identificación y visualización de los lípidos:

Con el fin de identificar los lípidos separados en las distintas TLC, se sembraron en las placas estándares de referencia de los sustratos adecuados. Como el propósito en este caso fue aislar los lípidos para utilizarlos como sustratos enzimáticos, resultó importante la elección de un método de revelado que no dañara sus estructuras. Por tanto, la visualización se realizó bajo luz ultravioleta luego de rociar la placa con 2',7'-dichlorofluoresceína (DCF) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) al 0,05 % en

metanol. Estos procedimientos se realizaron bajo una atmósfera de N_2 para minimizar la peroxidación de los ácidos grasos insaturados.

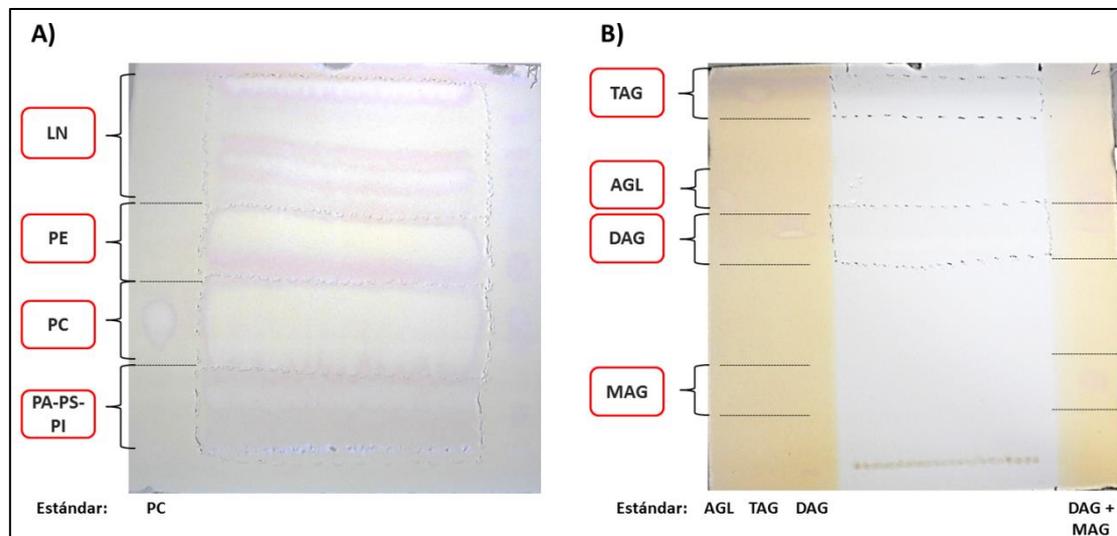


Figura 1: Cromatografías realizadas para resolver los lípidos del extracto de retina incubado con [2-³H]glicerol. A) Sílica gel H con el sistema de solventes C:M:H₂O (65:25:4, v/v/v) en una sola dimensión y revelado con diclorofluoresceína. **B)** Sílica gel G con el sistema de solventes H:E:AcAc (45:55:1,5, v/v/v) (cromatografía para resolver lípidos neutros) y revelado con diclorofluoresceína en la zona de los estándares (las muestras se rasparon “a ciegas”). Ácidos grasos libres (AGL), diacilglicerol (DAG), fosfatidato (PA), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), lípidos neutros (LN), monoacilglicerol (MAG), y triacilglicerol (TAG).

3.2. Obtención de [2-³H]diacilglicerol a partir de la hidrólisis de la [2-³H]fosfatidilcolina de la retina bovina:

La hidrólisis de la [³H]PC de la retina bovina (*sección 3.1. de Materiales y Métodos*) da origen a un [³H]DAG con una composición en grupos acilos diferente a la del [³H]DAG sintetizado por las retinas a partir del [2-³H]glicerol. La composición de ambos [³H]DAG se presenta en la Tabla 1 del *punto 2.1 de la Sección 1, Capítulo I de Resultados*.

La hidrólisis de la [³H]PC para obtener el [³H]DAG se basó en el método descrito por Parkes y Thompson (Parkes y Thompson, 1973) al cual se le aplicaron ligeras modificaciones. El equivalente a 3 mg de [³H]PC (0,15 μ Ci/ μ mol) fue secado bajo N_2 y disuelto en etanol 2 % en éter etílico (v/v). La enzima utilizada para la hidrólisis fue la fosfolipasa C de *Clostridium Welchi* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO,

Estados Unidos) y el *buffer* de ensayo empleado fue Tris 50 mM pH 7,3 conteniendo CaCl_2 3 mM. La incubación fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas, con agitación constante. Pasado este tiempo, el sustrato ($[^3\text{H}]\text{PC}$) y el producto ($[^3\text{H}]\text{DAG}$) fueron extraídos con éter etílico conteniendo agua 1 %. La separación de ambos lípidos se realizó por TLC monodimensional empleando sílica gel G como fase estacionaria y H:E:AcAc (45:55:1,5, v/v/v) como fase móvil, tal como se describió en la *sección 3.1.3. de Materiales y Métodos*, en la que se hace referencia a la separación de los lípidos neutros. La visualización se realizó por rociado de la placa con DCF (ver *sección 3.1.4. de Materiales y Métodos*). El $[^3\text{H}]\text{DAG}$ fue eluido de la sílica con una mezcla de n-hexano: 2-propanol (3:2 v/v) y almacenado en cloroformo, para evitar su isomerización, bajo una atmósfera de N_2 y a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Su actividad específica fue de $0,15\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

3.3. Obtención de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{monoacilglicerol}$ a partir de la hidrólisis del $[2\text{-}^3\text{H}]\text{triacilglicerol}$ de la retina bovina:

El $[^3\text{H}]\text{TAG}$ generado a partir de la incubación de las retinas bovinas con el $[^3\text{H}]\text{glicerol}$ (*sección 3.1. de Materiales y Métodos*) se utilizó como fuente de origen de $[^3\text{H}]\text{MAG}$ mediante la hidrólisis enzimática producida por una lipasa pancreática de cerdo (Calbiochem, Los Angeles, CA, Estados Unidos). Esta lipasa cataliza la hidrólisis del TAG de manera secuencial (Lykidis y col., 1994) generando primeramente DAG. El DAG es sustrato de la misma lipasa que también cataliza la formación de MAG. Estos pasos son secuenciales y ocurren simultáneamente pero su cinética es distinta, siendo más eficiente el paso de hidrólisis del DAG que el de hidrólisis del TAG.

La hidrólisis se frenó con el agregado de C:M (2:1, v/v) y se extrajeron los lípidos según la técnica de Folch y colaboradores (Folch y col., 1957). El $[^3\text{H}]\text{MAG}$ se separó, se identificó y se visualizó tal como se detalla en las *secciones 3.1.3 y 3.1.4. de Materiales y Métodos*. El lípido se eluyó de la placa según el método publicado por Arvidson (Arvidson, 1968). Una vez purificado, se calculó su actividad específica, tomándose una alícuota para determinar la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido y otra para determinar la masa por GLC. La misma fue de $0,5\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

Los solventes empleados para la solubilización, la extracción de lípidos y para las cromatografías aplicadas en la obtención de sustratos radioactivos fueron adquiridos en los laboratorios J.T.Baker (Millinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, Estados Unidos) y U.V.E. (Dorwil S.A., Buenos Aires, Argentina). Los reactivos utilizados en la preparación de *buffers* para la incubación de las retinas bovinas fueron obtenidos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

4. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los [2-³H]diacilgliceroles y de los [2-³H]monoacilgliceroles

La composición de los [³H]DAG y los [³H]MAG utilizados como sustratos para los ensayos enzimáticos fue determinada por GLC. Las manchas correspondientes a estos lípidos luego de ser separados por TLC y visualizados por un método no destructivo, fueron raspadas, y la sílica fue transferida a tubos con tapa a rosca con cubierta interna de Teflón para obtener los metil ésteres de ácidos grasos (FAME). Después de la metanólisis, las muestras fueron sometidas a GLC.

4.1. Obtención de los metil ésteres de ácidos grasos:

Los FAME se obtuvieron por metanólisis catalizada por trifluoruro de boro al 14 % en metanol a 45 °C bajo N₂ durante toda la noche siguiendo la técnica de Morrison y Smith (Morrison y Smith, 1964). Junto con las muestras se procesaron los controles correspondientes que permitieron evaluar la recuperación y la cuantificación de los ácidos grasos derivatizados. Una vez obtenidos los FAME en una solución metanólica, se procedió a extraerlos mediante partición con hexano y agua en igual proporción que la solución de metanol. Luego se purificaron por TLC utilizando placas de sílica gel G previamente lavadas con metanol: éter etílico (M:E, 75:25, v/v) y una fase móvil compuesta por la mezcla de solventes hexano: éter etílico (H:E, 95:5, v/v). Los FAME se visualizaron como manchas de R_f 0,5 aproximadamente bajo luz ultravioleta luego del rociado de las placas con DCF. Para extraerlos de la sílica, se realizó una partición entre agua, metanol y hexano (H₂O:M:H, 1:1:1, v/v/v), y posteriormente tres extracciones secuenciales con hexano, mediante agitación y centrifugación.

4.2. Análisis de los metil ésteres de ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa:

Los FAME se separaron por cromatografía de reparto gas-líquido en función de la longitud de su cadena y de su grado de insaturación. Para ello, se utilizó un cromatógrafo Varian 3700 que cuenta con dos columnas de vidrio (2 metros x 2 milímetros de diámetro) empaquetadas con una fase estacionaria polar SP2330 (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) 10 %, empleando N₂ como gas portador (30 mililitros/minuto). Este cromatógrafo está acoplado a dos detectores de ionización de llama utilizando un electrómetro diferencial de dos canales. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 220 °C y 230 °C, respectivamente. Las separaciones se realizaron sometiendo el horno de las columnas a gradientes de temperatura, en la mayor parte de los casos con incrementos lineales de 5 °C por minuto desde una temperatura inicial de 155 °C a una temperatura final de 230 °C, la cual se mantuvo constante durante el tiempo necesario para permitir la elución completa (aproximadamente 20 minutos).

Los FAME fueron identificados en base a sus tiempos de retención utilizando estándares comerciales. La cuantificación se realizó, según se señaló anteriormente, con un detector por ionización de llama, empleando integración electrónica (Varian Workstation).

Los reactivos utilizados en la determinación por GLC de la composición de los ácidos grasos presentes en los distintos lípidos fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) y en J.T.Baker (Millinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, Estados Unidos).

5. Métodos analíticos

5.1. Determinación de fósforo fosfolipídico:

El método utilizado para la cuantificación de fósforo fosfolipídico se basó en el descrito por Rouser y colaboradores (Rouser y col., 1970). El principio de este método

consiste en medir el fósforo inorgánico liberado por la digestión de la materia orgánica, en este caso de fosfolípidos, en presencia de ácido perclórico. Primeramente, se adicionó molibdato de amonio formándose fosfomolibdato de amonio, el cual es reducido por el ácido ascórbico a un complejo estable de color azul. El color se desarrolla por calentamiento de la reacción durante 5 minutos en un baño de agua hirviente, y se determina espectrofotométricamente a 800 nanómetros (nm) de longitud de onda (λ). A los valores de absorbancia así determinados, se les resta el valor del blanco de reacción y los μg de Pi se calculan previa realización de una curva estándar con KH_2PO_4 (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Los reactivos utilizados en la determinación de Pi fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) y en J.T.Baker (Millinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, Estados Unidos).

5.2. Determinación de proteínas:

Para cuantificar las proteínas de una preparación de la CC, se utilizó el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Este es un método colorimétrico de reacción en dos etapas. Primero los iones Cu^{2+} del reactivo C (0,5 ml de tartrato de sodio y potasio 2 % más 0,5 ml de CuSO_4 1 % cada 50 ml de Na_2CO_3 2 %, en NaOH 0,1N) en el medio alcalino forman un complejo de color azul claro con el nitrógeno presente en los enlaces peptídicos de las proteínas a determinar. La formación de estos complejos Cu^{2+} -proteína provocan la pérdida de la estructura tridimensional de las proteínas, las cuales exponen así los residuos fenólicos de los aminoácidos triptófano y tirosina. Luego, en una segunda etapa, el reactivo de Folin 2N (compuesto por ácido fosfomolibdotúngstico) es reducido por los grupos fenólicos expuestos virando su color amarillo a un color azul intenso. Este color es directamente proporcional a la concentración de proteínas en un rango de concentraciones previamente determinado.

Antes de ser cuantificadas, las proteínas deben estar solubilizadas en un medio alcalino, para lo cual se les adicionó NaOH hasta una concentración final de 0,1 N. La absorbancia de la reacción se determinó a una λ de 750 nm. Se realizó una curva

estándar empleando albúmina sérica bovina (BSA) de concentración conocida, la cual se expuso al mismo tratamiento que la muestra.

Los reactivos utilizados para la determinación de proteínas fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) y en J.T.Baker (Millinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, Estados Unidos).

5.3. Determinación de la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido:

Para determinar la radioactividad de un lípido, ya sea raspado desde una TLC o presente en una fase acuosa-metanólica o en una clorofórmica previo secado de las mismas, se colocó la muestra dentro de una vial de vidrio y luego se agregaron 0,25 ml de agua destilada y 5 ml del reactivo centelleante. El reactivo centelleante está compuesto por Preblended Dry Fluor (PPO 98 % y bis-MSD 2 %, de Research Products International Corp., Mt. Prospect, IL, Estados Unidos) en un 0,5 %, en una mezcla de 4 partes de tolueno y una parte del detergente Arkopal N-100 (ALSI Química Sanitaria, La Plata, Argentina). La medición de radioactividad se realizó con un contador de centelleo líquido WALLAK modelos 1214 Rackbeta.

6. Determinación de las actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo de los endocannabinoides

6.1. Determinación de las actividades enzimáticas que intervienen en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol:

Para analizar el metabolismo del 2-AG, se ensayaron las actividades de las enzimas que intervienen en la síntesis (la DAGL y la LPAasa) y la hidrólisis del mismo.

6.1.1. Ensayo de la actividad de la enzima diacilglicerol lipasa:

Para la determinación de la actividad enzimática de la DAGL se utilizaron sustratos de distinta composición en sus ácidos grasos, a saber:

- A)** El [³H]DAG sintetizado a partir de la incubación de las retinas bovinas con el [³H]glicerol, tal como se detalló en la *sección 3.1. de Materiales y Métodos*. Su actividad específica fue de 2,35 μCi/μmol.
- B)** El [³H]DAG generado a partir de la hidrólisis de la [³H]PC de la retina bovina, tal como se detalló en la *sección 3.2. de Materiales y Métodos*. Su actividad específica fue de 0,15 μCi/μmol.

El [³H]DAG obtenido como se especificó en **A)** tiene mayor contenido de ácido araquidónico (20:4) que el obtenido como se indicó en **B)**. Para ambos sustratos el ensayo fue llevado a cabo en similares condiciones. La composición de ambos [³H]DAG se presenta en la Tabla 1 del *punto 2.1 de la Sección 1, Capítulo I de Resultados*.

Ensayo enzimático: El ensayo enzimático fue llevado a cabo de manera similar a lo descrito por Rosenberg y colaboradores (Rosenberger y col., 2007). Para el mismo se incubaron 50 μg de proteínas en el *buffer* MOPS 50 mM, pH 7,4, conteniendo BSA 0,25 % libre de ácidos grasos y en presencia del sustrato, en un volumen final de 100 μl. La reacción comenzó con el agregado del [³H]DAG (10.000 dpm, para el sustrato **A** corresponde a una concentración en el ensayo de 20 μM y para **B** de 300 μM) y se incubó durante 20 minutos a 37 °C. Las suspensiones de los [³H]DAG fueron preparadas por sonicación durante 2 minutos con una concentración equimolecular de oleoil-LPC en el mismo *buffer* de ensayo. La reacción se frenó mediante el agregado de 5,5 ml de C:M (2:1, v/v).

Extracción y separación del sustrato y de los productos: Para la extracción lipídica se utilizó el protocolo de Folch y colaboradores (Folch y col., 1957). El extracto se particionó con 0,2 volúmenes de CaCl₂ 0,05 %, lo cual permitió la separación de las especies hidrosolubles. Seguidamente, los tubos fueron agitados utilizando un agitador vórtex y centrifugados a 900 x g durante 5 minutos. Después de la centrifugación se obtuvieron dos fases, una fase superior acuosa-metanólica y una fase inferior clorofórmica quedando las proteínas desnaturalizadas en la interfase. En la fase superior se obtiene el [³H]glicerol producto de la hidrólisis del [³H]MAG (generado por la actividad de la DAGL sobre el [³H]DAG) por una MAGL. Esta fase fue separada en un vial y llevada a sequedad para la medición de la radioactividad, tal como se especificó

en la *sección 5.3. de Materiales y Métodos*. La fase inferior se llevó a sequedad bajo una atmósfera de N₂ y se resuspendió en un volumen adecuado de C:M (2:1, v/v) para su posterior separación cromatográfica. Para la separación del producto de la reacción enzimática ([³H]MAG) de su sustrato ([³H]DAG), se utilizó una TLC monodimensional con sílica gel G como fase estacionaria y con una mezcla de H:E:AcAc (45:55:1,5, v/v/v) como fase móvil, tal como se describió en la *sección 3.1.3. de Materiales y Métodos*, donde se hace referencia a la separación de lípidos neutros.

Visualización e identificación de los lípidos: Para visualizar los lípidos separados por TLC e identificarlos mediante el uso de estándares de referencia, las placas fueron expuestas a vapores de yodo (I₂). El I₂ se fija a los dobles enlaces de los ácidos grasos y se manifiesta por aparición de manchas marrones o amarillas en la placa. La diferente intensidad de la coloración depende de la cantidad de lípido y del grado de insaturación de la especie adsorbida. La visualización de los lípidos por exposición a vapores de I₂ es un método que no conserva su estructura debido a que produce rupturas de los dobles enlaces de los ácidos grasos, por lo cual no permite su posterior utilización.

Una vez revelada la placa y después de evaporar el I₂, se procedió a raspar los lípidos en viales para su cuantificación por espectrometría de centello líquido, tal como se describió en la *sección 5.3. de Materiales y Métodos*.

La actividad de la DAGL se expresó como nmol de [³H]MAG x (mg de proteína x min)⁻¹.

6.1.2. Ensayo de la actividad de la enzima lisofosfatidato fosfohidrolasa:

El ensayo de medición de la actividad enzimática de la LPAasa se realizó utilizando 1-[9,10-³H]oleil-LPA (American Radiolabeled Chemicals, Inc, St. Louis, MO, Estados Unidos) como sustrato.

Ensayo enzimático: El ensayo enzimático fue llevado a cabo de manera similar a lo descrito por Baker y Chang (Baker y Chang, 2000) con ligeras modificaciones. Con el propósito de determinar qué compuesto lograba una mejor inhibición de la hidrólisis del MAG, producto de la reacción de la LPAasa, en una primera instancia la síntesis del

2-AG a partir del LPA se ensayó en presencia de los inhibidores de la MAGL, KML-29, y ácido oleico. Para ello, una fracción equivalente a 50 µg de proteínas se preincubó con el inhibidor KML-29 (Chang y col., 2012) en una concentración de 1 µM durante 30 minutos o con el ácido oleico en una concentración de 200 µM durante 10 minutos a 37 °C en el *buffer* Tris 100 µM, pH 7,4 conteniendo DTT 1,2 mM y EDTA 2 mM. Durante los últimos 10 minutos de la preincubación se agregó N-etilmaleimida (NEM) 4,4 mM. Transcurrido el tiempo de preincubación, se inició la reacción enzimática con el agregado de 1-[³H]oleil-LPA (60.000 dpm, concentración final en el ensayo de 20 µM). El sustrato, cuya actividad específica fue de 13,6 µCi/µmol, se preparó adicionando oleoil-LPA frío solubilizado en *buffer* fosfato salino (PBS) (pH 7,4) conteniendo BSA 0,1 % libre de ácidos grasos, al LPA radiomarcado (actividad específica de la solución comercial: 54 Ci/mmol), y sonicando durante 1 minuto. El volumen final de este ensayo fue de 100 µl. La incubación se realizó a 37 °C durante 20 minutos. La reacción enzimática se frenó mediante el agregado de 3 ml de C:M (1:1, v/v).

Extracción y separación del sustrato y de los productos: Para la extracción lipídica se utilizó un protocolo basado en lo descrito por Folch y colaboradores (Folch y col., 1957) con leves modificaciones. Después de frenar la reacción, se adicionó 1 ml de C:M:HCl 12,5 N (1:1:0,06, v/v/v) dejándose en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. El extracto se reconstituyó con 2 ml de cloroformo de manera que la mezcla de C:M quedara en una proporción 2:1 (v/v), y se procedió a particionarlo con 0,2 volúmenes de agua destilada para separar las especies hidrosolubles. Seguidamente los tubos fueron agitados utilizando un agitador vórtex y centrifugados a 900 x g durante 5 minutos. A partir de la centrifugación, se obtuvieron dos fases: una fase superior acuosa-metanólica y una fase inferior clorofórmica quedando las proteínas desnaturalizadas en la interfase. La fase superior fue separada en una vial y llevada a sequedad para la medición de la radioactividad, tal como se especificó anteriormente en la *sección 5.3. de Materiales y Métodos*. La fase inferior se llevó a sequedad bajo una atmósfera de N₂ y se resuspendió en un volumen adecuado de C:M (2:1, v/v) para su posterior separación cromatográfica. Para separar los productos de la reacción ([³H]oleato y [³H]oleil-MAG) del sustrato ([³H]LPA), se realizó una TLC utilizando, como fase estacionaria, sílica gel H preparada en una solución de acetato de Mg²⁺ 3 %, y

como fase móvil se emplearon dos sistemas de solventes. El primer sistema consistió en una mezcla de cloroformo: acetona: metanol: ácido acético: agua (C:A:M:AcAc:H₂O, 30:40:10:10:4, v/v/v/v/v) (Rouser II) (Rouser y col., 1970) y se realizó la cromatografía hasta un tercio de la placa. Para resolver los lípidos neutros, se empleó como segundo sistema H:E:AcAc (45:55:1,5, v/v/v) en el mismo sentido que la primer corrida pero hasta el borde superior de la placa (**Figura 2**).

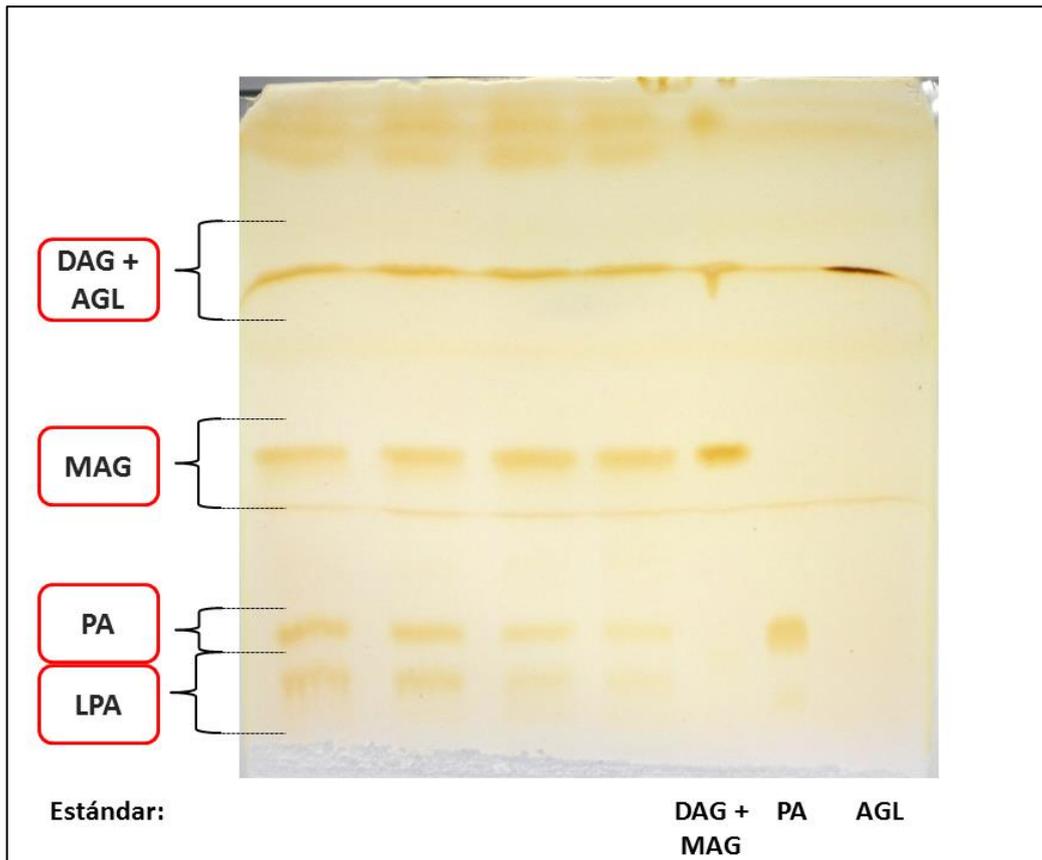


Figura 2: Cromatografía realizada para resolver los lípidos después del ensayo enzimático de la lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAasa). Sílica gel H con el sistema de solventes: 1° Rouser II hasta un tercio de la placa y 2° H:E:AcAc (45:55:1,5, v/v/v) en el mismo sentido que la primer corrida pero hasta el borde superior de la placa. Revelado con vapores de Iodo. Ácidos grasos libres (AGL), diacilglicerol (DAG), fosfatidato (PA), lisofosfatidato (LPA) y monoacilglicerol (MAG).

Visualización e identificación de los lípidos: Para visualizar e identificar los lípidos separados por TLC, las placas fueron expuestas a vapores de I₂ como se detalló para el ensayo de la DAGL (ver sección 6.1.1. de *Materiales y Métodos, Visualización e identificación de los lípidos*).

Después del revelado de la placa se procedió a raspar los lípidos en viales para su posterior cuantificación por espectrometría de centello líquido, según se describió en la *sección 5.3. de Materiales y Métodos*.

La actividad de la LPAasa se expresó como nmol de [³H]MAG x (mg de proteína x min)⁻¹.

6.1.3. Ensayo de la hidrólisis de los monoacilgliceroles con distinta composición en acilos y del 2-araquidonoilglicerol:

La hidrólisis de los MAG se ensayó empleando distintos sustratos:

- A')** El [³H]MAG endógeno generado por la acción de la DAGL sobre el [³H]DAG sintetizado a partir de la incubación de las retinas bovinas con el [³H]glicerol. Para este sustrato, la actividad enzimática se determinó en forma simultánea al ensayo de la DAGL (reacción acoplada a la acción de la DAGL), por lo tanto, las condiciones de ensayo fueron las mismas que las mencionadas en la *sección 6.1.1. de Materiales y Métodos*.
- B')** El [³H]MAG endógeno generado por la acción de la DAGL sobre el [³H]DAG obtenido a partir de la hidrólisis de la [³H]PC de la retina bovina. Para este sustrato, la actividad enzimática también se determinó en forma simultánea al ensayo de la DAGL (reacción acoplada a la acción de la DAGL), por lo tanto, las condiciones de ensayo fueron las mismas que las mencionadas en la *sección 6.1.1. de Materiales y Métodos*.
- C')** El [³H]MAG obtenido a partir del [³H]TAG que provenía de la incubación de las retinas bovinas con el [³H]glicerol, tal como se especificó en la *sección 3.3. de Materiales y Métodos*. Su actividad específica fue de 0,5 μCi/μmol.
- D')** 2-araquidonoil-[1,2,3-³H]glicerol ([³H]2-AG) (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, Estados Unidos) preparado a partir de una solución comercial (40 Ci/mmol) solubilizada en acetonitrilo, agregando 2-AG frío para obtener una actividad específica de 1,3 μCi/mmol).

Ensayo enzimático: Los ensayos de hidrólisis de los MAG y del 2-AG utilizando los sustratos **C'**) y **D'**), respectivamente, fueron llevados a cabo de manera similar a lo descrito por Baker y Chang (Baker y Chang, 2000) con ciertas modificaciones basadas en el protocolo de Blankman y colaboradores (Blankman y col., 2007). Los ensayos enzimáticos se realizaron incubando 50 µg de proteína en un volumen final de incubación de 200 µl en el *buffer* Tris 50 mM, pH 7,5 conteniendo EDTA 1 mM. La reacción se inició con el agregado del equivalente a 5.000 dpm de sustrato, esto corresponde a una concentración final en el ensayo de 20 µM del sustrato **C'**) y de 10 µM del sustrato **D'**). La reacción fue llevada a cabo durante 20 minutos a 37 °C y se frenó mediante el agregado de 400 µl de C:M (1:1, v/v) en hielo.

Extracción y separación del sustrato y del producto: Para la separación del sustrato y del producto, primero se dejaron los tubos a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se centrifugaron a 900 x g durante 5 minutos. La fase superior acuosa-metanólica conteniendo el producto de la reacción, [³H]glicerol, fue colectada en una vial y llevada a sequedad para la medición de la radioactividad tal como se especificó en la *sección 5.3. de Materiales y Métodos*. La fase inferior clorofórmica que contenía los lípidos se concentró bajo una atmósfera de N₂, se resuspendió y se cromatografió en una placa fina monodimensional con sílica gel G como fase estacionaria y H:E:AcAc (45:55:1,5, v/v/v) como fase móvil, tal como se describió en la *sección 3.1.3. de Materiales y Métodos* en la que se hace referencia a la separación de los lípidos neutros.

Visualización e identificación de los lípidos: Para visualizar e identificar los lípidos separados por TLC, las placas fueron expuestas a vapores de I₂, según se detalló para el ensayo de la DAGL (ver *sección 6.1.1. de Materiales y Métodos, Visualización e identificación de los lípidos*).

Después del revelado de la placa se procedió a raspar los lípidos en viales para su posterior cuantificación por espectrometría de centello líquido, según se describió en la *sección 5.3. de Materiales y Métodos*.

Tanto la hidrólisis de los MAG como la del 2-AG se expresaron como nmol de [³H]glicerol x (mg de proteína x min)⁻¹.

6.2. Determinación de la actividad de la enzima ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de la araquidonoiletanolamida:

La medición de la actividad enzimática de la FAAH se ensayó utilizando anandamida, [1-³H]etanolamina ([³H]anandamida, [³H]AEA) como sustrato (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, Estados Unidos) preparado a partir de una solución madre comercial (60 Ci/mmol) solubilizada en etanol, agregando AEA fría para obtener una actividad específica de 1,14 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$.

Ensayo enzimático: El ensayo fue llevado a cabo de manera similar a lo descrito por Saario y colaboradores (Saario y col., 2006) con ligeras modificaciones. Se incubaron 50 μg de proteínas en el *buffer* Tris 50 mM, pH 7,5 conteniendo EDTA 1 mM y en presencia de BSA 0,5 % (p/v). La reacción se inició con el agregado del sustrato (15.000 dpm, concentración final en el ensayo de 30 μM) y se incubó durante 15 minutos a 37 °C, en un volumen final de 200 μl . Para frenar la reacción, se agregaron 400 μl de C:M (1:1, v/v) y seguidamente 100 μl de etanolamina 1 mM, colocándose los tubos inmediatamente en hielo.

Extracción y separación del sustrato y del producto: Para la separación del sustrato y del producto, se procedió de la misma manera que para el ensayo de hidrólisis del 2-AG. El producto de la reacción, [³H]etanolamina, fue colectado de la fase superior acuosa-metanólica luego de la centrifugación a 900 x g durante 5 minutos. Por su parte, el sustrato sin reaccionar fue colectado desde la fase inferior clorofórmica.

Tanto el producto contenido en la fase superior como el sustrato sin reaccionar contenido en la fase inferior fueron colectados en viales y llevados a sequedad para la medición de la radioactividad (ver sección 5.3. de *Materiales y Métodos*).

La actividad de la FAAH se expresó como nmol de [³H]etanolamina x (mg de proteína x min)⁻¹.

6.3. Blancos de reacción enzimática:

Para todos los ensayos enzimáticos se realizaron los blancos correspondientes, los cuales fueron restados a cada actividad enzimática ensayada. Estos fueron preparados de igual manera que los ensayos descritos anteriormente, con la salvedad de que las proteínas fueron previamente desnaturalizadas por calentamiento a 100 °C durante 10 minutos o por el agregado de la mezcla de solventes orgánicos utilizados para frenar la reacción antes de la incubación con el sustrato. También se prepararon blancos sin el agregado de proteínas, los cuales mostraron resultados similares a los blancos preparados con las proteínas desnaturalizadas.

6.4. Evaluación de la acción de los inhibidores de la monoacilglicerol lipasa y de la ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de los endocannabinoides:

Para ensayar la acción de los inhibidores enzimáticos sobre el metabolismo de los endocannabinoides y, de esta manera, dilucidar el grado de participación de las diferentes enzimas involucradas en el mismo, se realizaron ensayos enzimáticos preincubando las fracciones de membrana y sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles con:

- I. URB-602 (1 mM): solubilizado en el *buffer* de ensayo. El URB-602 es un inhibidor de la MAGL (King y col., 2007).
- II. KML-29 (1 µM): solubilizado en DMSO a una concentración tal que no modifica la actividad enzimática. El KML-29 es un inhibidor de la MAGL (Chang y col., 2012).
- III. URB-597 (0,1 µM): solubilizado en el *buffer* de ensayo. El URB-597 es un inhibidor de la FAAH (Fegley y col., 2005).

La preincubación se realizó durante 10 minutos para I. y III. y durante 30 minutos para II. Luego se procedió con el ensayo enzimático según se describió anteriormente.

Los inhibidores de la MAGL (URB-602) y de la FAAH (URB-597), adquiridos en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, Estados Unidos), fueron gentilmente

proporcionados por la Dra. María L. de Ceballos (Departamento de Neurociencia Celular, Molecular y de Desarrollo, y CIBERNED, Instituto Cajal, CISC, Madrid, España). El inhibidor altamente específico de la MAGL (KML-29) fue sintetizado y generosamente donado por el Dr. Benjamin Cravatt (*Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, Estados Unidos*).

Los solventes empleados para la solubilización, la extracción de lípidos y para las cromatografías aplicadas en los distintos ensayos enzimáticos fueron adquiridos en Dorwil S.A. (Buenos Aires, Argentina). Los reactivos utilizados para la preparación de los *buffers* empleados en estos ensayos fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

7. Ensayos enzimáticos para evaluar la acción de agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2

Con el fin de establecer una posible relación entre los agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides y las enzimas que intervienen en el metabolismo de los endocannabinoides, se realizaron los ensayos enzimáticos descritos en la *sección 6. de Materiales y Métodos* en presencia de diferentes ligandos de los CBR. Estos ensayos fueron llevados a cabo en dos etapas. En la primera etapa, se analizó la acción de los agonistas o antagonistas de los receptores CB1 y CB2. En la segunda etapa, se analizó la acción de un agonista mixto CB1R/CB2R previo bloqueo de uno de los dos receptores cannabinoides con un antagonista específico.

7.1. Acción de agonistas o antagonistas de los receptores CB1 y CB2 sobre el metabolismo de los endocannabinoides:

La acción de agonistas o de antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 sobre las distintas actividades enzimáticas involucradas en la síntesis y degradación de los endocannabinoides, se determinó preincubando las fracciones sinaptosomales de la CC de ratas adultas y seniles en el *buffer* y bajo las condiciones

anteriormente señaladas para cada uno de los ensayos enzimáticos durante 10 minutos en presencia de:

- ✓ 5 μM de WIN55212-2 (WIN) solubilizado en el *buffer* de ensayo respectivo. El WIN es un agonista de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (agonista mixto CB1R/CB2R) (Felder y col., 1995; D'Ambra y col., 1992).
- ✓ 5 μM de JWH-133 (JWH) solubilizado en el *buffer* de ensayo respectivo. El JWH es un agonista del receptor cannabinoide CB2 (Huffman y col., 1999).
- ✓ 1 μM de SR141716 (SR1) solubilizado en DMSO a una concentración tal que no afecta las actividades enzimáticas (Ramirez y col., 2005; Breivogel y col., 2004). El SR1 es un antagonista del receptor cannabinoide CB1 (Rinaldi-Carmona y col., 1995).
- ✓ 1 μM de SR144528 (SR2) solubilizado en DMSO a una concentración tal que no afecta las actividades enzimáticas (Ramirez y col., 2005; Breivogel y col., 2004). El SR2 es un antagonista del receptor cannabinoide CB2 (Rinaldi-Carmona y col., 1998).
- ✓ 1 μM de SR1 y 1 μM de SR2 en simultáneo.

Luego se procedió con el ensayo enzimático según se describió anteriormente. El **Esquema 3-A** representa un ejemplo de un ensayo enzimático en una línea de tiempo donde se visualiza el momento del agregado del agonista o del/de los antagonista/s, la preincubación con los mismos, y el inicio y frenado de la reacción.

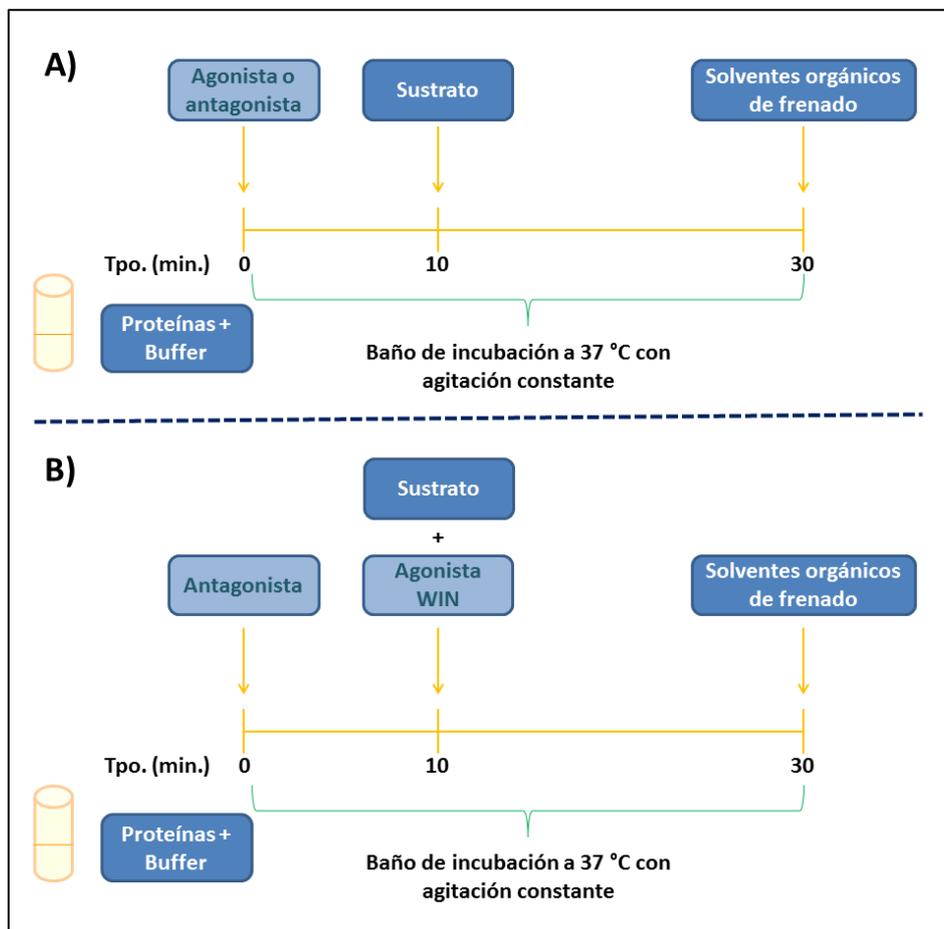
7.2. Acción de un agonista mixto en presencia de un antagonista de los receptores CB1 o CB2 sobre el metabolismo de los endocannabinoides:

Para determinar la acción del agonista mixto WIN a través del receptor CB1 o a través del receptor CB2, se preincubaron en el *buffer* y bajo las condiciones mencionadas para cada uno de los ensayos enzimáticos, las fracciones sinaptosomales de la CC de ratas adultas y seniles durante 10 minutos con:

- ✓ 1 μ M del antagonista del CB1R, SR1.
- ✓ 1 μ M del antagonista del CB2R, SR2.

Después de la preincubación, se inició la reacción enzimática con el agregado en simultáneo de 5 μ M del agonista mixto WIN y del sustrato respectivo. Seguidamente se procedió con el ensayo enzimático como se describió anteriormente.

El **Esquema 3-B** muestra un ejemplo de un ensayo enzimático en una línea de tiempo donde se visualiza el momento del agregado del antagonista, la preincubación con el mismo, el agregado del agonista y del sustrato indicando el inicio de la reacción, y el frenado de la misma.



Esquema 3: Ejemplo de ensayo enzimático en una línea de tiempo para la evaluación de: A) preincubación con agonistas o antagonistas y B) preincubación con antagonistas e incubación con el agonista mixto.

Los agonistas (WIN55212-2 y JWH-133) y los antagonistas (SR141716 y SR144528) de receptores cannabinoides fueron gentilmente proporcionados por la Dra. de Ceballos. Los agonistas fueron adquiridos por la Dra. de Ceballos en Tocris Bioscience (Bristol, Reino unido) en tanto que los antagonistas fueron sintetizados y donados a la Dra. de Ceballos por Sanofi-Synthelabo (Montpellier, Francia).

8. Ensayo de la degradación de los endocannabinoides en los sinaptosomas incubados con diferentes conformaciones del péptido beta amiloide

Con el fin de analizar la degradación de los endocannabinoides en un modelo de EA, se ensayaron las actividades enzimáticas involucradas en la hidrólisis del 2-AG y de la AEA, tal como fueron descritas en la *sección 6. de Materiales y Métodos*, en presencia del péptido β A. Para ello, se utilizaron sinaptosomas preincubados con distintas conformaciones del mismo, como un modelo *in vitro* de la EA.

8.1. Preparación del péptido beta amiloide:

Para la obtención de las conformaciones de oligómeros y fibrillas del péptido β A, se utilizaron los fragmentos 1-40 y 1-42. El protocolo de obtención de oligómeros fue llevado a cabo de manera similar a lo descrito por Uranga y colaboradores (Uranga y col., 2010), en tanto que el protocolo de obtención de fibrillas fue similar a lo descrito por Martín-Moreno y colaboradores (Martin-Moreno y col., 2011). A ambos protocolos se les introdujeron pequeñas modificaciones. Los fragmentos 1-40 y 1-42 del péptido β A fueron resuspendidos en DMSO a una concentración de 10 mg/ml. A partir de dicha solución, se prepararon diluciones en PBS a una concentración de 80 μ M, las cuales fueron “envejecidas” a 37 °C durante 2 horas con agitación constante de 300 rpm para la obtención de los oligómeros. Posteriormente, se continuó incubando las preparaciones durante 22 horas más (incubación total de 24 horas) a 37 °C con agitación constante de 150 rpm para la obtención de las fibrillas. A las 2 y a las 24 horas, como así también antes de proceder a incubar los péptidos, se tomaron alícuotas de las distintas conformaciones para ser analizadas por microscopía

electrónica de transmisión (MET) y para la preincubación con los sinaptosomas previo a la realización de los ensayos enzimáticos correspondientes.

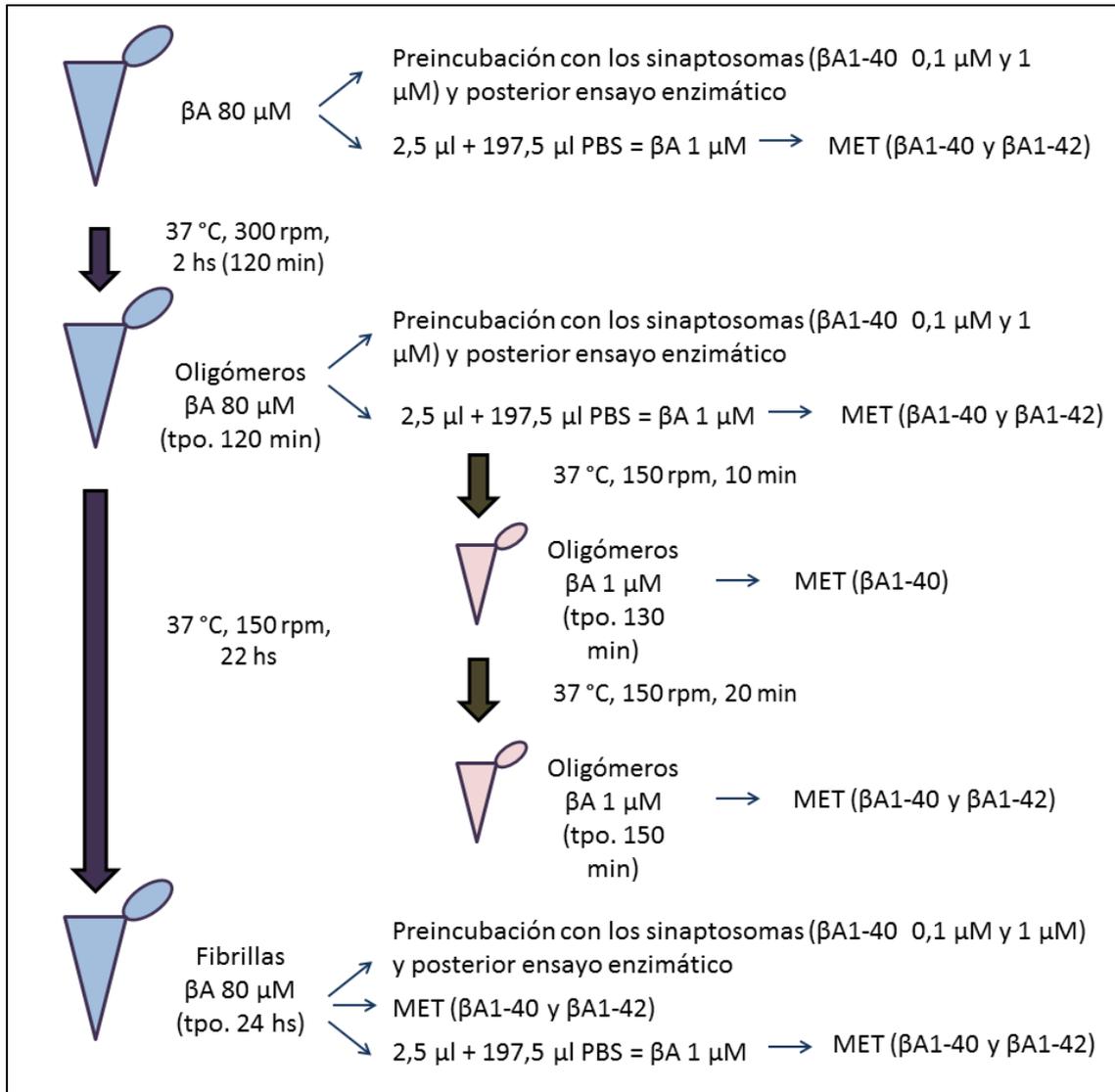
8.2. Preincubación de los sinaptosomas con el péptido beta amiloide y realización de los ensayos enzimáticos:

Los sinaptosomas de la CC de ratas adultas fueron preincubados durante 10 minutos con 0,1 μM y 1 μM del péptido $\beta\text{A1-40}$ en las siguientes conformaciones:

- Conformación obtenida antes de “envejecer” los péptidos.
- Conformación obtenida luego de “envejecer” los péptidos a 37 °C durante 2 horas (oligómeros).
- Conformación obtenida luego de “envejecer” los péptidos a 37 °C durante 24 horas (fibrillas).

Luego se procedió con los ensayos enzimáticos según se describió anteriormente.

En el **Esquema 4** se representa el proceso de “envejecimiento” del péptido βA para obtener las distintas conformaciones del mismo, indicando el momento en que se toman las alícuotas para realizar, por una parte, la preincubación con los sinaptosomas ($\beta\text{A1-40}$) y por otra parte, la MET ($\beta\text{A1-40}$ y $\beta\text{A1-42}$).



Esquema 4: Protocolo de envejecimiento de los péptidos beta amiloide (βA) 1-40 y 1-42 para la obtención de oligómeros según el método anteriormente descrito por Uranga y colaboradores (Uranga y col., 2010) y para la obtención de fibrillas según el método anteriormente descrito por Martín-Moreno y colaboradores (Martín-Moreno y col., 2011), con ligeras modificaciones. *Buffer* fosfato salino (PBS) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

El péptido βA1-40, adquirido en PolyPeptide Labs (Strasbourg, Francia), fue gentilmente proporcionado por la Dra. de Ceballos. El péptido βA1-42, adquirido en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos), fue gentilmente proporcionado por el Dr. Nicolás Guillermo Bazán (*Neuroscience Center of Excellence Louisiana State University, Health Sciences Center, New Orleans, LA, Estados Unidos*).

9. Inmunodetección de proteínas por *Western Blot*

Para la detección de las enzimas involucradas en el metabolismo de los endocannabinoides y de los receptores cannabinoides en fracciones de membrana, sinaptosomal y/o soluble de la CC de ratas adultas y seniles, se utilizó la técnica de inmunodetección de proteínas por *Western Blot* (WB).

9.1. Preparación de las muestras:

En primer lugar, a las fracciones de membrana, soluble o sinaptosomal de la CC de rata se les determinó la concentración de proteínas aplicando el método de Lowry, según se describió en la *sección 5.2. de Materiales y Métodos*.

En el caso en el que se emplearon cultivos celulares como controles positivos, a las células se les removió el medio y se las solubilizó en 80 μ l de *buffer* de lisis RIPA (Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 15 mM, Triton X-100 1%, NaF 5 mM, Na₂VO₄ 1 mM e inhibidores de proteasas). Posteriormente, se centrifugó para obtener, en el sobrenadante, el lisado libre de núcleos al cual se le determinó la concentración de proteínas también por el método de Lowry y se prosiguió de igual manera que con las muestras de la CC de rata.

De acuerdo con la concentración de proteínas, las preparaciones se diluyeron con el *buffer* Laemmli 4X (Tris 0,25 M, pH 6,8, 2-mercaptoetanol 20 %, glicerol 40 %, SDS 8 % y azul de bromofenol 0,01 %) en una proporción de 3:1 (Muestra: Laemmli) y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos (Laemmli, 1970).

9.2. Electroforesis y transferencia de las proteínas:

Una vez preparadas, las proteínas fueron resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Para ello, se sembraron 40 μ g de proteínas y se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10 %. Este gel estaba formado por acrilamida 10 % y bisacrilamida 0,26 % en Tris 375 mM pH 8,8 conteniendo SDS 0,1 %, persulfato amónico 0,05 % y TEMED 0,05 %. El gel de empaquetamiento estaba constituido por acrilamida 3,8 % y bisacrilamida 0,1 % en

Tris 125 mM pH 6,8 conteniendo SDS, persulfato amónico y TEMED en las mismas concentraciones que para el gel de corrida.

El *buffer* de electroforesis estaba compuesto por Tris 5 mM, glicina 40 mM y SDS 0,2 % (pH 8,3). La corrida se realizó a voltaje variable y amperaje constante de 30 mA durante aproximadamente 90 minutos.

Seguidamente, las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilidenofluoruro (PVDF) Immobilon (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) utilizando un Mini Trans-Blot cell electroblotter (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) durante 75 minutos a 350 mA y a un voltaje variable. El *buffer* de transferencia estaba compuesto por Tris 48 mM pH 9,2, glicina 39 mM, metanol 20 % y SDS 0,035 %.

9.3. Bloqueo, incubaciones con anticuerpos e inmunodetección:

Las membranas fueron bloqueadas a temperatura ambiente durante 2 horas utilizando BSA 5 % en el *buffer* TBS-T (Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 %). Después de tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T, se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo primario específico diluido en la solución de bloqueo. Las membranas fueron posteriormente sometidas a otros tres lavados de 5 minutos cada uno, y luego incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con una peroxidasa de rábano (HRP). Todas las incubaciones fueron realizadas con agitación constante.

Los reactivos utilizados en la preparación de *buffers* para la realización de los WB fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) o en J.T.Baker (Millinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, Estados Unidos) a excepción de la acrilamida y la bisacrilamida que se obtuvieron en Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, Estados Unidos).

Las condiciones de incubación y las concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios variaron según la proteína a detectar.

Anticuerpos primarios y secundarios:

→ El anticuerpo policlonal primario de conejo anti-MAGL se utilizó en una dilución de 1:2.000 y las membranas se incubaron durante 2 horas a

temperatura ambiente. El anticuerpo secundario para IgG de conejo se utilizó en una dilución de 1:10.000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

- El anticuerpo primario policlonal de conejo anti-FAAH se utilizó en una dilución de 1:2.000 y las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario para IgG de conejo se utilizó en una dilución de 1:10.000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
- El anticuerpo primario policlonal de cabra anti-DAGL- α se utilizó en una dilución 1:2.000 y las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario para IgG de cabra se utilizó en una dilución de 1:1.000 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
- El anticuerpo primario policlonal de conejo anti-DAGL- β , se utilizó en una dilución de 1:2.000 y las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario para IgG de conejo se utilizó en una dilución de 1:3.000 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
- El anticuerpo primario policlonal de conejo anti-CB1R se utilizó en una dilución de 1:3.000 y las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C. El anticuerpo secundario para IgG de conejo se utilizó en una dilución de 1:10.000 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
- El anticuerpo primario policlonal de conejo anti-CB2R (Thermo Scientific, Cat. PA1-744) se utilizó en una dilución de 1:1.000 y las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C. El anticuerpo secundario para IgG de conejo se utilizó en una dilución de 1:2.000 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.

- El anticuerpo primario policlonal de conejo anti-CB2R (Alomone Labs, Cat. ACR-002) se utilizó en una dilución de 1:1.000 y las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C. El anticuerpo secundario para IgG de conejo se utilizó en una dilución de 1:5.000 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Cuando se usó el péptido control, primero se lo preincubó con una dilución 1:1.000 del anticuerpo primario (a razón de 1 µg de péptido cada 1 µg de anticuerpo) durante toda la noche a 4 °C. Después se procedió a incubar las membranas con esta preparación y posteriormente con el anticuerpo secundario.
- El anticuerpo primario policlonal de conejo anti-CB2R (Santa Cruz, Cat. Sc-25494) se utilizó en una dilución de 1:500 y las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C. El anticuerpo secundario para IgG de conejo se utilizó en una dilución de 1:5.000 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
- El anticuerpo primario policlonal de cabra anti-Actina se utilizó como control de carga en una dilución de 1:1.000 y las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C. El anticuerpo secundario para IgG de cabra se utilizó en una dilución de 1:1.000 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
- El anticuerpo primario policlonal de ratón anti-Tubulina se utilizó como control de carga en una dilución de 1:5.000 y las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario para IgG de ratón se utilizó en una dilución de 1:5.000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios anti-MAGL, anti-FAAH, anti-CB1 y uno de los anticuerpos anti-CB2 utilizado fueron gentilmente proporcionados por la Dra. de Ceballos. Los anticuerpos anti-MAGL y anti-FAAH fueron adquiridos por la Dra. de Ceballos en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, Estados Unidos) y el anti-CB2 en Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA Estados Unidos). El anti-CB1 fue sintetizado y donado a

la Dra. de Ceballos por el Dr. Ken Mackie (*Department of Psychological and Brain Sciences, Indiana University, Bloomington, IN, Estados Unidos*). Los anticuerpos primarios anti-DAGL- α y anti-DAGL- β fueron gentilmente donados por el Dr. Patrick Doherty (*King's College London, Londres, Reino Unido*). El anticuerpo anti-DAGL- α fue adquirido por el Dr. Doherty en ABCAM (Cambridge, MA, Estados Unidos) y el anti-DAGL- β fue sintetizado en su laboratorio. El anticuerpo primario anti-Tubulina fue adquirido en Calbiochem (Los Angeles, CA, Estados Unidos). Por otro lado, tanto el anticuerpo primario anti-Actina, uno de los anticuerpos primarios anti-CB2 utilizados, como los anticuerpos secundarios para IgG de conejo, IgG de cabra, e IgG de ratón conjugados con HRP, fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, Estados Unidos). El tercer anticuerpo primario anti-CB2 utilizado y su péptido control correspondiente fueron adquiridos en Alomone Labs (Jerusalem, Israel).

La inmunodetección se realizó por medio de un ensayo de quimioluminiscencia utilizando el *kit* Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents y placas autorradiográficas, ambos adquiridos en GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, Estados Unidos).

Para una correcta identificación de la banda correspondiente a la proteína de interés, se sembró en todos los casos un marcador de peso molecular en el mismo gel en el que se sembró la muestra.

10. Microscopía electrónica de transmisión

La agregación de los péptidos β A1-40 y β A1-42 en sus distintas conformaciones se confirmó mediante la técnica de MET. Se tomaron alícuotas de 4 μ l de las preparaciones del péptido 1 μ M y/o 80 μ M a distintos tiempos, a saber, al momento de solubilizarlo, al momento de formación de los oligómeros (2 horas de incubación) y al momento de formación de las fibrillas (24 hs de incubación). A su vez, se tomaron alícuotas de los oligómeros después de su incubación a 37 °C durante 10 y 30 minutos más para probar la estabilidad de esta conformación en el transcurso de la preincubación y del ensayo enzimático. Las alícuotas fueron colocadas en grillas

recubiertas o no con carbono en las que fueron incubadas durante 60 segundos. Posteriormente, a cada grilla se le agregó 10 μ l de glutaraldehído 0,5 % incubándolas por 60 segundos más, se lavó con gotas de agua destilada y se secó. Por último, se colorearon con acetato de uranilo 2 % durante 2 minutos, se dejaron secar y se observaron en un microscopio electrónico JEOL 100 CXII.

11. Análisis estadístico de los datos obtenidos

El grado de significatividad de los cambios observados entre las condiciones control y experimental se determinó mediante el test “t” de Student o ANOVA de doble vía con posterior test de Bonferroni, según correspondiera. Para ello, se utilizaron los siguientes softwares: Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, Estados Unidos, www.graphpad.com), e InfoStat versión 2009p (FCA-Universidad Nacional de Córdoba–Argentina, www.infostat.com.ar). Cada experimento se repitió un mínimo de tres veces utilizando un *pool* de al menos dos animales y realizando las determinaciones por triplicado en cada ocasión. Los datos graficados corresponden a la media \pm error estándar de la media (SEM) de un *n* mínimo igual a tres. Los grados de significatividad (*p*) se expresan en las leyendas de las figuras. Los valores de *p* menores a 0,05 se consideran estadísticamente significativos.

CAPÍTULO I

**"ESTUDIO DEL METABOLISMO
DEL 2-ARAQUIDONOILGLICEROL"**

Sección 1:

*El metabolismo del 2-
araquidonoilglicerol en el
envejecimiento fisiológico*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En la primera etapa de esta Tesis Doctoral se analizó la presencia de las principales enzimas involucradas en la síntesis (isoformas α y β de la DAGL) y en la hidrólisis (MAGL y FAAH) del 2-AG tanto en las fracciones de membrana y soluble como en sinaptosomas de la CC de rata. Este estudio comparativo entre animales adultos y seniles, se realizó con el fin de determinar posibles diferencias en la expresión de estas enzimas en el proceso de envejecimiento fisiológico.

Por otra parte, se ensayaron, en las mismas fracciones y en ambos grupos etarios, las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis (actividades de la DAGL y de la LPAasa) y en la hidrólisis del 2-AG. Este estudio fue realizado para determinar si existe un paralelismo entre la expresión y la actividad de las diferentes enzimas y para inferir qué ocurre con el nivel de este endocannabinoide en el estado de envejecimiento fisiológico.

Con la finalidad de analizar las actividades de la DAGL y de la hidrólisis sobre el 2-AG, se utilizaron sustratos (DAG o MAG) de diferente composición en acilos. Esto permitió establecer la especificidad de las enzimas presentes en la CC de rata por los diferentes sustratos.

Si bien se sabe que existen diversas enzimas capaces de degradar al 2-AG, la principal actividad enzimática encargada de esta acción en el cerebro es la de la MAGL. En este Capítulo se presenta el grado de participación de las diferentes enzimas que intervienen en la hidrólisis del 2-AG, específicamente en las fracciones de membrana y sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles.

RESULTADOS

1. Expresión de las enzimas que intervienen en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

Para evaluar la expresión de las enzimas que intervienen en el metabolismo del 2-AG en la CC de rata se realizaron ensayos de WB.

En la **Figura 1** se observa la expresión de las siguientes enzimas: DAGL isoformas α y β , MAGL y FAAH, en la fracción de membrana (libre de la fracción nuclear) de la CC de ratas adultas y seniles. Como puede apreciarse, en la fracción de membrana se expresan ambas isoformas de la DAGL. Esta figura muestra que la expresión de la isoforma β no varió en el envejecimiento mientras que la isoforma α disminuyó en un 48 %. La expresión de la MAGL se observa por la aparición de 2 bandas coincidentes con un peso molecular de aproximadamente 35 kDa. El nivel de la MAGL no varió con el envejecimiento, sin embargo, el nivel de la FAAH aumentó ligeramente (20 %).

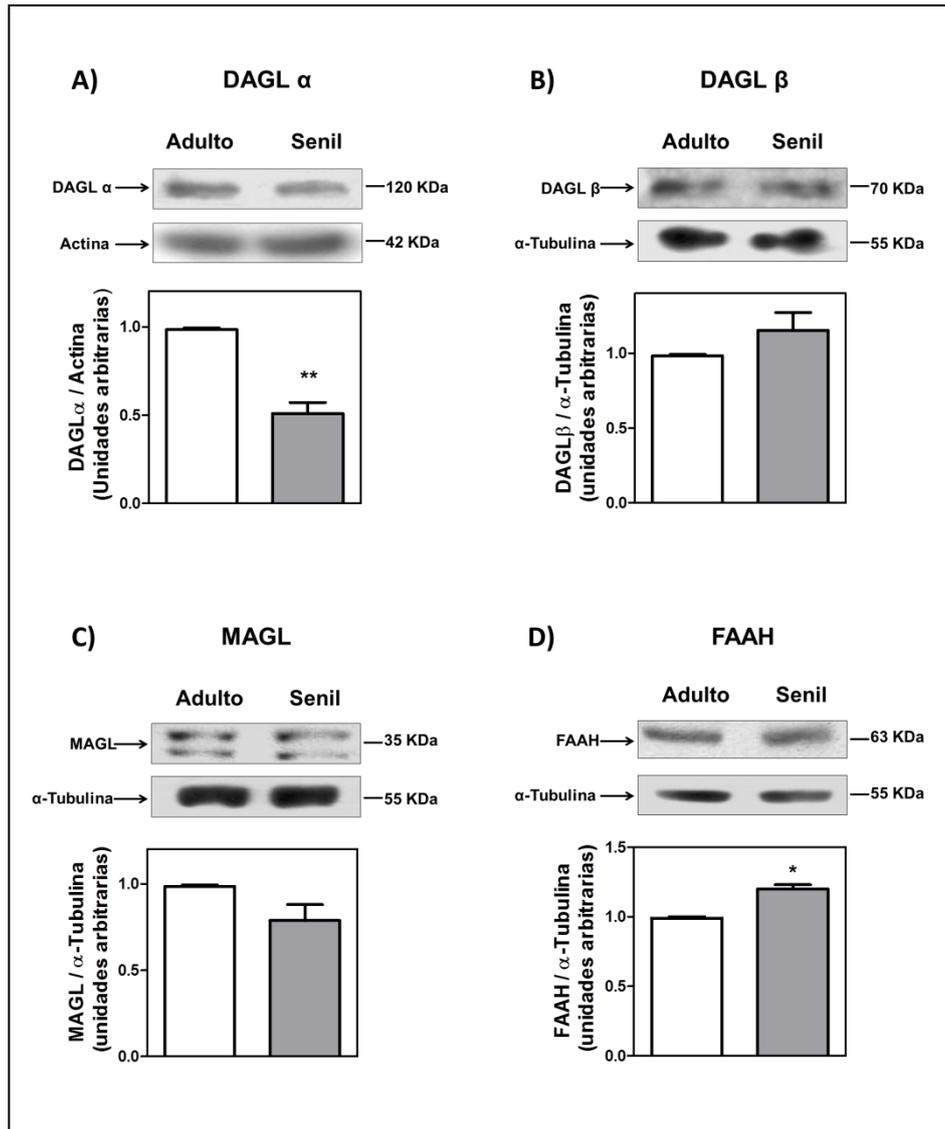


Figura 1. Expresión de las enzimas del metabolismo del 2-AG en la fracción de membrana de la CC de ratas adultas y seniles. Las proteínas de la fracción de membrana (40 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE en un gel al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Una vez bloqueada, la membrana, se incubó con: **A) Anti-DAGL α** , **B) Anti-DAGL β** , **C) Anti-MAGL** y **D) Anti-FAAH** como se detalló en *Materiales y Métodos*. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa. Los números de la derecha indican el peso molecular. Los gráficos de barras muestran la densidad relativa correspondiente a la expresión de la proteína en relación con el control de carga (actina o tubulina). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición adulto. ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$.

Cuando se evaluó la expresión de la MAGL en la fracción soluble de la CC de rata, se observó que los niveles de esta enzima aumentaron 4 veces en los animales seniles con respecto a los adultos (**Figura 2**).

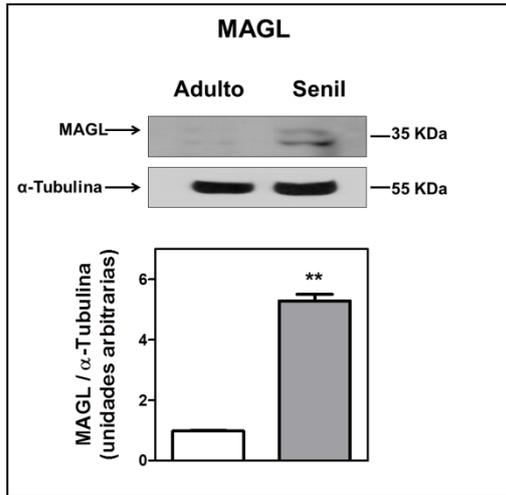


Figura 2: Expresión de la MAGL en la fracción soluble de la CC de ratas adultas y seniles. Las proteínas de la fracción soluble (40 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE en un gel al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Una vez bloqueada, la membrana se incubó con anti-MAGL como se detalló en *Materiales y Métodos*. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa. Los números de la derecha indican el peso molecular. El gráfico de barras muestra la densidad relativa correspondiente a la expresión de la proteína en relación con el control de carga (tubulina). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición adulto. ** $p < 0,01$.

A diferencia de lo que ocurrió en la fracción de membrana, en la que se expresan ambas isoformas de la DAGL, en sinaptosomas de la CC solo se pudo detectar la presencia de la isoforma β , siendo su expresión 8 veces mayor en ratas seniles (Figura 3 A).

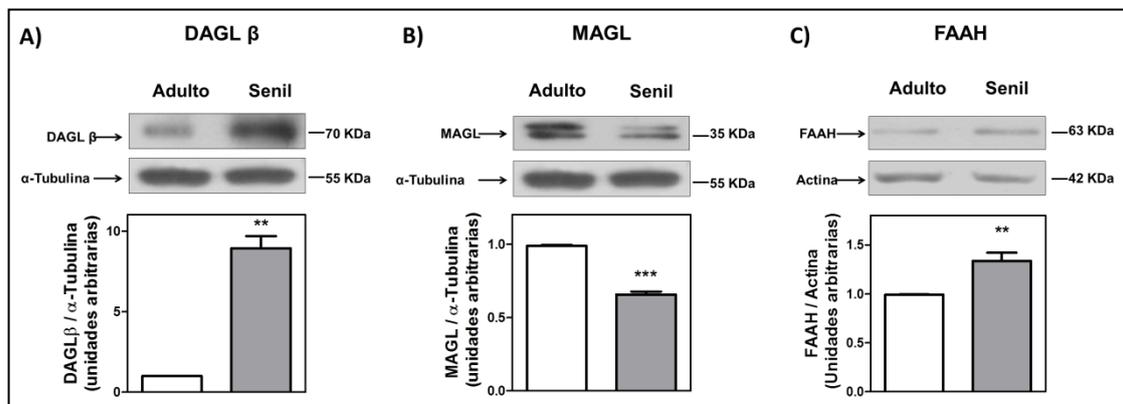


Figura 3: Expresión de las enzimas del metabolismo del 2-AG en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles. Las proteínas de la fracción sinaptosomal (40 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE en un gel al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Una vez bloqueada, la membrana se incubó con: **A) Anti-DAGL β** , **B) Anti-MAGL** y **C) Anti-FAAH** como se detalló en *Materiales y Métodos*. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa. Los números de la derecha indican el peso molecular. Los gráficos de barras muestran la densidad relativa correspondiente a la expresión de la proteína en relación con el control de carga (actina o tubulina). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición adulto. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$.

En las Figuras 3 B y 3C se puede observar que dos de las enzimas involucradas en la hidrólisis del 2-AG, la MAGL y la FAAH, se expresan en el terminal sináptico

proveniente de la CC. También se puede observar que mientras la expresión de la MAGL disminuyó un 33 %, la de la FAAH aumentó en el mismo porcentaje durante el envejecimiento.

2. Actividad de la enzima diacilglicerol lipasa en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

La síntesis del 2-AG a partir de DAG en fracciones de membrana, soluble y sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles se determinó ensayando la actividad de la DAGL.

2.1. Análisis de la composición en ácidos grasos de los sustratos radioactivos:

Mediante la técnica de GLC se realizó el análisis de las especies de ácidos grasos constitutivos de los diferentes DAG utilizados como sustratos en los ensayos enzimáticos de la DAGL. De esta manera, se analizaron los DAG de distinto origen:

A) El [³H]DAG generado a partir de la incubación de las retinas bovinas con el [³H]glicerol.

B) El [³H]DAG generado a partir de la hidrólisis de la [³H]PC de la retina bovina.

Los resultados de la composición de los ácidos grasos de **A** y de **B** se muestran en la **Tabla 1**. El sustrato **A** estaba compuesto principalmente por ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido araquidónico (20:4) y ácido docosahexaenoico (22:6), siendo el contenido del resto de los ácidos grasos menor al 5 %. El sustrato **B** tenía una composición similar a la del sustrato **A** pero su contenido de 20:4 era menor (5 % para el sustrato **B** comparado con el 13 % en el sustrato **A**) y el de 22:6 era mayor (17 % para el sustrato **B** comparado con el 12 % en el sustrato **A**). Esta diferencia en el contenido de 20:4 de los sustratos (resaltado en color rojo en la tabla) resultó de particular interés debido a que un DAG con mayor contenido de 20:4, que en este caso corresponde al sustrato **A**, sería un sustrato mucho más específico para evaluar la síntesis del 2-AG.

Ácido graso	% en sustrato A	% en sustrato B
16:0 (ácido palmítico)	32	35
16:1 (ácido palmitoleico)	4	2
18:0 (ácido esteárico)	20	20
18:1 (ácido oleico)	16	19
18:2 (ácido linoleico)	1	1
20:4 (ácido araquidónico)	13	5
22:5 (ácido docosapentaenoico)	2	1
22:6 (ácido docosaheptaenoico)	12	17

Tabla 1: Composición en acilos de los distintos [³H]DAG utilizados como sustratos en los ensayos enzimáticos. La composición fue determinada mediante GLC. Los sustratos fueron obtenidos como se especificó en *Materiales y Métodos*. El **sustrato A** corresponde al [³H]DAG generado a partir de la incubación de las retinas bovinas con el [³H]glicerol y el **sustrato B** corresponde al [³H]DAG generado a partir de la hidrólisis de la [³H]PC de la retina bovina. Los datos representan el porcentaje de distribución de cada ácido graso en el sustrato. El contenido de ácido araquidónico de cada sustrato se encuentra resaltado en color rojo.

2.2. Actividad de la enzima diacilglicerol lipasa en las fracciones de membrana y soluble:

La determinación de esta actividad enzimática se ensayó en presencia de los DAG de distinta composición en sus ácidos grasos, lo que permitió analizar la selectividad de la DAGL por los diferentes sustratos. La actividad de la DAGL en las fracciones de membrana y soluble de la CC solo pudo ser detectada utilizando el DAG de mayor contenido de 20:4 (sustrato **A**).

En la **Figura 4** se puede observar que la actividad de la DAGL se asociaba casi exclusivamente a la fracción de membrana, siendo mínima la actividad en el soluble. Si bien no se observaron diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre adultos y seniles, parecería haber cierta tendencia a la redistribución de la actividad desde el soluble hacia la membrana en el envejecimiento.

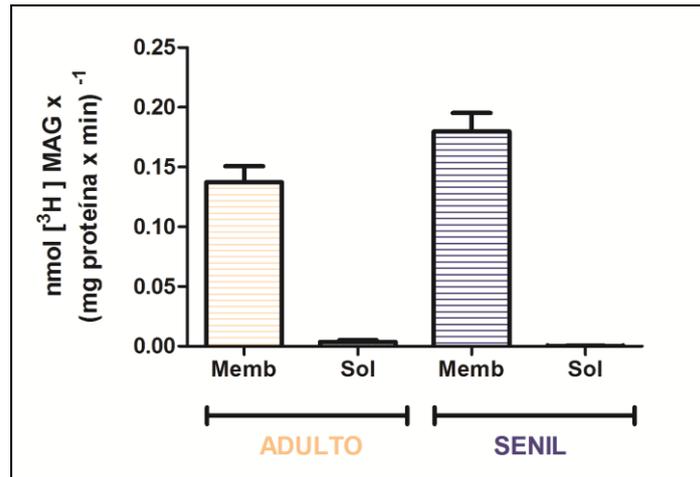


Figura 4: Actividad de la DAGL en las fracciones de membrana y soluble de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada incubando 20 μM de [³H]DAG exógeno (sustrato A de la Tabla 1) en presencia de 50 μg de proteínas de la fracción de membrana o de soluble durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Fracción de membrana (Memb) y fracción soluble (Sol).

2.3. Actividad de la enzima diacilglicerol lipasa en la fracción sinaptosomal:

La actividad de la DAGL en sinaptosomas de la CC fue ensayada utilizando los sustratos **A** y **B**. Esta presentó en el envejecimiento un perfil de actividad diferente según el sustrato utilizado. Se pudo observar una disminución de la actividad de la DAGL sobre **A** del 38 % (**Figura 5 A**) y un aumento en la producción del MAG (5 veces) con el empleo del sustrato **B** (**Figura 5 B**).

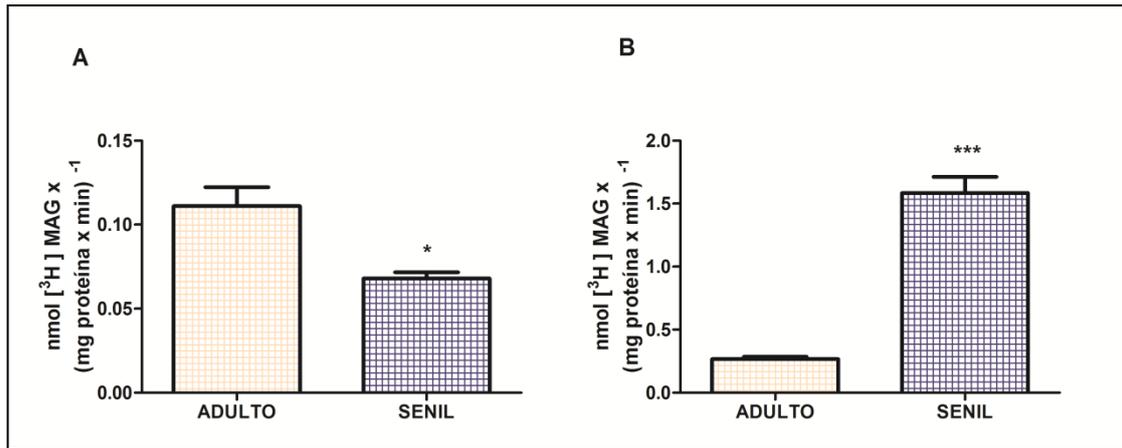
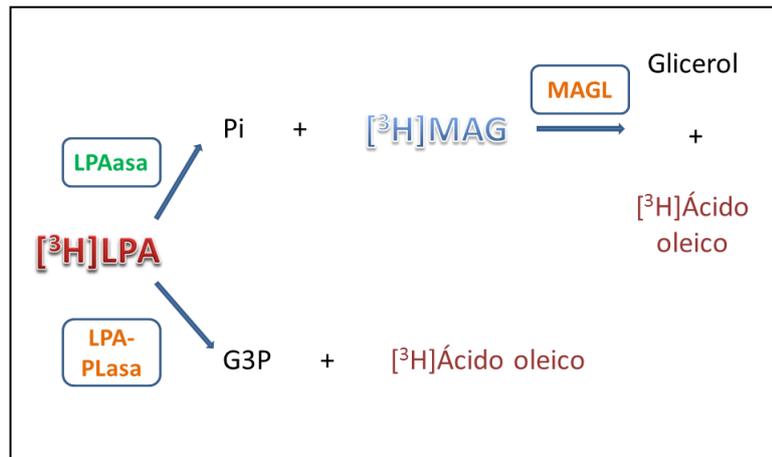


Figura 5: Actividad de la DAGL en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada incubando **A)** 20 μM de [³H]DAG exógeno (sustrato A de la Tabla 1) o **B)** 300 μM de [³H]DAG exógeno (sustrato B de la Tabla 1) en presencia de 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición adulto. ***p < 0,001 y *p < 0,05.

3. Actividad de la enzima lisofosfatidato fosfolipasa en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

La síntesis del 2-AG a partir del LPA en fracciones de membrana y soluble y en terminales sinápticos de la CC de ratas adultas y seniles, se determinó ensayando la actividad de la LPAasa.

El sustrato utilizado para determinar esta actividad fue el 1-[³H]oleil-LPA. En las condiciones de ensayo empleadas se observó que a partir del LPA, además de generarse [³H]MAG por acción de la LPAasa, también se producía [³H]ácido oleico y glicerol-3-fosfato (G3P) por acción de una lisofosfatidato fosfolipasa A (LPA-PLasa). Por otra parte, en las condiciones de ensayo el [³H]MAG formado demostró ser hidrolizado a [³H]ácido oleico y glicerol. El **Esquema 1** resume las diferentes vías que pueden suscitarse en este ensayo y muestra cómo estas rutas conducen a un producto común, el ácido oleico. Esto dificulta la determinación de la actividad de la formación del MAG por la LPAasa. Para remediar este inconveniente se ensayó la actividad de esta enzima en presencia de inhibidores de la MAGL.



Esquema 1: Posibles vías de degradación del $[^3\text{H}]\text{lisofosfatidato}$ ($[^3\text{H}]\text{LPA}$) en la corteza cerebral de rata. En el ensayo de la lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAasa) el sustrato puede ser metabolizado a monoacilglicerol (MAG) por la acción de la LPAasa o liberar ácido oleico por acción de una lisofosfatidato fosfolipasa A (LPA-PLasa). El MAG formado puede ser adicionalmente hidrolizado a ácido oleico por acción de una monoacilglicerol lipasa (MAGL). Fosfato (Pi), glicerol-3-fosfato (G3P).

3.1. Evaluación de diferentes inhibidores de la monoacilglicerol lipasa en la degradación del monoacilglicerol generado por acción de la lisofosfatidato fosfohidrolasa:

Con el fin de inhibir la degradación del MAG formado por la acción de la LPAasa y, de esta manera, lograr que el ácido oleico generado provenga casi exclusivamente de la acción de LPA-PLasa, se analizó el efecto de dos inhibidores de la MAGL. Para ello, se realizó el ensayo de la LPAasa preincubando la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles en las condiciones mencionadas en la *sección 6.1.2. de Materiales y Métodos*, con:

- KML-29: inhibidor selectivo de la MAGL solubilizado en DMSO a una concentración tal que no modifica la actividad enzimática.
- Ácido oleico: producto de la reacción de la MAGL solubilizado en BSA a una concentración tal que no modifica la actividad enzimática.

En estos casos se realizaron controles empleando los vehículos respectivos.

En la **Figura 6** se muestra la generación de [3 H]MAG y de [3 H]ácido oleico en las condiciones de ensayo de la LPAasa, utilizando el [3 H]LPA como sustrato en presencia de los inhibidores anteriormente mencionados.

En presencia del KML-29 se observó un aumento en la generación del MAG de un 30 % y de un 50 % y una disminución en la producción del ácido oleico de un 30 % y de un 35 % en sinaptosomas adultos y seniles, respectivamente. Esto demuestra que tanto en sinaptosomas adultos como en seniles el KML-29 fue capaz de inhibir la actividad de la MAGL. Por el contrario, el ácido oleico agregado no modificó la generación del MAG pero sí disminuyó la producción del AGL en un 59 % tanto en sinaptosomas adultos como en seniles. Este resultado indica que el ácido oleico inhibe la actividad de la LPA-PLasa más que la de la MAGL.

En base a los resultados descritos anteriormente, para evaluar la actividad de la LPAasa se empleó el inhibidor de la MAGL KML-29, lo que facilitó el cálculo de la actividad enzimática.

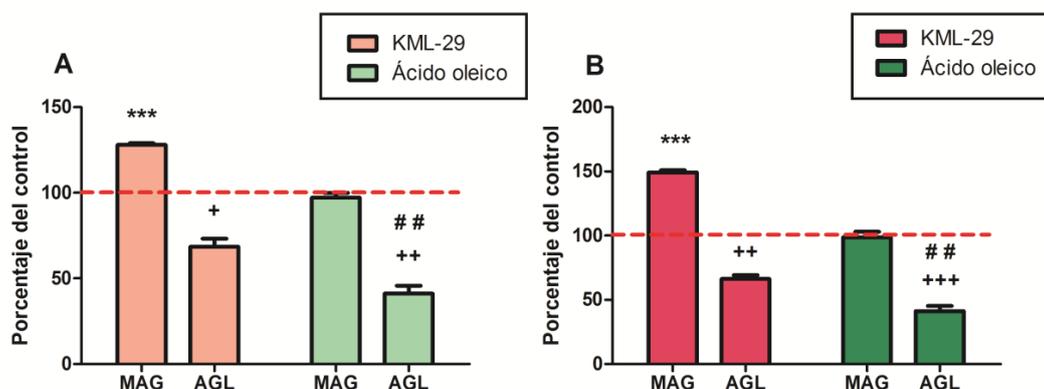


Figura 6: Producción de MAG y AGL en el ensayo de la LPAasa en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de dos inhibidores de la MAGL. La actividad fue ensayada preincubando durante 30 minutos con KML-29 (1 μ M) o 10 minutos con ácido oleico (200 μ M) en presencia de 50 μ g de proteínas de la fracción sinaptosomal e incubando con 20 μ M de [3 H]LPA exógeno durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de cada producto con respecto al control sin inhibidor. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al MAG generado en la condición control respectiva, las cruces indican diferencias significativas con respecto al ácido oleico generado en la condición control respectiva, y los numerales indican diferencias significativas con respecto al AGL generado en la condición con KML-29. ***p < 0,001; +++p < 0,001; ++p < 0,01; +p < 0,05 y ##p < 0,01. Ácido graso libre u oleato (AGL).

3.2. Actividad de la enzima lisofosfatidato fosfohidrolasa en las fracciones de membrana y soluble:

En la **Figura 7** se muestra la actividad de la LPAasa en las fracciones de membrana y soluble de la CC en presencia del [³H]LPA. La síntesis del MAG a partir del LPA en la fracción soluble representó un 11 % de la actividad total de la LPAasa (membrana + soluble) en las preparaciones de animales adultos. También se pudo observar que en el envejecimiento la actividad de la LPAasa disminuyó un 32 % en la fracción de membrana y un 26 % en la fracción soluble.

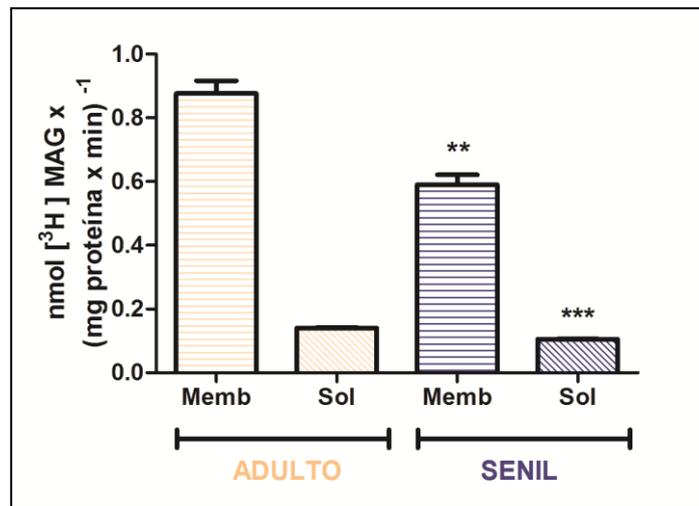


Figura 7: Actividad de la LPAasa en las fracciones de membrana y soluble de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada incubando 20 μ M de [³H]LPA exógeno en presencia de 50 μ g de proteínas de la fracción de membrana o soluble durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición adulto correspondiente. ***p < 0,001 y **p < 0,01. Fracción de membrana (Memb) y fracción soluble (Sol).

3.3. Actividad de la enzima lisofosfatidato fosfohidrolasa en la fracción sinaptosomal:

Al evaluar la actividad de la LPAasa en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles en presencia del [³H]LPA, se observó que la misma aumentó ligeramente (12 %) en el envejecimiento (**Figura 8**).

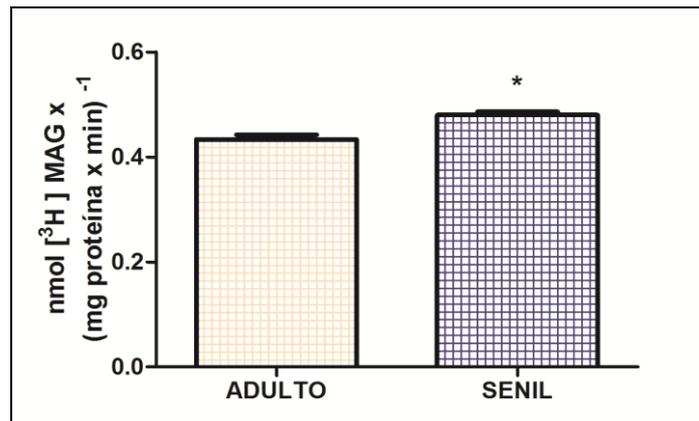


Figura 8: Actividad de la LPAasa en la fracción sináptica de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada incubando 20 μM de [^3H]LPA exógeno en presencia de 50 μg de proteínas de la fracción sináptica durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a la condición adulto. * $p < 0,05$.

4. Actividad de las enzimas que hidrolizan al 2-araquidonoilglicerol en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

La hidrólisis de los MAG, incluyendo el 2-AG, en las fracciones de membrana y soluble y en sináptomas de la CC de ratas adultas y seniles se determinó en presencia de diferentes sustratos:

- A')** El [^3H]MAG generado por la acción de la DAGL (MAG endógeno) sobre el [^3H]DAG obtenido a partir de la incubación de las retinas bovinas con [^3H]glicerol (Sustrato **A** de la **Tabla 1**).
- B')** El [^3H]MAG generado por la acción de la DAGL (MAG endógeno) sobre el [^3H]DAG obtenido a partir de la hidrólisis de la [^3H]PC de la retina bovina (Sustrato **B** de la **Tabla 1**).
- C')** El [^3H]MAG obtenido a partir del [^3H]TAG que provenía de la incubación de las retinas bovinas con [^3H]glicerol.
- D')** El [^3H]2-AG preparado a partir de una solución madre comercial.

Para los sustratos **A'** y **B'**, la actividad enzimática se determinó en forma simultánea al ensayo de la DAGL (reacción acoplada a la acción de la DAGL). Por esta razón, la composición de estos MAG es semejante a la de los DAG a partir de los cuales fueron generados. La composición del sustrato **C'** fue determinada por GLC.

4.1. Composición en ácidos grasos del [³H]monoacilglicerol obtenido a partir del [³H]triacilglicerol (sustrato C'):

Al igual que para el [³H]DAG, la composición en ácidos grasos del [³H]MAG se determinó mediante la técnica de GLC. En la **Tabla 2** se puede observar que este lípido estaba compuesto mayoritariamente por ácidos grasos saturados, principalmente por el ácido esteárico.

Ácido graso	% en sustrato C'
14:0 (ácido mirístico)	8
16:0 (ácido palmítico)	25
16:1 (ácido palmitoleico)	10
18:0 (ácido esteárico)	44
18:1 (ácido oleico)	13

Tabla 2: Composición de los ácidos grasos del [³H]MAG (sustrato C') utilizado como sustrato del ensayo enzimático. La composición fue determinada mediante GLC. Los sustratos fueron obtenidos como se especificó en *Materiales y Métodos*. El sustrato C' corresponde al [³H]MAG obtenido a partir del [³H]TAG que provenía de la incubación de las retinas bovinas con [³H]glicerol. Los datos representan el porcentaje de distribución de cada ácido graso en el sustrato.

4.2. Hidrólisis de los monoacilglicerol en las fracciones de membrana y soluble:

Se pudo observar que cuando se ensayó la hidrólisis del sustrato **A'** (MAG endógeno proveniente del DAG con mayor contenido de 20:4), dicha actividad estuvo presente exclusivamente en la fracción de membrana y se observó incrementada (40 %) en el envejecimiento (**Figura 9 A**).

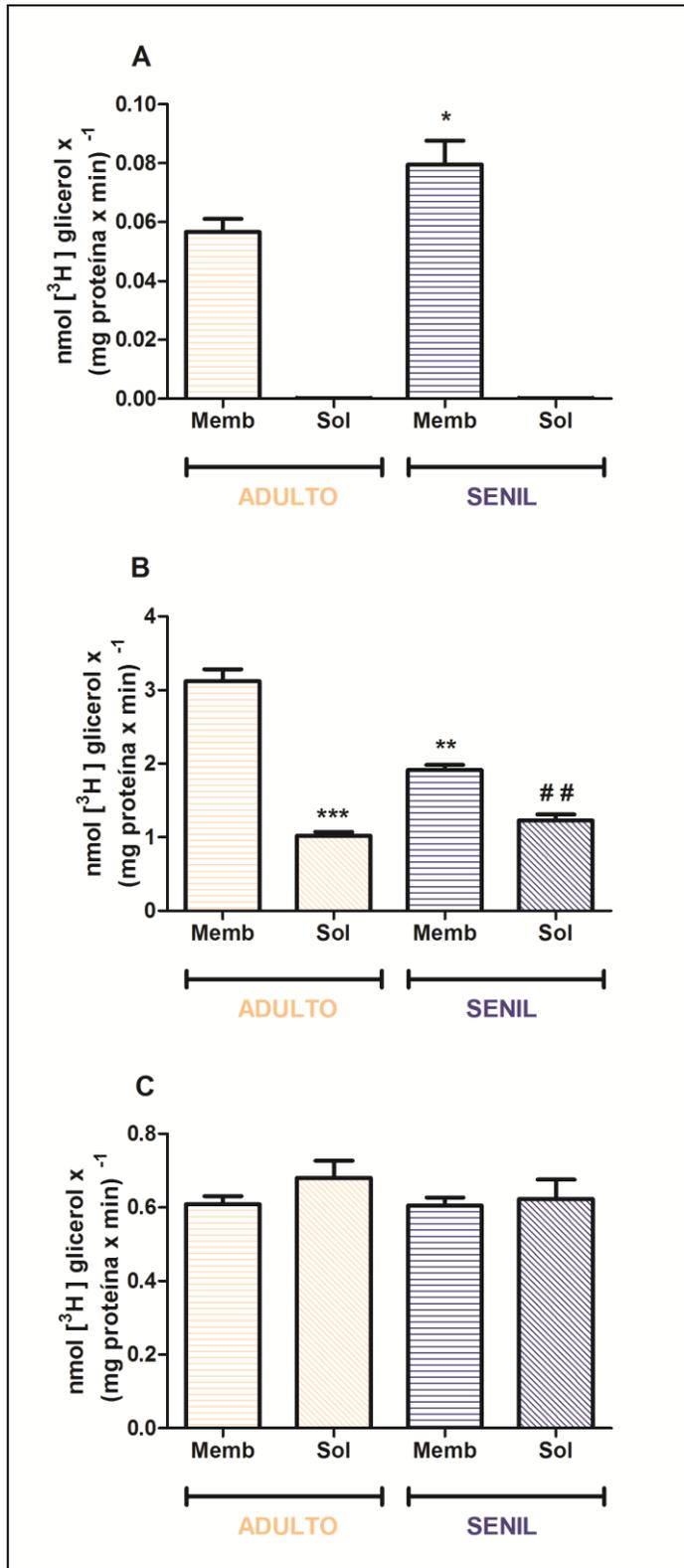


Figura 9: Hidrólisis de los MAG en las fracciones de membrana y soluble de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada utilizando **A)** [³H]MAG generado por la acción de la DAGL (MAG endógeno) sobre el [³H]DAG sintetizado en la retina bovina (sustrato A'), **B)** 20 μM de [³H]MAG obtenido a partir del [³H]TAG (sustrato C') y **C)** 10 μM de [³H]2-AG (sustrato D'). Las incubaciones se realizaron en presencia de 50 μg de proteínas de la fracción de membrana o soluble durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición membrana adulta y los numerales indican diferencias significativas con respecto a la condición membrana senil. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 y ##p < 0,01. Fracción de membrana (Memb) y fracción soluble (Sol).

Al utilizar un MAG compuesto mayoritariamente por ácidos grasos saturados (sustrato C') se pudo observar actividad tanto en la fracción de membrana como en la fracción soluble (**Figura 9 B**). La principal actividad en la CC de ratas adultas estuvo

asociada a la fracción de membrana (75 %) y disminuyó en el envejecimiento (38 %). La actividad en la fracción soluble no experimentó modificaciones en esta condición.

Como se puede observar en la **Figura 9 C**, la hidrólisis del 2-AG (sustrato **D'**) no mostró diferencias significativas entre las fracciones de membrana y soluble. Además, en el envejecimiento no se modificó ni la actividad total (membrana + soluble) ni la distribución de la misma entre las fracciones.

4.3. Hidrólisis de los monoacilgliceroles en la fracción sinaptosomal:

La **Figura 10** muestra la hidrólisis de los diferentes MAG en la fracción sinaptosomal. Al analizar la hidrólisis del MAG generado a partir del DAG con mayor contenido de 20:4 (sustrato **A'**), se pudo observar una disminución del 42 % en el envejecimiento. Sin embargo, al emplear el MAG con mayor contenido de 22:6 (sustrato **B'**), el MAG altamente saturado (sustrato **C'**) o el 2-AG (sustrato **D'**), la hidrólisis de los mismos registró un incremento del 63 %, 31 % y 43 %, respectivamente.

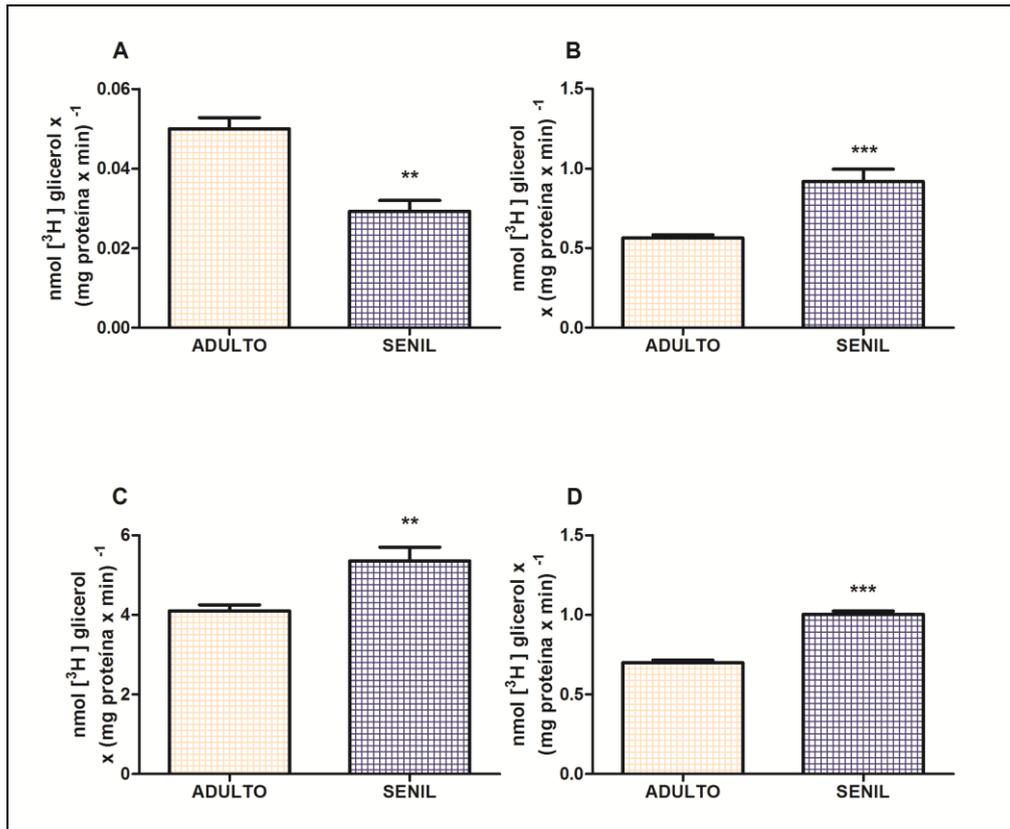


Figura 10: Hidrólisis de los MAG en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada en presencia de 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 20 minutos utilizando **A)** [³H]MAG generado por la acción de la DAGL (MAG endógeno) sobre el [³H]DAG sintetizado en la retina bovina (sustrato A'), **B)** [³H]MAG generado por la acción de la DAGL (MAG endógeno) sobre el [³H]DAG obtenido a partir de la hidrólisis de la [³H]PC de la retina bovina (sustrato B'), **C)** 20 μM de [³H]MAG obtenido a partir del [³H]TAG (sustrato C') y **D)** 10 μM de [³H]2-AG (sustrato D'). La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición adulto. ***p < 0,001 y **p < 0,01.

4.4. Hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en presencia de inhibidores enzimáticos:

Con el fin de determinar la contribución a la hidrólisis del 2-AG de las diferentes enzimas involucradas (MAGL, ABHD6/12 y FAAH) en la CC de rata, los ensayos se realizaron en presencia de los siguientes inhibidores:

- URB-602: inhibidor de la MAGL solubilizado en el *buffer* de ensayo.
- KML-29: inhibidor selectivo de la MAGL solubilizado en DMSO a una concentración que no modifica la actividad enzimática.

- URB-597: inhibidor de la FAAH solubilizado en el *buffer* de ensayo.

Para el KML-29 se realizaron controles empleando el vehículo respectivo.

4.4.1. Efecto de los inhibidores enzimáticos de la hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en la fracción de membrana:

En la **Figura 11** puede observarse que en la fracción de membrana de animales adultos el inhibidor de la MAGL URB-602 fue capaz de bloquear la hidrólisis del endocannabinoide en un 16 %. Por su parte, su inhibidor más específico, KML-29, logró un efecto del 78 %. Sin embargo, ninguno de los inhibidores ensayados ejerció efecto alguno sobre la hidrólisis del 2-AG en la misma fracción de animales seniles. Esta figura muestra también que el inhibidor de la FAAH, URB-597, no modificó la hidrólisis del 2-AG en animales adultos ni en seniles.

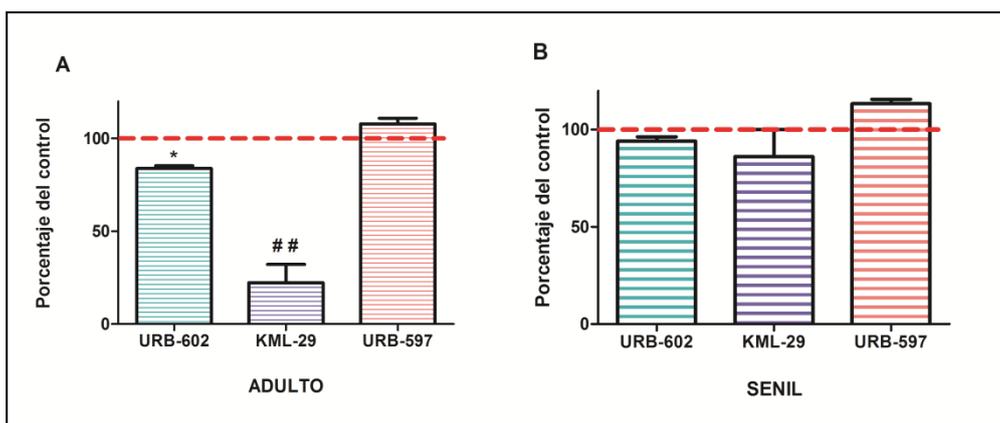


Figura 11: Efecto de los inhibidores enzimáticos en la hidrólisis del 2-AG en la fracción de membrana de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles. La actividad fue ensayada preincubando durante 10 minutos con URB-602 (1 mM) o URB-597 (0,1 μ M), o 30 minutos con KML-29 (1 μ M) en presencia de 50 μ g de proteínas de la fracción de membrana, e incubando con 10 μ M de [3 H]2-AG durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin inhibidor representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control del vehículo de URB-602 y URB-597 y los numerales indican diferencias significativas con respecto a la condición control del vehículo del KML-29. * $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$.

4.4.2. Efecto de los inhibidores enzimáticos de la hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en la fracción sinaptosomal:

El estudio del efecto de los inhibidores enzimáticos de la hidrólisis del 2-AG en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles se encuentra graficado en la **Figura 12**. Analizando esta figura se puede observar que en los sinaptosomas adultos la hidrólisis del endocannabinoide disminuyó en un 40 %, 76 % y 25 % en presencia de los inhibidores URB-602, KML-29 y URB-597, respectivamente. Si bien en los sinaptosomas seniles también se pudo observar que todos los compuestos utilizados ejercen un efecto inhibitorio, el KML-29 y el URB-597 produjeron un efecto de magnitud similar al observado en los animales adultos (inhibición del 75 % y 18 %, respectivamente) en tanto que el URB-602 inhibió en su totalidad la hidrólisis del 2-AG.

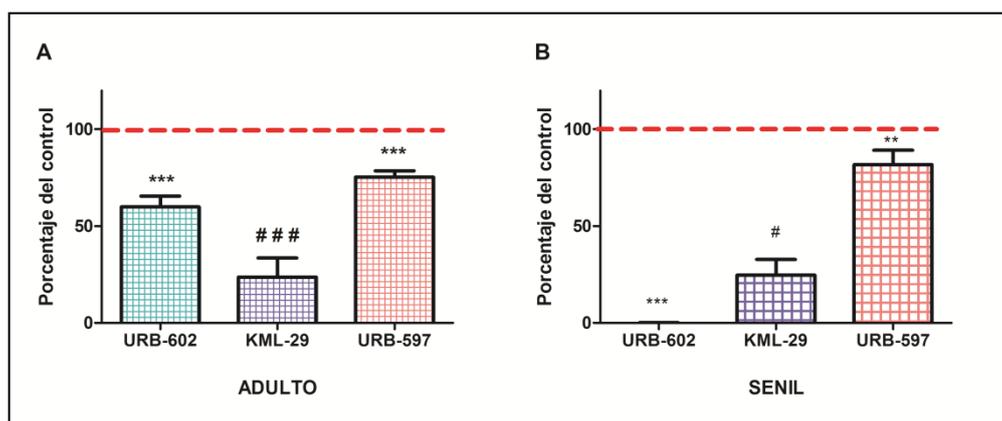


Figura 12: Efecto de los inhibidores enzimáticos en la hidrólisis del 2-AG en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles. La actividad fue ensayada preincubando durante 10 minutos con URB-602 (1 mM), o URB-597 (0,1 μ M) o 30 minutos con KML-29 (1 μ M) en presencia de 50 μ g de proteínas de la fracción sinaptosomal, e incubando con 10 μ M de [3 H]2-AG durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin inhibidor representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control del vehículo de URB-602 y URB-597 y los numerales indican diferencias significativas con respecto a la condición control del vehículo del KML-29. ***p < 0,001; **p < 0,01; ###p < 0,001 y #p < 0,05.

CAPÍTULO I

**"ESTUDIO DEL METABOLISMO
DEL 2-ARAQUIDONOILGLICEROL"**

Sección 2:

*Regulación del metabolismo del 2-
araquidonoilglicerol por agonistas
y/o antagonistas de los receptores
cannabinoides CB1 y CB2*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En la primera Sección de este Capítulo se describe una desregulación del metabolismo del 2-AG en las fracciones de membrana y sinaptosomal de la CC de rata en el envejecimiento fisiológico.

Esta segunda Sección presenta la regulación del metabolismo del 2-AG tanto en animales adultos como en seniles mediante el uso de agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

Para este estudio se evaluó primero la presencia de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en los sinaptosomas de la CC de rata y, además, se determinó si el nivel de los mismos varía en el envejecimiento. Este ensayo se realizó comparativamente en la fracción de membrana de la CC de rata para comprobar si las diferencias observadas eran exclusivas o no de los terminales sinápticos.

Con el propósito de determinar si ciertos ligandos de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, son capaces de revertir la desregulación en el metabolismo del endocannabinoide observada en el envejecimiento, se estudiaron las actividades de las enzimas DAGL, LPAasa y MAGL en presencia de agonistas y antagonistas de estos receptores. Para ello, se emplearon como sustratos enzimáticos aquellos que presentan una composición similar a la de los fisiológicos. Los agonistas utilizados para estos ensayos fueron el WIN (agonista mixto de CB1R/CB2R) y el JWH (agonista del CB2R) en tanto que los antagonistas fueron el SR1 (antagonista del CB1R) y el SR2 (antagonista del CB2R).

RESULTADOS

1. Expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

Para evaluar la expresión de los receptores CB1 y CB2 en la CC de rata se realizaron ensayos de WB.

1.1. Expresión del receptor CB1 en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles:

Al ensayar los niveles del receptor CB1, en los sinaptosomas de la CC de ratas seniles se pudo observar una disminución del 36 % con respecto a los adultos (**Figura 13 A**). Sin embargo, en la fracción de membrana de la CC no se observaron modificaciones en los niveles de este receptor durante el envejecimiento (**Figura 13 B**).

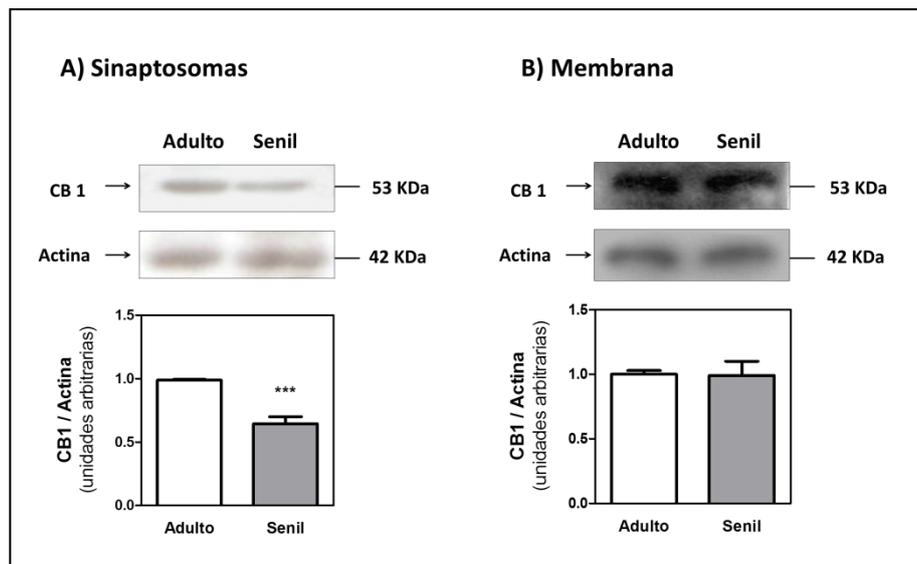


Figura 13: Expresión del receptor cannabinoide CB1 en las fracciones de: A) Sinaptosomas y B) Membrana de la CC de ratas adultas y seniles. Las proteínas de la fracción sinaptosomal o de membrana (40 µg) se resolvieron por SDS-PAGE en un gel al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana una vez bloqueada se incubó como se detalló en *Materiales y Métodos* con anti-CB1R. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa. Los números de la derecha indican el peso molecular. Los gráficos de barras muestran la densidad relativa correspondiente a la expresión de la proteína en relación con el control de carga (actina). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición adulto. ***p < 0,001.

1.2. Expresión del receptor CB2 en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles:

Varios investigadores señalan la falta de especificidad de los anticuerpos comerciales contra el receptor CB2. Es por ello que, antes de comenzar con el ensayo de la expresión del mismo en la CC, se realizaron varias pruebas para comprobar la especificidad de los diferentes anticuerpos y así seleccionar el más adecuado.

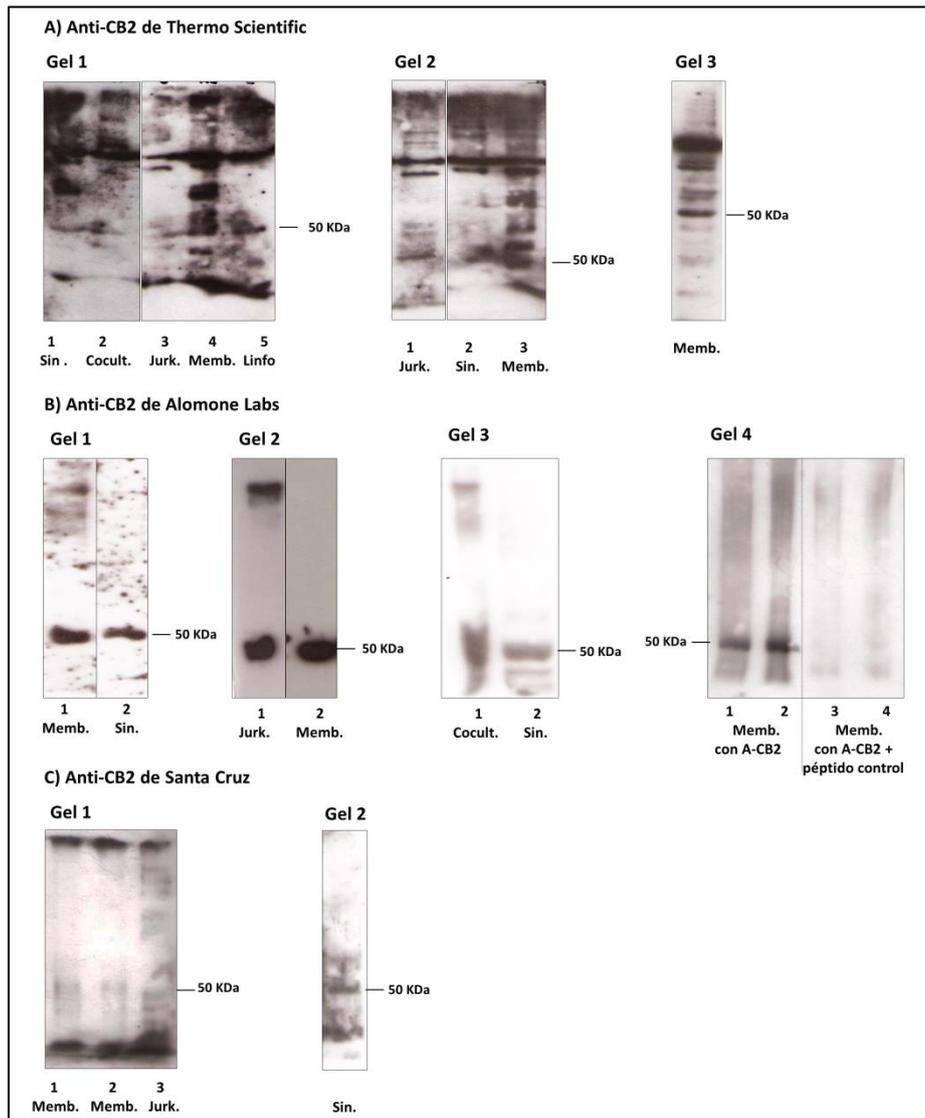


Figura 14: Análisis de WB en las fracciones de sinaptosomas y membrana de la CC de rata y en controles positivos utilizando anticuerpos anti-CB2R de A) Thermo Scientific, B) Alomone Labs con o sin péptido control y C) Santa Cruz. Las proteínas (aproximadamente 40 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE en un gel al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana una vez bloqueada se incubó como se detalló en Materiales y Métodos con la preparación de anti-CB2R correspondiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa. Los números situados a uno u otro lado de los geles indican el peso molecular de la banda. Fracción sinaptosomal (Sin.), fracción de membrana (Memb.), cocultivo de neurona y glía (Cocult.) y linfocitos humanos (Linfo).

La **Figura 14** muestra la expresión del receptor CB2 ensayada por WB en diferentes tipos y/o fracciones celulares empleando anticuerpos generados contra distintos epitopes comercializados por diferentes laboratorios. En dicha figura, se puede observar que los tres anticuerpos utilizados fueron capaces de reconocer una banda de alrededor de 50 KDa en las muestras de la CC de rata, que correspondía al peso molecular del receptor CB2. Esta banda se detectó también en los controles positivos sembrados (linfocitos humanos, células Jurkat y cocultivo de neurona y glía de rata). Sin embargo, no se visualizó cuando el anticuerpo fue preincubado con el péptido antigénico control. Cabe destacar que la posición de esta banda de alrededor de 50 KDa difiere entre los diferentes geles corridos, probablemente debido a mínimas diferencias en el proceso de electroforesis. Sin embargo, el peso molecular de cada una de las bandas observadas fue siempre corroborado con el uso de un marcador de peso molecular.

Una vez probada la especificidad de la banda correspondiente al CB2R y corroborada la expresión de este receptor cannabinoide en las fracciones de membrana y sinaptosomal de la CC de rata, se realizó un análisis comparativo de los niveles de este receptor en ratas adultas y seniles. Para ello, se utilizó el anticuerpo adquirido en Alomone Labs (**Figura 14 B**) debido a que mostraba un WB más limpio donde se observó exclusivamente la banda correspondiente al receptor CB2. De esta manera, se pudo observar que en los sinaptosomas seniles los niveles de este receptor disminuyeron un 24 % (**Figura 15 A**). Sin embargo, al igual que lo que se observó con el CB1R, en la fracción de membrana de la CC no hubo modificaciones en los niveles del mismo durante el envejecimiento (**Figura 15 B**).

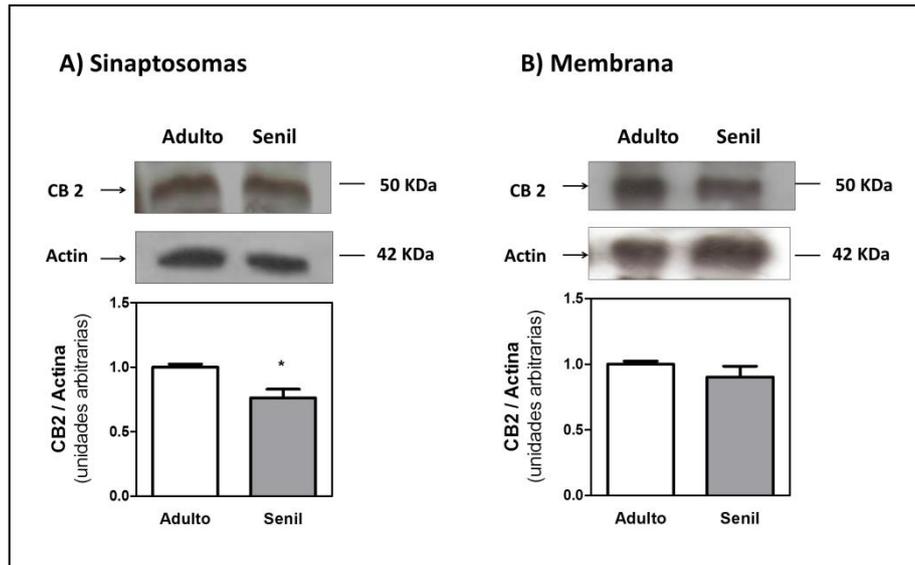


Figura 15: Expresión del receptor cannabinoide CB2 en las fracciones de: A) Sinaptosomas y B) Membrana de la CC de ratas adultas y seniles. Las proteínas de la fracción sinaptosomal o de membrana (40 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE en un gel al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana una vez bloqueada se incubó como se detalló en *Materiales y Métodos* con anti-CB2R (Alomone Labs). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa. Los números de la derecha indican el peso molecular. Los gráficos de barras muestran la densidad relativa correspondiente a la expresión de la proteína en relación con el control de carga (actina). El asterisco indica diferencias significativas con respecto a la condición adulto. * $p < 0,05$.

2. Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoide sobre la actividad de la diacilglicerol lipasa en la fracción sinaptosomal de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

En todos los casos en que se emplearon agonistas, estos fueron solubilizados en el *buffer* de ensayo respectivo según la actividad enzimática a evaluar. Los antagonistas fueron solubilizados en DMSO a una concentración tal que no afectara las actividades enzimáticas (Ramirez y col., 2005; Breivogel y col., 2004), realizándose controles con el vehículo.

Como se puede observar en la **Figura 16**, los agonistas y antagonistas de los receptores CB ejercieron un efecto diferente en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles.

En los sinaptosomas adultos, ni los agonistas (WIN y JWH) ni los antagonistas (SR1 y SR2) produjeron cambios en la actividad de la DAGL (**Figura 16 A**). En el envejecimiento, los agonistas empleados no modificaron la actividad de la DAGL. Sin embargo, el antagonista del CB1R (SR1) y el antagonista del CB2R (SR2) individualmente o ambos en simultáneo, estimularon en un porcentaje similar (10-20 %) la actividad de esta enzima (**Figura 16 B**).

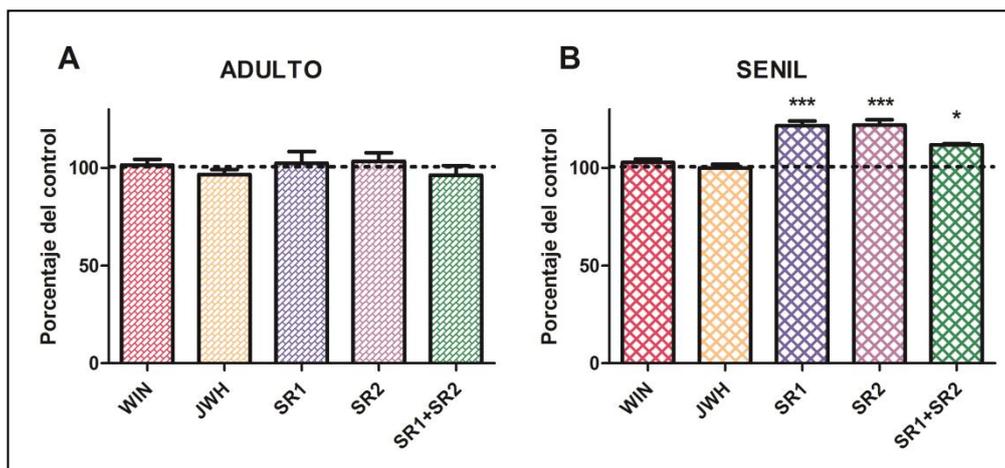


Figura 16: Actividad de la DAGL en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas o antagonistas de los receptores CB. La actividad fue ensayada preincubando 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 10 minutos con los agonistas (5 μM de WIN o de JWH) o los antagonistas (1 μM de SR1 y/o de SR2). Posteriormente, se incubó durante 20 minutos con 20 μM de [^3H]DAG exógeno (sustrato A de la Tabla 1). La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista y sin antagonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control. *** $p < 0,001$ y * $p < 0,05$.

Con el fin de evaluar la capacidad del agonista mixto WIN de revertir el efecto del antagonista del CB1R y/o el del antagonista del CB2R, se preincubó con uno u otro antagonista durante 10 minutos y se procedió a incubar con el agonista y el sustrato en simultáneo.

La incubación con el agonista mixto WIN después de una preincubación con el antagonista del CB1R o del CB2R en sinaptosomas adultos no modificó la actividad de la DAGL (**Figura 17 A**). Sin embargo, preincubando los sinaptosomas seniles con los

antagonistas de los receptores CB1 o CB2, la incubación con el agonista mixto WIN revirtió el efecto estimulador de los antagonistas (**Figura 17 B**).

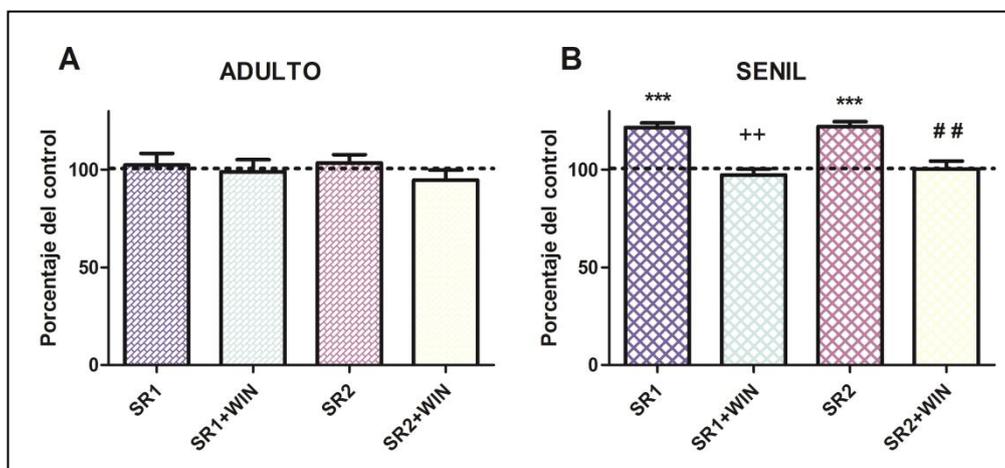


Figura 17: Actividad de la DAGL en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas y antagonistas de los receptores CB. La actividad fue ensayada preincubando 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 10 minutos con los antagonistas (1 μM de SR1 o de SR2) e incubando en presencia o en ausencia del agonista WIN (5 μM) conjuntamente con 20 μM de [^3H]DAG exógeno (sustrato A de la Tabla 1) durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista y sin antagonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control, las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición SR1, y los numerales indican diferencias significativas con respecto a la condición SR2. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ y ## $p < 0,01$.

3. Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre la actividad de la lisofosfatidato fosfohidrolasa en la fracción sinaptosomal de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

Al ensayar la actividad de la LPAasa en presencia de agonistas y/o antagonistas de los receptores CB (**Figura 18**), se pudo observar que estos ligandos ejercieron una acción diferente sobre la actividad enzimática en los sinaptosomas de ratas adultas y seniles.

El agonista WIN inhibió la actividad de la LPAasa en un porcentaje similar (24 %) en los sinaptosomas adultos y seniles mientras que el JWH no modificó dicha actividad

en ninguno de los dos grupos etarios analizados. Por otra parte, entre los animales adultos y seniles no se observaron diferencias significativas en los efectos de los agonistas WIN y JWH (**Figura 18**). El antagonista del CB1R inhibió la actividad de la LPAasa en los sinaptosomas adultos (10 %) y seniles (23 %). El antagonista del CB2R también inhibió (22 %) la actividad de la LPAasa en los sinaptosomas de la CC. A su vez, los estudios estadísticos demostraron que el SR2 ejerció el mismo efecto en ambos grupos etarios. Sin embargo, el efecto del antagonista SR1 fue significativamente más potente en los animales seniles. (**Figura 18**). Si bien en estos últimos ambos antagonistas mostraron un efecto de similar magnitud, el antagonista del CB2R en los sinaptosomas adultos ejerció un efecto significativamente más potente que el antagonista del CB1R. Cuando se preincubaron tanto los sinaptosomas adultos como los seniles con ambos antagonistas en simultáneo, se revirtió el efecto inhibitorio ejercido por cada antagonista individualmente (**Figura 18**).

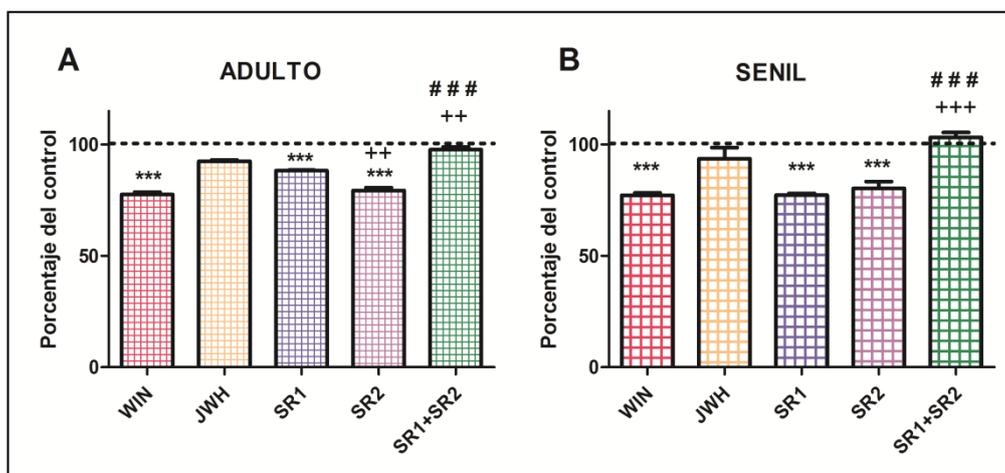


Figura 18: Actividad de la LPAasa en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas o antagonistas de los receptores CB. La actividad fue ensayada preincubando 50 μ g de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 10 minutos con los agonistas (5 μ M de WIN o de JWH) o los antagonistas (1 μ M de SR1 y/o de SR2). Posteriormente, se incubó durante 20 minutos con 20 μ M de [3 H]LPA. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista ni antagonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control, las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición SR1 y los numerales indican diferencias significativas con respecto a la condición SR2. *** $p < 0,001$; +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$.

La **Figura 19** muestra los resultados de la actividad de la LPAasa obtenidos al preincubar los sinaptosomas adultos o seniles con el antagonista del CB1R o el antagonista del CB2R seguido por la incubación con WIN.

En el terminal sináptico adulto (**Figura 19 A**) el agonista WIN incrementó la actividad de la LPAasa en un 11 % con respecto a la condición con el antagonista SR1, alcanzado valores similares a la condición control (sin agonista y sin antagonista). Si bien al incubarse con WIN después de la preincubación con el antagonista del CB2R, la actividad de la LPAasa también se vio incrementada (9 %) con respecto a la condición del antagonista, esta no llegó a alcanzar el valor del control. En los sinaptosomas seniles (**Figura 19 B**) la actividad enzimática fue estimulada en un 17 % cuando se preincubó con SR1 y luego se incubó con WIN, alcanzando valores similares a la condición control. Por el contrario, preincubando con SR2 e incubando con WIN, la actividad enzimática no mostró modificaciones.

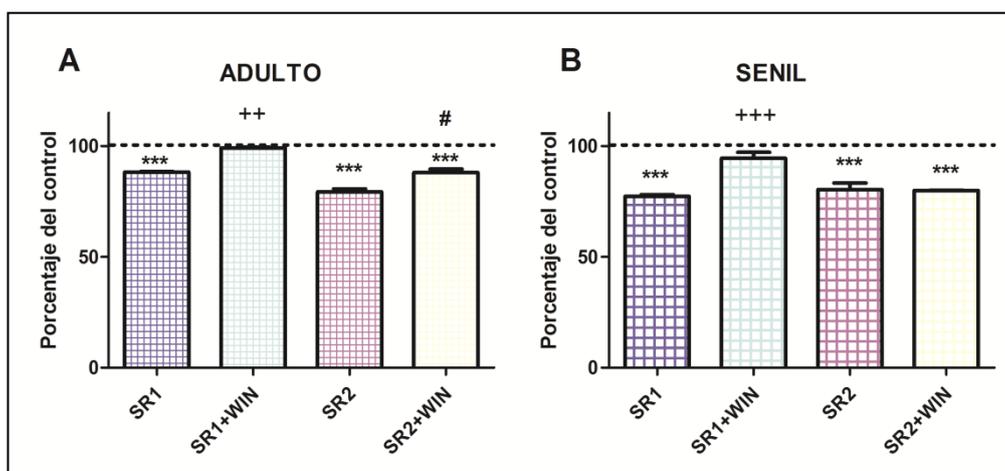


Figura 19: Actividad de la LPAasa en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas y antagonistas de los receptores CB. La actividad fue ensayada preincubando 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 10 minutos con los antagonistas (1 μM de SR1 o de SR2) e incubando en presencia o en ausencia del agonista WIN (5 μM) conjuntamente con 20 μM de [^3H]LPA durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista y sin antagonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control, las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición SR1 y los numerales indican diferencias significativas con respecto a la condición SR2. *** $p < 0,001$; +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$ y # $p < 0,05$.

4. Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre la hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en la fracción sinaptosomal de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

Al igual que lo observado con las principales vías de síntesis del 2-AG, al analizar el efecto de agonistas y/o antagonistas de los receptores CB en la hidrólisis de este endocannabinoide se observaron diferentes efectos en la fracción sinaptosomal de ratas adultas y seniles (**Figuras 20 y 21**).

Tanto en los sinaptosomas adultos como en los seniles los agonistas WIN y JWH no modificaron la hidrólisis del 2-AG (**Figura 20**). Si bien en los sinaptosomas adultos los antagonistas de los receptores CB1 y CB2 tampoco ejercieron efecto alguno sobre dicha actividad (**Figura 20 A**), en los animales seniles estos ligandos la redujeron en igual magnitud (15 %) (**Figura 20 B**). La presencia simultánea de ambos antagonistas en los terminales sinápticos de animales seniles potenció el efecto inhibitorio que cada uno de los antagonistas ejercía individualmente, resultando así en una inhibición del 50 % con respecto a la condición control (**Figura 20 B**).

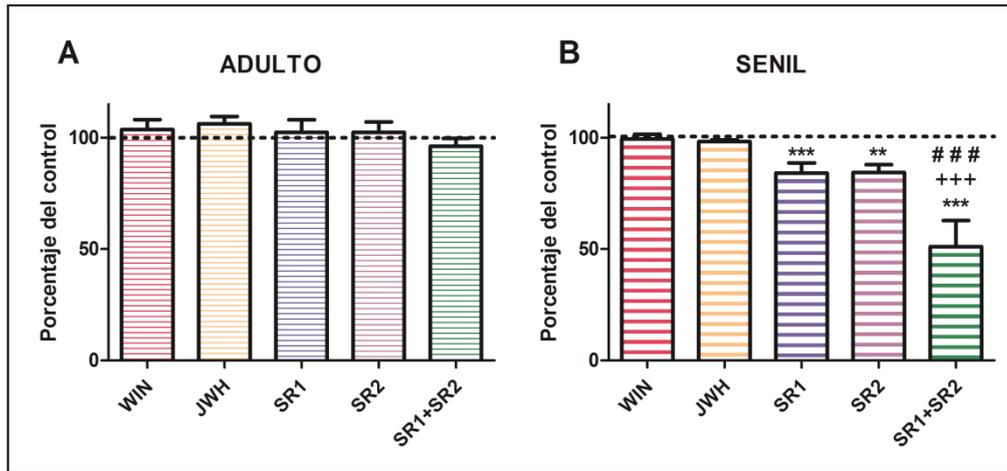


Figura 20: Hidrólisis del 2-AG en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas o antagonistas de los receptores CB. La actividad fue ensayada preincubando 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 10 minutos con los agonistas (5 μM de WIN o de JWH) o los antagonistas (1 μM de SR1 y/o de SR2). Posteriormente, se incubó durante 20 minutos con 10 μM de [^3H]2-AG. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista y sin antagonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control, las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición SR1 y los numerales indican diferencias significativas con respecto a la condición SR2. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ y ### $p < 0,001$.

En los ensayos en los que los sinaptosomas adultos fueron preincubados con los antagonistas del CB1R o del CB2R e incubados con el agonista WIN, no se observaron modificaciones en la hidrólisis del 2-AG (**Figura 21 A**). Cuando los mismos ensayos se realizaron en sinaptosomas seniles se pudo observar que el agonista WIN no revirtió el efecto inhibitorio ejercido por los antagonistas del CB1R y del CB2R (**Figura 21 B**). De esta manera, la hidrólisis del 2-AG en las condiciones SR1 + WIN y SR2 + WIN mostró una inhibición del 20 % respecto a la condición control.

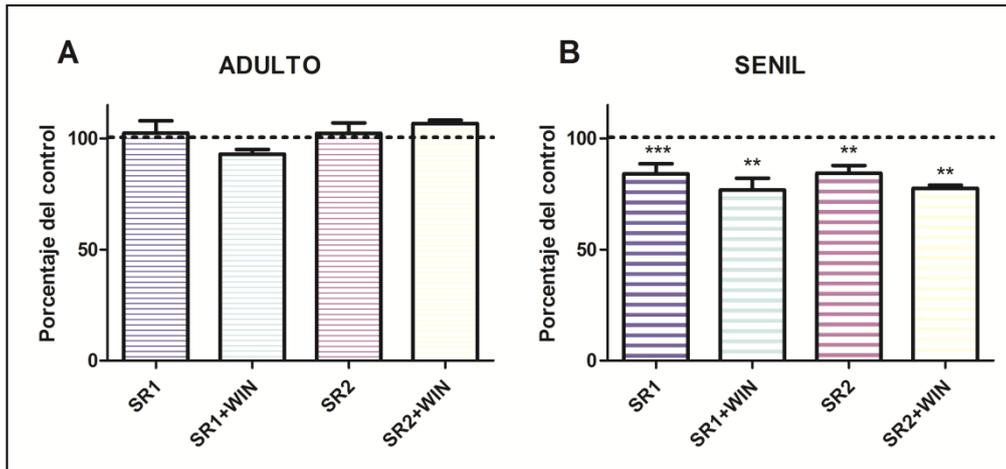


Figura 21: Hidrólisis del 2-AG en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas y antagonistas de los receptores CB. La actividad fue ensayada preincubando 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 10 minutos con los antagonistas (1 μM de SR1 o de SR2) e incubando en presencia o en ausencia del agonista WIN (5 μM) conjuntamente con 10 μM de [^3H]2-AG durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista y sin antagonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO I

El 2-AG es uno de los principales MAG del tejido animal. Antes de que se lo caracterizara como endocannabinoide, esta molécula era considerada un mero producto de la hidrólisis del DAG (Prescott y Majerus, 1983). A partir de ese momento se le atribuyeron numerosas funciones hasta entonces desconocidas. Además de su rol neuroprotector frente a enfermedades neurodegenerativas (Scotter y col., 2010), recientemente se ha estudiado la estrecha relación que existe entre el sistema cannabinoide y el envejecimiento (Bilkei-Gorzo, 2012). Aun así, al inicio de esta Tesis Doctoral, poco se conocía sobre el metabolismo de este MAG en el envejecimiento fisiológico.

Investigaciones anteriores han demostrado que tanto en los procesos fisiológicos como en ciertos estados patológicos, los niveles de los endocannabinoides, la expresión y/o las actividades de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los mismos y los receptores CB, experimentaban modificaciones (Di Marzo, 2008; Ludanyi y col., 2008; Di Marzo y Petrosino, 2007). Los hallazgos descritos en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral demuestran claramente la existencia de una desregulación en el metabolismo del 2-AG en la CC de rata durante el envejecimiento. Esto nos permite inferir que el nivel de este endocannabinoide en la CC está severamente afectado en dicho estado. Queda demostrada también una regulación diferente del metabolismo por agonistas y/o antagonistas de sus propios receptores.

El metabolismo del 2-AG puede modificarse tanto a nivel de la expresión de las proteínas enzimáticas que participan en su síntesis y en su degradación, como también a nivel de las actividades de las mismas. En este primer Capítulo se analizó el metabolismo del 2-AG abordando estas dos estrategias. Las vías biosintéticas e hidrolíticas de este endocannabinoide no solo difieren en los distintos tejidos y células sino que también dependen de las condiciones de estimulación (Ahn y col., 2008).

Los estudios de esta Tesis Doctoral fueron realizados utilizando como modelo biológico las fracciones de membrana (libre de la fracción nuclear) y soluble de la CC

de rata. Dichas fracciones provienen de distintos tipos de células presentes en la CC, tales como las neuronas, glía y células endoteliales. Teniendo en cuenta el rol que cumple el endocannabinoide en la sinapsis neuronal, y considerando que su síntesis e hidrólisis ocurren en sitios postsinápticos y presinápticos, respectivamente, estos estudios fueron también llevados a cabo en los terminales sinápticos.

Como es sabido, la principal vía de síntesis del 2-AG es a partir del DAG mediante la acción de la enzima DAGL. La actividad de esta enzima fue analizada en presencia de los DAG de diferente composición en acilos. La diferencia entre los sustratos radica en el contenido de sus ácidos grasos poliinsaturados. Es decir, uno contenía un mayor porcentaje de 20:4 mientras que el otro estaba compuesto mayoritariamente por 22:6, siendo la relación de ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados similar para ambos sustratos. En 2003, Bisogno y colaboradores lograron expresar mediante la transfección de células COS, dos genes correspondientes a la enzima DAGL: el de la DAGL α de aproximadamente 70 KDa y el de la DAGL β de aproximadamente 120 KDa. Estas dos proteínas se localizaban en la membrana plasmática de estas células. En el estudio de Bisogno y colaboradores se analizó también la selectividad por el sustrato de ambas isoformas en el cerebro y les fue posible concluir que la isoforma β presenta cierta preferencia por los DAG que contienen 18:2 > 18:1 > 20:4 > 18:0 en la posición 2 mientras que la isoforma α parece ser igualmente efectiva para todos los DAG cualquiera sea su composición en ácidos grasos (Bisogno y col., 2003).

Los resultados de la actividad enzimática obtenidos utilizando los sustratos con diferente composición en acilos conjuntamente con los de la expresión de las DAGL α y β , sugieren que ambas isoformas de la enzima coexisten y contribuyen a la generación del 2-AG en la fracción de membrana de la CC. Sin embargo, en los sinaptosomas solo se detectó la presencia de la isoforma β . Estos resultados parecerían ser contradictorios con hallazgos de estudios previos en los que se observó que la mayor parte de la señalización retrógrada de los endocannabinoides en el cerebro es consecuencia del 2-AG derivado de la acción enzimática de la DAGL α (Tanimura y col., 2010). Sin embargo, los resultados de esta Tesis Doctoral indicarían que la expresión de la DAGL α en sinaptosomas es mínima y, por ende, no detectable por los ensayos de

WB realizados, aunque podría tomar relevancia en respuesta a un estímulo. Así, la DAGL α podría constituir un reservorio presente en ciertas organelas de las neuronas, como lo indican los resultados en membrana, y migrar hacia el terminal sináptico en respuesta a un estímulo en el momento que se requiera la síntesis del 2-AG. En trabajos anteriores en los que se utilizaron ratones DAGL $\alpha^{-/-}$ y DAGL $\beta^{-/-}$, se observó que ambas isoformas de la enzima participaban en la síntesis del 2-AG en el SNC (Gao y col., 2010). La actividad de la DAGL está asociada casi exclusivamente a la membrana, siendo mínima en la fracción soluble. Esta actividad prácticamente ausente de la DAGL coincide con la no detección de la expresión de ambas isoformas de la enzima en el soluble celular. Sin embargo, no se puede dejar de señalar que en los animales seniles hay una tendencia al aumento de la actividad en la fracción de membrana y a una disminución de dicha actividad en el soluble. Esto parecería indicar una posible redistribución de la actividad desde el soluble hacia la membrana en el envejecimiento. Esta forma de regulación enzimática ha sido reportada para otras enzimas del metabolismo lipídico (Pasquare y col., 2001) y, en particular, del 2-AG (Mulder y col., 2011).

La expresión y la actividad de la DAGL en los sinaptosomas mostraron importantes cambios en el envejecimiento, sin embargo la actividad de esta enzima así como los niveles de la isoforma β no se vieron modificados en la membrana de animales seniles. Esto, junto con la disminución de los niveles de la isoforma α de la enzima en la membrana, parecerían indicar que la síntesis del 2-AG en la CC es llevada a cabo por la DAGL β y que la aparente ausencia de la isoforma α en los terminales sinápticos estaría compensada por un incremento en el nivel de la DAGL β . El envejecimiento produjo un efecto diferente cuando la actividad de la DAGL en los sinaptosomas fue ensayada con los DAG que tenían un alto porcentaje de 22:6 o de 20:4. En el primer caso, la actividad aumentó coincidentemente con lo que ocurre con la expresión de la DAGL β en tanto que en el segundo caso la actividad disminuyó. Los resultados de la actividad de la DAGL anteriormente descritos corroboran el rol de la DAGL β como la principal responsable de la síntesis del 2-AG a partir del DAG durante el envejecimiento.

Si bien la DAGL ha sido identificada como la principal vía de generación del 2-AG, en 2002 Nakane y colaboradores encontraron claras evidencias de una rápida conversión enzimática del 2-araquidonoil-LPA a 2-AG en el homogenado de cerebro de rata (Nakane y col., 2002). Esta vía alternativa es consecuencia de la actividad enzimática de la LPAasa y, en base a los resultados de esta Tesis Doctoral, parecería ser de mayor contribución que la DAGL en la fracción de membrana y en la sinaptosomal de la CC de rata. Para evitar que la actividad de la LPAasa fuese cuantificada en defecto, ya que su producto (MAG) puede ser degradado por la MAGL, fue pertinente el empleo de un inhibidor específico de esta última. De este modo, determinando la actividad de la LPAasa en presencia del inhibidor de la MAGL KML-29, se pudo observar que la contribución de dicha actividad enzimática a la generación del MAG también mostraba una modulación diferente en el envejecimiento fisiológico. La actividad de la LPAasa en animales seniles experimentó una disminución en la fracción de membrana y un ligero aumento en la fracción sinaptosomal. Basándose en los resultados obtenidos a partir de los sustratos con mayor similitud en su composición a los fisiológicos, en la CC de los animales seniles, el balance de la síntesis del 2-AG se encontró inclinado hacia su disminución, siendo responsable de este efecto la LPAasa en la membrana y la DAGL en el terminal sináptico.

El 2-AG, al igual que la mayoría de los neuromoduladores, es metabolizado rápidamente con el fin de asegurar una inmediata inactivación de la señal. Si bien existen caminos alternativos para la degradación del 2-AG, como por ejemplo, la acción de la COX2 que genera ésteres de prostaglandinas (Kozak y col., 2000), la principal vía de inactivación de la señalización es llevada a cabo por su recaptación y posterior hidrólisis a través de las enzimas responsables de la misma. Las enzimas MAGL, ABHD6 y ABHD12 son tres serina hidrolasas a las que en conjunto se les atribuye el 99 % de la hidrólisis del 2-AG. De estas tres enzimas, la MAGL es la principal responsable de la hidrólisis del endocannabinoide en tanto que la ABHD6 y la ABHD12 contribuyen en un 4 % y 9 %, respectivamente (Savinainen y col., 2012; Schlosburg y col., 2010). Otros hallazgos sugieren que la FAAH también parecería contribuir a la inactivación del 2-AG (Blankman y col., 2007).

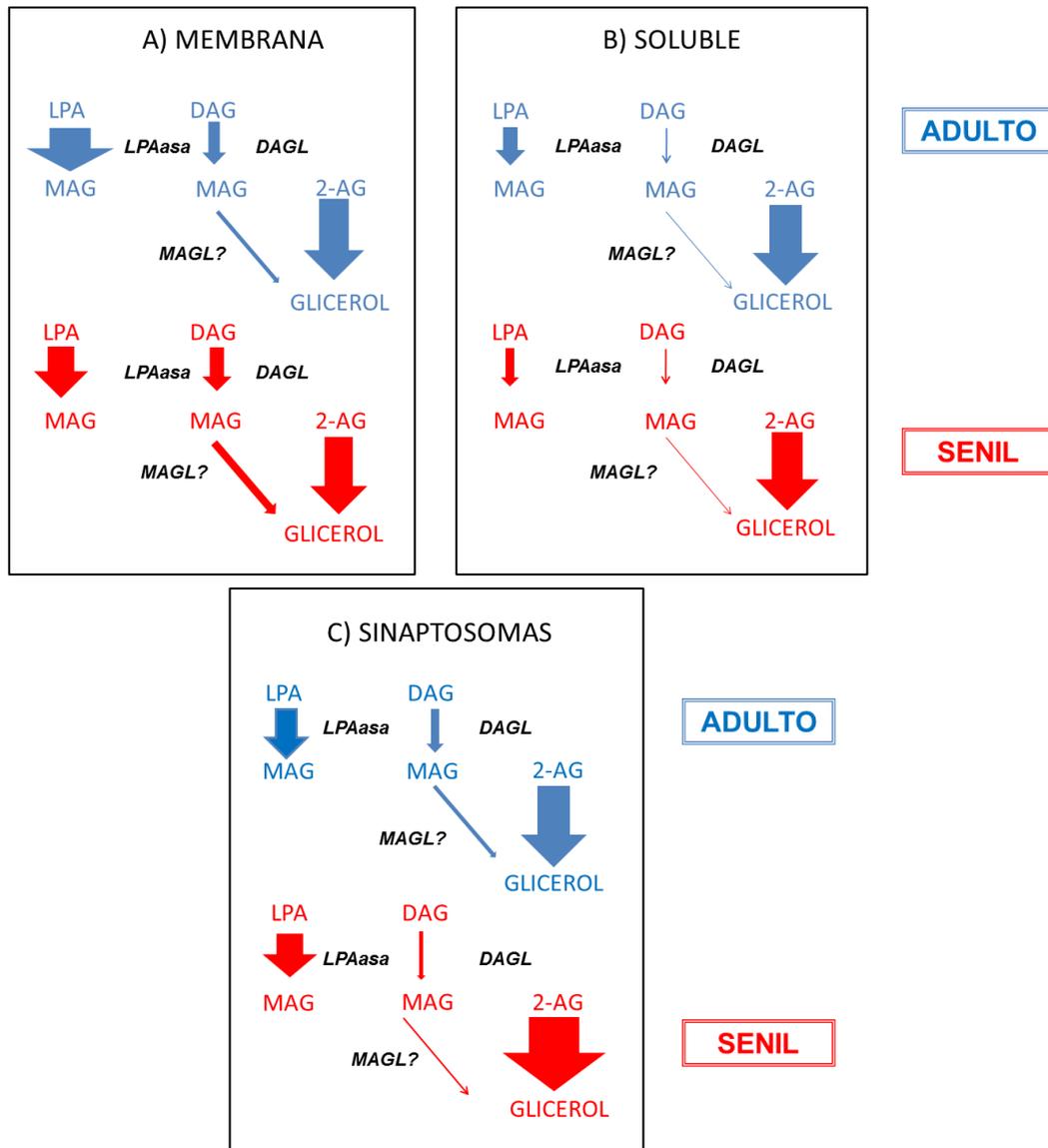
Estudios anteriores han demostrado que la MAGL actúa sobre los MAG de distinta composición (Nomura y col., 2010). En el presente trabajo se ensayó la hidrólisis del MAG utilizando sustratos que difieren en su composición de acilos. La mayor actividad hidrolítica en fracciones de membrana y soluble y en sinaptosomas de la CC se pudo observar cuando se utilizó un MAG con un alto grado de saturación. La hidrólisis de este MAG altamente saturado disminuyó en la fracción de membrana durante el envejecimiento. Los cambios observados en la hidrólisis del MAG generado a partir del DAG con alto contenido de 20:4 en la membrana y en los sinaptosomas fueron consecuencia del efecto que el envejecimiento ejerce sobre la actividad de la DAGL, debido a que generó una disponibilidad diferente del sustrato MAG.

La hidrólisis del 2-AG tanto en la fracción de membrana como en la fracción soluble no sufrió modificación alguna durante el envejecimiento. En la fracción de membrana, coincidentemente con lo que ocurrió con la actividad, tampoco se observaron modificaciones en los niveles de la enzima MAGL durante el envejecimiento. Sin embargo, en la fracción soluble estos niveles fueron considerablemente mayores. La MAGL es una enzima principalmente de membrana, por lo que un cambio en el nivel de la misma en esta fracción no es tan fácilmente perceptible como sí lo es en la fracción soluble en la que su contenido es marcadamente menor. Esto sugiere que el citosol celular constituiría un reservorio en el que la enzima MAGL está en estado inactivo necesitando ser translocada a la membrana para ejercer su actividad. Además, el hecho de que la MAGL quede retenida en la fracción soluble aparenta asegurar una mayor disponibilidad del 2-AG durante el envejecimiento.

En los terminales sinápticos se pudo observar que en el envejecimiento la hidrólisis del 2-AG fue mayor mientras que la expresión de la MAGL fue menor. Este resultado parecería indicar la acción de algún factor de señalización involucrado en este mecanismo que estimularía la actividad enzimática y, de esta manera, compensaría la deficiencia de la MAGL. Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que, tanto en las fracciones de membrana y citosólica como en los sinaptosomas, las actividades hidrolíticas involucradas en el metabolismo del endocannabinoide 2-AG y de otros MAG son moduladas diferentemente en el

envejecimiento. Esto sugeriría que estas actividades tienen accesos preferenciales a diferentes reservorios de MAG.

En el siguiente esquema se representan los resultados discutidos recientemente:



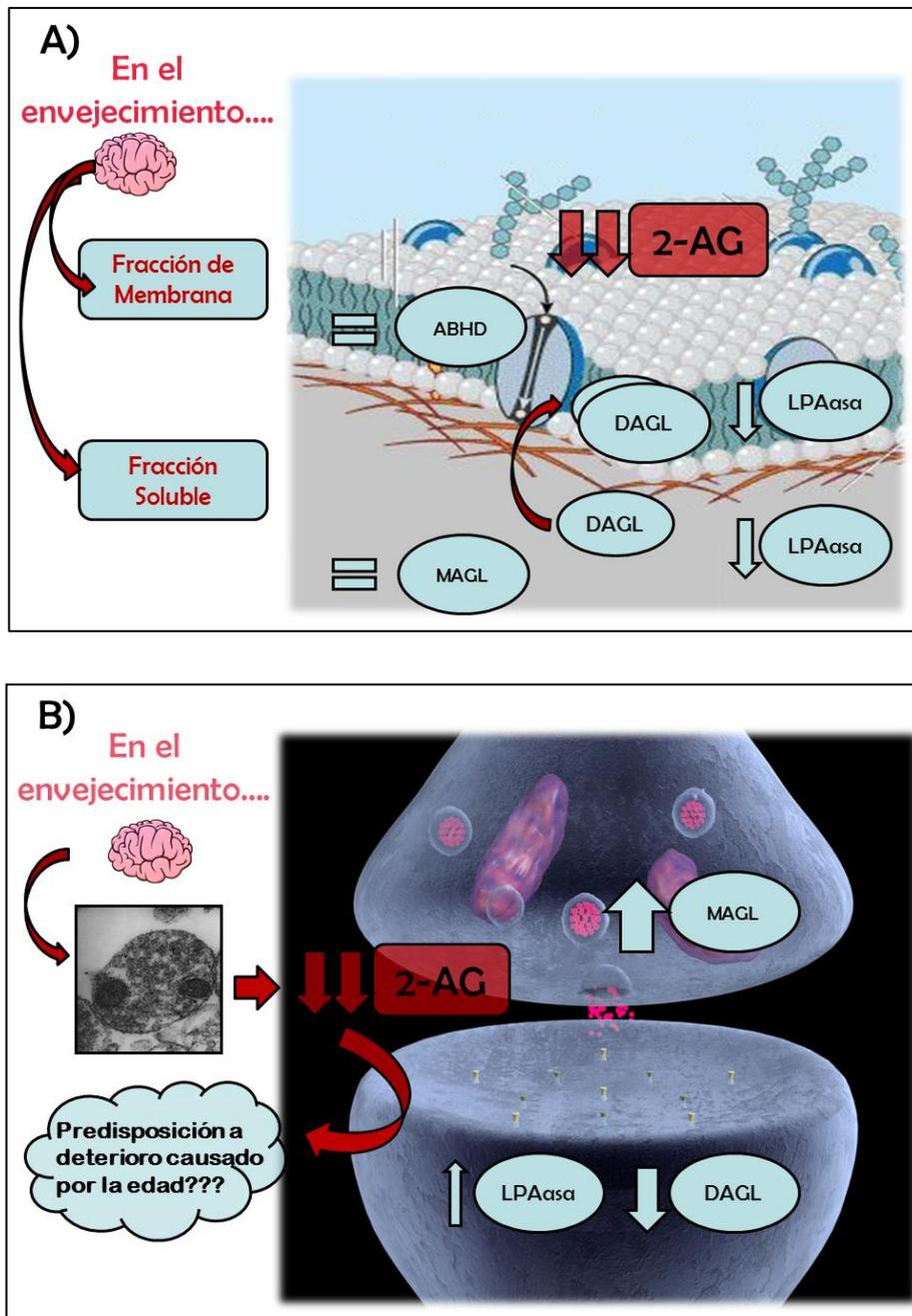
Esquema representativo del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol (2-AG) en las fracciones de: A) Membrana, B) Soluble, y en C) Sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas adultas (azul) y seniles (rojo) a partir de los sustratos con mayor similitud en su composición a los fisiológicos. El grosor de las flechas indica el nivel de actividad de las enzimas. Las enzimas del metabolismo de los endocannabinoides se indican en letra cursiva: diacilglicerol lipasa (*DAGL*), lisofosfatidato fosfohidrolasa (*LPAasa*), y monoacilglicerol lipasa (*MAGL?*). Diacilglicerol (DAG), lisofosfatidato (LPA), y monoacilglicerol (MAG).

Como se mencionó anteriormente, son varias las enzimas capaces de hidrolizar al 2-AG (MAGL, FAAH y ABHD). Para determinar la contribución de cada una de ellas a la degradación de este endocannabinoide, la hidrólisis del 2-AG fue ensayada en presencia de los inhibidores de la MAGL URB-602 (King y col., 2007) y KML-29 (Chang y col., 2012) y del inhibidor de la FAAH URB-597 (Fegley y col., 2005). Previamente ha sido demostrado que el KML-29 es un inhibidor potente y selectivo de la MAGL (Chang y col., 2012) mientras que el URB-602 muestra una menor capacidad para inhibir esta actividad hidrolítica, dependiendo del origen de la enzima (Viso y col., 2008). Los resultados obtenidos utilizando estos inhibidores en la fracción de membrana sugieren que en animales adultos la hidrólisis del 2-AG es producida principalmente por la MAGL (78 %) y parcialmente por la ABHD en tanto que en animales seniles la ABHD sería la única responsable. En coincidencia con los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral, se ha reportado la presencia de la proteína ABHD6 en hipocampo proveniente de humanos seniles (Marrs y col., 2010). Si bien en la membrana senil se observó un mayor nivel de la proteína FAAH con respecto a la misma fracción de animales adultos, los resultados de la hidrólisis del 2-AG en presencia del inhibidor URB-597 parecerían indicar que esta enzima no está involucrada. Esta modificación de los niveles de la FAAH durante el envejecimiento podría estar relacionada con la regulación del metabolismo del endocannabinoide AEA. Cuando se ensayó la hidrólisis del 2-AG en presencia de los inhibidores en sinaptosomas obtenidos a partir de la CC el perfil fue distinto. Los resultados sugieren que en los sinaptosomas adultos el 75 % de la hidrólisis del 2-AG corresponde a la actividad de la MAGL y el 25 % restante a la de la FAAH. Por otro lado, en animales seniles la MAGL seguida por la FAAH serían las mayores responsables de la hidrólisis del 2-AG, no pudiéndose descartar la participación de otras serina hidrolasas como, por ejemplo, la ABHD. La participación de la FAAH en la hidrólisis del 2-AG en animales adultos y seniles es similar aunque los niveles de esta enzima se vieron incrementados en el envejecimiento. Esto sugiere que el incremento de la proteína enzimática en sinaptosomas seniles no sería responsable de la degradación del 2-AG.

Los resultados presentados y discutidos en la Sección I de este Capítulo constituyen la primera evidencia de la regulación de las enzimas involucradas en el

metabolismo del 2-AG durante el envejecimiento. Estos indican que el balance neto entre las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis y en la degradación de los MAG (basándose en los resultados obtenidos a partir de los sustratos con mayor similitud en su composición a los fisiológicos) muestran una menor disponibilidad del 2-AG en la fracción de membrana y en el terminal sináptico de la CC durante el envejecimiento. Teniendo en cuenta que el endocannabinoide en su acción neuromoduladora inhibe la liberación de neurotransmisores (Cheer y col., 2004; Gessa y col., 1997; Gifford y Ashby, 1996), y conociendo el rol neuroprotector de estas moléculas en numerosos modelos experimentales y/o en enfermedades neurodegenerativas (Mulder y col., 2011; Basavarajappa y col., 2009; Zuccato y Cattaneo, 2009), podemos concluir que la menor disponibilidad del 2-AG en la CC puede ser, al menos parcialmente, responsable de la disfunción en los procesos sinápticos que se dan en el envejecimiento fisiológico.

En el siguiente esquema se representan los resultados discutidos recientemente:



Esquema representativo del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol (2-AG) en las fracciones de: A) Membrana y Soluble y B) Sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas seniles. El grosor de las flechas celestes indica el nivel de actividad de las enzimas. Diacilglicerol lipasa (DAGL), lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAasa), monoacilglicerol lipasa (MAGL) y serina hidrolasa con dominios α/β (ABHD).

Lo discutido hasta aquí demuestra que las enzimas involucradas en la síntesis y en la degradación del 2-AG constituyen una promisorio diana terapéutica para atenuar los daños sinápticos producidos durante el envejecimiento fisiológico. El envejecimiento cronológico predispone al cerebro a una incrementada sensibilidad frente a enfermedades neurodegenerativas (Ledesma y col., 2012). Varios de los eventos deletéreos que ocurren durante el envejecimiento pueden ser, al menos parcialmente, atenuados por la acción de los endocannabinoides (Bilkei-Gorzo, 2012). Diversos estudios han revelado que el nivel de estas moléculas, el de las enzimas que participan en su metabolismo y el de los CBR, se modifica bajo ciertas condiciones fisiológicas y patológicas (Ludanyi y col., 2008; Wang y Ueda, 2008; Di Marzo y Petrosino, 2007; Pertwee, 2005). Los resultados de esta Tesis Doctoral sobre el metabolismo del 2-AG en el envejecimiento fisiológico complementan estos hallazgos.

En vista del rol neuroprotector de los endocannabinoides y de su relevante función en la sinapsis neuronal, otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue estudiar la regulación del metabolismo del 2-AG por la acción de ligandos de sus propios receptores en los terminales sinápticos.

Por tal razón, primero se analizó la presencia de los CBR en la CC de rata. El receptor CB1 está mayormente expresado en el cerebro y desde un principio se lo ha relacionado con numerosas funciones a nivel neuronal (Matsuda y col., 1990). Su presencia en distintas zonas del cerebro y en diferentes subpoblaciones neuronales ha sido descrita (Mackie, 2005; Marsicano y Lutz, 1999; Matsuda y col., 1993; Herkenham y col., 1991). La presencia del CB1R también fue detectada en las preparaciones de la CC de rata empleadas como material biológico para esta Tesis Doctoral.

Si bien desde un primer momento se relacionó al receptor CB2 con tejidos periféricos y principalmente con células del sistema inmune (Lynn y Herkenham, 1994; Munro y col., 1993), estudios relativamente recientes en los que se aplicaron diversas técnicas reportaron la presencia del receptor CB2 funcional en progenitores neuronales, neuronas y células endoteliales (Viscomi y col., 2009; Brusco y col., 2008; Palazuelos y col., 2006; Van Sickle y col., 2005). Aun habiendo vasta evidencia que

indica la presencia del CB2R en el tejido nervioso, este hallazgo sigue siendo controversial. Debido a esto y a que la especificidad de los anticuerpos anti-CB2R es bastante cuestionada, se han probado distintos anticuerpos que reconocen a este receptor. El que mostró la mayor especificidad fue empleado para determinar, posteriormente, la expresión del receptor. El uso de anticuerpos comerciales generados contra distintos epitopes evidenció la presencia de una banda de alrededor de 50 KDa tanto en las muestras de la CC de rata como en los controles positivos (linfocitos humanos, células Jurkat y cocultivo de neurona y glía de rata). Esta banda corresponde al peso molecular aproximado para el CB2R descrito en numerosos trabajos (Gong y col., 2006; Van Sickle y col., 2005) y no se visualiza cuando el anticuerpo se preincuba con el péptido antigénico control. De esta manera, se corroboró la especificidad de la banda y una vez más, se comprobó la expresión del receptor CB2 en el cerebro, más específicamente en preparaciones tanto de membrana como de sinaptosomas de la CC de rata.

Los resultados demuestran que la expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en sinaptosomas de la CC disminuye significativamente durante el envejecimiento. A su vez, este efecto parecería ser exclusivo de los terminales sinápticos, debido a que en la membrana de la CC no varían los niveles de los mismos. En coincidencia con estos resultados, los estudios de unión a los CBR empleando el ligando [³H]WIN 55,212-2 realizados por otros autores demostraron que en la CC de ratas seniles esta unión se veía disminuida sin modificarse los niveles del ARNm de estos receptores (Berrendero y col., 1998). También se ha demostrado la coexpresión de los receptores CB1 y CB2 en ciertas regiones del cerebro (Callen y col., 2012; Gong y col., 2006; Golech y col., 2004).

La disminución de la disponibilidad del 2-AG y el menor nivel de los receptores CB en terminales sinápticos observados en el envejecimiento, podrían estar relacionados con la degeneración neuronal y/o podrían contribuir al deterioro sináptico observado en el envejecimiento (Bilkei-Gorzo, 2012).

Los hallazgos derivados del uso de agonistas y/o antagonistas de los CBR demostraron que las enzimas intervinientes en el metabolismo del 2-AG podían ser

reguladas por ellos generando perfiles distintos en los sinaptosomas adultos y seniles. En adultos, la LPAasa es la única responsable de regular los niveles de 2-AG, manteniéndolos bajos, vía ligandos de los receptores CB1 y CB2. En sinaptosomas seniles la actividad de la LPAasa, mediante la regulación por los antagonistas de los receptores CB1 o CB2, también disminuye la disponibilidad del 2-AG. Sin embargo, esta disminución es eficientemente compensada por el incremento de la actividad de la DAGL y por la marcada disminución de su hidrólisis, inclinándose así el metabolismo del endocannabinoide hacia una mayor disponibilidad del mismo.

El bloqueo de los CBR en los sinaptosomas de animales seniles podría ser percibido por el sistema como una señal que indica bajos niveles del endocannabinoide. Esto estaría compensado por un aumento en los niveles del 2-AG como lo demuestran los resultados en presencia del antagonista del CB1R y/o del antagonista del CB2R. Aunque se sabe que en el SNC el receptor CB1 es más abundante que el receptor CB2 (Zanettini y col., 2011; Govaerts y col., 2004), el efecto de los dos antagonistas sobre las actividades de la DAGL y de la MAGL parece ser similar. Los trabajos de Gong y colaboradores indican que el CB1R y el CB2R colocan en ciertas estructuras cerebrales pudiendo trabajar independientemente o cooperativamente (Gong y col., 2006). La similitud en los efectos producidos por ambos antagonistas sobre las actividades de la DAGL y de la MAGL, a pesar de que los niveles de ambos receptores son diferentes, podría deberse a que en el sistema estudiado el CB1R y el CB2R operan en forma conjunta para lograr este efecto. A favor de esto, Callen y colaboradores observaron que estos receptores pueden formar heterómeros en neuronas estableciéndose entre ellos un fenómeno de regulación bidireccional (Callen y col., 2012). De todos modos, cabe destacar que no necesariamente un menor nivel de ARNm está asociado con una menor expresión de la proteína y con una menor actividad biológica de la misma (Berrendero y col., 1998).

Con el fin de discernir si la modulación del metabolismo del 2-AG ocurría a través de los receptores CB1 y/o CB2, se evaluaron las actividades de las enzimas DAGL, LPAasa y MAGL bloqueando uno u otro de los receptores CB con el antagonista selectivo para el CB1R (SR1) o con el antagonista selectivo para el CB2R (SR2) (Rinaldi-Carmona y col., 1998; Rinaldi-Carmona y col., 1995) antes de llevar a cabo la

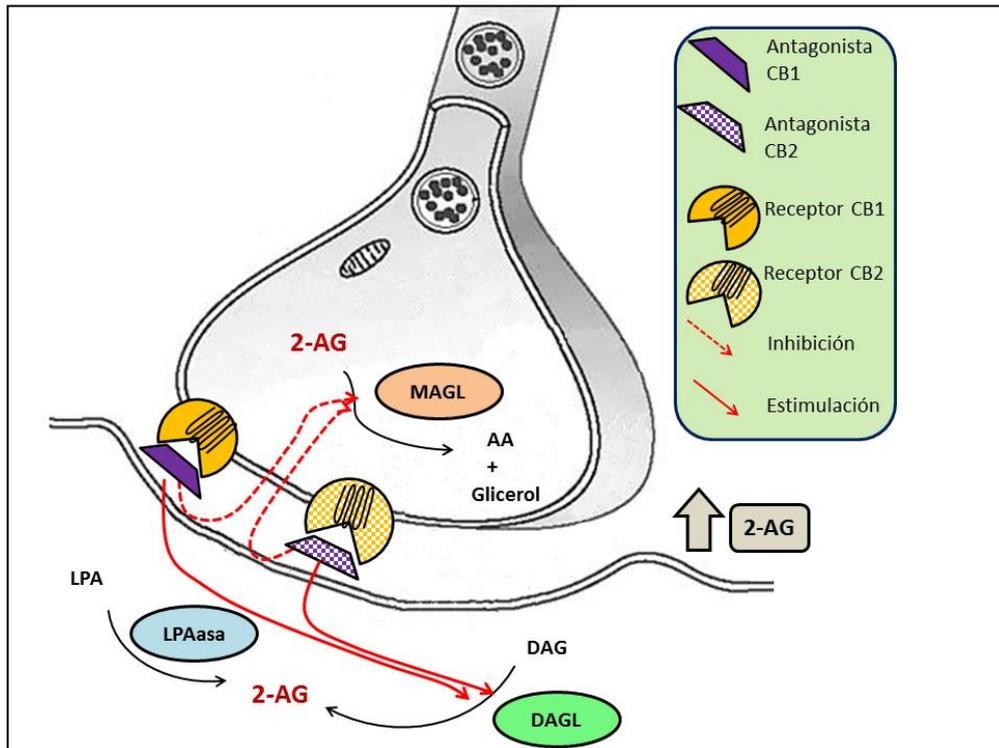
incubación con el agonista mixto WIN. Cuando este fue redirigido hacia el receptor CB1 o hacia el CB2 en los sinaptosomas adultos, aumentó la actividad de la LPAasa. De esta manera, se pudo inferir que el agonista WIN a través de los receptores CB1 o CB2 era capaz de revertir totalmente o parcialmente la menor disponibilidad del 2-AG que provocaban los antagonistas.

En los sinaptosomas seniles, el patrón de regulación observado a través de los CBR fue diferente. La menor disponibilidad del 2-AG, resultante de la disminución de la actividad de la LPAasa por la acción de los antagonistas, fue revertida únicamente por el receptor CB2. Cabe destacar que aunque el agonista específico del receptor CB2 no modificó la actividad de la LPAasa, la acción del agonista WIN a través del CB2R revirtió la inhibición ejercida por el antagonista del CB1R. Este resultado sugiere que el receptor CB2 adquiere importancia cuando el CB1 se encuentra bloqueado. Por otra parte, se pudo observar que el agonista WIN revirtió el efecto estimulador que el bloqueo de los receptores CB1 o CB2 ejercía sobre la actividad de la DAGL, alcanzando el 2-AG, de esta manera, niveles basales. Aun así, los niveles de este endocannabinoide, se mantendrían altos a expensas de la inhibición de su hidrólisis por medio de los antagonistas de los receptores CB1 o CB2, efecto que no fue revertido por el agonista WIN.

Los resultados de la Sección 2 del Capítulo I discutidos anteriormente revelan la necesidad de mantener niveles altos de la molécula neuroprotectora 2-AG durante el envejecimiento. También demuestran que el metabolismo del 2-AG es regulado principalmente por los antagonistas de los receptores CB1 y CB2. Sin embargo, no es posible aseverar que estos efectos ocurran exclusivamente por la acción directa de los antagonistas de los CBR sobre los mismos receptores o por un mecanismo no mediado por receptor. No obstante, una acción directa de los ligandos de los receptores CB sobre las enzimas del metabolismo del 2-AG no parecería ser factible. En este aspecto, De Petrocellis y colaboradores demostraron que los efectos de otros ligandos de los CBR, como, por ejemplo, los cannabinoides puros y extractos de cannabis enriquecidos en cannabinoides, eran capaces de inhibir a la MAGL con un valor de IC₅₀ entre 30 y 50 μ M (De Petrocellis y col., 2011). Estos valores de IC₅₀ resultan mucho mayores que

las concentraciones de agonistas (5 μM) y antagonistas (1 μM) utilizados en esta Tesis Doctoral.

En el siguiente esquema se encuentran representados los principales hallazgos en la regulación del metabolismo del 2-AG a través de sus propios receptores en el envejecimiento:



Esquema representativo de la regulación del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol (2-AG) a través de antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas seniles. Ácido araquidónico (AA), diacilglicerol (DAG), diacilglicerol lipasa (DAGL), lisofosfatidato (LPA), lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAasa) y monoacilglicerol lipasa (MAGL).

El rol de los endocannabinoides en la neuroprotección frente a enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad está siendo cada vez más estudiado, lo cual se ve reflejado en la diversidad de trabajos de los que se dispone en la actualidad. En este contexto, esta Tesis Doctoral que muestra la capacidad de aumentar la disponibilidad del endocannabinoide 2-AG por acción de ligandos de los receptores CB, principalmente por la acción de antagonistas, sugiere que los receptores cannabinoides son una importante diana terapéutica para atenuar la disfunción

sináptica y/o proteger al sistema nervioso de los daños provocados por el proceso de envejecimiento.

CAPÍTULO II
"ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN
DE LA ANANDAMIDA"

*Hidrólisis de la anandamida en el
envejecimiento fisiológico y su
regulación por agonistas y/o
antagonistas de los receptores
cannabinoides CB1 y CB2*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En el primer Capítulo de esta Tesis Doctoral se presenta el metabolismo del endocannabinoide 2-AG. Este estudio incluyó la evaluación de la presencia de la enzima FAAH, la cual se sabe que participa tanto en la hidrólisis del 2-AG como del otro endocannabinoide, la AEA. Se observó que la FAAH se expresa en las fracciones de membrana y sinaptosomal de la CC de rata y que el nivel de la misma experimenta modificaciones durante el envejecimiento. Conociendo esto, se procedió a estudiar la hidrólisis del endocannabinoide AEA en las fracciones de membrana y sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles, tema que se trata en el segundo Capítulo de esta Tesis Doctoral.

La enzima FAAH es la responsable de hidrolizar casi con exclusividad a la AEA. También se conoce que la NAAA y la AC pueden degradar a este endocannabinoide aunque con mucha menor eficiencia. Para determinar la participación de la FAAH en la degradación de la AEA, tanto en animales adultos como en animales seniles, se realizaron ensayos con un inhibidor específico de esta enzima.

Por último, habiendo determinado la presencia de ambos receptores cannabinoides y teniendo en cuenta las modificaciones que experimentan los niveles de los mismos en el envejecimiento, se analizó la degradación de la AEA tanto en animales adultos como en seniles mediante el uso de agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, como fue descrito para el metabolismo del 2-AG.

RESULTADOS

1. Hidrólisis de la anandamida en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

La hidrólisis de la AEA en las fracciones de membrana y sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles se determinó ensayando dicha actividad en presencia de AEA radiomarcada.

1.1. Hidrólisis de la anandamida en la fracción de membrana:

La hidrólisis de la AEA en la fracción de membrana de la CC de ratas adultas y seniles se encuentra representada en la **Figura 22**. En ella puede observarse que la actividad hidrolítica en membrana adulta fue muy baja y que en los animales seniles aumentó notablemente (7,7 veces mayor).

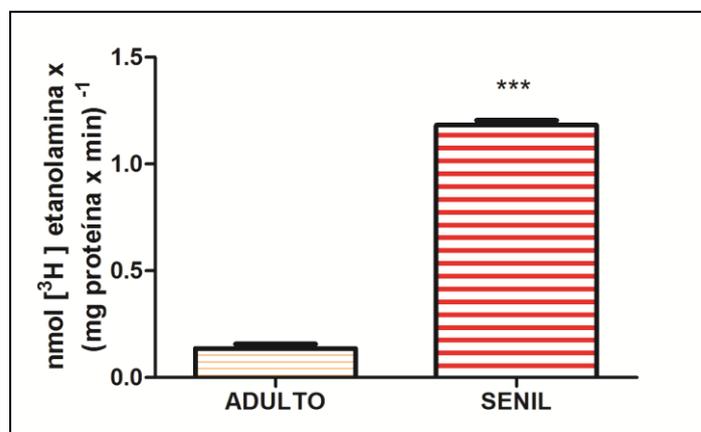


Figura 22: Hidrólisis de la AEA en la fracción de membrana de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada incubando 30 μ M de [3 H]AEA en presencia de 50 μ g de proteínas de la fracción de membrana durante 15 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto a la condición adulto. *** $p < 0,001$.

1.2. Hidrólisis de la anandamida en la fracción sinaptosomal:

En la **Figura 23** se puede observar que la hidrólisis de la AEA en sinaptosomas de la CC de animales adultos fue considerablemente mayor que en la fracción de membrana. Por otro lado, en los animales seniles la hidrólisis de la AEA en la fracción sinaptosomal disminuyó marcadamente (57 %).

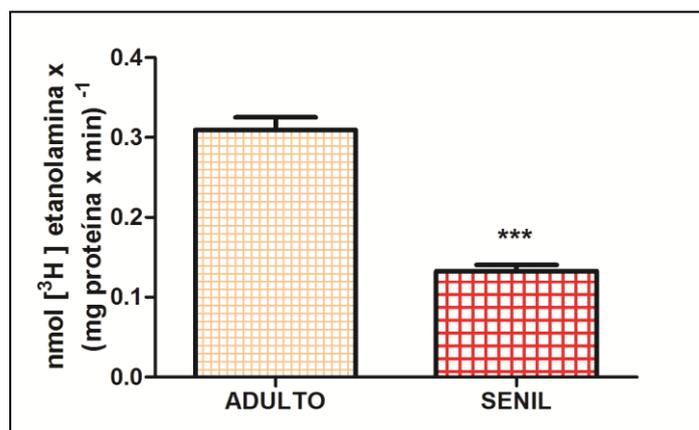


Figura 23: Hidrólisis de la AEA en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada incubando 30 μ M de [³H]AEA en presencia de 50 μ g de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 15 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto a la condición adulto. ***p < 0,001.

2. Efecto del inhibidor de la ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de la anandamida en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

Con el fin de determinar la contribución de la FAAH, principal enzima propuesta en la hidrólisis de la AEA, en la degradación de este endocannabinoide, los ensayos se realizaron preincubando las distintas fracciones de la CC de rata en presencia de URB-597, inhibidor de esta enzima.

2.1. Efecto del inhibidor de la ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de la anandamida en la fracción de membrana:

Como puede observarse en la **Figura 24**, el inhibidor específico de la FAAH disminuyó la hidrólisis de la AEA en un 66 % en la fracción de membrana de la CC de

animales adultos. En la misma fracción de los animales seniles la inhibición producida por el URB-597 fue de un 83 %.

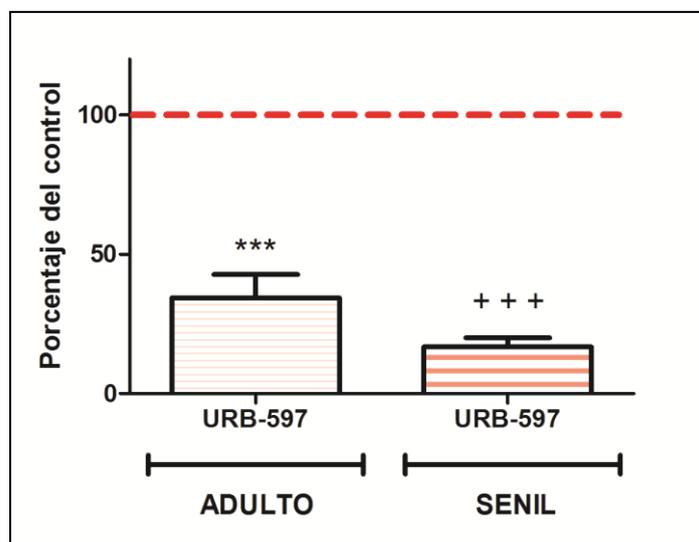


Figura 24: Efecto del inhibidor de la FAAH URB-597 en la hidrólisis de la AEA en la fracción de membrana de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada preincubando durante 10 minutos con URB-597 (0,1 μ M) en presencia de 50 μ g de proteínas de la fracción de membrana e incubando con 30 μ M de [3 H]AEA durante 15 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin inhibidor representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control adulto y las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición control senil. *** $p < 0,001$ y +++ $p < 0,001$.

2.2. Efecto del inhibidor de la ácido graso amidohidrolasa en la hidrólisis de la anandamida en la fracción sinaptosomal:

En la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas, el inhibidor disminuyó la hidrólisis de la AEA en un porcentaje similar (64 %) a lo ocurrido en la fracción de membrana del mismo grupo etario. En los sinaptosomas de animales seniles la inhibición producida por el URB-597 fue cercana al 100 % (**Figura 25**).

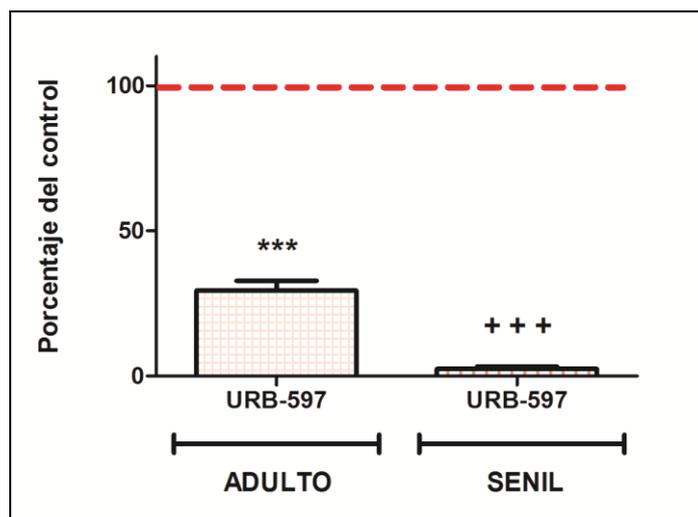


Figura 25: Efecto del inhibidor de la FAAH URB-597 en la hidrólisis de la AEA en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas y seniles. La actividad fue ensayada preincubando durante 10 minutos con URB-597 (0,1 μ M) en presencia de 50 μ g de proteínas de la fracción sinaptosomal e incubando con 30 μ M de [3 H]AEA durante 15 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin inhibidor representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control adulto y las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición control senil. *** $p < 0,001$ y +++ $p < 0,001$.

3. Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides en la hidrólisis de la anandamida en la corteza cerebral de ratas adultas y seniles

3.1. Efecto de agonistas de los receptores CB1 y CB2 en la hidrólisis de la anandamida en la corteza cerebral de rata:

Al ensayar la hidrólisis de la AEA en presencia de agonistas de los receptores CB, se pudo observar que estos ejercieron una acción diferente sobre la actividad tanto en la fracción de membrana (**Figura 26**) de animales adultos y seniles como en la fracción sinaptosomal de animales adultos (**Figura 27**).

En la fracción de membrana de la CC de ratas adultas, tanto el agonista WIN como el JWH provocaron una inhibición en la hidrólisis de la AEA de un 63 % y de un 42 %, respectivamente, observándose diferencias significativas entre estos efectos (**Figura**

26 A). Ambos agonistas también inhibieron la actividad hidrolítica de la FAAH en la fracción de membrana de los animales seniles, siendo el porcentaje de inhibición menor para el caso del agonista WIN (42 %) y observándose la anulación de la misma por parte del JWH (**Figura 26 B**).

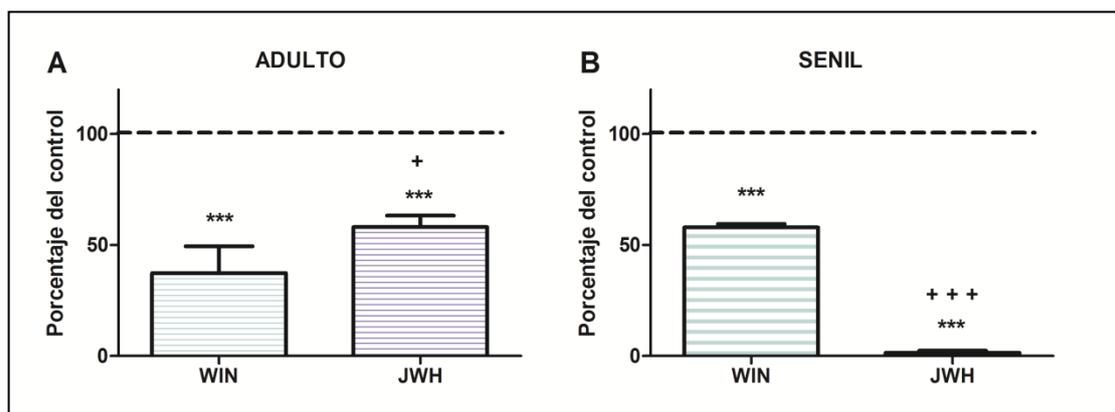


Figura 26: Hidrólisis de la AEA en la fracción de membrana de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas de los CBR. La actividad fue ensayada preincubando 50 μg de proteínas de la fracción de membrana durante 10 minutos con los agonistas (5 μM de WIN o de JWH). Posteriormente, se incubó durante 15 minutos con 30 μM de [^3H]AEA. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control y las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición WIN. *** $p < 0,001$; +++ $p < 0,001$ y + $p < 0,05$.

Al igual que lo observado en la fracción de membrana, en los sinaptosomas de la CC también se observó un efecto inhibitorio en la hidrólisis de la AEA ejercido por los agonistas de los receptores CB. El agonista WIN inhibió la hidrólisis en las ratas adultas y seniles en un porcentaje similar (44 %). Sin embargo, el JWH provocó efectos inhibitorios de magnitudes distintas entre ambos grupos etarios. El agonista del CB2R produjo una inhibición significativamente mayor en los animales adultos (89 %) comparada con la producida por el agonista mixto. Por su parte, el efecto inhibitorio del JWH (51 %) en las ratas seniles no mostró diferencias con respecto al producido por el agonista WIN (**Figura 27**).

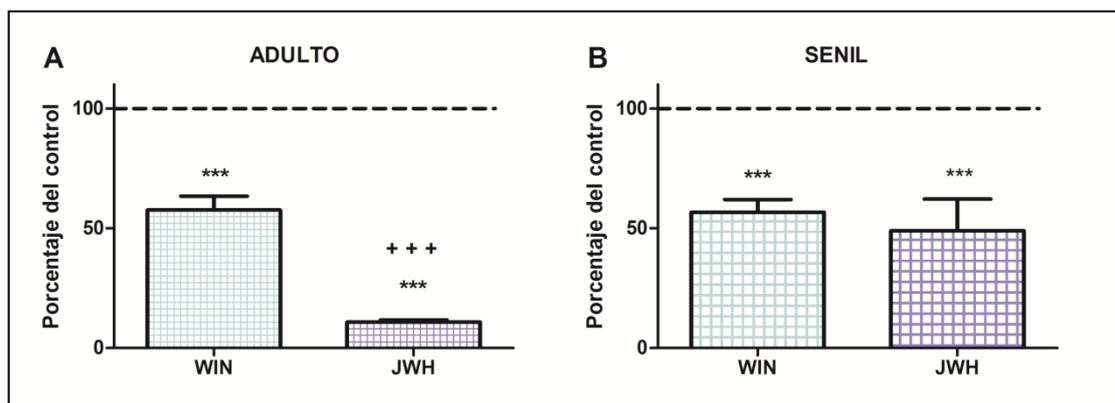


Figura 27: Hidrólisis de la AEA en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas de los CBR. La actividad fue ensayada preincubando 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 10 minutos con los agonistas (5 μM de WIN o de JWH). Posteriormente, se incubó durante 15 minutos con 30 μM de [^3H]AEA. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control y las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición WIN. *** $p < 0,001$ y +++ $p < 0,001$.

3.2. Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores CB1 y CB2 en la hidrólisis de la anandamida en la fracción sinaptosomal de la corteza cerebral de rata:

Tal como se puede observar en las **Figuras 28 y 29**, los ligandos de los receptores CB ejercieron una acción diferente en los sinaptosomas de la CC de animales adultos y seniles.

Los efectos ejercidos por los agonistas de los receptores CB en la fracción sinaptosomal fueron descritos en el *punto 3.1. del presente Capítulo*. Los antagonistas de los receptores CB también ejercieron efectos inhibitorios sobre la hidrólisis de la AEA. El antagonista del CB1R inhibió la actividad en un porcentaje similar (35 %) en los sinaptosomas adultos y seniles, mientras que el antagonista del CB2R logró una inhibición del 35 % en los animales adultos y del 45 % en los animales seniles. Sin embargo, es importante destacar que tanto en adultos como en seniles los efectos ejercidos por el antagonista del receptor CB1 y del receptor CB2 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (**Figura 28**). La condición en la

que se preincubó con ambos antagonistas en simultáneo tampoco evidenció diferencias significativas con respecto a cada antagonista por separado (**Figura 28**).

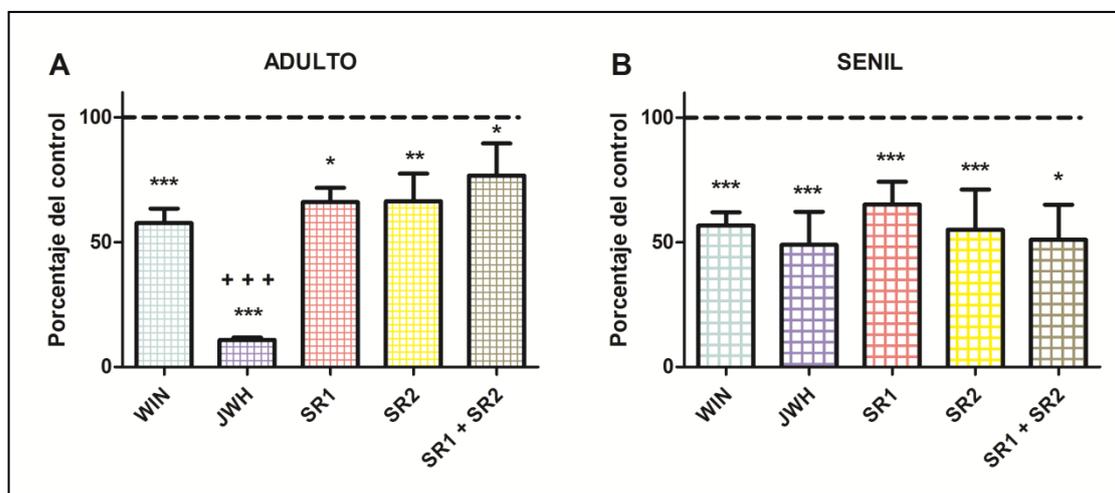


Figura 28: Hidrólisis de la AEA en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas o antagonistas de los CBR. La actividad fue ensayada preincubando 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 10 minutos con los agonistas (5 μM de WIN o de JWH) o los antagonistas (1 μM de SR1 y/o de SR2). Posteriormente, se incubó durante 15 minutos con 30 μM de [^3H]AEA. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista y sin antagonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control y las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición WIN. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ y +++ $p < 0,001$.

Cuando los sinaptosomas adultos fueron incubados con WIN, después de la preincubación de 10 minutos con el antagonista del CB1R, la hidrólisis de la AEA no se modificó con respecto a la condición con el antagonista SR1 (**Figura 29 A**), pero sí resultó mayor que la condición con el agonista del CB2R (**Figura 28 A**). Sin embargo, cuando se preincubó con el antagonista del CB2R, la incubación con WIN produjo una inhibición en la degradación de la AEA de un 86 %. Esta inhibición fue significativamente mayor a la que se observó con el antagonista SR2 solo (**Figura 29 A**).

En el caso de los sinaptosomas seniles, la hidrólisis de la AEA no se vio modificada con respecto a la condición con cada antagonista por separado cuando se preincubó con el antagonista del CB1R o del CB2R y luego se incubó con WIN (**Figura 29 B**).

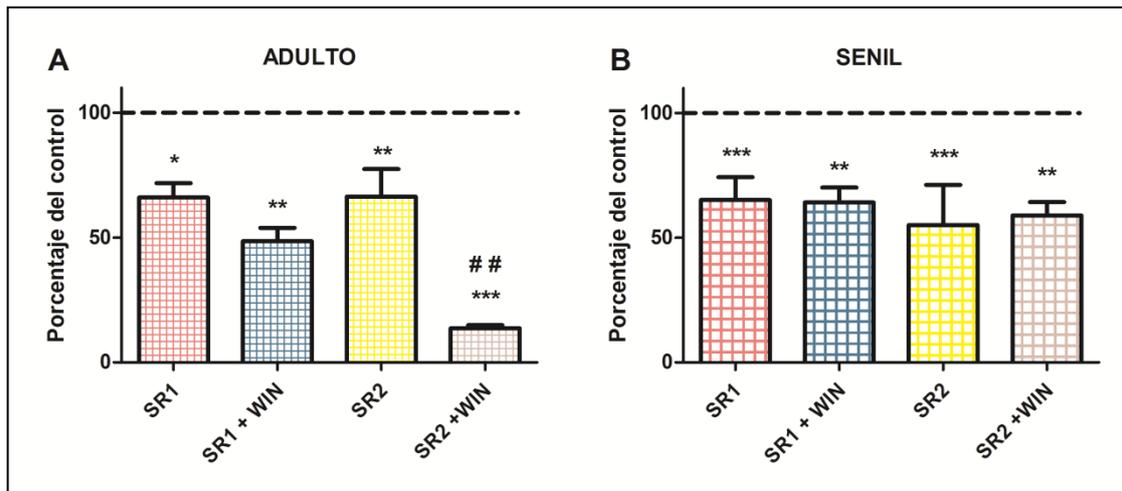


Figura 29: Hidrólisis de la AEA en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas A) Adultas y B) Seniles en presencia de agonistas y antagonistas de los CBR. La actividad fue ensayada preincubando 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal durante 10 minutos con los antagonistas (1 μM de SR1 o de SR2) e incubando en presencia o en ausencia del agonista WIN conjuntamente con 30 μM de [^3H]AEA durante 15 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición adulto o senil sin agonista y sin antagonista representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control y los numerales indican diferencias significativas con respecto a la condición SR2. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO II

La identificación de sitios de unión para los cannabinoides en tejidos de mamíferos desencadenó una rápida búsqueda de ligandos endógenos para estos sitios. El primer ligando endógeno que se descubrió fue la AEA (Devane y col., 1992).

La AEA, al igual que el 2-AG, es liberada a partir de fosfolípidos de membrana por la acción de diferentes actividades enzimáticas dependiendo del tipo de tejido, del tipo celular y del estímulo. La NAPE-PLD fue identificada como una de las enzimas candidatas para la síntesis de la AEA (Okamoto y col., 2004; Schmid y col., 1983; Natarajan y col., 1982). La inactivación de la señalización de la AEA es llevada a cabo por la recaptación de la misma y su posterior degradación (Ahn y col., 2008). La degradación de la AEA puede producirse por hidrólisis o por oxidación enzimática (Yates y Barker, 2009), de la primera está a cargo principalmente la enzima FAAH (Cravatt y col., 1996; Maurelli y col., 1995; Ueda y col., 1995).

Es sabido que los endocannabinoides actúan como moléculas de señalización lipídicas participando activamente en varios procesos homeostáticos y regulatorios (Pertwee, 2008; Mackie y Stella, 2006; Pacher y col., 2006). Varios estudios clínicos y experimentales han demostrado que una de las funciones más importantes del sistema endocannabinoide es la de proteger a los tejidos frente a injurias patológicas (Lara-Celador y col., 2012; Pacher y Hasko, 2008). Existen evidencias experimentales que demuestran que tanto las N-aciletanolaminas, especialmente la AEA, como también sus precursores se acumulan durante procesos de injuria neuronal (Hansen y col., 2001a; Hansen y col., 2001b), este hecho recalca el rol neuroprotector de la AEA. El principal factor relacionado con los síndromes neurodegenerativos es la edad. La neurodegeneración observada durante el proceso de envejecimiento podría ser consecuencia del envejecimiento cronológico, debido a que este predispone al cerebro a una mayor sensibilidad frente a enfermedades neurodegenerativas (Ledesma y col., 2012).

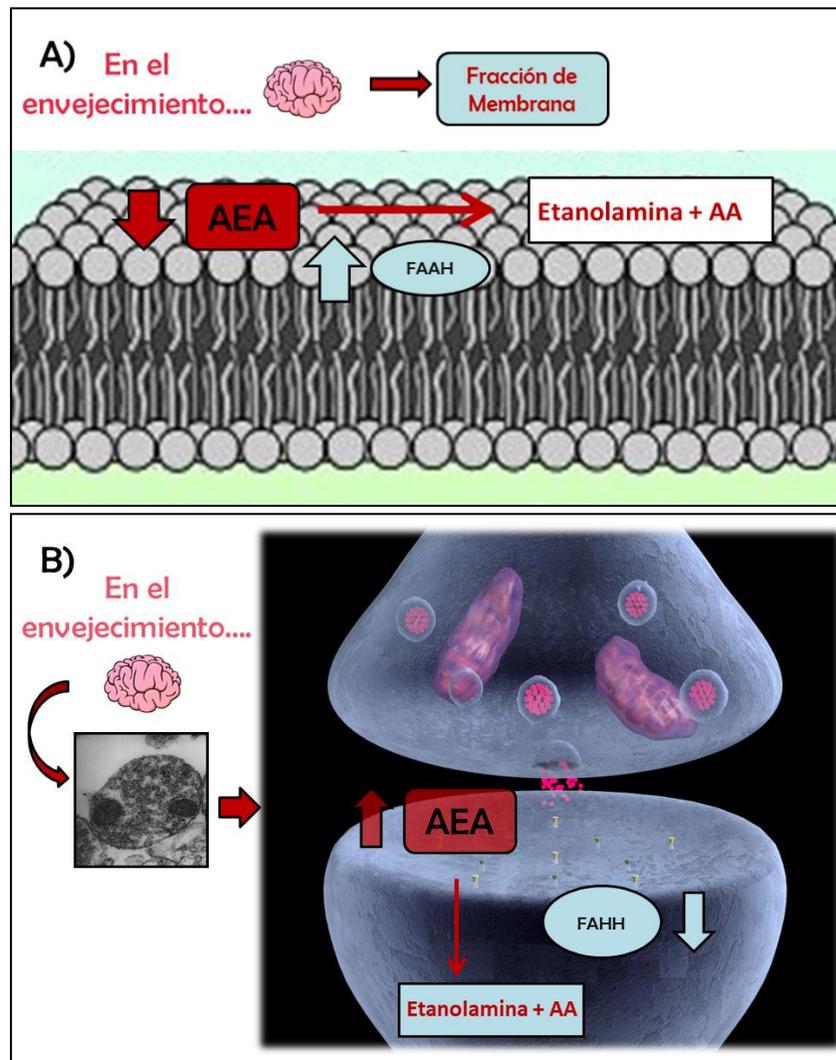
El segundo Capítulo de esta Tesis Doctoral comenzó con el estudio de la hidrólisis de la AEA en las fracciones de membrana y sinaptosomal de la CC de rata durante el envejecimiento. Los resultados indicaron que la hidrólisis de la AEA se vio incrementada drásticamente en la membrana de animales seniles mientras que en los terminales sinápticos disminuyó. Es importante destacar que la actividad de la FAAH en la fracción de membrana se debe a la contribución de distintos tipos celulares como las neuronas, glía y células endoteliales. En consecuencia, la disminución de la disponibilidad de la AEA en el envejecimiento comprometería sus efectos antiinflamatorios en el cerebro (Nagarkatti y col., 2009; Pandey y col., 2009; Eljaschewitsch y col., 2006). Este aumento en la hidrólisis de la AEA en la membrana senil podría ser consecuencia de los mayores niveles de la enzima FAAH observados en estos animales (**Figura 1 D**). Por el contrario, la reducción de la hidrólisis en sinaptosomas aparenta ser un intento por mantener la inhibición retrógrada que ejerce este endocannabinoide en estas estructuras neuronales. En virtud del rol neuroprotector que tiene la AEA frente a varias enfermedades neurodegenerativas, la mayor disponibilidad de la misma en sinaptosomas seniles podría proteger al sistema nervioso de los daños provocados por el proceso de envejecimiento. Los mayores niveles de la FAAH en el terminal sináptico no se correlacionan con una mayor hidrólisis de la AEA. En consecuencia, el aumento de los niveles de la FAAH sería compensado por la disminución de la actividad de la misma con el fin de incrementar la disponibilidad de este endocannabinoide.

Por otra parte, la diferencia observada en el comportamiento de la hidrólisis de la AEA frente al envejecimiento, entre la fracción de membrana (donde la mayor contribución es por parte del retículo endoplasmático) y la sinaptosomal podría indicar la presencia de distintas isoformas de la FAAH que poseen una sensibilidad diferente en el envejecimiento y/o regulación particular en las distintas membranas neuronales. En favor de esto, estudios recientes en los que se utilizaron vesículas lipídicas artificiales de composición similar al retículo endoplasmático o a la membrana plasmática, demostraron el rol clave que cumple la composición lipídica de la membrana para estabilizar una forma dimérica de la enzima FAAH. De esta manera, la unión preferencial de la FAAH a regiones de la membrana ricas en AEA y en colesterol

podría contribuir al mantenimiento de la localización de la enzima en cierto compartimento (Dainese y col., 2014). Por otra parte, Viani y colaboradores observaron que en los sinaptosomas seniles la fracción de fosfolípidos de membrana se veía disminuida con un incremento en la relación colesterol: fosfolípido (Viani y col., 1991). El incremento de esta relación podría ser responsable de los niveles más elevados de la proteína FAAH, observados en los terminales sinápticos de los animales seniles.

Si bien se sabe que la FAAH es por excelencia la principal enzima involucrada en la hidrólisis de la AEA, hay otras enzimas que podrían ser también responsables. Se ha observado que la NAAA (Ueda y col., 2001) y la AC (Park y Schuchman, 2006; Li y col., 1998) degradan a este endocannabinoide presentando un pH óptimo menor y, contrariamente a la FAAH, presentan muy poca afinidad por este endocannabinoide. Para determinar la participación de la FAAH en la degradación de la AEA, tanto en animales adultos como en seniles se realizaron ensayos con un inhibidor específico de esta enzima. De esta manera, se corroboró que el inhibidor es capaz de disminuir parcialmente la hidrólisis de la AEA en la membrana de ambos grupos etarios y en los sinaptosomas adultos. Esto indica que si bien la FAAH es la mayor responsable de la degradación de la AEA, no se puede descartar la participación de la NAAA o de la AC. Sin embargo, en los sinaptosomas de las ratas seniles el inhibidor anuló totalmente la hidrólisis de la AEA. Esto indicaría la localización preferentemente sináptica de la FAAH, siendo esta la única enzima responsable de la hidrólisis de este endocannabinoide en los sinaptosomas de animales envejecidos.

En el siguiente esquema se representan los resultados discutidos precedentemente:



Esquema representativo de la hidrólisis de la anandamida (AEA) en fracciones de: A) Membrana y B) Sinaptosomal de la corteza cerebral de ratas seniles. Ácido araquidónico (AA) y ácido graso amidohidrolasa (FAAH).

Entre los diversos componentes del sistema endocannabinoide, la FAAH representa un elemento clave en el control de la actividad biológica de la AEA dado que regula su tono endógeno (Cravatt y col., 2001). Así, como ya ha sido propuesto, la modulación farmacológica de la FAAH puede ser utilizada para el tratamiento de enfermedades que involucran procesos neurodegenerativos (Centonze y col., 2007). Con respecto a esto, los inhibidores de la FAAH son propuestos por muchos

investigadores para ser utilizados con el fin de incrementar el efecto neuroprotector natural dado por la AEA. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la utilización de agonistas y/o antagonistas de receptores cannabinoides que afectan la disponibilidad de la AEA es un tema mucho menos explorado.

En el *Capítulo I* de esta Tesis Doctoral se presentó la expresión de los CBR y la regulación del metabolismo del 2-AG por ligandos de los mismos. En el Capítulo II se muestra cómo la activación y/o el antagonismo de los CBR inciden en la actividad de la FAAH.

La ocupación de los receptores CB1 o CB2 por agonistas tanto en la fracción de membrana como en la de los sinaptosomas de animales adultos provocaría una mayor disponibilidad de la AEA por inhibición de su hidrólisis. En la fracción de membrana de animales adultos, la inhibición ejercida por el agonista mixto fue levemente menor que la ejercida por el agonista del CB2R. Esto indicaría que si bien el receptor CB1 participa en esta regulación, el receptor CB2 es el principal responsable de mantener los niveles de la AEA incrementados. En los sinaptosomas de animales adultos el efecto inhibitorio en la actividad hidrolítica ejercido por el agonista del CB2R fue mucho más pronunciado que el ejercido por el agonista mixto de CB1R/CB2R. Esto parecería indicar que la cascada de señalización mediada principalmente por el receptor CB2 regula negativamente la actividad de la FAAH. De todos modos, no se puede descartar una regulación cruzada entre heterómeros formados por los receptores CB1 y CB2, la cual ha sido demostrada en células neuronales en las que se observó la expresión conjunta de ambos receptores (Callen y col., 2012). Se cree que este tipo de interacción participaría en varias vías de señalización que involucran a los cannabinoides (Mulder y col., 2008; Harkany y col., 2007). Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos, se puede concluir que la regulación de la FAAH en la CC de animales adultos (que generaría una mayor disponibilidad de la AEA) puede ser ejercida por los agonistas de ambos receptores CB aunque la principal vía sería la del receptor CB2.

En la membrana senil, la menor disponibilidad de la AEA observada como consecuencia de su mayor hidrólisis podría ser revertida por la acción de un agonista

de los CB, principalmente del receptor CB2. De esta manera, y teniendo en cuenta su potencial rol antiinflamatorio en el cerebro (Pandey y col., 2009; Eljaschewitsch y col., 2006), una estimulación del receptor CB2 podría resultar en una acción protectora para mantener altos los niveles de la AEA. En los sinaptosomas de animales seniles, la inhibición ejercida por el agonista mixto fue similar a la ejercida por el agonista del CB2R, lo que indicaría que este receptor es el mayor responsable de mantener un nivel más elevado de AEA. Sin embargo, la inhibición observada a través del agonista del CB2R en los sinaptosomas seniles fue mucho menos pronunciada que la observada en la fracción de membrana. Esto puede deberse a: i) los niveles más bajos de los receptores CB observados exclusivamente en sinaptosomas seniles (**Figuras 13 y 15**) y/o ii) que no requieren de un mayor incremento de la disponibilidad de la AEA, debido a que en los terminales sinápticos de animales seniles la misma ya estaría elevada por su menor hidrólisis. No obstante, no se puede descartar la existencia de una desregulación del sistema de señalización mediado por los receptores CB.

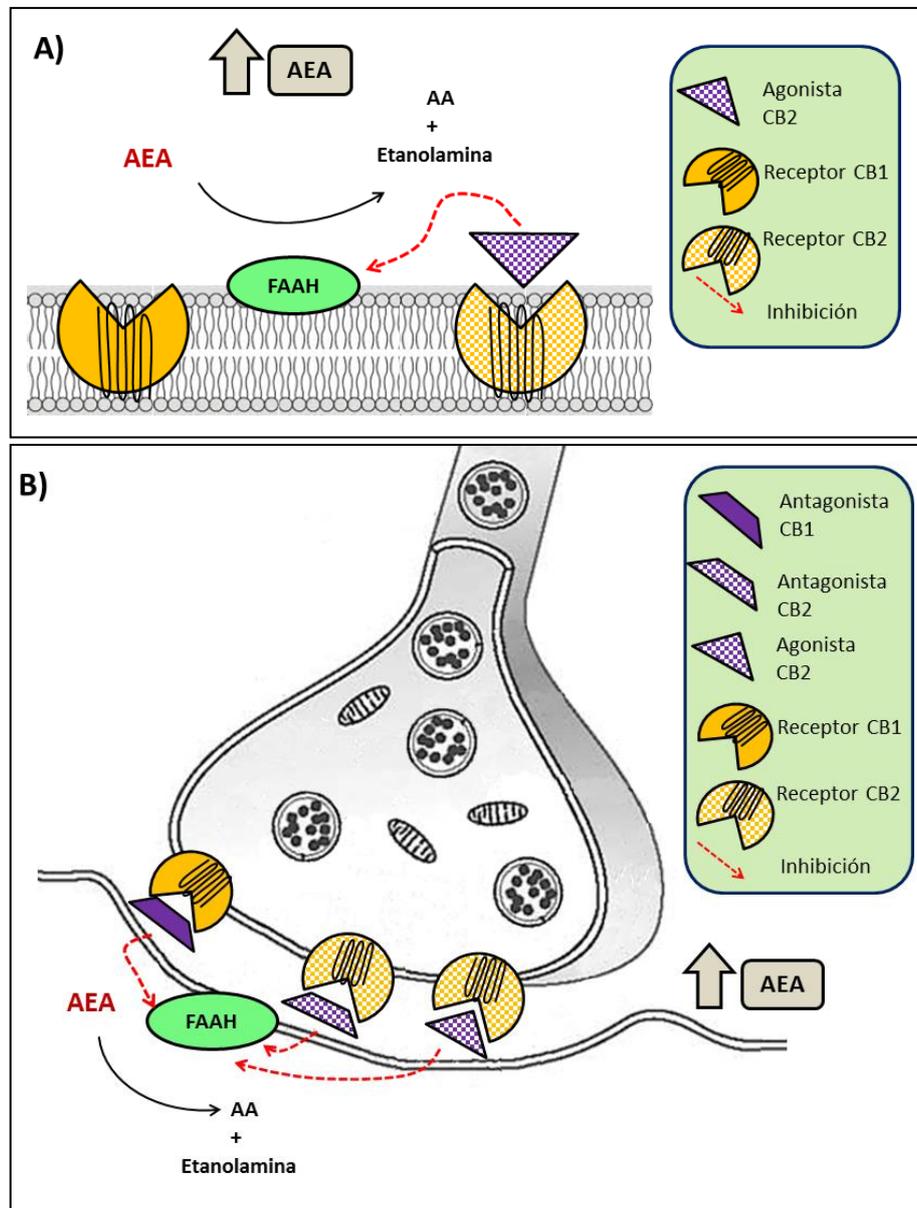
En la fracción sinaptosomal, la ocupación de los receptores CB1 y CB2 por los antagonistas específicos condujo a una mayor disponibilidad de la AEA por inhibición de su hidrólisis. Al igual que lo que ocurre con el 2-AG, esto parecería indicar que el bloqueo de los receptores CB en la fracción sinaptosomal a través de sus antagonistas puede ser percibido por el sistema como una señal que indicaría bajos niveles del endocannabinoide. Teniendo en cuenta los bajos niveles de la AEA comparados con los del 2-AG en el cerebro (Sugiura y col., 2002; Sugiura y col., 1995), y también los innumerables efectos benéficos del endocannabinoide en cuestión, no sorprende que haya un estricto control de su metabolismo, dando como respuesta un aumento del endocannabinoide frente a señales que indican la disminución del mismo. Si bien se sabe que en el SNC el receptor CB1 es mucho más abundante que el receptor CB2 (Zanettini y col., 2011; Govaerts y col., 2004), el efecto de los dos antagonistas en la hidrólisis de la AEA aparenta ser similar. Esta similitud en los efectos producidos por ambos antagonistas también fue observada para las enzimas MAGL y DAGL en el metabolismo del 2-AG.

Si bien el efecto del agonista mixto a través del CB2R en sinaptosomas adultos cuando el CB1R estaba bloqueado, provocó una inhibición en la hidrólisis de la AEA,

este cambio no fue tan marcado como el observado con el uso del agonista específico del CB2R. Asimismo, el agonista mixto direccionado hacia el CB1R por bloqueo del receptor CB2, provocó una inhibición en la hidrólisis de la AEA mucho más marcada que en las condiciones con el agonista mixto y con el antagonista del CB2R solos. Esto puede deberse a una regulación cruzada entre ambos receptores CB, tal como fue demostrado por Callen y colaboradores. Este estudio indica que los receptores CB1 y CB2 pueden formar heterómeros en las células neuronales y en otras células del cerebro, mediante los cuales se da un antagonismo cruzado bidireccional en el que el antagonista de uno de los receptores bloquea el efecto del agonista sobre el otro receptor (Callen y col., 2012). De esta manera, se puede concluir que si bien el receptor CB2 jugaría un papel importante en la regulación de la degradación de la AEA, el CB1R cobraría mayor importancia cuando el CB2R se encuentra bloqueado.

En los sinaptosomas de ratas seniles, el direccionamiento del agonista mixto hacia el receptor CB2 por bloqueo del CB1 no modificó la inhibición de la hidrólisis de la AEA ejercida por el antagonista solo. Este efecto se asemeja a lo que ocurre con el agonista específico del CB2R. Asimismo, el direccionamiento del agonista mixto hacia el receptor CB1 por bloqueo del CB2 tampoco modificó la inhibición de la hidrólisis de la AEA ejercida por el antagonista solo. Es decir, que el efecto observado con el agonista mixto estando bloqueado el receptor CB2 se debe meramente al bloqueo de este receptor y no a una acción del mismo sobre el receptor CB1. Este comportamiento confirmaría lo concluido anteriormente cuando se compararon los efectos del agonista mixto con el agonista del CB2R, en los que ambos eran similares, poniendo en evidencia, por tanto, la importancia del receptor CB2 en la regulación ejercida por el agonista sobre la disponibilidad de la AEA en terminales sinápticos de los animales seniles. Esto demuestra que el CB2 podría ser el receptor por el cual los agonistas regulan los niveles de la AEA con exclusividad.

El siguiente esquema sintetiza los principales hallazgos en la hidrólisis de la AEA por la acción de ligandos de sus propios receptores en el envejecimiento:



Esquema representativo de la regulación de la degradación de la anandamida (AEA) a través de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides en A) Membrana y B) Sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas seniles. Ácido araquidónico (AA) y ácido graso amidohidrolasa (FAAH).

Teniendo en cuenta los efectos neuroprotectores de la AEA frente a enfermedades neurodegenerativas, se puede postular que la mayor disponibilidad de este endocannabinoide en los terminales sinápticos de animales seniles protegería

frente a daños más severos que pueden ser infligidos por ciertas patologías. Sin embargo, la menor disponibilidad de este endocannabinoide en la fracción de membrana de diversas células presentes en la CC de animales seniles comprometería sus efectos antiinflamatorios en el cerebro, de modo que no se lograrían atenuar los daños de las patologías neurodegenerativas que cursan con inflamación.

Por último, se propone que los ligandos de los receptores CB podrían representar una estrategia terapéutica a explorar en el envejecimiento fisiológico con el fin de favorecer el aumento de los niveles del endocannabinoide AEA, y así asegurar una mayor protección y atenuar la neuroinflamación.

CAPÍTULO III

**"ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN
DE LOS ENDOCANNABINOIDES
EN UN MODELO *IN VITRO* DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER"**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En los dos primeros Capítulos de esta Tesis Doctoral se aborda el estudio de: el metabolismo del 2-AG y la hidrólisis de la AEA en la CC de ratas durante el envejecimiento fisiológico, la regulación de las actividades enzimáticas involucradas por agonistas y/o antagonistas de los CBR, y la presencia de determinados componentes del sistema endocannabinoide en sinaptosomas de la CC de ratas. Estos estudios revelaron que el metabolismo del 2-AG y de la AEA se encontraba desregulado en el proceso de envejecimiento fisiológico.

Teniendo en cuenta la estrecha relación que hay entre la senescencia y los procesos neurodegenerativos patológicos como lo es la EA en lo que respecta al deterioro sináptico observado, se estudió y se presenta en este Capítulo, la degradación de los endocannabinoides en un modelo *in vitro* de la EA. Este modelo consiste en la incubación de sinaptosomas de la CC de ratas adultas con distintas conformaciones del péptido β A.

Para llevar a cabo este estudio, en primera instancia se analizó la capacidad de formación de oligómeros y fibrillas de los péptidos β A1-40 y β A1-42 con el propósito de encontrar un protocolo apropiado para obtener estas conformaciones y determinar cuál de estos dos péptidos genera mejores estructuras oligoméricas y fibrilares. A su vez, se estudió la estabilidad de las conformaciones oligoméricas durante el tiempo que transcurre en el ensayo enzimático.

Por último, se estudió la hidrólisis del 2-AG y de la AEA en los sinaptosomas expuestos a oligómeros y fibrillas del péptido β A con el fin de determinar si este en sus distintas conformaciones tiene la potencialidad de modificar la degradación de los endocannabinoides y, a su vez, si existen efectos diferenciales entre los oligómeros y las fibrillas. Para ello, se utilizaron las distintas conformaciones del péptido a dos concentraciones distintas: 0,1 μ M y 1 μ M. La primera fue seleccionada en base a la concentración presente en el fluido cerebroespinal de pacientes con EA (Grimmer y

col., 2009). La segunda surgió de las curvas de hidrólisis del 2-AG (Mulder y col., 2011) y de la AEA (Pascual y col., 2014) en función de la concentración del β A realizadas utilizando la fracción de membrana proveniente de la CC de humanos.

RESULTADOS

1. Análisis de las distintas conformaciones de los péptidos beta amiloide

El “envejecimiento” de los péptidos β A1-40 y β A1-42 para formar oligómeros y fibrillas, así como el estado conformacional inicial de cada péptido, se estudiaron mediante MET.

1.1. Análisis de las conformaciones del péptido beta amiloide 1-40:

El “envejecimiento” del péptido β A1-40 fue seguido mediante MET y las fotografías obtenidas se presentan en la **Figura 30**, en la que se puede observar que antes de incubar el péptido para su “envejecimiento”, una solución 1 μ M del mismo mostraba una disposición de manera separada entre los distintos monómeros sin formar acúmulos entre ellos (**Figura 30 A**). Cuando el péptido fue incubado a 37 °C durante 2 horas se pudo observar, en la solución 1 μ M, que este comenzaba a agregarse formando acúmulos no fibrilares con características de oligómeros (**Figura 30 B**). Por último, luego de una incubación de 24 horas a 37 °C, la **Figura 30 C** muestra la disposición de los péptidos en forma de fibrillas. Cuando se observó esta preparación a una concentración de 1 μ M en el microscopio electrónico, las **Figuras 30 C-1 y 30 C-2** muestran la presencia de fibrillas pequeñas dispersas a lo largo de la grilla. Para corroborar que se trataba de fibrillas de similares características a lo descrito en la bibliografía, se observó bajo el microscopio electrónico la preparación de 24 horas de incubación a 37 °C a una concentración de 80 μ M. Así se pudo observar una abundante cantidad de fibrillas que se entrecruzaban y recorrían todo el campo del microscopio, confirmando la presencia de esta conformación del péptido (**Figuras 30 C-3 y 30 C-4**).

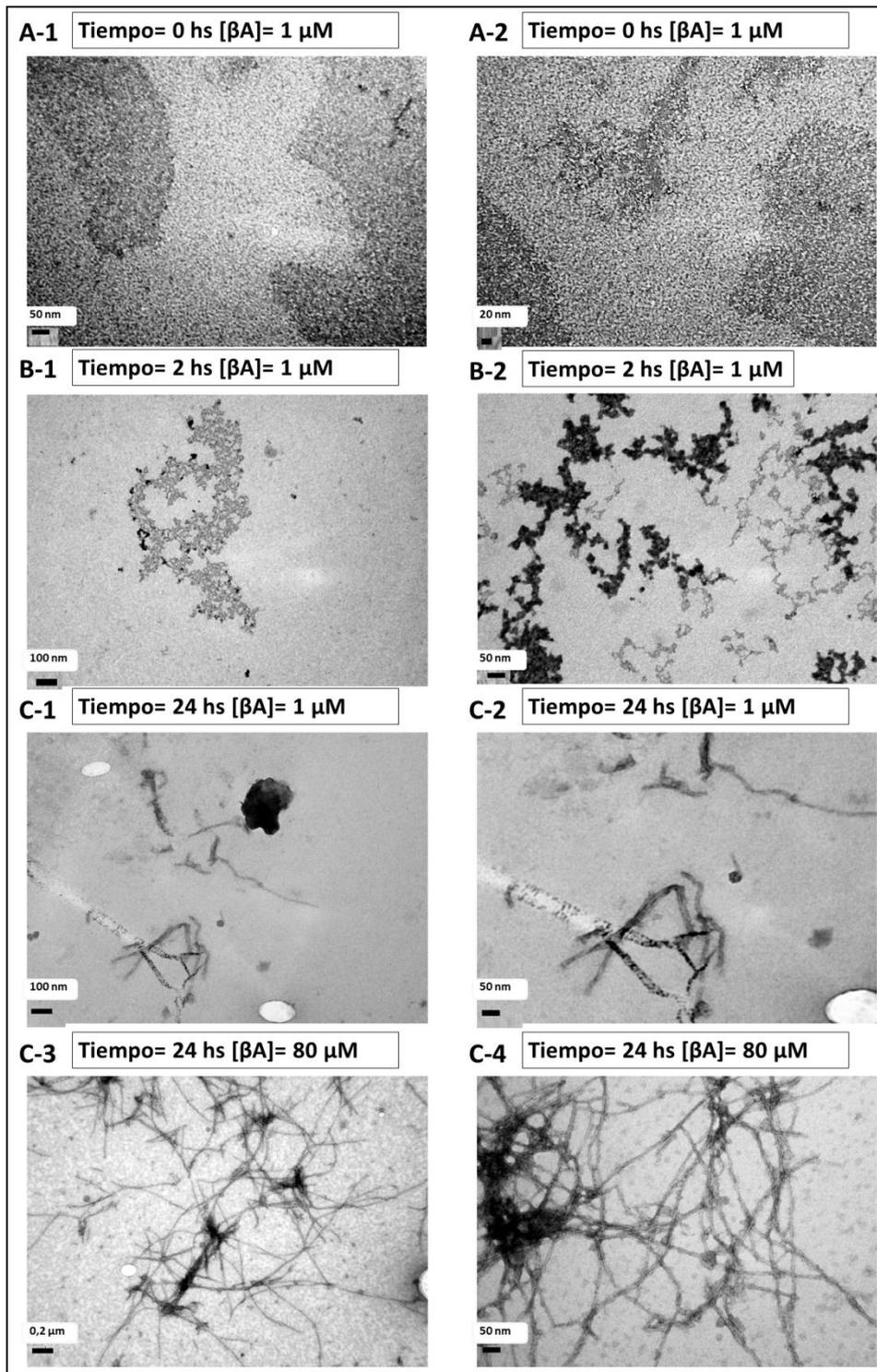


Figura 30: MET de las preparaciones del péptido β A1-40 incubadas por un período de: A) 0 hs, B) 2 hs y C) 24 hs. Pevio al “envejecimiento” del péptido β A (A) y luego del mismo, a distintos tiempos (B y C), se tomaron alícuotas de las preparaciones de β A 80 μ M y se realizaron diluciones de concentración final 1 μ M. Las alícuotas de estas preparaciones se colocaron en grillas sin carbono (A, B, C-1 y C-2) o con carbono (C-3 y C-4), se fijaron con glutaraldehído 0,5 % y se colorearon con acetato de uranilo 2 % para luego ser observadas en el microscopio electrónico, tal como se describe en *Materiales y Métodos*. La fotografía C-3 corresponde a un aumento de 40.000x, las B-1 y C-1 a 80.000x, las A-1, B-2, C-2 y C-4 a 140.000x y la A-2 a 200.000x.

Debido a la rápida agregación de los péptidos β A y a la inestabilidad atribuida a los oligómeros, se estudió la conformación de la preparación del péptido envejecido durante 120 minutos por incubación a tiempos mayores que correspondían al tiempo de preincubación con los sinaptosomas (10 minutos más, 130 minutos totales) y al tiempo de ensayo enzimático (20 minutos más, 150 minutos totales). En la **Figura 31**, se puede apreciar que la estructura con características de oligómeros obtenida por el “envejecimiento” del péptido β A1-40 durante 120 minutos, no sufrió grandes modificaciones en su conformación por incubación del mismo durante 10 (**Figura 31 B**) y 20 minutos (**Figura 31 C**) más.

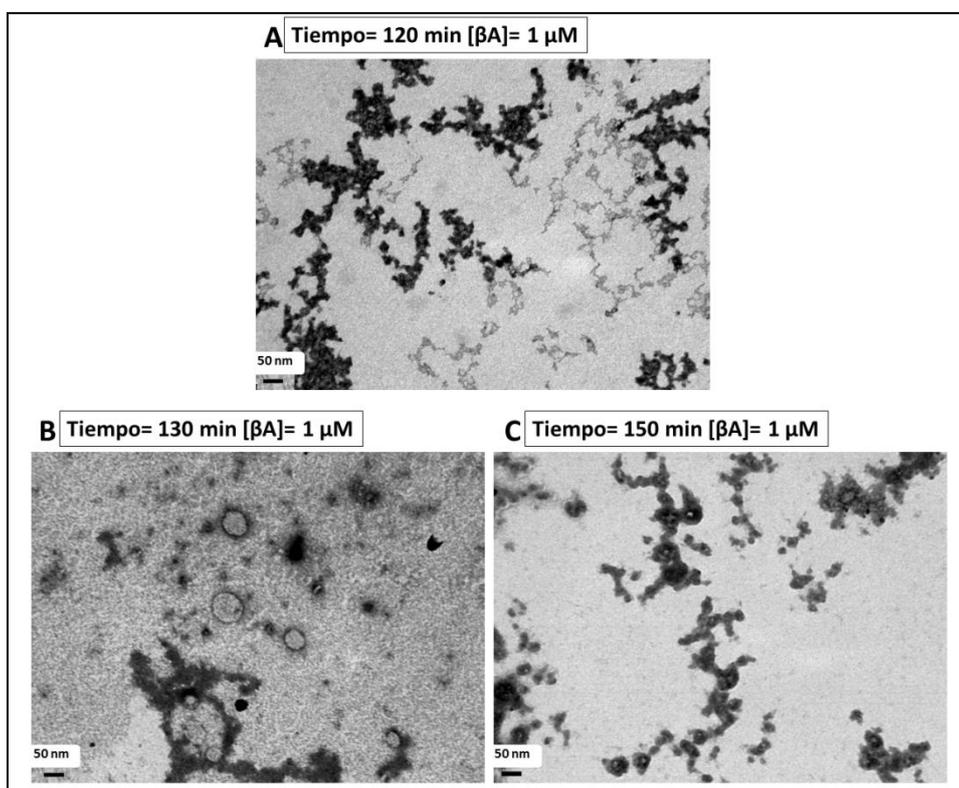


Figura 31: MET de las preparaciones del péptido β A1-40 incubadas por un período de: **A) 120 min**, **B) 130 min** y **C) 150 min**. Durante el “envejecimiento” del péptido β A se tomaron alícuotas de las preparaciones de β A 80 μ M a distintos tiempos y se realizaron diluciones de concentración final 1 μ M. Las alícuotas de esta última preparación se colocaron en grillas sin carbono, se fijaron con glutaraldehído 0,5 % y se colorearon con acetato de uranilo 2 % para luego ser observadas en el microscopio electrónico, tal como se describe en *Materiales y Métodos*. Las fotografías corresponden a un aumento de 140.000x.

1.2. Análisis de las conformaciones del péptido beta amiloide 1-42:

El “envejecimiento” del péptido β A1-42 también fue seguido mediante MET, tal como se observa en la **Figura 32**.

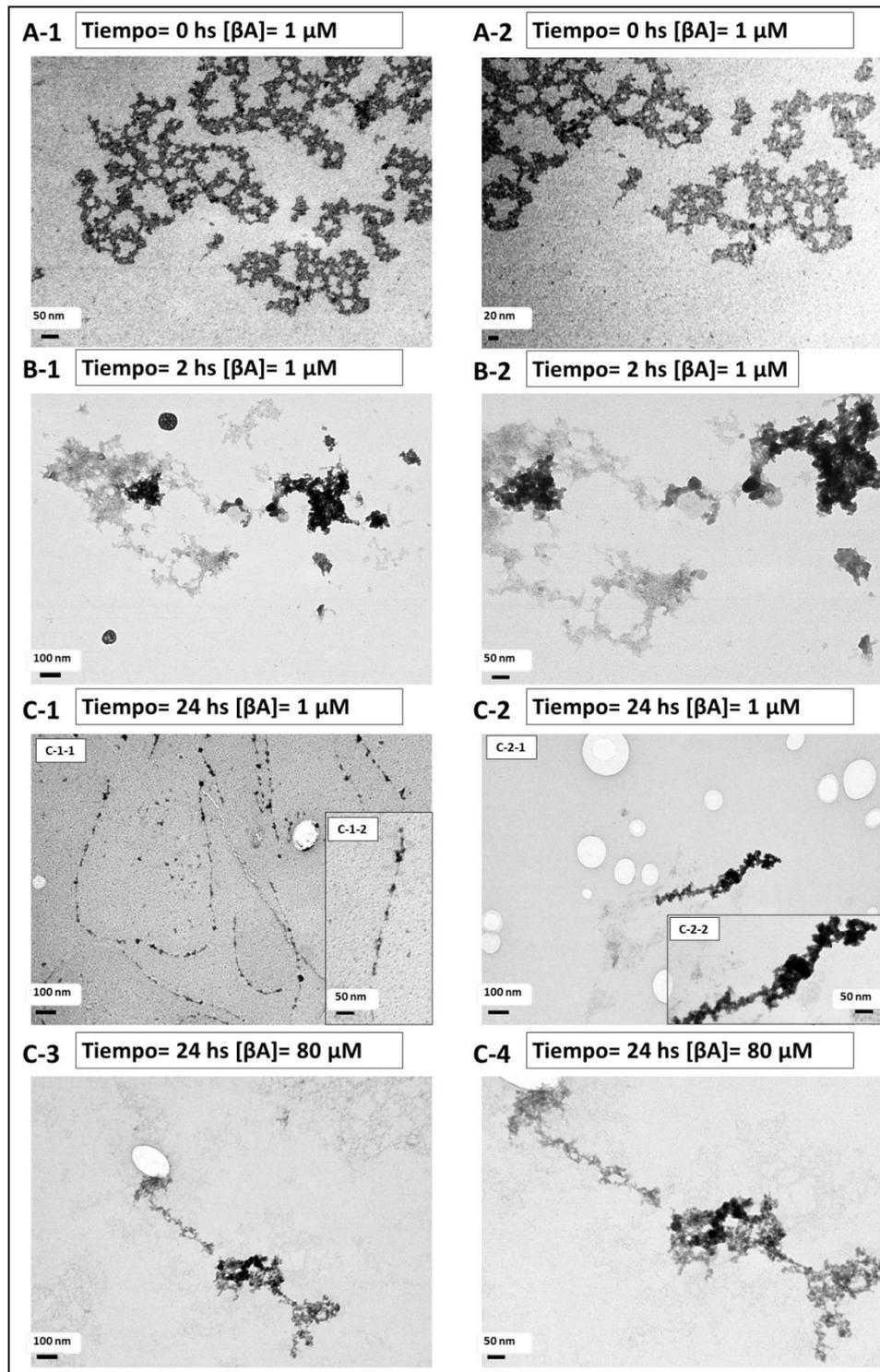


Figura 32: MET de las preparaciones del péptido β A1-42 incubadas por un período de: **A) 0 hs**, **B) 2 hs** y **C) 24 hs**. Pevio al “envejecimiento” del péptido β A (A) y luego del mismo a distintos tiempos (B y C), se tomaron alícuotas de las preparaciones de β A 80 μ M y se realizaron diluciones de concentración final 1 μ M. Las alícuotas de estas preparaciones se colocaron en grillas sin carbono (A, B y C-2) o con carbono (C-1, C-3 y C-4), se fijaron con glutaraldehído 0,5 % y se colorearon con acetato de uranilo 2 % para luego ser observadas en el microscopio electrónico, tal como se describe en *Materiales y Métodos*. Las fotografías B-1, C-1-1, C-2-1 y C3 corresponden a un aumento de 80.000x, las A-1, B-2, C-1-2, C-2-2 y C-4 a 140.000x y la A-2 a 200.000x.

Al observar bajo el microscopio electrónico una solución 1 μM del péptido $\beta\text{A1-42}$ antes de incubarlo para su “envejecimiento”, la fotografía mostró una conformación del péptido en forma de acúmulos distinta a los monómeros aislados observados con el péptido $\beta\text{A1-40}$. Esta preparación era similar a la conformación de oligómeros (**Figura 32 A**). Cuando este péptido se incubó a 37 °C durante 2 horas y se obtuvieron preparaciones 1 μM , se pudo observar que el mismo se disponía en forma de oligómeros de estructuras más típicas (**Figura 32 B**) que las que mostraba inicialmente (**Figura 32 A**). Por último, al incubar el péptido a 37 °C durante 24 horas se pudo observar que en la solución 1 μM coexistían campos con fibrillas muy finas y cortas (**Figura 32 C-1**) y campos en los se podían observar oligómeros dispuestos de manera más alargada hacia uno de sus ejes, lo que probablemente sería un punto de inicio para la formación de fibrillas (**Figura 32 C-2**). Esta última estructura se asemejaría a lo que se denomina protofibrilla. En la solución 80 μM de estas mismas preparaciones se pudieron observar (**Figura 32 C-3 y C-4**) estructuras como las mencionadas anteriormente, las cuales no coinciden con un patrón de conformación típico de fibrillas como se observaba con el péptido $\beta\text{A1-40}$ (**Figura 30 C**).

Al igual que para las conformaciones de oligómeros obtenidas con el $\beta\text{A1-40}$, para los oligómeros del péptido $\beta\text{A1-42}$ también se analizó la estabilidad. Para ello, se observaron al microscopio electrónico las diluciones 1 μM provenientes de preparaciones de oligómeros (incubación de 120 minutos) incubadas a un tiempo mayor. Este tiempo fue de 150 minutos totales (30 minutos más), y correspondía al tiempo que transcurre durante la preincubación con los sinaptosomas (10 minutos) y el ensayo enzimático (20 minutos más). Como se puede observar en la **Figura 33**, las preparaciones obtenidas luego de 120 minutos de incubación no sufrían grandes modificaciones en su conformación al ser incubadas durante 30 minutos más (**Figura 33 B**).

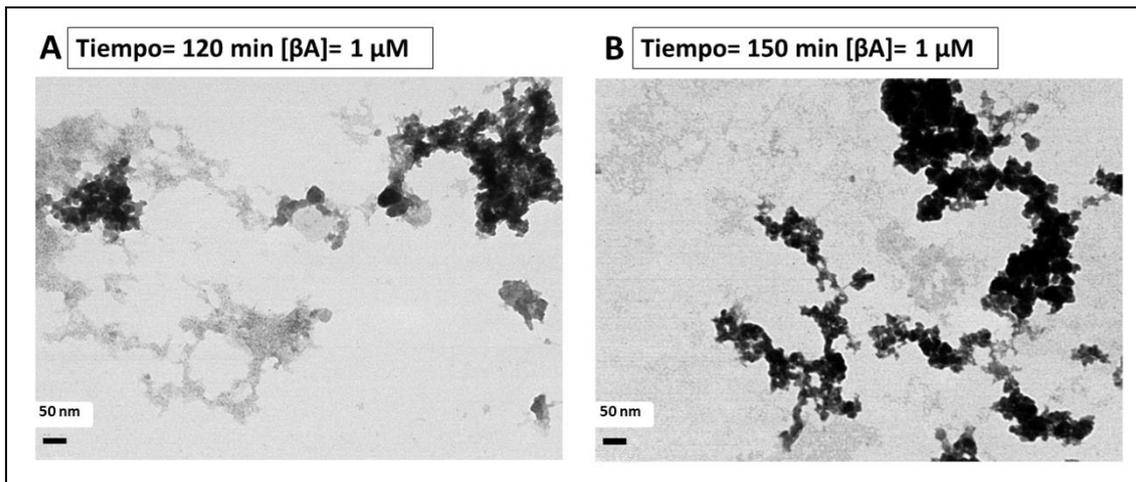


Figura 33: MET de las preparaciones del péptido β A1-42 incubadas por un período de A) 120 min y B) 150 min. Durante el “envejecimiento” del péptido β A se tomaron alícuotas de las preparaciones de β A 80 μ M a distintos tiempos y se realizaron diluciones de concentración final 1 μ M. Las alícuotas de esta última preparación se colocaron en grillas sin carbono, se fijaron con glutaraldehído 0,5 % y se colorearon con acetato de uranilo 2 % para luego ser observadas en el microscopio electrónico, tal como se describe en *Materiales y Métodos*. Las fotografías corresponden a un aumento de 140.000x.

2. Hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol en sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas adultas incubadas con el péptido beta amiloide 1-40:

Con el fin de evaluar la degradación del 2-AG en un modelo *in vitro* de la EA, el ensayo enzimático se realizó luego de la preincubación de la fracción sinaptosomal con el péptido β A1-40 en las conformaciones obtenidas mediante la incubación del mismo a 37 °C con agitación continua por un período de:

- 0 horas: su conformación se muestra en la **Figura 30 A** y se referirá a la misma como Monómeros.
- 2 horas: su conformación se muestra en la **Figura 30 B** y se referirá a la misma como Oligómeros.
- 24 horas: su conformación se muestra en la **Figura 30 C** y se referirá a la misma como Fibrillas.

Como el péptido β A fue solubilizado en DMSO, se realizaron controles con el vehículo. Es importante igualmente destacar que estos controles no mostraron diferencias con respecto al control sin DMSO.

Como se puede observar en la **Figura 34**, los monómeros del péptido β A1-40 no modificaron la hidrólisis del 2-AG a ninguna de las concentraciones ensayadas, sin embargo, los oligómeros provocaron un efecto dosis-dependiente. Si bien la preincubación con oligómeros de β A1-40 a 0,1 μ M, no modificó significativamente la hidrólisis del 2-AG, se observó una tendencia de la misma a disminuir. Este efecto se tornó significativo cuando se trataron los sinaptosomas con los oligómeros a una concentración de 1 μ M, observándose una inhibición de la actividad enzimática sobre el 2-AG de un 90 %. Por otra parte, las fibrillas ejercieron un efecto contrario al observado para los oligómeros. Tanto a una concentración de 0,1 μ M como a una de 1 μ M, las fibrillas incrementaron la hidrólisis del endocannabinoide en un porcentaje entre un 200 % a un 250 %, no mostrando diferencias significativas en los efectos entre estas dos concentraciones.

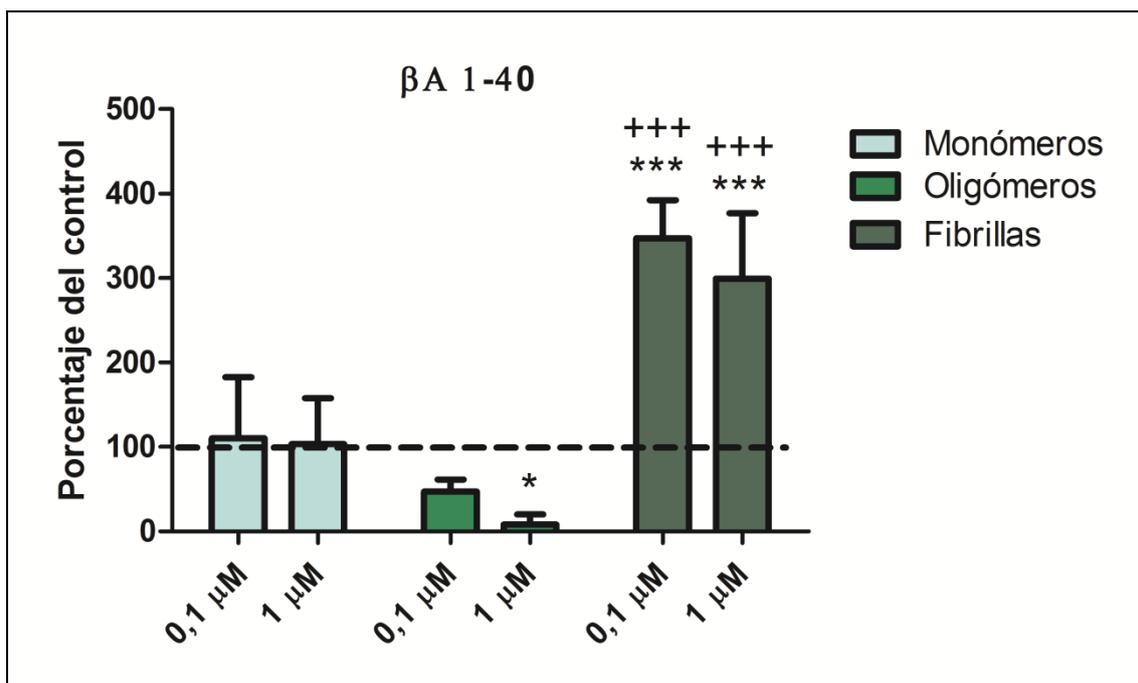


Figura 34: Hidrólisis del 2-AG en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas preincubadas con distintas conformaciones del péptido $\beta A1-40$. La actividad fue ensayada preincubando durante 10 minutos con $\beta A1-40$ 0,1 μM o 1 μM en sus conformaciones de monómeros, oligómeros o fibrillas en presencia de 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal, e incubando con 10 μM de [3H]2-AG durante 20 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición sin péptido βA representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control del vehículo del péptido βA y las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición de oligómeros. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ y +++ $p < 0,001$.

3. Hidrólisis de la anandamida en sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas adultas incubadas con el péptido beta amiloide 1-40:

Para el estudio de la degradación de la AEA en un modelo *in vitro* de la EA, el ensayo enzimático se realizó después de la preincubación de la fracción sinaptosomal con el péptido $\beta A1-40$ en las conformaciones obtenidas, tal como fue descrito para el análisis de la hidrólisis del 2-AG. Para ello, se realizaron las mismas condiciones y los mismos controles.

En la **Figura 35** se representan los resultados obtenidos. Al igual que lo observado en la hidrólisis del endocannabinoide 2-AG, los monómeros del péptido $\beta A1-40$ no modificaron la degradación de la AEA a ninguna de las concentraciones

evaluadas. Los oligómeros de este péptido también ejercieron un efecto dosis-dependiente. Mientras que las preparaciones de esta conformación a una concentración de 0,1 μM no produjeron cambio alguno, las mismas en una concentración de 1 μM redujeron la hidrólisis en un 62 %. Cuando se preincubaron los sinaptosomas con las fibrillas del péptido, también se observó un efecto dosis-dependiente. Esta conformación logró una disminución de la actividad enzimática sobre la AEA de un 47 % a una concentración de 0,1 μM y de un 92 % a una concentración de 1 μM . A su vez, la disminución de la hidrólisis producida por las fibrillas fue significativamente mayor al compararlo con los oligómeros en sus respectivas concentraciones.

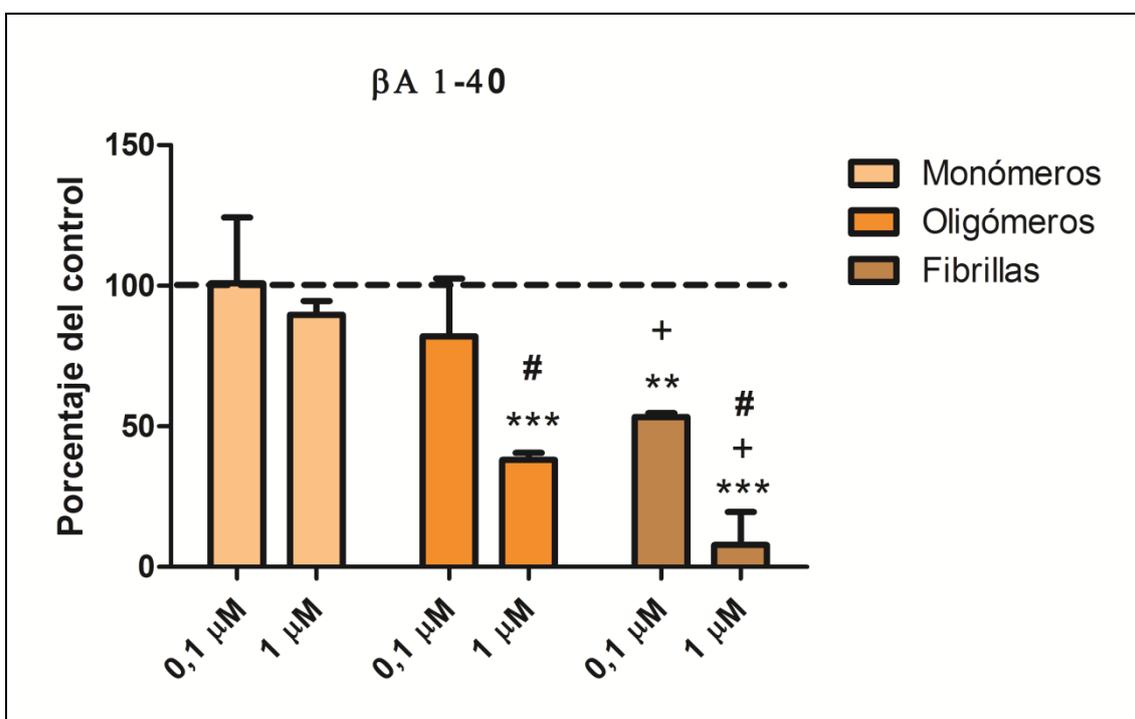


Figura 35: Hidrólisis de la AEA en la fracción sinaptosomal de la CC de ratas adultas preincubadas con distintas conformaciones del péptido $\beta\text{A1-40}$. La actividad fue ensayada preincubando durante 10 minutos con $\beta\text{A1-40}$ 0,1 μM o 1 μM en sus conformaciones de monómeros, oligómeros o fibrillas en presencia de 50 μg de proteínas de la fracción sinaptosomal, e incubando con 30 μM de [^3H]AEA durante 15 minutos. La reacción se frenó con solventes orgánicos y los productos fueron extraídos y separados como se describió en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje del control (la condición sin péptido βA representa el 100 %). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la condición control del vehículo del péptido βA , las cruces indican diferencias significativas con respecto a la condición de oligómeros y los numerales indican diferencias significativas con respecto a cada condición que contiene 0,1 μM del péptido βA en su respectiva conformación. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, + $p < 0,05$ y # $p < 0,05$.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO III

La EA es la demencia senil más prevalente en la actualidad y su diagnóstico inequívoco se realiza mediante análisis *postmortem* del cerebro. La presencia de depósitos extracelulares de placas amiloides o placas seniles formados por fibrillas del péptido β A es una típica característica de los cerebros de pacientes con EA. Esto ha sugerido, en una primera instancia, que estos depósitos son los causantes del deterioro neuronal y, por lo tanto, de la pérdida de las capacidades cognitivas observadas en los pacientes con EA. Esta hipótesis es conocida como hipótesis de la cascada amiloide (Minati y col., 2009). Su contraparte es la hipótesis que propone a los ovillos neurofibrilares formados por depósito de la proteína tau (proteína axonal que regula el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos) hiperfosforilada, como causantes de la neurotoxicidad. Esta hipótesis es actualmente menos reconocida debido a que la presencia de esta proteína no es una característica específica de los cerebros con EA y, además, se ha observado que la acumulación del péptido β A (correlacionado con la demencia en esta enfermedad) precede a la aparición de agregados de tau (Minati y col., 2009; Mudher y Lovestone, 2002).

Estudios más recientes postulan que serían los oligómeros del péptido β A y no las fibrillas los causantes del daño neuronal. Los oligómeros se originan como el primer paso de la agregación del péptido β A (antes de formar fibrillas) y su presencia coincide con el deterioro de la plasticidad sináptica observado en las primeras etapas de la EA (Shankar y col., 2008; Townsend y col., 2006; Lacor y col., 2004).

La formación de oligómeros y fibrillas *in vitro* mediante el “envejecimiento” del péptido β A responde a la capacidad del péptido para agregarse, siendo los puntos más críticos de este proceso la temperatura, el pH, la naturaleza del péptido, la agitación y el tiempo de incubación (Stine, Jr. y col., 2003; Chu y Lin, 2001; Wood y col., 1996). Los protocolos de formación de oligómeros y fibrillas utilizados en esta Tesis Doctoral se basaron en publicaciones previas (Martin-Moreno y col., 2011; Uranga y col., 2010) y poniendo estricta atención en las condiciones de temperatura, pH y agitación.

Los péptidos β A que se encuentran en mayor proporción en el cerebro con EA son el β A1-40 y el β A1-42, siendo el primero más prevalente que el segundo (Lu y col., 2013; Gravina y col., 1995; Jarrett y col., 1993). Teniendo en cuenta estos datos bibliográficos, se comenzó a estudiar el efecto que produce el “envejecimiento” de los péptidos más prevalentes (β A1-40 y β A1-42) sobre la hidrólisis de los endocannabinoides, tema abordado en el tercer Capítulo de esta Tesis Doctoral.

Si bien se cuenta con evidencia que indica que el péptido β A1-42 es el fragmento más neurotóxico debido a su rápida cinética de agregación (Dahlgren y col., 2002; Jarrett y col., 1993), se sabe que el fragmento compuesto por los aminoácidos 17 a 21 del péptido β A constituye el centro de nucleación para la formación de placas amiloides. Por tanto, cualquier fragmento que contenga este segmento podría ser capaz de formar depósitos del péptido (Hilbich y col., 1991). Las fotografías tomadas bajo el microscopio electrónico a distintos tiempos de “envejecimiento” de los péptidos demuestran que, comparado con el β A1-42, el β A1-40 es capaz de formar más claramente estructuras similares a los oligómeros y a las fibrillas. El β A1-42, en su conformación inicial (antes del “envejecimiento”), muestra estructuras similares a los oligómeros probablemente debido a su rápida capacidad de agregación. Después de la incubación por 24 horas no es capaz de formar fibrillas bien constituidas como sí lo es el β A1-40. Por el contrario, aparecen estructuras similares a las protofibrillas que son estadios previos a la formación de fibrillas (Walsh y col., 1997). En concordancia con lo observado en los estudios de MET, trabajos anteriores han demostrado que los preparados del péptido β A1-40 libre de agregados muestran estructuras en forma de monómeros, dímeros y tetrámeros, mientras que el β A1-42 forma preferentemente pentámeros y hexámeros que se ensamblan posteriormente formando estructuras similares a las protofibrillas (Bitan y col., 2003).

Los oligómeros formados especialmente por el péptido β A1-40 son estructuras inestables (Klein, 2002). Para determinar si estas estructuras se mantienen a lo largo del tratamiento con los sinaptosomas y del ensayo enzimático, se analizó su estabilidad a distintos tiempos. Tanto los oligómeros obtenidos con el péptido β A1-40 como los obtenidos con el β A1-42, mantuvieron esta conformación y no mostraron estructuras que coincidieran con fibrillas o protofibrillas. Esto valida el ensayo

enzimático en los sinaptosomas preincubados con los oligómeros. Teniendo en cuenta estos resultados y considerando la mayor prevalencia del β A1-40 por sobre el β A1-42, se realizaron los ensayos enzimáticos de hidrólisis de los endocannabinoides en sinaptosomas preincubados con las distintas conformaciones del péptido β A1-40.

Los resultados de la hidrólisis del 2-AG y de la AEA en los sinaptosomas preincubados con β A1-40 demuestran que la conformación de monómeros del péptido no tendría efecto alguno sobre la degradación de estos endocannabinoides. En concordancia con estos hallazgos, se ha demostrado que mientras las fracciones que contienen oligómeros del péptido β A inhiben la potenciación a largo plazo en el cerebro de ratón, las fracciones conteniendo solo monómeros no son capaces de hacerlo (Townsend y col., 2006). Se ha demostrado también que los monómeros, a diferencia de los oligómeros, son inactivos sobre diferentes efectos ensayados (Shankar y col., 2007).

Los estudios sobre la hidrólisis del 2-AG en modelos de la EA revelaron que los oligómeros y las fibrillas tienen efectos totalmente opuestos. Sin embargo, cuando se ensaya la hidrólisis de la AEA, ambas conformaciones producen el mismo efecto, aunque en distinta magnitud.

Los oligómeros provocarían un aumento en la disponibilidad tanto del endocannabinoide 2-AG como de la AEA por inhibición de la degradación de los mismos. Si bien este efecto no es significativo a los niveles de β A similares a los encontrados en la EA (0,1 μ M), sí lo es a concentraciones mayores. De este modo, los oligómeros podrían contribuir a la disminución de las actividades enzimáticas de hidrólisis de los endocannabinoides por oxidación o nitrosilación de las enzimas intervinientes, como ha sido reportado para otras enzimas en ciertas enfermedades relacionadas con la neurodegeneración (Butterfield y col., 2010; Butterfield, 2002; Aoyama y col., 2000).

Si bien la mayor parte de los estudios realizados hasta la actualidad respalda el rol neurotóxico de los oligómeros, hay otros que apoyan una nueva hipótesis a la que denominan “hipótesis alternativa”, de acuerdo con la cual el péptido β A, lejos de ser dañino para las neuronas, ejercería un rol protector sobre ellas (Gilbert, 2014; Lee y col., 2007). Esta hipótesis se basa en numerosas evidencias (Lee y col., 2007), entre

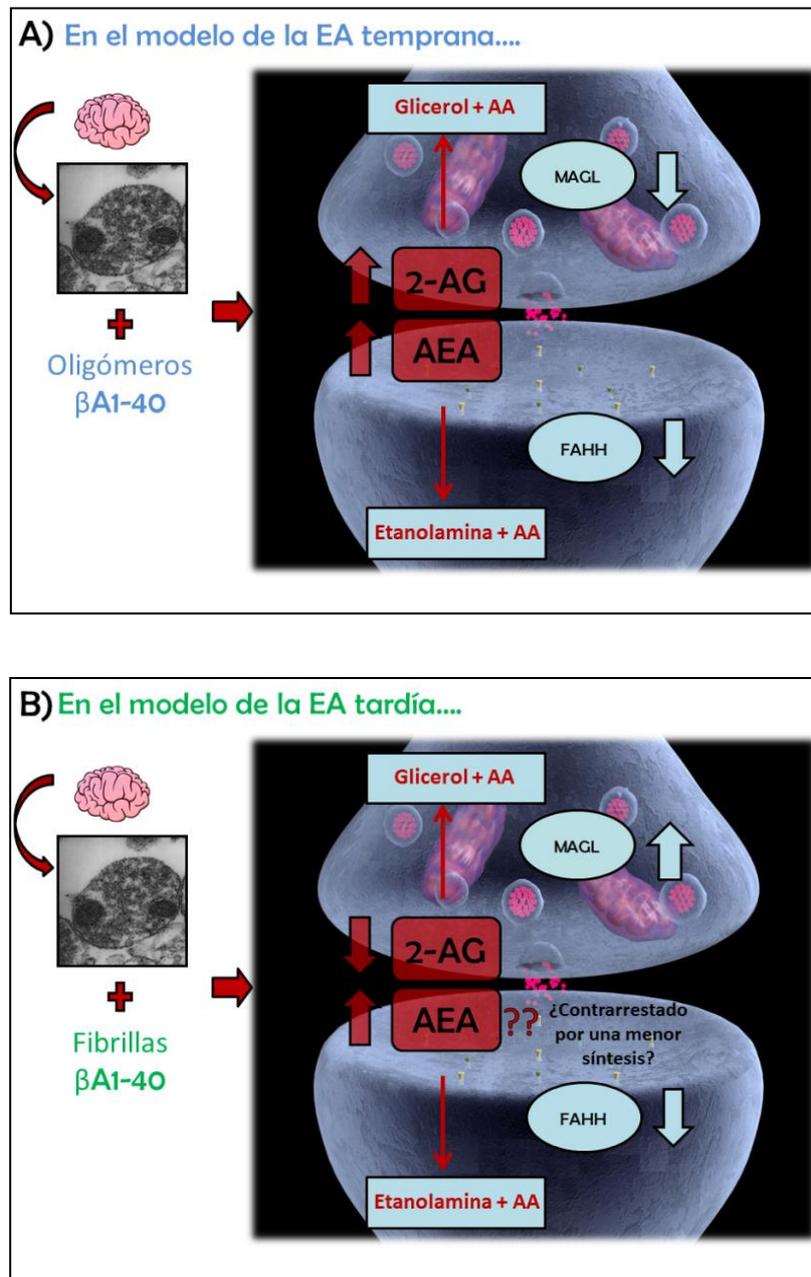
ellas, las que indican que el péptido β A previene la neurotoxicidad inducida por hierro (Bishop y Robinson, 2003), y que, en principio, este péptido protege a las lipoproteínas de la oxidación en el cerebro (Kontush, 2001), entre otras. Los estudios a favor de esta hipótesis señalan que la mayor generación del péptido β A en condiciones de estrés celular podría ser en respuesta al estado de oxidación observado en la EA y a favor de reducir los niveles de ROS, y así, prevenir la apoptosis (Lee y col., 2007). Si bien los resultados de esta Tesis Doctoral indican que los oligómeros del β A1-40 disminuyen las actividades de las enzimas de hidrólisis de los endocannabinoides, esta acción de daño enzimático por parte del péptido podría tener consecuencias beneficiosas para las neuronas debido a que se lograrían aumentar los niveles de los endocannabinoides que se postulan como neuroprotectores.

Las conformaciones coincidentes con la última fase de la agregación del péptido y también con los últimos estadios de la EA, las fibrillas del péptido β A1-40, provocaron efectos opuestos en la hidrólisis del 2-AG y de la AEA. Con respecto al 2-AG, se observó que esta conformación era capaz de aumentar drásticamente la hidrólisis del endocannabinoide, sugiriendo una disminución de su disponibilidad y así, de sus efectos neuroprotectores. Este efecto sería desencadenado por una acción específica de la conformación de fibrillas del péptido relacionado con etapas más tardías de la EA. En concordancia con estos resultados, en estudios anteriores también se observó un aumento de la hidrólisis del 2-AG en la fracción de membrana de la CC de humanos sanos preincubada con 1 μ M de β A1-40, en su conformación de fibrillas (Mulder y col., 2011).

Por otra parte, las fibrillas del péptido β A1-40 disminuyeron la hidrólisis de la AEA con un efecto dependiente de su concentración, el cual fue más marcado que el producido por los oligómeros. Estos resultados coinciden con lo observado en fracciones de membrana de la CC de humanos sanos en iguales condiciones de ensayo con β A1-40 en su conformación de fibrillas y en la CC de pacientes con EA (Pascual y col., 2014). Esto lleva a pensar que la disponibilidad del endocannabinoide neuroprotector AEA es mayor en el modelo de EA ensayado. Sin embargo, se sabe que los niveles de la AEA en pacientes con EA se encuentran disminuidos y que esto se debe probablemente a los menores niveles de la NAPE (Jung y col., 2012a). Por lo

tanto, los niveles más bajos del precursor de la AEA podrían contrarrestar la disminución en la degradación del endocannabinoide.

El siguiente esquema representa los resultados discutidos en este Capítulo:



Esquema representativo de la hidrólisis del 2-araquidiloilglicerol (2-AG) y de la anandamida (AEA) en sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas adultas preincubadas con el péptido beta amiloide (β A) 1-40 en sus conformaciones de: A) Oligómeros y B) Fibrillas. Ácido araquidónico (AA), ácido graso amidohidrolasa (FAHH), enfermedad de Alzheimer (EA) y monoacilglicerol lipasa (MAGL).

Los resultados en el modelo de EA utilizado en esta Tesis Doctoral que proponen a los oligómeros y a las fibrillas como participantes de los efectos observados en esta patología son novedosos. Es importante destacar que las dos conformaciones del péptido β A1-40 ensayadas, las cuales representan distintos estadios de la EA, tienen efectos diferentes en cuanto a la degradación de los endocannabinoides, especialmente del 2-AG. Esto pone en evidencia la posibilidad de diferentes mecanismos desencadenados por el péptido β A en eventos tempranos y en eventos tardíos de la EA. Si bien aún resta conocer qué ocurre con la síntesis de los endocannabinoides en el modelo de la EA, los resultados obtenidos sugieren que en estadios tempranos de la enfermedad, la disponibilidad de los endocannabinoides estaría incrementada favoreciendo la neuroprotección frente a los daños observados, posiblemente intentando contrarrestar el estrés oxidativo. Sin embargo, en estadios tardíos, la degradación del 2-AG aumenta marcadamente y, si bien la hidrólisis de la AEA disminuye, sus niveles aún serían menores. Esto indica que en las últimas etapas de la EA se perdería la neuroprotección atribuida a los endocannabinoides, conduciendo a las características típicas de un estado avanzado de la EA.

CONCLUSIONES

Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral demuestran la existencia de una desregulación en el metabolismo de los dos endocannabinoides principales, 2-AG y AEA, en los terminales sinápticos y en las membranas de las células de la CC de ratas seniles y en un modelo *in vitro* de la EA.

Con respecto al endocannabinoide 2-AG:

- ④ Tanto la LPAasa como la DAGL participan en la síntesis del 2-AG. La DAGL β sería la principal isoforma de esta enzima involucrada en este proceso. Por su parte, la isoforma α podría constituir un reservorio presente en las membranas de ciertas células de la CC o de ciertas organelas, y frente a un estímulo migraría hacia el terminal sináptico para poder aumentar el *pool* del endocannabinoide.
- ④ La hidrólisis del 2-AG en los terminales sinápticos de animales adultos y seniles se da principalmente por medio de la enzima MAGL. En la fracción de membrana de animales adultos, la MAGL también es la responsable de hidrolizar al 2-AG. Sin embargo, en la misma fracción de animales seniles, la ABHD sería la principal involucrada.
- ④ En la CC de los animales seniles, la actividad de las enzimas del metabolismo del 2-AG en el envejecimiento fisiológico se vio desbalanceada a favor de una disminución del endocannabinoide.
- ④ El citosol celular en el cerebro de animales seniles constituiría un reservorio para la enzima MAGL inactiva, disponible para ser translocada a la membrana y ejercer su actividad. De esta manera, el hecho de retener la enzima en un compartimento donde no es activa, revela la necesidad de mantener niveles altos del neuroprotector 2-AG durante el envejecimiento.
- ④ Los niveles de CBR1 y de CBR2 disminuyeron en los terminales sinápticos durante el envejecimiento. Esto juntamente con la disminución de la disponibilidad del 2-AG podrían ser responsables de la disfunción sináptica que se da en la

senescencia, indicando que tanto las enzimas de síntesis y degradación del 2-AG como los CBR constituirían blancos farmacológicos para prevenir los daños en la plasticidad sináptica propios de este proceso.

- Ⓢ Los antagonistas selectivos de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, a través de la regulación de las enzimas DAGL y MAGL, aumentarían la disponibilidad del 2-AG en los terminales sinápticos de animales seniles.
- Ⓢ La hidrólisis del 2-AG en los terminales sinápticos en el modelo de EA temprana disminuyó de manera tal que la disponibilidad del endocannabinoide aumentaría, posiblemente protegiendo a la neurona frente al daño degenerativo. Sin embargo, en el modelo de EA tardía, la degradación del 2-AG aumentó drásticamente por lo que los niveles de este endocannabinoide y sus efectos neuroprotectores disminuirían.

Con respecto al endocannabinoide AEA:

- Ⓢ La hidrólisis de la AEA en las fracciones de membrana de células de la CC de animales adultos y seniles ocurre principalmente a través de la acción de la enzima FAAH. Si bien en los terminales sinápticos de animales adultos la principal enzima encargada de la hidrólisis del endocannabinoide también es la FAAH, en la misma fracción de animales seniles esta enzima es la única responsable de hidrolizarlo.
- Ⓢ La hidrólisis de la AEA en las fracciones de membrana de células de la CC de animales seniles se vio incrementada, lo cual podría ser consecuencia de la mayor expresión de la proteína. Esta mayor degradación de la AEA podría comprometer los efectos antiinflamatorios que tiene este endocannabinoide en las células de la CC encargadas de esta función. De este modo, no se atenuarían los daños causados por la inflamación comúnmente asociados a patologías neurodegenerativas.
- Ⓢ En los terminales sinápticos de animales seniles, la hidrólisis de la AEA se vio disminuida. Esto podría ser una respuesta al aumento de los niveles de la FAAH para incrementar la disponibilidad del endocannabinoide, y así proteger al SNC

frente a los daños en la sinapsis neuronal provocados por el mismo proceso de envejecimiento.

- ④ Al igual que para el 2-AG, las enzimas responsables del metabolismo de la AEA y los CBR constituirían blancos farmacológicos para prevenir los daños infligidos por el envejecimiento.
- ④ Los agonistas de los CBR, principalmente mediante el CB2R, disminuyeron la hidrólisis de la AEA tanto en membrana como en los terminales sinápticos de la CC. Los antagonistas específicos de los receptores CB1 y CB2 también disminuyeron la hidrólisis del endocannabinoide en los terminales sinápticos.
- ④ La hidrólisis de la AEA se vio disminuida tanto en el modelo de EA temprana como tardía, sugiriendo, por lo tanto, un incremento en la disponibilidad de este endocannabinoide.

Los resultados de esta Tesis Doctoral indican que los cambios en la hidrólisis de los endocannabinoides que se observan durante el envejecimiento fisiológico se asemejarían a lo ocurrido en un estadio tardío de la EA. Por lo tanto, es factible pensar que estos cambios producidos en el catabolismo de los endocannabinoides en la senescencia podrían predisponer al cerebro a padecer esta enfermedad. Por otra parte, los ligandos (agonistas y/o antagonistas) de los receptores cannabinoides podrían utilizarse como estrategia terapéutica para regular los niveles de estas biomoléculas en el envejecimiento, y por tanto, aumentar la neuroprotección y atenuar la neuroinflamación del cerebro en animales seniles.

A su vez, los hallazgos de esta Tesis Doctoral plantean nuevos interrogantes, entre ellos:

- ✓ ¿Por qué en el envejecimiento los niveles del 2-AG parecerían disminuir y los de la AEA aumentar? ¿Los resultados inferidos en base a la medición de las actividades enzimáticas coinciden con los niveles de los endocannabinoides en los distintos estados fisiológicos del animal?
- ✓ ¿Sufre modificaciones la síntesis de la AEA en el envejecimiento fisiológico?
- ✓ ¿Sufre modificaciones la síntesis del 2-AG y de la AEA en los modelos de la EA planteados?

- ✓ ¿Qué pasa con las vías alternativas de la degradación de los endocannabinoides durante el envejecimiento?
- ✓ ¿Los diferentes componentes del sistema endocannabinoide se localizan en un dominio particular de la membrana sinaptosomal sensible al proceso de envejecimiento?
- ✓ ¿Cómo es el mecanismo por la cual un agonista o antagonista de los CBR regula las actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo de los endocannabinoides?
- ✓ ¿La acción de ligandos de otros receptores (TRPV1 o GPR55) a través de los cuales actúan los endocannabinoides es también capaz de regular el metabolismo de estos lípidos?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, K., McKinney, M. K., y Cravatt, B. F. *Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system*. Chem.Rev. 108, 1687-1707. 2008.
- Ames, A. y Hastings, A. B. *Studies on water and electrolytes in nervous tissue. I. Rabbit retina: methods and interpretation of data*. J.Neurophysiol. 19, 201-212. 1956.
- Aoyama, K., Matsubara, K., Fujikawa, Y., Nagahiro, Y., Shimizu, K., Umegae, N., Hayase, N., Shiono, H., y Kobayashi, S. *Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Ann.Neurol. 47, 524-527. 2000.
- Arvidson, G. A. *Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides*. Eur.J.Biochem. 4, 478-486. 1968.
- Aso, E., Ozaita, A., Valdizan, E. M., Ledent, C., Pazos, A., Maldonado, R., y Valverde, O. *BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice*. J.Neurochem. 105, 565-572. 2008.
- Atwood, B. K. y Mackie, K. *CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis*. Br.J.Pharmacol. 160, 467-479. 2010.
- Baker, R. R. y Chang, H. *A metabolic path for the degradation of lysophosphatidic acid, an inhibitor of lysophosphatidylcholine lysophospholipase, in neuronal nuclei of cerebral cortex*. Biochim.Biophys.Acta 1483, 58-68. 2000.
- Baltes, P. B. y Lindenberger, U. *Emergence of a powerful connection between sensory and cognitive functions across the adult life span: a new window to the study of cognitive aging?* Psychol.Aging 12, 12-21. 1997.
- Bano, D., Agostini, M., Melino, G., y Nicotera, P. *Ageing, neuronal connectivity and brain disorders: an unsolved ripple effect*. Mol.Neurobiol. 43, 124-130. 2011.
- Basavarajappa, B. S. *Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism*. Protein Pept.Lett. 14, 237-246. 2007.
- Basavarajappa, B. S., Nixon, R. A., y Arancio, O. *Endocannabinoid system: emerging role from neurodevelopment to neurodegeneration*. Mini.Rev.Med.Chem. 9, 448-462. 2009.
- Batkai, S., Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Hasko, G., Liaudet, L., Cravatt, B. F., Csiszar, A., Ungvari, Z., y Pacher, P. *Decreased age-related cardiac dysfunction, myocardial nitrate stress, inflammatory gene expression, and apoptosis in mice lacking fatty acid amide hydrolase*. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol 293, H909-H918. 2007.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., y Piomelli, D. *Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition*. Science 277, 1094-1097. 1997.

- Benard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenco, J., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., Hebert-Chatelain, E., Mulle, C., Ortega-Gutierrez, S., Martin-Fontecha, M., Klugmann, M., Guggenhuber, S., Lutz, B., Gertsch, J., Chaouloff, F., Lopez-Rodriguez, M. L., Grandes, P., Rossignol, R., y Marsicano, G. *Mitochondrial CB(1) receptors regulate neuronal energy metabolism*. *Nat.Neurosci.* 15, 558-564. 2012.
- Berrendero, F., Romero, J., Garcia-Gil, L., Suarez, I., De la Cruz, P., Ramos, J. A., y Fernandez-Ruiz, J. J. *Changes in cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several brain regions of aged rats*. *Biochim.Biophys.Acta* 1407, 205-214. 1998.
- Bilkei-Gorzo, A. *The endocannabinoid system in normal and pathological brain ageing*. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 367, 3326-3341. 2012.
- Bishop, G. M. y Robinson, S. R. *Human Abeta1-42 reduces iron-induced toxicity in rat cerebral cortex*. *J.Neurosci.Res.* 73, 316-323. 2003.
- Bishop, N. A., Lu, T., y Yankner, B. A. *Neural mechanisms of ageing and cognitive decline*. *Nature* 464, 529-535. 2010.
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M. G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E. J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., y Doherty, P. *Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain*. *J.Cell Biol.* 163, 463-468. 2003.
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., y Teplow, D. B. *Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 330-335. 2003.
- Blankman, J. L., Simon, G. M., y Cravatt, B. F. *A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol*. *Chem.Biol.* 14, 1347-1356. 2007.
- Breivogel, C. S., Walker, J. M., Huang, S. M., Roy, M. B., y Childers, S. R. *Cannabinoid signaling in rat cerebellar granule cells: G-protein activation, inhibition of glutamate release and endogenous cannabinoids*. *Neuropharmacology* 47, 81-91. 2004.
- Brera, B., Serrano, A., y de Ceballos, M. L. *beta-amyloid peptides are cytotoxic to astrocytes in culture: a role for oxidative stress*. *Neurobiol.Dis.* 7, 395-405. 2000.
- Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T., y Onaivi, E. S. *Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus*. *Synapse* 62, 944-949. 2008.
- Butovsky, E., Juknat, A., Goncharov, I., Elbaz, J., Eilam, R., Zangen, A., y Vogel, Z. *In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Delta-tetrahydrocannabinol*. *J.Neurochem.* 93, 802-811. 2005.
- Butterfield, D. A. *Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review*. *Free Radic.Res.* 36, 1307-1313. 2002.
- Butterfield, D. A., Hardas, S. S., y Lange, M. L. *Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration*. *J.Alzheimers.Dis.* 20, 369-393. 2010.

- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., y Piomelli, D. *Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP*. J.Neurosci. 16, 3934-3942. 1996.
- Callen, L., Moreno, E., Barroso-Chinea, P., Moreno-Delgado, D., Cortes, A., Mallol, J., Casado, V., Lanciego, J. L., Franco, R., Lluís, C., Canela, E. I., y McCormick, P. J. *Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain*. J.Biol.Chem. 287, 20851-20865. 2012.
- Canas, P. M., Duarte, J. M., Rodrigues, R. J., Kofalvi, A., y Cunha, R. A. *Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus*. Neurobiol.Aging 30, 1877-1884. 2009.
- Castillo, P. E., Younts, T. J., Chavez, A. E., y Hashimoto, Y. *Endocannabinoid signaling and synaptic function*. Neuron 76, 70-81. 2012.
- Centonze, D., Bari, M., Rossi, S., Prosperetti, C., Furlan, R., Fezza, F., De Chiara, V., Battistini, L., Bernardi, G., Bernardini, S., Martino, G., y Maccarrone, M. *The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain 130, 2543-2553. 2007.
- Chang, J. W., Niphakis, M. J., Lum, K. M., Cognetta, A. B., III, Wang, C., Matthews, M. L., Niessen, S., Buczynski, M. W., Parsons, L. H., y Cravatt, B. F. *Highly selective inhibitors of monoacylglycerol lipase bearing a reactive group that is bioisosteric with endocannabinoid substrates*. Chem.Biol. 19, 579-588. 2012.
- Checler, F. *Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease*. J.Neurochem. 65, 1431-1444. 1995.
- Cheer, J. F., Wassum, K. M., Heien, M. L., Phillips, P. E., y Wightman, R. M. *Cannabinoids enhance subsecond dopamine release in the nucleus accumbens of awake rats*. J.Neurosci. 24, 4393-4400. 2004.
- Chu, H. L. y Lin, S. Y. *Temperature-induced conformational changes in amyloid beta(1-40) peptide investigated by simultaneous FT-IR microspectroscopy with thermal system*. Biophys.Chem. 89, 173-180. 2001.
- Cocco, L., Faenza, I., Fiume, R., Maria, B. A., Gilmour, R. S., y Manzoli, F. A. *Phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) beta1 and nuclear lipid-dependent signaling*. Biochim.Biophys.Acta 1761, 509-521. 2006.
- Cotman, C. W. *Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions*. Methods Enzymol. 31, 445-452. 1974.
- Cravatt, B. F., Demarest, K., Patricelli, M. P., Bracey, M. H., Giang, D. K., Martin, B. R., y Lichtman, A. H. *Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98, 9371-9376. 2001.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., y Gilula, N. B. *Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides*. Nature 384, 83-87. 1996.

- Crowe, E., Sell, C., Thomas, J. D., Johannes, G. J., y Torres, C. *Activation of proteasome by insulin-like growth factor-I may enhance clearance of oxidized proteins in the brain.* Mech.Ageing Dev. 130, 793-800. 2009.
- Cummings, B. J. y Cotman, C. W. *Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity.* Lancet 346, 1524-1528. 1995.
- D'Addario, C., Di Francesco, A., Arosio, B., Gussago, C., Dell'Osso, B., Bari, M., Galimberti, D., Scarpini, E., Altamura, A. C., Mari, D., y Maccarrone, M. *Epigenetic regulation of fatty acid amide hydrolase in Alzheimer disease.* PLoS.One. 7, e39186. 2012.
- D'Ambra, T. E., Estep, K. G., Bell, M. R., Eissenstat, M. A., Josef, K. A., Ward, S. J., Haycock, D. A., Baizman, E. R., Casiano, F. M., Beglin, N. C., Chippari, S. M., Grego, J. D., Kullnig, R. K., y Daley, G. T. *Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor.* J.Med.Chem. 35, 124-135. 1992.
- Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Jr., Baker, L. K., Krafft, G. A., y LaDu, M. J. *Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability.* J.Biol.Chem. 277, 32046-32053. 2002.
- Dainese, E., De Fabrittis, G., Sabatucci, A., Oddi, S., Angelucci, C. B., Di Pancrazio, C., Giorgino, T., Stanley, N., Del Carlo, M., Cravatt, B. F., y Maccarrone, M. *Membrane lipids are key modulators of the endocannabinoid-hydrolase FAAH.* Biochem.J. 457, 463-472. 2014.
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A. S., Allara, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C. G., y Di Marzo, V. *Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes.* Br.J.Pharmacol. 163, 1479-1494. 2011.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., III, Johnson, M. R., Melvin, L. S., y Howlett, A. C. *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.* Mol.Pharmacol. 34, 605-613. 1988.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., y Mechoulam, R. *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.* Science 258, 1946-1949. 1992.
- Di Marzo, V. *Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?* Nat.Rev.Drug Discov. 7, 438-455. 2008.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., Sugiura, T., Melck, D., y De Petrocellis, L. *The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide.* Biochem.J. 331, 15-19. 1998a.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., y Piomelli, D. *Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.* Nature 372, 686-691. 1994.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., y De Petrocellis, L. *Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action.* Trends Neurosci. 21, 521-528. 1998b.

- Di Marzo, V., y Petrosino, S. *Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease*. *Curr.Opin.Lipidol.* 18, 129-140. 2007.
- Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S., y Piomelli, D. *Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 10819-10824. 2002.
- Dinh, T. P., Kathuria, S., y Piomelli, D. *RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol*. *Mol.Pharmacol.* 66, 1260-1264. 2004.
- Donadelli, M., Dando, I., Zaniboni, T., Costanzo, C., Dalla, P. E., Scupoli, M. T., Scarpa, A., Zappavigna, S., Marra, M., Abbruzzese, A., Bifulco, M., Caraglia, M., y Palmieri, M. *Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism*. *Cell Death.Dis.* 2, e152. 2011.
- Egertova, M., Simon, G. M., Cravatt, B. F., y Elphick, M. R. *Localization of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) expression in mouse brain: A new perspective on N-acylethanolamines as neural signaling molecules*. *J.Comp Neurol.* 506, 604-615. 2008.
- Eljaschewitsch, E., Witting, A., Mawrin, C., Lee, T., Schmidt, P. M., Wolf, S., Hoertnagl, H., Raine, C. S., Schneider-Stock, R., Nitsch, R., y Ullrich, O. *The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells*. *Neuron* 49, 67-79. 2006.
- Farooqui, A. A., Ong, W. Y., y Horrocks, L. A. *Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2*. *Neurochem.Res.* 29, 1961-1977. 2004.
- Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., y Piomelli, D. *Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation*. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 313, 352-358. 2005.
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A. L., y Mitchell, R. L. *Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors*. *Mol.Pharmacol.* 48, 443-450. 1995.
- Fernandez-Ruiz, J., Berrendero, F., Hernandez, M. L., y Ramos, J. A. *The endogenous cannabinoid system and brain development*. *Trends Neurosci.* 23, 14-20. 2000.
- Finch, C. E. *Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Evolution of the human lifespan and diseases of aging: roles of infection, inflammation, and nutrition*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107, 1718-1724. 2010.
- Folch, J., Lees, M., y Sloane Stanley, G. H. *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. *J.Biol.Chem.* 226, 497-509. 1957.
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur G., y Casellas, P. *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. *Eur.J.Biochem.* 232, 54-61. 1995.

- Gallily, R., Breuer, A., y Mechoulam, R. *2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice.* Eur.J.Pharmacol. 406, R5-R7. 2000.
- Gao, Y., Vasilyev, D. V., Goncalves, M. B., Howell, F. V., Hobbs, C., Reisenberg, M., Shen, R., Zhang, M. Y., Strassle, B. W., Lu, P., Mark, L., Piesla, M. J., Deng, K., Kouranova, E. V., Ring, R. H., Whiteside, G. T., Bates, B., Walsh, F. S., Williams, G., Pangalos, M. N., Samad, T. A., y Doherty, P. *Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice.* J.Neurosci. 30, 2017-2024. 2010.
- Garcia-Matas, S., Gutierrez-Cuesta, J., Coto-Montes, A., Rubio-Acero, R., Diez-Vives, C., Camins, A., Pallas, M., Sanfeliu, C., y Cristofol, R. *Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity.* Aging Cell 7, 630-640. 2008.
- Genova, M. L., Pich, M. M., Bernacchia, A., Bianchi, C., Biondi, A., Bovina, C., Falasca, A. I., Formiggini, G., Castelli, G. P., y Lenaz, G. *The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology.* Ann.N.Y.Acad.Sci. 1011, 86-100. 2004.
- Gessa, G. L., Mascia, M. S., Casu, M. A., y Carta, G. *Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A.* Eur.J.Pharmacol. 327, R1-R2. 1997.
- Gifford, A. N. y Ashby, C. R., Jr. *Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A.* J.Pharmacol.Exp.Ther. 277, 1431-1436. 1996.
- Gilbert, B. J. *Republished: the role of amyloid beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Postgrad.Med.J. 90, 113-117. 2014.
- Giusto, N. M., Salvador, G. A., Castagnet, P. I., Pasquare, S. J., e llincheta de Boschero, M. G. *Age-associated changes in central nervous system glycerolipid composition and metabolism.* Neurochem.Res. 27, 1513-1523. 2002.
- Golech, S. A., McCarron, R. M., Chen, Y., Bembry, J., Lenz, F., Mechoulam, R., Shohami, E., y Spatz, M. *Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors.* Brain Res.Mol.Brain Res. 132, 87-92. 2004.
- Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., y Uhl, G. R. *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain.* Brain Res. 1071, 10-23. 2006.
- Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D., y Hipkin, R. W. *Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide.* Mol.Pharmacol. 57, 1045-1050. 2000.
- Goparaju, S. K., Kurahashi, Y., Suzuki, H., Ueda, N., y Yamamoto, S. *Anandamide amidohydrolase of porcine brain: cDNA cloning, functional expression and site-directed mutagenesis(1).* Biochim.Biophys.Acta 1441, 77-84. 1999.
- Govaerts, S. J., Hermans, E., y Lambert, D. M. *Comparison of cannabinoid ligands affinities and efficacies in murine tissues and in transfected cells expressing human recombinant cannabinoid receptors.* Eur.J.Pharm.Sci. 23, 233-243. 2004.

- Gravina, S. A., Ho, L., Eckman, C. B., Long, K. E., Otvos, L., Jr., Younkin, L. H., Suzuki, N., y Younkin, S. G. *Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43)*. J.Biol.Chem. 270, 7013-7016. 1995.
- Greenamyre, J. T., Penney, J. B., Young, A. B., D'Amato, C. J., Hicks, S. P., y Shoulson, I. *Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases*. Science 227, 1496-1499. 1985.
- Griffin, G., Wray, E. J., Tao, Q., McAllister, S. D., Rorrer, W. K., Aung, M. M., Martin, B. R., y Abood, M. E. *Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system*. Eur.J.Pharmacol. 377, 117-125. 1999.
- Grigorenko, E., Kittler, J., Clayton, C., Wallace, D., Zhuang, S., Bridges, D., Bunday, S., Boon, A., Pagget, C., Hayashizaki, S., Lowe, G., Hampson, R., y Deadwyler, S. *Assessment of cannabinoid induced gene changes: tolerance and neuroprotection*. Chem.Phys.Lipids 121, 257-266. 2002.
- Grimmer, T., Riemenschneider, M., Forstl, H., Henriksen, G., Klunk, W. E., Mathis, C. A., Shiga, T., Wester, H. J., Kurz, A., y Drzezga, A. *Beta amyloid in Alzheimer's disease: increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid*. Biol.Psychiatry 65, 927-934. 2009.
- Gulyas, A. I., Cravatt, B. F., Bracey, M. H., Dinh, T. P., Piomelli, D., Boschia, F., y Freund, T. F. *Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala*. Eur.J.Neurosci. 20, 441-458. 2004.
- Hall, W. y Solowij, N. *Adverse effects of cannabis*. Lancet 352, 1611-1616. 1998.
- Hanisch, U. K. y Kettenmann, H. *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat.Neurosci. 10, 1387-1394. 2007.
- Hansen, H. H., Ikonomidou, C., Bittigau, P., Hansen, S. H., y Hansen, H. S. *Accumulation of the anandamide precursor and other N-acylethanolamine phospholipids in infant rat models of in vivo necrotic and apoptotic neuronal death*. Neurochem. 76, 39-46. 2001a.
- Hansen, H. H., Schmid, P. C., Bittigau, P., Lastres-Becker, I., Berrendero, F., Manzanares, J., Ikonomidou, C., Schmid, H. H., Fernandez-Ruiz, J. J., y Hansen, H. S. *Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration*. J.Neurochem. 78, 1415-1427. 2001b.
- Hardy, J. A. y Higgins, G. A. *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science 256, 184-185. 1992.
- Harkany, T., Guzman, M., Galve-Roperh, I., Berghuis, P., Devi, L. A., y Mackie, K. *The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development*. Trends Pharmacol.Sci. 28, 83-92. 2007.
- Harvey, B. S., Ohlsson, K. S., Maag, J. L., Musgrave, I. F., y Smid, S. D. *Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid-beta evoked neurotoxicity in vitro*. Neurotoxicology 33, 138-146. 2012.

- Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., y Kano, M. *Endocannabinoids and synaptic function in the CNS*. *Neuroscientist*. 13, 127-137. 2007.
- Henstridge, C. M. *Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55*. *Pharmacology* 89, 179-187. 2012.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., De Costa, B. R., y Rice, K. C. *Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study*. *J.Neurosci*. 11, 563-583. 1991.
- Hickman, S. E., Allison, E. K., y El Khoury, J. *Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice*. *J.Neurosci*. 28, 8354-8360. 2008.
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C. L., y Beyreuther, K. *Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease*. *J.Mol.Biol*. 218, 149-163. 1991.
- Hillard, C. J. *Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 61, 3-18. 2000.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., y Pertwee, R. G. *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors*. *Pharmacol.Rev*. 54, 161-202. 2002.
- Huffman, J. W., Liddle, J., Yu, S., Aung, M. M., Abood, M. E., Wiley, J. L., y Martin, B. R. *3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor*. *Bioorg.Med.Chem*. 7, 2905-2914. 1999.
- Iuvone, T., Esposito, G., Esposito, R., Santamaria, R., Di Rosa, M., e Izzo, A. A. *Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells*. *J.Neurochem*. 89, 134-141. 2004.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., y Lansbury, P. T., Jr. *The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Biochemistry* 32, 4693-4697. 1993.
- Jernigan, T. L. y Gamst, A. C. *Changes in volume with age--consistency and interpretation of observed effects*. *Neurobiol.Aging* 26, 1271-1274. 2005.
- Jung, K. M., Astarita, G., Yasar, S., Vasilevko, V., Cribbs, D. H., Head, E., Cotman, C. W., y Piomelli, D. *An amyloid beta42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease*. *Neurobiol.Aging* 33, 1522-1532. 2012a.
- Jung, K. M., Sepers, M., Henstridge, C. M., Lassalle, O., Neuhofer, D., Martin, H., Ginger, M., Frick, A., DiPatrizio, N. V., Mackie, K., Katona, I., Piomelli, D., y Manzoni, O. J. *Uncoupling of the endocannabinoid signalling complex in a mouse model of fragile X syndrome*. *Nat.Commun*. 3, 1080. 2012b.
- Katsel, P., Tan, W., y Haroutunian, V. *Gain in brain immunity in the oldest-old differentiates cognitively normal from demented individuals*. *PLoS.One*. 4, e7642. 2009.

- Katzman, R., Terry, R., De Teresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., y Peck, A. *Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques*. Ann.Neurol. 23, 138-144. 1988.
- Kessiova, M., Alexandrova, A., Georgieva, A., Kirkova, M., y Todorov, S. *In vitro effects of CB1 receptor ligands on lipid peroxidation and antioxidant defense systems in the rat brain*. Pharmacol.Rep. 58, 870-875. 2006.
- King, A. R., Duranti, A., Tontini, A., Rivara, S., Rosengarth, A., Clapper, J. R., Astarita, G., Geaga, J. A., Luecke, H., Mor, M., Tarzia, G., y Piomelli, D. *URB602 inhibits monoacylglycerol lipase and selectively blocks 2-arachidonoylglycerol degradation in intact brain slices*. Chem.Biol. 14, 1357-1365. 2007.
- Klein, W. L. *Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets*. Neurochem.Int. 41, 345-352. 2002.
- Klein, W. L., Krafft, G. A., y Finch, C. E. *Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?* Trends Neurosci. 24, 219-224. 2001.
- Kontush, A. *Alzheimer's amyloid-beta as a preventive antioxidant for brain lipoproteins*. Cell Mol.Neurobiol. 21, 299-315. 2001.
- Kozak, K. R., Rowlinson, S. W., y Marnett, L. J. *Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2*. J.Biol.Chem. 275, 33744-33749. 2000.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., y Gage, F. H. *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation*. J.Neurosci. 16, 2027-2033. 1996.
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Lambert, M. P., Velasco, P. T., Bigio, E. H., Finch, C. E., Krafft, G. A., y Klein, W. L. *Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers*. J.Neurosci. 24, 10191-10200. 2004.
- Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227, 680-685. 1970.
- Lara-Celador, I., Castro-Ortega, L., Alvarez, A., Goni-de-Cerio, F., Lacalle, J., e Hilario, E. *Endocannabinoids reduce cerebral damage after hypoxic-ischemic injury in perinatal rats*. Brain Res. 1474, 91-99. 2012.
- Ledesma, M. D., Martin, M. G., y Dotti, C. G. *Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival*. Prog.Lipid Res. 51, 23-35. 2012.
- Lee, H. G., Zhu, X., Castellani, R. J., Nunomura, A., Perry, G., y Smith, M. A. *Amyloid-beta in Alzheimer disease: the null versus the alternate hypotheses*. J.Pharmacol.Exp.Ther. 321, 823-829. 2007.
- Lee, J. H., Agacinski, G., Williams, J. H., Wilcock, G. K., Esiri, M. M., Francis, P. T., Wong, P. T., Chen, C. P., y Lai, M. K. *Intact cannabinoid CB1 receptors in the Alzheimer's disease cortex*. Neurochem.Int. 57, 985-989. 2010.

- Li, C. M., Hong, S. B., Kopal, G., He, X., Linke, T., Hou, W. S., Koch, J., Gatt, S., Sandhoff, K., y Schuchman, E. H. *Cloning and characterization of the full-length cDNA and genomic sequences encoding murine acid ceramidase*. *Genomics* 50, 267-274. 1998.
- Li, Y. P., Bushnell, A. F., Lee, C. M., Perlmutter, L. S., y Wong, S. K. *Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells*. *Brain Res.* 738, 196-204. 1996.
- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A. C., Zhou, Z., Huang, B. X., Kim, H. Y., y Kunos, G. *A biosynthetic pathway for anandamide*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 13345-13350. 2006.
- Liu, P., Bilkey, D. K., Darlington, C. L., y Smith, P. F. *Cannabinoid CB1 receptor protein expression in the rat hippocampus and entorhinal, perirhinal, postrhinal and temporal cortices: regional variations and age-related changes*. *Brain Res.* 979, 235-239. 2003.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275. 1951.
- Lu, J. X., Qiang, W., Yau, W. M., Schwieters, C. D., Meredith, S. C., y Tycko, R. *Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue*. *Cell* 154, 1257-1268. 2013.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S. Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., y Yankner, B. A. *Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain*. *Nature* 429, 883-891. 2004.
- Ludanyi, A., Eross, L., Czirjak, S., Vajda, J., Halasz, P., Watanabe, M., Palkovits, M., Magloczky, Z., Freund, T. F., y Katona, I. *Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus*. *J.Neurosci.* 28, 2976-2990. 2008.
- Lykidis, A., Mougios, V., y Arzoglou, P. *Pancreatic lipase assays with triglycerides as substrate: contribution of each sequential reaction to product formation*. *Clin.Chem.* 40, 2053-2056. 1994.
- Lynn, A. B. y Herkenham, M. *Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids*. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 268, 1612-1623. 1994.
- Maccarrone, M., Dainese, E., y Oddi, S. *Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling*. *Trends Biochem.Sci.* 35, 601-608. 2010.
- Maccarrone, M., Fiori, A., Bari, M., Granata, F., Gasperi, V., De Stefano, M. E., Finazzi-Agro, A., y Strom, R. *Regulation by cannabinoid receptors of anandamide transport across the blood-brain barrier and through other endothelial cells*. *Thromb.Haemost.* 95, 117-127. 2006.
- Maccarrone, M., Gasperi, V., Fezza, F., Finazzi-Agro, A., y Rossi, A. *Differential regulation of fatty acid amide hydrolase promoter in human immune cells and neuronal cells by leptin and progesterone*. *Eur.J.Biochem.* 271, 4666-4676. 2004.
- Mackie, K. *Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system*. *Handb.Exp.Pharmacol.* 168, 299-325. 2005.

- Mackie, K. *Cannabinoid receptors: where they are and what they do*. J.Neuroendocrinol. 20, 10-14. 2008.
- Mackie, K. y Stella, N. *Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players*. AAPS.J. 8, E298-E306. 2006.
- Marchalant, Y., Brothers, H. M., y Wenk, G. L. *Inflammation and aging: can endocannabinoids help?* Biomed.Pharmacother. 62, 212-217. 2008.
- Marchalant, Y., Brothers, H. M. y Wenk, G. L. *Cannabinoid agonist WIN-55,212-2 partially restores neurogenesis in the aged rat brain*. Mol.Psychiatry 14, 1068-1069. 2009.
- Marrs, W. R., Blankman, J. L., Horne, E. A., Thomazeau, A., Lin, Y. H., Coy, J., Bodor, A. L., Muccioli, G. G., Hu, S. S., Woodruff, G., Fung, S., Lafourcade, M., Alexander, J. P., Long, J. Z., Li, W., Xu, C., Moller, T., Mackie, K., Manzoni, O. J., Cravatt, B. F., y Stella, N. *The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors*. Nat.Neurosci. 13, 951-957. 2010.
- Marsicano, G. y Lutz, B. *Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain*. Eur.J.Neurosci. 11, 4213-4225. 1999.
- Martin-Moreno, A. M., Reigada, D., Ramirez, B. G., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., y de Ceballos, M. L. *Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease*. Mol.Pharmacol. 79, 964-973. 2011.
- Matsuda, L. A., Bonner, T. I., y Lolait, S. J. *Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain*. J.Comp Neurol. 327, 535-550. 1993.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., y Bonner, T. I. *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature 346, 561-564. 1990.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I., y Rydel, R. E. *Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein*. Neuron 10, 243-254. 1993.
- Maurelli, S., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Di Luccia, A., Marino, G., y Di Marzo, V. *Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'*. FEBS Lett. 377, 82-86. 1995.
- Meccariello, R., Battista, N., Bradshaw, H. B., y Wang, H. *Endocannabinoids and reproduction*. Int.J.Endocrinol. 2014, 378069. 2014.
- Mechoulam, R. *Marihuana chemistry*. Science 168, 1159-1166. 1970.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., Pertwee, R. G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J. y Vogel, Z. *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors*. Biochem.Pharmacol. 50, 83-90. 1995.
- Mechoulam, R., Spatz, M., y Shohami, E. *Endocannabinoids and neuroprotection*. Sci.STKE. 2002, 129, re5. 2002.
- Mendizabal, V. E. y Adler-Graschinsky, E. *Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions*. Br.J.Pharmacol. 151, 427-440. 2007.

- Milton, N. G. *Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide*. *Neurosci.Lett.* 332, 127-130. 2002.
- Minati, L., Edginton, T., Bruzzone, M. G., y Giaccone, G. *Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review*. *Am.J.Alzheimers.Dis.Other Demen.* 24, 95-121. 2009.
- Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M. B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fulop, L., Penke, B., Zilberter, Y., Harkany, T., Pitkanen, A., y Tanila, H. *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. *J.Neurosci.* 29, 3453-3462. 2009.
- Moody, J. S., Kozak, K. R., Ji, C., y Marnett, L. J. *Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase*. *Biochemistry* 40, 861-866. 2001.
- Morrison, W. R. y Smith, L. M. *Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol*. *J.Lipid Res.* 5, 600-608. 1964.
- Mudher, A. y Lovestone, S. *Alzheimer's disease-do taoists and baptists finally shake hands?* *Trends Neurosci.* 25, 22-26. 2002.
- Mulder, J., Aguado, T., Keimpema, E., Barabas, K., Ballester Rosado, C. J., Nguyen, L., Monory, K., Marsicano, G., Di Marzo, V., Hurd, Y. L., Guillemot, F., Mackie, K., Lutz, B., Guzman, M., Lu, H. C., Galve-Roperh, I., y Harkany, T. *Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 8760-8765. 2008.
- Mulder, J., Zilberter, M., Pasquaré, S. J., Alpar, A., Schulte, G., Ferreira, S. G., Kofalvi, A., Martin-Moreno, A. M., Keimpema, E., Tanila, H., Watanabe, M., Mackie, K., Hortobagyi, T., de Ceballos, M. L., y Harkany, T. *Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease*. *Brain* 134, 1041-1060. 2011.
- Muñoz, F. J. e Inestrosa, N. C. *Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid beta-peptide aggregates is dependent on the type of Aβ peptide and the AChE concentration present in the complexes*. *FEBS Lett.* 450, 205-209. 1999.
- Munro, S., Thomas, K. L., y Abu-Shaar, M. *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. *Nature* 365, 61-65. 1993.
- Nagarkatti, P., Pandey, R., Rieder, S. A., Hegde, V. L., y Nagarkatti, M. *Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs*. *Future.Med.Chem.* 1, 1333-1349. 2009.
- Nakane, S., Oka, S., Arai, S., Waku, K., Ishima, Y., Tokumura, A., y Sugiura, T. *2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid-containing lysophosphatidic acid: occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor ligand, in rat brain*. *Arch.Biochem.Biophys.* 402, 51-58. 2002.
- Nakanishi, H. y Wu, Z. *Microglia-aging: roles of microglial lysosome- and mitochondria-derived reactive oxygen species in brain aging*. *Behav.Brain Res.* 201, 1-7. 2009.
- Natarajan, V., Reddy, P. V., Schmid, P. C., y Schmid, H. H. *N-Acylation of ethanolamine phospholipids in canine myocardium*. *Biochim.Biophys.Acta* 712, 342-355. 1982.
- Neve, R. L. y Robakis, N. K. *Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis*. *Trends Neurosci.* 21, 15-19. 1998.

- Nomura, D. K., Long, J. Z., Niessen, S., Hoover, H. S., Ng, S. W., y Cravatt, B. F. *Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis*. Cell 140, 49-61. 2010.
- Noonan, J., Tanveer, R., Klompas, A., Gowran, A., McKiernan, J., y Campbell, V. A. *Endocannabinoids prevent beta-amyloid-mediated lysosomal destabilization in cultured neurons*. J.Biol.Chem. 285, 38543-38554. 2010.
- Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., y Ueda, N. *Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners*. J.Biol.Chem. 279, 5298-5305. 2004.
- Osei-Hyiaman, D., Harvey-White, J., Batkai, S., y Kunos, G. *The role of the endocannabinoid system in the control of energy homeostasis*. Int.J.Obes.(Lond) 30, S33-S38. 2006.
- Oz, M. *Receptor-independent actions of cannabinoids on cell membranes: focus on endocannabinoids*. Pharmacol.Ther. 111, 114-144. 2006.
- Pacher, P., Batkai, S., y Kunos, G. *The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy*. Pharmacol.Rev. 58, 389-462. 2006.
- Pacher, P. Hasko, G. *Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischaemia-reperfusion injury and preconditioning*. Br.J.Pharmacol. 153, 252-262. 2008.
- Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzman, M., y Galve-Roperh, I. *Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation*. FASEB J. 20, 2405-2407. 2006.
- Pandey, R., Mousawy, K., Nagarkatti, M., y Nagarkatti, P. *Endocannabinoids and immune regulation*. Pharmacol.Res. 60, 85-92. 2009.
- Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Breuer, A., Mechoulam, R., y Shohami, E. *An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury*. Nature 413, 527-531. 2001.
- Park, J. H. y Schuchman, E. H. *Acid ceramidase and human disease*. Biochim.Biophys.Acta 1758, 2133-2138. 2006.
- Parkes, J. G. y Thompson, W. *Structural and metabolic relation between molecular classes of phosphatidylcholine in mitochondria and endoplasmic reticulum of guinea pig liver*. J.Biol.Chem. 248, 6655-6662. 1973.
- Pascual, A.C., Martín-Moreno, A.M., Giusto, N.M., de Ceballos, M.L. y Pasquaré, S.J. *Normal aging in rats and pathological aging in human Alzheimer's disease decrease FAAH activity: Modulation by cannabinoid agonists*". Exp. Gerontol. 60, 92-99. 2014.
- Pasquare de Garcia, S. J. y Giusto, N. M. *Phosphatidate phosphatase activity in isolated rod outer segment from bovine retina*. Biochim.Biophys.Acta 875, 195-202. 1986.
- Pasquare, S. J., Ilincheta de Boschero, M. G., y Giusto, N. M. *Aging promotes a different phosphatidic acid utilization in cytosolic and microsomal fractions from brain and liver*. Exp.Gerontol. 36, 1387-1401. 2001.
- Pertwee, R. G. *Pharmacological actions of cannabinoids*. Handb.Exp.Pharmacol. 168, 1-51. 2005.

- Pertwee, R. G. *Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond*. *Addict.Biol.* 13, 147-159. 2008.
- Pertwee, R. G. *Elevating endocannabinoid levels: pharmacological strategies and potential therapeutic applications*. *Proc.Nutr.Soc.* 73, 96-105. 2014.
- Piomelli, D. *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. *Nat.Rev.Neurosci.* 4, 873-884. 2003.
- Piomelli, D. *More surprises lying ahead. The endocannabinoids keep us guessing*. *Neuropharmacology* 76, 228-234. 2014.
- Prescott, S. M. y Majerus, P. W. *Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate*. *J.Biol.Chem.* 258, 764-769. 1983.
- Price, M. R., Baillie, G. L., Thomas, A., Stevenson, L. A., Easson, M., Goodwin, R., McLean, A., McIntosh, L., Goodwin, G., Walker, G., Westwood, P., Marrs, J., Thomson, F., Cowley, P., Christopoulos, A., Pertwee, R. G., y Ross, R. A. *Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor*. *Mol.Pharmacol.* 68, 1484-1495. 2005.
- Puffenbarger, R. A., Kapulina, O., Howell, J. M., y Deutsch, D. G. *Characterization of the 5'-sequence of the mouse fatty acid amide hydrolase*. *Neurosci.Lett.* 314, 21-24. 2001.
- Ramirez, B. G., Blazquez, C., Gomez del, P. T., Guzman, M., y de Ceballos, M. L. *Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation*. *J.Neurosci.* 25, 1904-1913. 2005.
- Reisenberg, M., Singh, P. K., Williams, G., y Doherty, P. *The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling*. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 367, 3264-3275. 2012.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Alonso, R., Shire, D., Congy, C., Soubrie, P., Breliere, J. C., y Le Fur G. *Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist*. *Life Sci.* 56, 1941-1947. 1995.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J. M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Breliere, J. C., y Le Fur, G. L. *SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor*. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 284, 644-650. 1998.
- Romero, J., Berrendero, F., Garcia-Gil, L., De la Cruz, P., Ramos, J. A., y Fernandez-Ruiz, J. J. *Loss of cannabinoid receptor binding and messenger RNA levels and cannabinoid agonist-stimulated [35S]guanylyl-5'O-(thio)-triphosphate binding in the basal ganglia of aged rats*. *Neuroscience* 84, 1075-1083. 1998.
- Ron-Harel, N. y Schwartz, M. *Immune senescence and brain aging: can rejuvenation of immunity reverse memory loss?* *Trends Neurosci.* 32, 367-375. 2009.
- Rosenberger, T. A., Farooqui, A. A., y Horrocks, L. A. *Bovine brain diacylglycerol lipase: substrate specificity and activation by cyclic AMP-dependent protein kinase*. *Lipids* 42, 187-195. 2007.

- Rouser, G., Fkeischer, S., y Yamamoto, A. *Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots*. *Lipids* 5, 494-496. 1970.
- Rubinsztein, D. C., Marino, G., y Kroemer, G. *Autophagy and aging*. *Cell* 146, 682-695. 2011.
- Russo, I., Barlati, S., y Bosetti, F. *Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells*. *J.Neurochem.* 116, 947-956. 2011.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., y Greasley, P. J. *The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor*. *Br.J.Pharmacol.* 152, 1092-1101. 2007.
- Saario, S. M., Poso, A., Juvonen, R. O., Jarvinen, T., y Salo-Ahen, O. M. *Fatty acid amide hydrolase inhibitors from virtual screening of the endocannabinoid system*. *J.Med.Chem.* 49, 4650-4656. 2006.
- Sasaki, T., Unno, K., Tahara, S., Shimada, A., Chiba, Y., Hoshino, M., y Kaneko, T. *Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds*. *Aging Cell* 7, 459-469. 2008.
- Saura, C. A. y Valero, J. *The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders*. *Rev.Neurosci.* 22, 153-169. 2011.
- Savinainen, J. R., Saario, S. M., y Laitinen, J. T. *The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors*. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 267-276. 2012.
- Schlicker, E. y Kathmann, M. *Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors*. *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 565-572. 2001.
- Schlosburg, J. E., Blankman, J. L., Long, J. Z., Nomura, D. K., Pan, B., Kinsey, S. G., Nguyen, P. T., Ramesh, D., Booker, L., Burston, J. J., Thomas, E. A., Selley, D. E., Sim-Selley, L. J., Liu, Q. S., Lichtman, A. H., y Cravatt, B. F. *Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system*. *Nat.Neurosci.* 13, 1113-1119. 2010.
- Schmid, H. H., Schmid, P. C., y Berdyshev, E. V. *Cell signaling by endocannabinoids and their congeners: questions of selectivity and other challenges*. *Chem.Phys.Lipids* 121, 111-134. 2002.
- Schmid, P. C., Reddy, P. V., Natarajan, V., y Schmid, H. H. *Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type*. *J.Biol.Chem.* 258, 9302-9306. 1983.
- Schuitemaker, A., van der Doef, T. F., Boellaard, R., van der Flier, W. M., Yaqub, M., Windhorst, A. D., Barkhof, F., Jonker, C., Kloet, R. W., Lammertsma, A. A., Scheltens, P., y van Berckel, B. N. *Microglial activation in healthy aging*. *Neurobiol.Aging* 33, 1067-1072. 2012.
- Scotter, E. L., Abood, M. E., y Glass, M. *The endocannabinoid system as a target for the treatment of neurodegenerative disease*. *Br.J.Pharmacol.* 160, 480-498. 2010.

- Seidler, R. D., Bernard, J. A., Burutolu, T. B., Fling, B. W., Gordon, M. T., Gwin, J. T., Kwak, Y., y Lipps, D. B. *Motor control and aging: links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects*. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 34, 721-733. 2010.
- Serrano, F. y Klann, E. *Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus*. *Ageing Res.Rev.* 3, 431-443. 2004.
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., y Sabatini, B. L. *Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway*. *J.Neurosci.* 27, 2866-2875. 2007.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., y Selkoe, D. J. *Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory*. *Nat.Med.* 14, 837-842. 2008.
- Sheng, W. S., Hu, S., Min, X., Cabral, G. A., Lokensgard, J. R., y Peterson, P. K. *Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes*. *Glia* 49, 211-219. 2005.
- Simon, G. M. y Cravatt, B. F. *Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway*. *J.Biol.Chem.* 281, 26465-26472. 2006.
- Simpson, C. M., Itabe, H., Reynolds, C. N., King, W. C., y Glomset, J. A. *Swiss 3T3 cells preferentially incorporate sn-2-arachidonoyl monoacylglycerol into sn-1-stearoyl-2-arachidonoyl phosphatidylinositol*. *J.Biol.Chem.* 266, 15902-15909. 1991.
- Sinha, S. y Lieberburg, I. *Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 11049-11053. 1999.
- Sinor, A. D., Irvin, S. M., y Greenberg, D. A. *Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats*. *Neurosci.Lett.* 278, 157-160. 2000.
- Solas, M., Francis, P. T., Franco, R., y Ramirez, M. J. *CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer's disease patients*. *Neurobiol.Aging* 34, 805-808. 2013.
- Soto, C., Sigurdsson, E. M., Morelli, L., Kumar, R. A., Castano, E. M., y Frangione, B. *Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy*. *Nat.Med.* 4, 822-826. 1998.
- Sparling, P. B., Giuffrida, A., Piomelli, D., Roskopf, L., y Dietrich, A. *Exercise activates the endocannabinoid system*. *Neuroreport* 14, 2209-2211. 2003.
- Starowicz, K., Makuch, W., Korostynski, M., Malek, N., Slezak, M., Zychowska, M., Petrosino, S., De Petrocellis, L., Cristino, L., Przewlocka, B., y Di Marzo, V. *Full inhibition of spinal FAAH leads to TRPV1-mediated analgesic effects in neuropathic rats and possible lipoxygenase-mediated remodeling of anandamide metabolism*. *PLoS.One.* 8, e60040. 2013.
- Stella, N. *Endocannabinoid signaling in microglial cells*. *Neuropharmacology* 56, 244-253. 2009.
- Stella, N., Schweitzer, P., y Piomelli, D. *A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation*. *Nature* 388, 773-778. 1997.

- Stine, W. B., Jr., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A., y LaDu, M. J. *In vitro* characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J.Biol.Chem.* 278, 11612-11622. 2003.
- Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S., y Gokoh, M. *Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand.* *Prog.Lipid Res.* 45, 405-446. 2006.
- Sugiura, T., Kobayashi, Y., Oka, S., y Waku, K. *Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance.* *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 66, 173-192. 2002.
- Sugiura, T., Kodaka, T., Kondo, S., Nakane, S., Kondo, H., Waku, K., Ishima, Y., Watanabe, K., y Yamamoto, I. *Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca²⁺ transient in NG108-15 cells.* *J.Biochem.* 122, 890-895. 1997.
- Sugiura, T., Kodaka, T., Nakane, S., Miyashita, T., Kondo, S., Suhara, Y., Takayama, H., Waku, K., Seki, C., Baba, N., e Ishima, Y. *Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds.* *J.Biol.Chem.* 274, 2794-2801. 1999a.
- Sugiura, T., Kondo, S., Kishimoto, S., Miyashita, T., Nakane, S., Kodaka, T., Suhara, Y., Takayama, H., y Waku, K. *Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells.* *J.Biol.Chem.* 275, 605-612. 2000.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., y Waku, K. *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain.* *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 215, 89-97. 1995.
- Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y., Tokumura, A., y Hanahan, D. J. *Occurrence of lysophosphatidic acid and its alkyl ether-linked analog in rat brain and comparison of their biological activities toward cultured neural cells.* *Biochim.Biophys.Acta* 1440, 194-204. 1999b.
- Sun, Y. X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., y Ueda, N. *Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D.* *Biochem.J.* 380, 749-756. 2004.
- Tanimura, A., Yamazaki, M., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., Kawata, S., Abe, M., Kita, Y., Hashimoto, K., Shimizu, T., Watanabe, M., Sakimura, K., y Kano, M. *The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission.* *Neuron* 65, 320-327. 2010.
- Tapia-Arancibia, L., Aliaga, E., Silhol, M., y Arancibia, S. *New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease.* *Brain Res.Rev.* 59, 201-220. 2008.
- Tham, C. S., Whitaker, J., Luo, L., y Webb, M. *Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators.* *FEBS Lett.* 581, 2899-2904. 2007.

- Townsend, M., Shankar, G. M., Mehta, T., Walsh, D. M., y Selkoe, D. J. *Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers*. J.Physiol 572, 477-492. 2006.
- Tsutsumi, T., Kobayashi, T., Ueda, H., Yamauchi, E., Watanabe, S., y Okuyama, H. *Lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain synaptic plasma membranes*. Neurochem.Res. 19, 399-406. 1994.
- Ueda, H., Kobayashi, T., Kishimoto, M., Tsutsumi, T., y Okuyama, H. *A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain*. J.Neurochem. 61, 1874-1881. 1993.
- Ueda, N., Kurahashi, Y., Yamamoto, S., y Tokunaga, T. *Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide*. J.Biol.Chem. 270, 23823-23827. 1995.
- Ueda, N., Tsuboi, K., y Uyama, T. *Metabolism of endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines: canonical and alternative pathways*. FEBS J. 280, 1874-1894. 2013.
- Ueda, N., Yamanaka, K., y Yamamoto, S. *Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance*. J.Biol.Chem. 276, 35552-35557. 2001.
- Uranga, R. M., Giusto, N. M., y Salvador, G. A. *Effect of transition metals in synaptic damage induced by amyloid beta peptide*. Neuroscience 170, 381-389. 2010.
- van der Stelt, M., Veldhuis, W. B., Maccarrone, M., Bar, P. R., Nicolay, K., Veldink, G. A., Di Marzo, V., y Vliegenthart, J. F. *Acute neuronal injury, excitotoxicity, and the endocannabinoid system*. Mol.Neurobiol. 26, 317-346. 2002.
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D., y Sharkey, K. A. *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. Science 310, 329-332. 2005.
- Vara, D., Salazar, M., Olea-Herrero, N., Guzman, M., Velasco, G., y Diaz-Laviada, I. *Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy*. Cell Death.Differ. 18, 1099-1111. 2011.
- Velez-Pardo, C., Jimenez-Del-Rio, M., Lores-Arnaiz, S., y Bustamante, J. *Protective effects of the synthetic cannabinoids CP55,940 and JWH-015 on rat brain mitochondria upon paraquat exposure*. Neurochem.Res. 35, 1323-1332. 2010.
- Viani, P., Cervato, G., Fiorilli, A., y Cestaro, B. *Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties*. J.Neurochem. 56, 253-258. 1991.
- Viscomi, M. T., Oddi, S., Latini, L., Pasquariello, N., Florenzano, F., Bernardi, G., Molinari, M., y Maccarrone, M. *Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway*. J.Neurosci. 29, 4564-4570. 2009.
- Viso, A., Cisneros, J. A., y Ortega-Gutierrez, S. *The medicinal chemistry of agents targeting monoacylglycerol lipase*. Curr.Top.Med.Chem. 8, 231-246. 2008.

- Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., y Teplow, D. B. *Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate*. J.Biol.Chem. 272, 22364-22372. 1997.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Moller, T., y Stella, N. *Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides*. J.Biol.Chem. 277, 20869-20876. 2002.
- Wang, J. y Ueda, N. *Role of the endocannabinoid system in metabolic control*. Curr.Opin.Nephrol.Hypertens. 17, 1-10. 2008.
- Watson, S. J., Benson, J. A., Jr., y Joy, J. E. *Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report*. Arch.Gen.Psychiatry 57, 547-552. 2000.
- Westlake, T. M., Howlett, A. C., Bonner, T. I., Matsuda, L. A., y Herkenham, M. *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. 1994.
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., y Delon, M. R. *Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain*. Science 215, 1237-1239. 1982.
- Witting, A., Walter, L., Wacker, J., Moller, T., y Stella, N. *P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 101, 3214-3219. 2004.
- Wood, S. J., Maleeff, B., Hart, T., y Wetzel, R. *Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide A β* . J.Mol.Biol. 256, 870-877. 1996.
- Woodward, D. F., Carling, R. W., Cornell, C. L., Fliri, H. G., Martos, J. L., Pettit, S. N., Liang, Y., y Wang, J. W. *The pharmacology and therapeutic relevance of endocannabinoid derived cyclo-oxygenase (COX)-2 products*. Pharmacol.Ther. 120, 71-80. 2008.
- Yates, M. L. y Barker, E. L. *Inactivation and biotransformation of the endogenous cannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol*. Mol.Pharmacol. 76, 11-17. 2009.
- Zanettini, C., Panlilio, L. V., Alicki, M., Goldberg, S. R., Haller, J., y Yasar, S. *Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior*. Front Behav.Neurosci. 5, 57. 2011.
- Zuccato, C. y Cattaneo, E. *Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases*. Nat.Rev.Neurol. 5, 311-322. 2009.

TRABAJOS PUBLICADOS

- ✓ **Pascual, A.C.[#]**, Gaveglio, V.L.[#], Giusto, N.M. y Pasquaré, S.J. (2013). "Aging modifies the enzymatic activities involved in 2-arachidonoylglycerol metabolism".
[#]Estos autores contribuyeron igualmente en el presente trabajo. *Biofactors*, 2013, vol. 39, 209-220.

- ✓ **Pascual, A.C.**, Gaveglio, V.L., Giusto, N.M. y Pasquaré, S.J. (2014). "Cannabinoid receptor-dependent metabolism of 2-arachidonoylglycerol during aging". *Experimental Gerontology*, 2014, vol. 55, 134-142.

- ✓ **Pascual, A.C.**, Martín-Moreno, A.M., Giusto, N.M., de Ceballos, M.L. y Pasquaré, S.J. (2014). "Normal aging in rats and pathological aging in human Alzheimer's disease decrease FAAH activity: Modulation by cannabinoid agonists". *Experimental Gerontology*, 2014, vol. 60, 92-99.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

- 1) Gaveglio, V.L., **Pascual, A.C.**, Giusto, N.M., Pasquaré, S.J. “Efecto del envejecimiento en la metabolización de endocannabinoides en sinaptosomas de corteza cerebral de rata”. I Jornadas Bioquímicas del Sudoeste Bonaerense, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. 4-5 de Diciembre de 2009. *Científica*, vol. 19 (Supl.I): p. 15.
- 2) **Pascual, Ana C.**, Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. “Modulación farmacológica del metabolismo de 2-araquidonoilglicerol en sinaptosomas de corteza cerebral de rata durante el envejecimiento”. LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 17-20 de Noviembre de 2010. *Medicina*, vol. 70 (Supl.II)-2010: p. 116-117.
- 3) **Pascual, Ana C.**, Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. “Aged-related changes in endocannabinoid hydrolysis in rat cerebral cortex synaptosomes”. XLVII Reunión Anual de la Sociedad de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. 30 de Octubre - 2 de Noviembre de 2011. *BIOCELL*, vol. 35 (Supl. 2011): p. 127.
- 4) **Pascual, Ana C.**, Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. “Efectos del envejecimiento en el metabolismo de 2-araquidonoilglicerol en fracciones de membrana y soluble de corteza cerebral de rata”. LVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 16-19 de Noviembre de 2011. *Medicina*, vol. 71 - (Supl. III)- 2011: p.224.
- 5) **Pascual, Ana C.**, Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. “Endocannabinoid 2-AG metabolism in rat cerebral cortex during physiological aging”. Workshop “Frontiers in BioScience” organizado entre el MINCYT y la MAX PLANCK. Polo Científico Tecnológico, Buenos Aires, Argentina. 22-25 de Abril de 2012.
- 6) **Pascual, Ana C.**, Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. “Metabolismo del endocannabinoid 2-AG en corteza cerebral de rata en el envejecimiento fisiológico”. V Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 10-11 de Julio de 2012. *Libro de Resúmenes*, pág. 34.

- 7) **Pascual, Ana C.**, Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. "Endocannabinoid 2-AG metabolism in rat cerebral cortex during physiological aging". 5th Special Conference of the International Society for Neurochemistry. Synapses and dendritic spines in health and disease, Buenos Aires, Argentina. 12-15 de Septiembre de 2012. *Journal of Neurochemistry* (JNC), vol. 122 (Supl. 1)- 2012: p. 24.
- 8) **Pascual, Ana C.**, Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. "Aged-related changes in 2-AG metabolism enzymes expression and activity in rat cerebral cortex". XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mendoza, Argentina. 29 de Octubre- 1 de Noviembre de 2012. *BIOCELL*, vol. 36 (Supl. 2012): p. 109
- 9) **Pascual, Ana C.**, Gaveglio, Virginia L., Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. "The enzymatic activities involved in 2-AG hydrolysis are regulated by cannabinoid receptors during aging". Gordon Research Seminar: Cannabinoid Function in the CNS, Waterville Valley, NH, Estados Unidos. 3-4 de Agosto de 2013.
- 10) **Pascual, Ana C.**, Gaveglio, Virginia L., Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. "The enzymatic activities involved in 2-AG hydrolysis are regulated by cannabinoid receptors during aging". Gordon Research Conference: Cannabinoid Function in the CNS, Waterville Valley, NH, Estados Unidos. 4-9 de Agosto de 2013. Trabajo premiado como mejor póster.
- 11) Gaveglio, Virginia L., **Pascual, Ana C.**, Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. "Regulation of Phosphatidic Acid metabolism by different nuclear agonists in isolated nuclei from rat cerebellum". International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL). Bari, Italia. 17-21 de Septiembre de 2013.
- 12) **Pascual, Ana C.**, Gaveglio, Virginia L., Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. "El metabolismo del endocannabinoide 2-AG en sinaptosomas de ratas seniles es regulado por agonistas y/o antagonistas de receptores cannabinoides". LVIII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 20-23 de Noviembre de 2013. *Medicina*, vol. 73-(Supl. III)- 2013: p. 81. Trabajo seleccionado para ser presentado al premio Eduardo Soto.
- 13) **Pascual, Ana C.**, Gaveglio, Virginia L., Giusto, Norma M. y Pasquaré, Susana J. "Anandamide hydrolysis is modulated by cannabinoid receptors in aged rat cerebral cortex". L Reunión Anual de la Sociedad de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario, Argentina. 11-14 de Noviembre de 2014. *BIOCELL*, vol. 38 (Supl. 2)-2014: p. 157.

ABREVIATURAS

[³ H]2-AG	(2-araquidonoil-[³ H]glicerol)
[³ H]AEA	(anandamida, [³ H]etanolamina)
[³ H]DAG	([³ H]diacilglicerol)
[³ H]MAG	([³ H]monoacilglicerol)
[³ H]PC	([³ H]fosfatidilcolina)
[³ H]TAG	([³ H]triacilglicerol)
2-AG	(2-araquidonoilglicerol)
12-LOX	(12-lipooxigenasa)
A	(acetona)
AA	(ácido araquidónico)
ABHD4	(serina hidrolasa con dominios α/β 4)
ABHD6	(serina hidrolasa con dominios α/β 6)
ABHD12	(serina hidrolasa con dominios α/β 12)
AC	(ceramidasa ácida)
AcAc	(ácido acético)
AEA	(anandamida/araquidonoiletanolamida)
AGL	(ácido/s graso/s libre/s)
AMP	(adenosina 5'-monofosfato)
AMT	(transportador de membrana de la anandamida)
APP	(proteína precursora de amiloide)
BDNF	(factor neurotrófico derivado del cerebro)
β A	(β -amiloide)
bis-MSD	(1,4-bis(2-metilestiril)benceno)
BSA	(albúmina sérica bovina)
C	(cloroformo)
CB1R	(receptor cannabinoide CB1)
CB2R	(receptor cannabinoide CB2)
CBR	(receptor/es cannabinoide/s)
CC	(corteza cerebral)
Cocult	(cocultivo de neurona y glía)
COX-2	(ciclooxigenasa-2)

CREB	(elemento de respuesta a adenosina 5'-monofosfato cíclico)
DAG	(diacilglicerol/es)
DAGL	(diacilglicerol lipasa)
DCF	(2',7'-diclorofluoresceína)
DMSO	(dimetilsulfóxido)
dpm	(desintegraciones por minuto)
DTT	(ditiotreitól)
E	(éter etílico)
EA	(Enfermedad de Alzheimer)
EDTA	(ácido etiléndiamino tetraacético)
FAAH	(ácido graso amidohidrolasa)
FAME	(metil ésteres de ácidos grasos)
FMit	(fracción mitocondrial)
FN	(fracción nuclear)
FST	(fase superior teórica)
G3P	(glicerol-3-fosfato)
GABA	(ácido gamma-aminobutírico)
GDE1	(glicerofosfodiéster fosfodiesterasa 1)
GLC	(cromatografía en fase gaseosa)
Glu	(glutamato)
GPCR	(receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a proteína G)
H	(hexano)
HEPES	(N-(2-hidroxietyl) piperazina-N'-2- ácido etanosulfónico)
hr	(hora/s)
HRP	(peroxidasa de rábano)
HT	(homogenado total)
JWH-133/JWH	((6aR,10aR)-3-(1,1-dimetilbutil)-6a,7,10,10a-tetrahidro-6,6,9-trimetil-6H-dibenzo[b,d]pirano)
KML-29	(1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-il 4-(bis(benzo[d][1,3]dioxol-5-il) (hidroxi) metil) piperidina-1-carboxilato)
Linfo	(linfocitos humanos)
LN	(lípidos neutros)
LPA	(lisofosfatidato)

LPAasa	(lisofosfatidato fosfohidrolasa)
LPA-PLasa	(lisofosfatidato fosfolipasa A)
LPC	(lisofosfatidilcolina)
M	(metanol)
MAG	(monoacilglicerol/es)
MAGL	(monoacilglicerol lipasa)
MAPK	(proteína quinasa activada por mitógenos)
Memb	(fracción de membrana)
MET	(microscopía electrónica de transmisión)
min	(minuto/s)
MOPS	(3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico)
NAAA	(amidasa ácida que hidroliza N-acetiletanolaminas)
NAE	(N-aciletanolamina/s)
NAPE	(N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina/s)
NAPE-PLD	(N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D)
NEM	(N-etilmaleimida)
NO	(óxido nítrico)
NOS	(óxido nítrico sintasa)
PA	(fosfatidato)
p/v	(peso/volumen)
pAEA	(fosfo-anandamida)
PBS	(<i>buffer</i> fosfato salino)
PC	(fosfatidilcolina)
PE	(fosfatidiletanolamina/s)
PI	(fosfatidilinositol)
Pi	(fósforo)
PIP ₂	(fosfatidilinositol 4,5-bifosfato)
PLA1	(fosfolipasa A de tipo 1)
PLA2	(fosfolipasa A de tipo 2)
PLC	(fosfolipasa C)
PLD	(fosfolipasa D)
PMSF	(fenilmetilsulfonil fluoruro)
PPO	(2,5-difeniloxazol)
PS	(fosfatidilserina)

PVDF	(polivinilidenofluoruro)
ROS	(especies reactivas del oxígeno)
rpm	(revoluciones por minuto)
SDS	(dodecilsulfato de sodio)
SDS-PAGE	(electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)
SEM	(error estándar de la media)
SIDA	(síndrome de inmunodeficiencia adquirida)
Sin	(fracción sinaptosomal/sinaptosomas)
SNC	(sistema nervioso central)
Sol	(fracción soluble)
SPMic	(sobrenadante postmicrosomal)
SPMit	(sobrenadante postmitocondrial)
SR141716/SR1	(N-(Piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida)
SR144528/SR2	(N-[(1S)-endo-1,3,3-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-il]-5-(4-cloro-3-metilfenil)-1-[(4-metilfenil)metil]-1H-pirazol-3-carboxamida)
TEMED	(N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina)
THC	(9-tetrahidrocannabinol)
TLC	(cromatografía en capa fina)
Tris	(tris(hidroximetil)aminometano)
Triton X-100	(éter mono[p-(1, 1, 3, 3-tetrametilbutil) fenílico] del polietilenglicol)
TRPV1	(receptor vainilloide de tipo 1)
Tween	(polioxietileno sorbitan monolaurato)
URB-597	((3'-(aminocarbonil)[1,1'-bifenil]-3-il)-ciclohexilcarbamato)
URB-602	([1,1'-bifenil]-3-il-ácido carbámico ciclohexil ester)
v/v	(volumen/volumen)
WB	(<i>Western Blot</i>)
WIN55212-2/WIN	((R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naftalenilmetanona mesilato)