



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

**PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
COMO MODULADOR DE PROCESOS INFLAMATORIOS EN
EL HIPOTÁLAMO EN CONDICIONES DE ENDOTOXEMIA**

Berra, Federico Alejandro
Libreta Universitaria: 1043425
Licenciatura en Biotecnología

Tutor:
Dr. Fernández Solari, Javier
Departamento de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de
Buenos Aires

Co-Tutor:
Dr. Prada, Federico
Universidad Argentina de la Empresa

Colaborador:
Lic. Surkin, Pablo Nicolás, UBA.

Tesis para optar por el título de Licenciado en Biotecnología Realizada en:



Buenos Aires, 1 de junio de 2017

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	4
1.1 Objetivos	4
1.2 Relevancia del proyecto	5
1.3 Descripción de la estructura del informe	5
2 Antecedentes	7
2.1 Sistema Endocannabinoide	7
2.2 Cannabinoides	8
2.3 Receptores de Cannabinoides	9
2.3.1 Receptores clásicos: CB1 y CB2	9
2.3.2 TRPV1	11
2.3.3 Otros receptores	14
2.4 Endocannabinoides	15
2.4.1 Localización y características farmacológicas de los eCBs	15
2.4.2 Biosíntesis y metabolismo de los eCBs	17
2.5 Perspectivas terapéuticas asociadas al SEC	20
2.6 Inflamación	21
2.6.1 Mediadores inflamatorios	22
2.6.1.1 Factor de Necrosis tumoral alfa	23
2.6.1.2 Prostaglandina E2	23
2.7 Neuroinflamación	26
2.7.1 Respuesta inmune innata en el SNC	27
2.7.2. Rol de los cannabinoides en neuroinflamación	29
2.7.3 Interacción entre cannabinoides y los TLRs.	31
2.7.4 Impacto de la activación de los TLRs sobre el SEC.	33
3.0 Hipótesis	35
4. Materiales y métodos	36
4.1 Animales	36

4.2 Drogas	36
4.3 Experimentos <i>in vivo</i>	36
4.3.1 Técnica de cirugía estereotáxica.....	37
4.3.2 Tratamientos	39
4.3.3 Obtención de muestras	40
4.4 Determinaciones	40
4.4.1 Determinación de prostaglandina E2	40
4.4.2 Determinación de TNF α	41
4.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.	41
4.4.3.1 Extracción del ARNm	42
4.4.3.2 Obtención del ADNc	43
4.4.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	43
4.4.3.4 Detección de la amplificación	45
4.5 Evaluación estadística de los resultados.....	45
5. Resultados	46
A - Participación del SEC en la producción de mediadores inflamatorios.	46
5.1 Determinación de la concentración plasmática e hipotalámica de TNF α en respuesta a la endotoxemia y al control farmacológico del SEC.	46
5.2 Determinación de la concentración hipotalámica de prostaglandina E2 en respuesta a la endotoxemia y al control farmacológico del SEC.....	49
B - Estudio de la expresión del ARNm de los receptores CB2 y TRPV1 en respuesta a la endotoxemia y al control farmacológico del SEC.....	50
6. Discusión.....	53
7. Conclusión.....	62
8. Bibliografía.....	63
9. Anexos.....	74
Anexo A - Descubrimiento del Sistema Endocannabinoide	74
Anexo B - Mecanismos de transducción de señales de los receptores CB1	77
Anexo C - Vías de señalización de TNF α	79
Anexo D - Vías de señalización de TLR4.....	82

Anexo E - Usos experimentales de elementos del SEC para potenciales terapias frente a desordenes neurológicos.....	84
Anexo F – Protocolo de RIA para Prostaglandina E ₂	86
Anexo G – Protocolo de ELISA para TNF α	89
Anexo H - Resultados complementarios obtenidos por el grupo de trabajo.	91

Resumen

La neuroinflamación es una respuesta inmune innata (RII) del Sistema Nervioso Central (SNC) frente a estímulos nocivos como patógenos, residuos metabólicos tóxicos o estrés crónico, que aparecen como consecuencia de un trauma, infecciones o enfermedades neurodegenerativas. Los principales tipos celulares que contribuyen a la RII en el SNC son la microglia y los astrocitos. Estas células supervisan el ambiente próximo a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores no sólo reconocen patrones moleculares asociados a patógenos exógenos (PAMPs), sino también moléculas endógenas modificadas, llamados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Después de su activación, el sistema inmune innato genera respuestas inflamatorias y reguladoras a fin de contrarrestar la infección, la lesión y contribuir al correcto mantenimiento de la homeostasis del tejido. Aunque su función original es neuroprotectora, cuando es excesiva, la RII puede promover la aparición de procesos patológicos. A modo de ejemplo, durante la activación crónica del sistema inmune existe una exposición prolongada de las neuronas a mediadores proinflamatorios que puede causar disfunción neuronal y provocar muerte celular.

El sistema endocannabinoide (SEC) es considerado un importante neuromodulador involucrado en numerosos procesos fisiopatológicos. Si bien existen numerosos estudios que demuestran la participación del SEC en procesos inflamatorios, no todos concluyen que sus efectos tienden a recuperar la homeostasis frente a la instalación de procesos fisiopatológicos. Algunos trabajos han evidenciado los efectos antiinflamatorios del SEC, mientras que otros indican que su activación conlleva a una exacerbación de la inflamación.

Con el objetivo de determinar la participación del SEC como modulador de procesos inflamatorios en el hipotálamo, se implementó un modelo experimental en el cual se sometieron a ratas macho adultas al bloqueo farmacológico de receptores hipotalámicos de cannabinoides mediante una inyección intra-cerebro-ventricular de sus respectivos antagonistas, y a una condición de endotoxemia a través de la administración intraperitoneal de lipopolisacáridos (LPS). En las mencionadas condiciones experimentales, se determinaron las concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y prostaglandina E2 (PGE2), y se midieron los niveles de expresión de RNAm del receptor de cannabinoides tipo 2 (CB2) y del receptor vanilloide de potencial transitorio tipo 1 (TRPV1).

Los resultados obtenidos en esta Tesina sugieren que el SEC hipotalámico participa en los mecanismos alostáticos inducidos por activación del sistema inmune, los cuales intentan controlar los niveles de mediadores inflamatorios con el objetivo de combatir la infección sin dañar los tejidos del huésped. Por otro lado, los resultados indican que la activación del receptor CB1 hipotalámico previene una excesiva respuesta inmune, mientras que la estimulación de los TRPV1 produce una exacerbación de la inflamación.

Abstract

It is known that neuroinflammation is an innate immune response (IIR) of the Central Nervous System (CNS) to harmful stimuli as pathogens, toxic metabolic residues or chronic stress, which appears in cases of trauma, infections or neurodegenerative diseases. The main cells contributing to the IIR in the CNS are the microglia and astrocytes. These cells supervise the environment by pattern recognition receptors (PRRs), which recognize not only pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), but also endogenous modified molecules, named damage-associated molecular patterns (DAMPs). After its activation, the innate immune system induces inflammatory and regulatory responses to maintain homeostasis by counteracting the lesion and the infection. Although its primordial function is neuroprotective, when the IIR is excessive, it can promote pathological processes.

The endocannabinoid system (SEC) is an important neuromodulator involved in plenty physiopathological processes. Although several studies show SEC participation on inflammatory processes, their results are not conclusive with regard to their possible pro homeostatic role, since some reports indicate anti-inflammatory effects of the SEC, while others indicate that its activation enhances inflammation.

To determine the participation of the SEC as a modulatory factor on inflammatory hypothalamic processes, an experimental model in adult rats was performed, involving pharmacological blockade of cannabinoid hypothalamic receptors by intracerebro-ventricular administration of its antagonists. The rats were also subjected to endotoxemia by an intraperitoneal administration of lipopolysaccharides (LPS). Tumor necrosis factor (TNF α) and prostaglandin E2 (PGE2) concentrations were determined in those experimental conditions, followed by evaluation of mRNA expression of cannabinoid receptor type 2 (CB2) and vanilloid transient receptor potential (TRPV1).

Results suggest that the hypothalamic SEC participates in allostatic mechanisms induced by immune system activation, by controlling inflammation in order to fight against infection without causing host tissue damage. Particularly, results indicate that hypothalamic CB1 activation prevents an excessive immune response, while TRPV1 activation enhances.

1. Introducción

1.1 Objetivos

El objetivo general de la Tesis es reconocer el papel del sistema endocannabinoide (SEC) ante el desarrollo de procesos inflamatorios que se desencadenan en el sistema nervioso central (SNC) a partir de una endotoxemia inducida por LPS en ratas macho adultas.

Muchas de las patologías asociadas a neuroinflamación se producen por una respuesta exacerbada del sistema inmune innato, existiendo simultáneamente una desregulación en algunos elementos del SEC. Diversos resultados indican que, en general, el SEC actúa mediante mecanismos alostáticos con el objetivo de atenuar la respuesta inflamatoria local; sin embargo, dependiendo el modelo utilizado, el tipo de fármacos empleados, y la duración del estímulo, se han reportado resultados diversos y contradictorios. Basándose en estos antecedentes, hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

A- Determinar la participación del SEC hipotalámico en la producción de mediadores inflamatorios.

Se ha reportado que los cannabinoides pueden actuar sobre las neuronas y glía interfiriendo en la liberación de moléculas tanto pro-inflamatorias (IL-1, TNF α y NO) como anti-inflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-1ra), eventos que en conjunto determinan el resultado global de la respuesta inflamatoria. Por lo antedicho, se decidió determinar específicamente:

- 1- La concentración plasmática e hipotalámica de TNF α en respuesta a la endotoxemia y al control farmacológico del SEC.
- 2- La concentración hipotalámica de prostaglandina E2 en respuesta a la endotoxemia y al control farmacológico del SEC.

B- Estudiar la expresión del ARNm de los receptores CB2 y TRPV1 en el hipotálamo en respuesta a la endotoxemia y al bloqueo farmacológico del CB1.

Los cannabinoides conducen sus efectos a través de receptores específicos, sin embargo, tienen la capacidad de estimular otros receptores de los cuales no son ligandos específicos. La acción sobre una u otra vía depende de la cantidad y disponibilidad de los distintos receptores,

que pueden conducir a respuestas diferentes e incluso opuestas. De esta forma, bloqueando farmacológicamente un tipo específico de receptor, pueden identificarse vías alternativas por las cuales los cannabinoides median sus acciones, y al relacionarlas con un aumento o descenso en los marcadores inflamatorios, se puede hipotetizar acerca de su rol en los procesos correspondientes.

1.2 Relevancia del proyecto

Existe una vasta evidencia que indica que los cannabinoides pueden modular respuestas inflamatorias. Sin embargo, las vías de señalización o mecanismos por los cuales el SEC interactúa con el sistema inmune (en especial el sistema inmune innato) no han sido establecidos con claridad. Debido a que se expresan en diversas regiones del cerebro, y en terminaciones neuronales tanto excitatorias como inhibitorias, los cannabinoides y sus receptores están siendo investigados actualmente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis múltiple y epilepsia (Infante-Duarte *et al*, 2008). Estos trastornos son un grupo heterogéneo de condiciones patológicas que presentan una etiología diferente dependiendo de la localización en la que se produzca la pérdida neuronal, por lo que se requiere de un modelo experimental específico para estudiar cada una de ellas.

En el presente proyecto se estudia una porción específica del SNC como es el hipotálamo, por lo que los resultados del mismo podrían ser de utilidad, especialmente, en futuros estudios que contemplen al SEC como blanco terapéutico para paliar trastornos producidos como consecuencia de las condiciones inflamatorias en ese órgano en particular, un campo que aún no fue del todo desarrollado. No obstante, y teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, también podrían ser de utilidad en cualquier investigación que relacione una patología neurodegenerativa con el SEC y el sistema inmune innato.

1.3 Descripción de la estructura del informe

El proyecto se encuentra compuesto por las siguientes secciones:

Antecedentes: Se presentan trabajos previos que describen al SEC y lo vinculan con procesos neuroinflamatorios, proporcionando la evidencia que soporta las hipótesis planteadas.

Hipótesis: Teniendo en cuenta las evidencias presentadas por trabajos previos, se plantean las hipótesis sobre el rol del SEC en procesos inflamatorios en el SNC, particularmente en el hipotálamo.

Metodología: Se describe el abordaje experimental y todas las técnicas utilizadas en el proyecto, a fin de permitir juzgar la capacidad y rigurosidad de los experimentos realizados.

Resultados: Se describen los resultados obtenidos.

Discusión: Se discuten las interpretaciones posibles de los resultados obtenidos y su relevancia directa y potencial, basándose en resultados previos comentados en la introducción.

Conclusión: Se presentan las conclusiones que se pueden generar en base a la evidencia experimental obtenida.

Anexos: Se presenta información adicional del estado del arte, y se detallan procedimientos específicos a fin de proporcionar protocolos experimentales reproducibles.

2 Antecedentes

2.1 Sistema Endocannabinoide

El sistema endocannabinoide es un sistema de señalización complejo que interviene en múltiples procesos biológicos y que actúa como un modulador de amplio espectro. Este sistema está compuesto de receptores específicos e inespecíficos de cannabinoides, sus ligandos endógenos, conocidos como endocannabinoides, las enzimas que catalizan su síntesis y degradación y las moléculas transportadoras responsables de su captación celular. Sus componentes utilizan los mecanismos biológicos básicos de transducción de señales, y mediante numerosas interacciones, son capaces de regular la fisiología del sistema nervioso central (SNC) y del periférico. Dado el amplio espectro de vías de señalización que puede modular, y la diversidad de tejidos y órganos en los que tiene actividad, este sistema está implicado en diversos procesos importantes en el desarrollo embrionario y en la vida postnatal como son: la plasticidad y el desarrollo neuronal (Di Marzo *et al*, 1998; Schilker *et al*, 2001), el aprendizaje (Goodman y Packard, 2015) y la memoria (Drumond *et al*, 2016), el ciclo de sueño-vigilia (Prospéro-García *et al*, 2016), el destino celular (proliferación, diferenciación, apoptosis) (Guzman *et al*, 2002), la nocicepción (Woodhams *et al*, 2015), inflamación (Turcotte *et al*, 2015), regulación del apetito (Kirkham *et al*, 2002), digestión (Di Carlo *et al*, 2003), el metabolismo (Mazier *et al*, 2015), el equilibrio energético (Pagotto *et al*, 2006), la termogénesis (Mahmmoud y Gaster, 2012), la reproducción (Maccarrone *et al*, 2015), la regulación del estrés (Hillard *et al*, 2016), las emociones (Korem *et al*, 2016), y la adicción (Sagheddu *et al*, 2015). Esta amplia participación en tales procesos vitales hace que sea un blanco atractivo para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas.

Mientras que los principales sistemas neurotransmisores fueron descubiertos varias décadas atrás, el SEC permaneció inadvertido hasta los principios de los años 90. Esto se debió, en parte, a la falta de trabajos de investigación sobre los principios activos de la planta *Cannabis sativa*, dificultados por cuestiones legales. De hecho, los principales cannabinoides no fueron aislados, ni sus estructuras dilucidadas, hasta mediados de los años 60. Para más información acerca del descubrimiento del SEC, revisar anexo A.

2.2 Cannabinoides

La única especie del reino vegetal conocida que produce cannabinoides es la *Cannabis* spp., cuyas variedades *indica* y *americana* son las más comunes. En esta planta se han identificado entre 200 y 250 sustancias, de las cuales más de 70 son cannabinoides (Pertwee, 2008). Se caracterizan por tener una estructura carbocíclica con 21 carbonos formados, generalmente, por tres anillos: un ciclohexeno, un tetrahidropirano y benceno. Los tres más abundantes son el Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (Δ^9 THC, 0.014-21.06mg/g planta), el Cannabinol (CBN, 0.0002-0.350mg/g planta) y el Cannabidiol (CBD, 0.03-29.6 mg/g planta) (Tsatsakis, 2000). Muchas de las propiedades farmacológicas y efectos adversos del Δ^9 THC pueden ser atribuidos a su alta liposolubilidad, que conlleva una rápida absorción y acumulación en la membrana celular, causando cambios en la fluidez de la misma (Makriyannis *et al*, 1984).

Los cannabinoides fueron considerados inicialmente como compuestos del tipo C21 presentes en el *Cannabis sativa*. Actualmente, bajo el término "cannabinoides" se agrupan numerosas sustancias con estructuras químicas diferentes pero que tienen en común la capacidad de actuar a nivel de algunos de los elementos constituyentes del SEC. Con el objetivo de diferenciarlos, se decidió denominar "fitocannabinoides" a los procedentes de la planta, "endocannabinoides" (eCBs) a los ligandos endógenos producidos por invertebrados y vertebrados, y "cannabinoides sintéticos" a los desarrollados artificialmente en el laboratorio (Fig. 1).

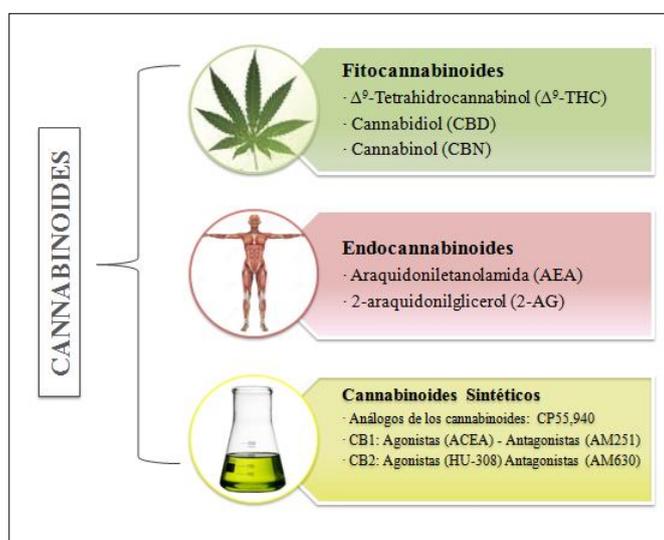


Figura 1. Clasificación de los cannabinoides y compuestos relacionados. Los distintos cannabinoides se clasifican según su origen en fitocannabinoides, endocannabinoides o sintéticos.

2.3 Receptores de Cannabinoides

2.3.1 Receptores clásicos: CB1 y CB2

Los receptores CB1 y CB2 pertenecen a la gran superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Consisten en una única cadena polipeptídica con siete dominios de α -hélices transmembrana conectadas por tres *loops* intracelulares (i1-i3) y tres extracelulares (e1-e3); poseen el C-terminal del lado intracelular, y el N-terminal glicosilado del lado extracelular (Fig. 2). Se acoplan principalmente a proteínas Gi/o, aunque también se ha descrito que en algunas situaciones pueden señalar vía proteínas Gs/Gq (Mackie, 2008; Galve-Roperh *et al*, 2013).

El receptor CB1 es el encargado de regular los efectos psicoactivos de los cannabinoides (Devane *et al*, 1988) y, de hecho, se encuentra principalmente en la membrana presináptica de las neuronas, modulando la liberación de algunos neurotransmisores, como dopamina, noradrenalina, glutamato, GABA y serotonina (Ishac *et al*, 1996).

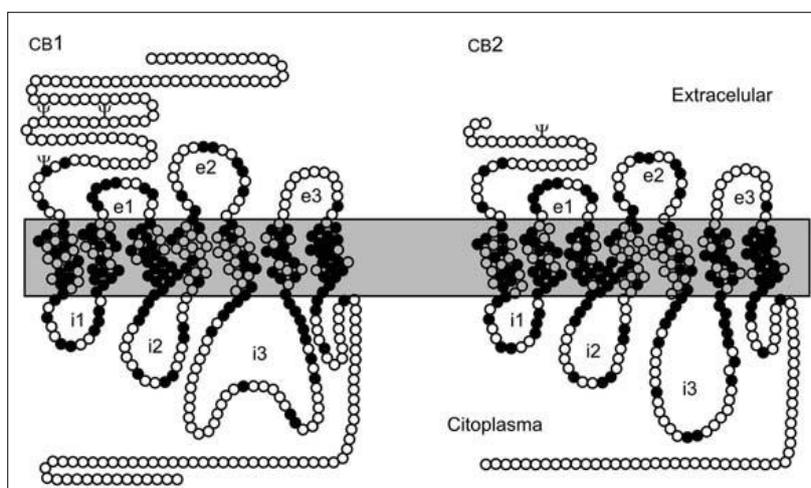


Figura 2. Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2. Círculos negros representan aminoácidos comunes a los dos receptores, correspondientes al 44% de homología. Fuente: Maldonado, 2010.

Debido a que se encuentran en varios tejidos del cuerpo, y pueden interactuar con distintos ligandos, se han descrito una gran variedad de efectos producidos por la activación de estos receptores. Se ha observado que los CB1 actúan a través de la modulación de adenilato ciclasa (AC), inhibición de canales de calcio sensibles a voltaje, regulación de cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos, activación de canales rectificadores de potasio, modulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} , interacción con óxido nítrico y generación

de ceramida. Para más información acerca de las vías de transducción de señales, revisar anexo B.

La función del receptor CB2 está a menudo relacionada con la de CB1 aunque sus secuencias proteicas solo presentan un 44% de homología. Su estimulación inhibe la actividad de AC y es capaz de activar MAPK de una manera similar a CB1 (Felder *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 2001). La principal diferencia entre ambos a nivel de transducción de señales, es que la activación de CB2 no produciría una modificación en las corrientes de Ca^{2+} y K^{+} (Felder *et al.*, 1995; McAllister *et al.*, 1999). Una de las funciones más importantes de CB2 a nivel fisiológico se corresponde a su interacción con el sistema inmune. Luego de varios estudios donde se utilizaron fármacos selectivos en ratones CB2^{+/+} y CB2^{-/-}, se estableció que los receptores CB2 tienen la capacidad de controlar la activación y migración de las células inmunes y, por lo tanto, son reguladores clave de las respuestas inflamatorias (Malan *et al.*, 2003; Whiteside *et al.*, 2007).

Naturalmente, sólo los tejidos del organismo que poseen receptores específicos para cannabinoides (CBRs) son blanco de la acción de estos compuestos. El receptor CB1 ha sido clonado en rata (Matsuda *et al.*, 1990), ratón (Chakrabarti *et al.*, 1995; Abood *et al.*, 1995), gato (Gebremedhin *et al.*, 1999) y humano (Gerard *et al.*, 1991); y otros vertebrados como las aves (Soderstrom *et al.*, 2001), anfibios (Soderstrom *et al.*, 2000) y peces (Yamaguchi *et al.*, 1996). En mamíferos es especialmente abundante en áreas del SNC implicadas en el control de la actividad motora (cerebelo), memoria y aprendizaje (corteza, hipocampo, sustancia negra), percepción sensorial (tálamo) y diversas funciones autónomas y endocrinas (hipotálamo, médula) (Herkenham *et al.*, 1991; Tsou *et al.*, 1998; Ong y Macke, 1999; Moldrich y Wenger, 2000) (Fig. 3b). Se ha detectado también en astrocitos (Bouaboula *et al.*, 1995) y en células de la microglía (Sinha *et al.*, 1998; Waksman *et al.*, 1999). En menor medida, se expresan en tejidos periféricos y se ha encontrado en el tracto gastrointestinal (Pertwee 2001; Izzo *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2002) y glándulas salivales (Prestifilippo *et al.*, 2006), la vejiga urinaria (Pertwee *et al.*, 1996), pulmón (Rice *et al.*, 1997), algunos tejidos inmunes como el bazo (Schatz *et al.*, 1997) y el timo (Galiegue *et al.*, 1995), órganos endocrinos como tiroides (Porcella *et al.*, 2002), la glándula suprarrenal (Buckley *et al.*, 1998), testículo (Gerard *et al.*, 1991; Wenger *et al.*, 2001), ovario (Galiegue *et al.* 1995; Buckley *et al.*, 1998), en otros tejidos reproductivos como útero (Ruiz-Llorrente *et al.*, 2003) y próstata (Gerard *et al.*, 1991) (Fig 3a). En las regiones periféricas,

su activación contribuye a la regulación de la motilidad intestinal, fertilidad, termogénesis, metabolismo, diferenciación de mioblastos y protección del sistema cardíaco.

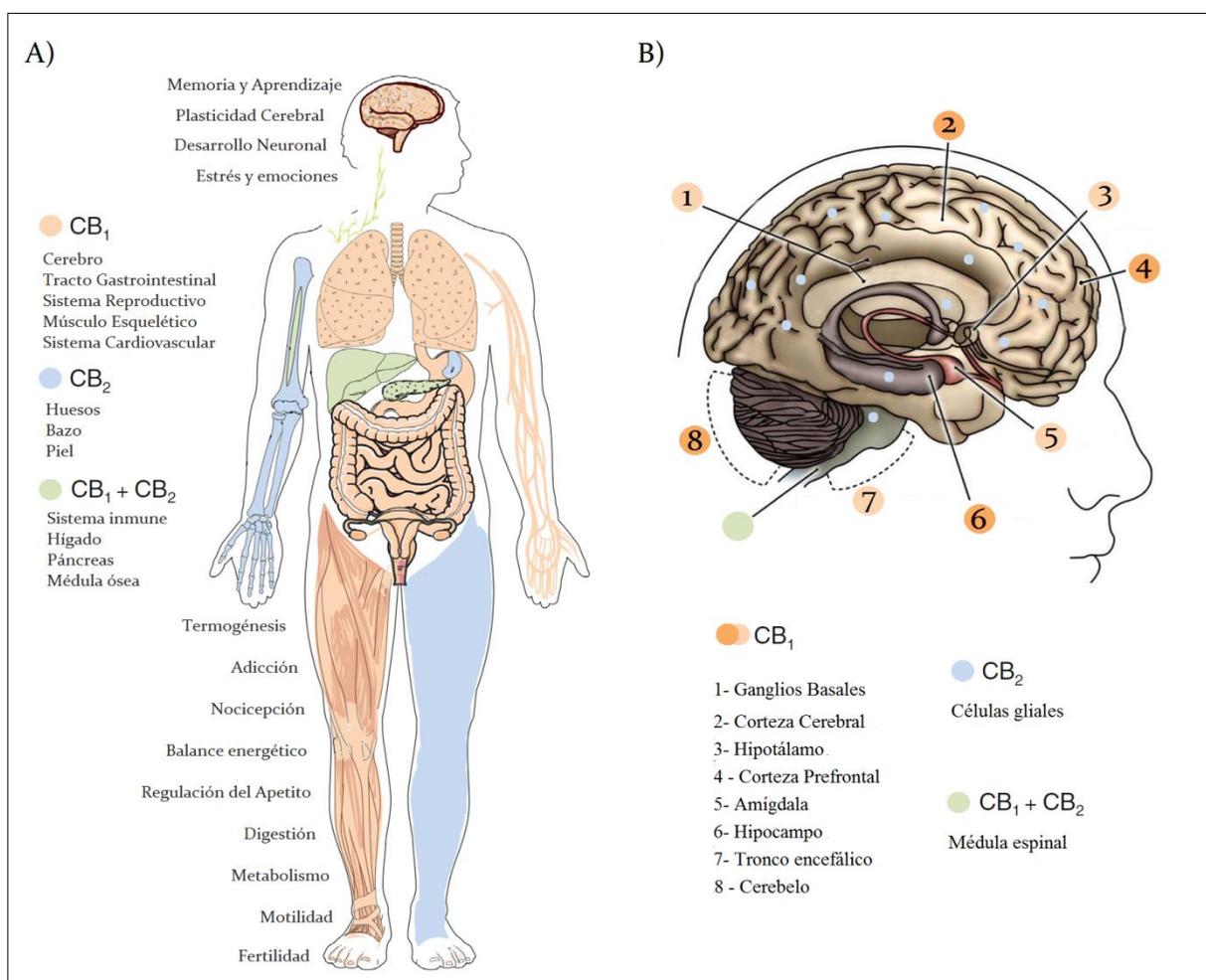


Figura 3. Distribución de los receptores CB1 y CB2 en el cuerpo humano. (a) CB1 y CB2 presentan una localización distinta en el organismo, lo que determina, junto con las vías de señalización en la que participan, las funciones en las cuales están involucrados. (b) Diferencias de expresión de CB1 dentro de las distintas regiones del cerebro. Colores más oscuros reflejan mayores niveles de expresión. Imagen (a) adaptada de Aizpurura-Olaizola *et al*, 2016 e imagen (b) adaptada de "Endocannabinoid System Network".

En contraste con CB1, la expresión de CB2 en el cerebro es muy baja. Su presencia en neuronas aún sigue siendo discutida por la comunidad científica, aunque hay consenso acerca de su expresión en en microglía y astrocitos (Demuth y Molleman, 2006; Stella, 2010). Los receptores CB2 se expresan abundantemente en las células que pertenecen al sistema inmune tales como monocitos, macrófagos, y linfocitos B y T, donde su activación, en conjunto con otros mecanismos, reduce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias o factores linfoangiogénicos (Matias y Di Marzo, 2007; Staiano *et al*, 2015).

Por otra parte, los receptores CB2 también están presentes en otros órganos periféricos y tipos de células que juegan un papel en la respuesta inmune, incluyendo el bazo, las amígdalas, el timo, mastocitos y queratinocitos, células óseas como osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Galiegue *et al*, 1995; Ständer *et al*, 2005; Campora *et al*, 2012; Iannotti *et al*, 2013), y células pertenecientes al sistema gastrointestinal (Prestifilippo, 2016) (Fig. 3a).

2.3.2 TRPV1

El receptor vanilloide de potencial transitorio tipo 1 (TRPV1), también conocido como receptor de capsaicina o receptor vanilloide 1, se encuentra dentro de la gran familia de receptores TRP (del inglés *Transient Receptor Potential Cation Channel*), perteneciendo particularmente a la subfamilia de canales TRPV (Caterina *et al*, 1997). De manera similar a todos los TRP, el TRPV1 es un canal catiónico con seis dominios transmembrana, un bucle entre el segmento S5 y S6 donde se encuentra la región del poro (Fig. 4) (Owsianik *et al*, 2006). Las mutaciones en algunos de estos receptores están vinculadas con enfermedades humanas, y su expresión está por lo general incrementada en tejidos afectados por diversas condiciones patológicas.

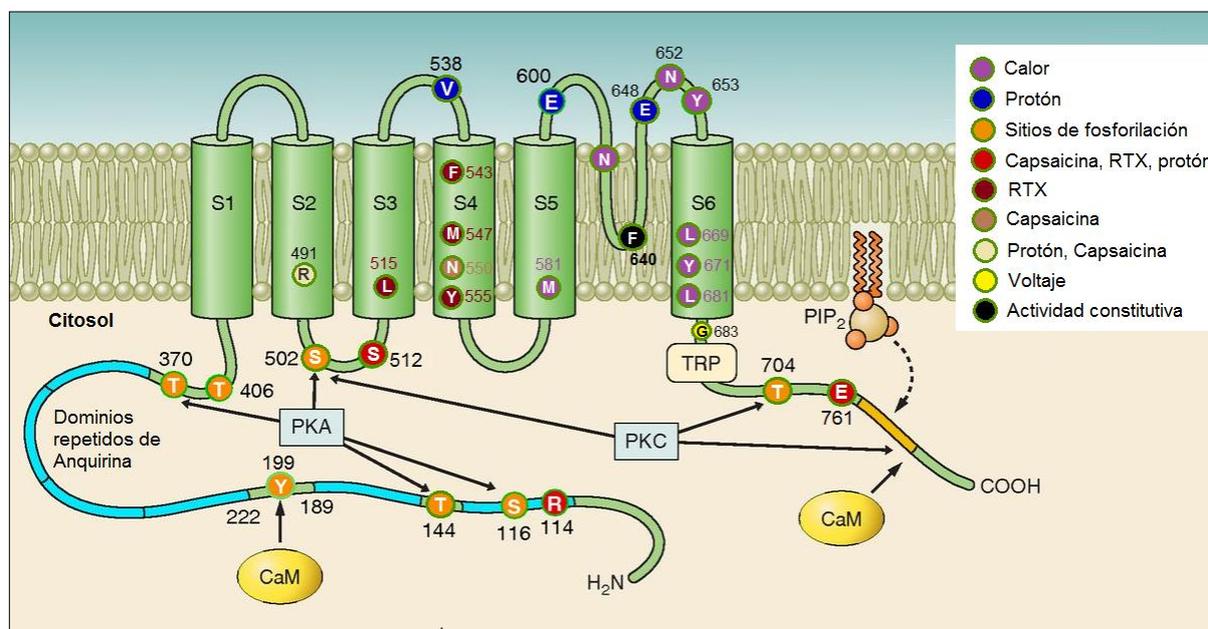


Figura 4. Topología de los canales TRPV1. Se resaltan los múltiples sitios regulatorios donde interactúan la proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA), la calmodulina (CaM) y el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂). Además, se marcan los residuos claves y aminoácidos que son activados por los distintos estímulos. Imagen adaptada de Bourinet *et al*, 2014.

Los TRPV1 se caracterizan por su sensibilidad ante voltajes débiles y una permeabilidad no selectiva para cationes monovalentes y divalentes, que incluyen Mg^{2+} , Ca^{2+} y Na^+ . Se activan por una gran cantidad de agentes químicos exógenos y endógenos, tales como la capsaicina (8-metil-N-vainillil-6-nonenamida, compuesto activo de los ajíes picantes), piperina, eugenol, resiniferatoxina (RTX), alcanfor, algunos fitocannabinoides, anandamida (AEA), palmitoiletanolamida, N-oleil-dopamina, N-araquidonil dopamina, y algunos derivados de la lipoxigenasa, incluyendo leucotrieno B4 y ácido 12-hidroxi-peroxi-eicosatetraenoico (Caterina *et al*, 1997; Di Marzo y De Petrocellis, 2010; Iannotti *et al*, 2014; De Petrocellis *et al*, 2004; Ambrosino *et al*, 2013; Van Der Stelt *et al*, 2005). Los estímulos físicos o mecánicos, tales como altas temperaturas ($> 43^{\circ}C$), alta concentración de protones ($pH < 5,9$) y cambios osmóticos, también activan TRPV1 (Fig. 5) (Cesare *et al*, 1999; Nagy *et al*, 2014).

La función de TRPV1 depende estrechamente de la unión de proteínas reguladoras que inducen cambios en su estado de fosforilación. En particular, la fosforilación inducida por el trifosfato de adenosina (ATP), PKA, PKC, proteína de unión a fosfoinositol (PIRT) y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), ha demostrado ser necesaria para la activación o sensibilización del receptor y la regulación en el flujo de cationes. Algunas prostaglandinas y otros mediadores inflamatorios activan indirectamente a PKC y/o PKA, y varios productos del metabolismo del ácido araquidónico son agonistas de TRPV1, por lo que este receptor no sólo participa en la modulación del dolor evocado por los distintos estímulos, sino que también contribuye a la sensibilización periférica, ya que actúa como el sustrato final de múltiples mediadores inflamatorios que operan a través de distintas vías de señalización intracelulares. No obstante, la activación de TRPV1 contribuye a la transmisión del dolor, la inflamación neurogénica y, según lo sugerido por estudios más recientes, también la plasticidad sináptica, sobreexcitación neuronal y la neurotoxicidad (Julius, 2013). Se han acumulado datos que demuestran la presencia de TRPV1 no sólo en neuronas sensoriales, sino también en neuronas cerebrales y en células no neuronales, incluyendo células epiteliales, endoteliales, gliales, de músculo liso, dendríticas, linfocitos, queratinocitos, osteoclastos, hepatocitos, fibroblastos y células β pancreáticas (Nagy *et al*, 2014; Starowicz *et al*, 2008; Edwards, 2014).

Cabe destacar que en varios tipos celulares donde se expresa TRPV1 también se expresan CB1 y/o CB2. Esta co-localización da lugar a varios tipos de *cross-talk* intracelular

(Di Marzo y Cristino, 2008; De Petrocellis y Di Marzo, 2009), lo cual tiene importantes consecuencias funcionales para aquellos ligandos que activan ambos tipos de receptores, ya que la actividad del CB2, y en particular, la del receptor CB1, pueden afectar fuertemente al TRPV1 (Hermann *et al*, 2003; Fioravanti *et al*, 2008). En las neuronas sensoriales, los canales TRPV1 funcionan como integradores moleculares de múltiples tipos de estímulos sensoriales que contribuyen a generar y transmitir el dolor. En las neuronas centrales se expresan en cantidades menores, tanto pre como post-sinápticamente, donde actúan regulando la fuerza sináptica (Edwards, 2014; Cristino *et al*, 2006; Mori *et al*, 2012) y participan en la modulación del dolor, la ansiedad, depresión y emesis, por lo general induciendo efectos opuestos a los ejercidos por los receptores CB1 en el mismo contexto (Chahl, 2011; Starowicz *et al*, 2008). Por otra parte, el TRPV1 también podría participar en la liberación de citoquinas inflamatorias de las células microgliales (Ryskamp *et al*, 2014).

2.3.3 Otros receptores

Los cannabinoides pueden activar receptores de los cuales no son ligandos específicos. Uno de los más estudiados es el GPR55, un receptor huérfano asociado a proteína G, el cual comparte solo un 13.5% de la secuencia identificada para CB1 y 14.4% de la de CB2. El receptor GPR55 está vinculado a una serie de eventos de señalización que incluyen la liberación de Ca^{2+} , la activación de los factores de transcripción CREB y NF- κ B y del factor nuclear de células T activadas (NFAT), y la fosforilación de ERK (Pertwee, 2007).

Finalmente, los eCBs también son ligandos potenciales de los receptores nucleares activados por proliferados de peroxisomas (PPAR) (Stahel *et al*, 2008), en particular, las subfamilia PPAR α y PPAR γ . Los PPAR son una familia de receptores nucleares o factores de transcripción activados por ligandos, que ejercen un papel importante en la regulación del metabolismo lipídico, homeostasis de la glucosa y sensibilidad a la insulina. Se ha descrito que la oleiletanolamida, a través de la activación de PPAR α , regula el apetito y peso corporal, estimula la lipólisis y tiene efectos neuroprotectores (Fu y *et al*, 2003; Guzmán *et al*, 2004; LoVerme *et al*, 2005; Sun *et al*, 2006). También palmitoiletanolamida (PEA) presenta propiedades anti-inflamatorias y analgésicas mediadas por PPAR α (LoVerme *et al*, 2005). Otros eCBs que activan PPAR α son AEA, virodamina y noladin éter (Sun *et al*, 2006). Tanto AEA y 2-araquidonilglicerol (2-AG), y el ácido ajulémico poseen propiedades antiinflamatorias mediadas por PPAR γ (Liu y cols., 2003a; Rockwell y cols., 2006).

2.4 Endocannabinoides

En concordancia con la alta lipofilia del THC, todos los endocannabinoides (eCBs) son compuestos de naturaleza lipídica y derivados de ácidos grasos poliinsaturados (Di Marzo, 1995). Los más importantes son la AEA y el 2-AG (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995) (Tabla I), ambos derivados del ácido araquidónico, un compuesto precursor de un largo número de moléculas endógenas como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos. Se han observado otros ácidos grasos ω -6 capaces de interactuar con los CBRs con diferente potencia y eficacia: O-araquidonil etanolamina (Virodamina), que se ha propuesto como un antagonista del receptor CB1 (Porter *et al.*, 2002), la N-araquidonil dopamina (NADA), un agonista vanilloide con afinidad CB1 (Huang y cols., 2002) y el 2-araquidonilglicerol éter (2-AGE o Noladin éter) (Hanus y cols., 2001).

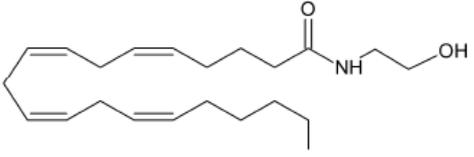
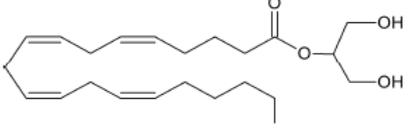
Anandamida		2-Araquidonilglicerol	
 <p>AEA</p>	Target	 <p>2-AG</p>	Target
	CB1 CB2 TRPV1 PPAR α PPAR γ GPR55		CB1 CB2 PPAR γ

Tabla I. Estructura química de los principales eCBs y sus respectivos targets moleculares. Tabla adaptada de Fezza, 2014.

Además, se han descrito otros lípidos relacionados, que presentan actividades biológicas similares a los cannabinoides pero que no se unen a los receptores, denominados en general compuestos cannabimiméticos. Ejemplos de estos compuestos son la PEA, que presenta efectos analgésicos y antiinflamatorios, y la oiletanolamida (OEA), que tiene efectos anorexígenos (Bisogno, 2008).

2.4.1 Localización y características farmacológicas de los eCBs

La AEA comparte muchas propiedades farmacológicas con el THC tanto a nivel del SNC como del periférico, y actúa como un agonista parcial de los receptores CB1 y como un débil agonista parcial de CB2 (Pertwee *et al.*, 2010). Inicialmente se creía que, dentro del cerebro, los niveles más altos de AEA se correspondían con áreas que también presentaban una elevada densidad de CBRs, como el hipocampo, la corteza o el estriado (Felder *et al.*, 1996). En la

actualidad, se sabe que AEA está presente en cantidades muy bajas en el cerebro (Zoerner *et al*, 2011), ya sea en zonas con alta o baja expresión de CBRs, lo que puede explicarse considerando la biodisponibilidad de su precursor, el hecho de que puede activar otros receptores, como TRPV1 (Zygmunt *et al.*, 1999) y la imposibilidad de medir con precisión su concentración local exacta (Zoerner *et al*, 2011).

Los niveles de 2-AG son, por lo general, marcadamente más altos que los de AEA en los mismos tejidos, valores que pueden llegar a ser hasta 200 veces mayores (Sugiura *et al*, 2002). El 2-AG actúa como un agonista completo de los CBRs, y se ha propuesto como el principal agonista endógeno para los receptores CB1 y CB2 (Pertwee *et al*, 2010). El 2-AG, además de actuar como un eCB, es también un intermediario importante en el metabolismo de los lípidos y, por lo tanto, sus concentraciones fisiológicas no reflejan sólo la cantidad necesaria para activar los CBRs (Di Marzo y Petrosino, 2007). De hecho, el 2-AG ha sido considerado como un producto de degradación de los fosfolípidos de inositol, y como una posible fuente de ácido araquidónico en las células estimuladas.

Una de las funciones más importantes y estudiadas de ambos eCBs es la señalización retrógrada que inhibe la liberación pre-sináptica del neurotransmisor excitatorio glutamato y del neurotransmisor inhibitorio GABA (Vaughan y Christie, 2005; Elphick, 2012). Luego de la despolarización de una neurona postsináptica, la síntesis de eCBs se activa rápidamente en ella; una vez sintetizados, AEA o 2-AG, son liberados hacia el espacio sináptico, estimulando los receptores CB1 en las terminales pre-sinápticas, para ser luego inactivados por sus respectivas enzimas hidrolíticas. Por lo tanto, la producción a demanda de eCBs que actúan como señales retrógradas, en conjunto con la activación de canales de potasio e inhibición de canales de calcio mediada por CB1, controlan la liberación de neurotransmisores, modulando finamente la duración de la actividad sináptica y, como consecuencia, varias formas de plasticidad sináptica tanto a corto como a largo plazo.

Si bien la señalización retrógrada es el principal mecanismo por el cual los eCBs regulan la función sináptica, existe una visión actual más compleja que incluye otros mecanismos de acción de los eCBs. Actualmente, se cuenta con evidencia que indica que los eCBs también pueden actuar de manera autócrina (por unión a los receptores TRPV1 o CB1 localizados en los terminales post-sinápticos), y además, que tienen la capacidad de modular indirectamente

las funciones pre y post-sinápticas por una señalización a través de astrocitos (Castillo *et al*, 2012).

Cabe destacar que el nivel de los eCBs varía en respuesta a diferentes estímulos, en los distintos estadios de desarrollo y dependiendo de las condiciones fisiológicas y patológicas (Di Marzo y Petrosino, 2007). Además, el SEC puede influenciar otros sistemas fisiológicos mediante la interacción con sus receptores, vías de señalización intracelular, hormonas y neurotransmisores. De esta forma, algunos o bastantes de los efectos biológicos del SEC podrían ocurrir a través de una compleja interacción con otros receptores, como el ya mencionado TRPV1, el receptor serotoninérgico 5-HT₃, el receptor de glutamato NMDA y los receptores nicotínicos de acetilcolina (Mackie, 2008).

2.4.2 Biosíntesis y metabolismo de los eCBs.

Se considera que los eCBs son sintetizados e inmediatamente liberados hacia el espacio sináptico, ya que no existe evidencia de que se almacenen en alguna vesícula secretora, y además, la mayoría de las enzimas que los producen se encuentran en la membrana plasmática. Por otro lado, los eCBs actúan sobre sus receptores sólo localmente, posiblemente debido a su alta lipofilia, y son inactivados de inmediato bajo condiciones fisiológicas. De hecho, esta característica de ser producidos a demanda vuelve al sistema capaz de adaptarse rápidamente a distintos cambios de condiciones.

La biosíntesis de AEA, similar a la de otros de cadena larga N-aciletanolaminas (NAE), se puede producir a través de al menos tres rutas biosintéticas distintas: i) directamente, mediante la hidrólisis de N-araquidonoil-fosfatidiletanolaminas (NArPE) por la acción de una fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD); ii) en tres pasos, a través de la desacilación secuencial de NArPE por la $\alpha\beta$ -hidrolasa 4 (ABHD4) y la hidrólisis de glicerofosfoetanolamina (GFEA) por la glicerolfosfodiéster fosfodiesterasa 1 (GDE1); y iii) en dos etapas, a través de la hidrólisis NArPE mediada por una fosfolipasa C (PLC) para producir fosfoanandamida, que a su vez se desfosforila en AEA por una fosfatasa, como PTPN22 (Di Marzo, 2011) (Fig. 5).

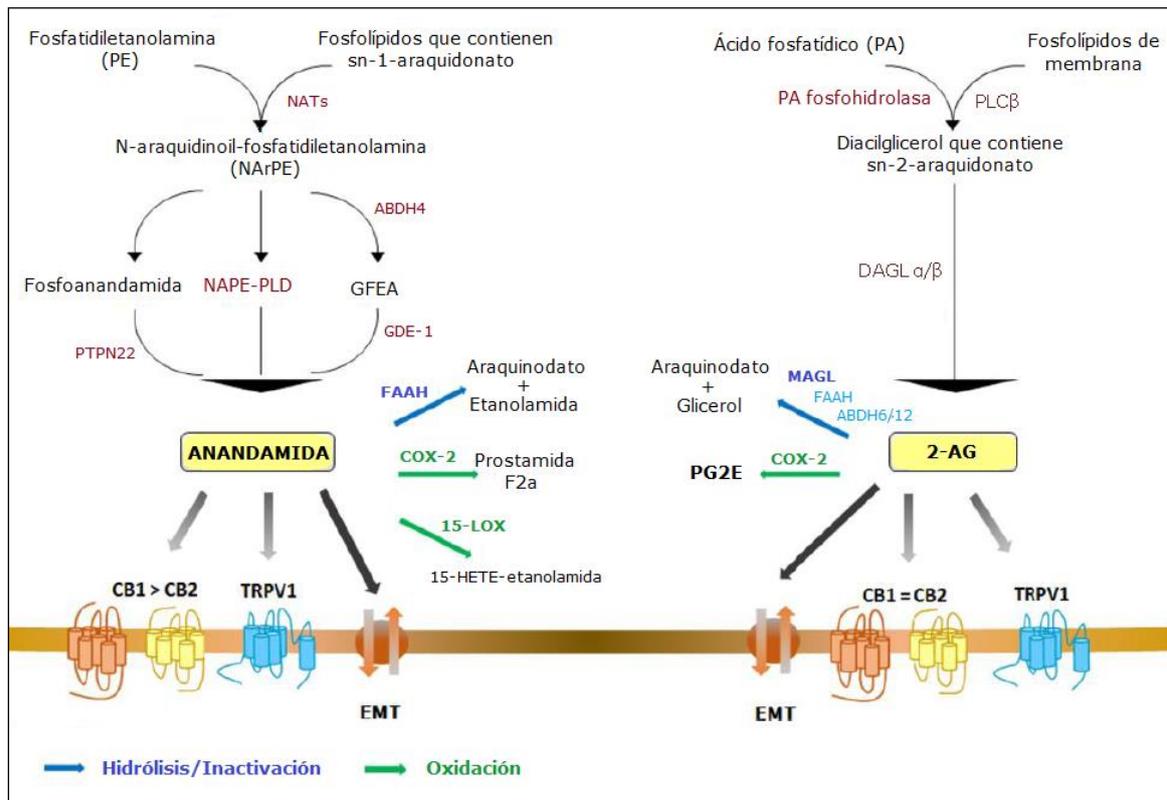


Figura 5. Biosíntesis y metabolismo de AEA y 2-AG. Se describen las principales vías para la síntesis de AEA y 2-AG reportadas hasta el momento. Además, se muestran los productos finales de las rutas de hidrólisis/oxidación más investigadas. Abreviaturas: ABH 4/6/12, hidrolasa con dominios $\alpha\beta$ 4/6/12; DAG, diacilglicerol; EMT, transportador de endocannabinoides de membrana; FAAH, amida hidrolasa de ácidos grasos; GDE1, glicerolfosfodiéster fosfodiésterasa 1; GFEA, glicerofosfoetanolamina; MAGL, monoacilglicerol lipasa; NAPE, N-acil-fosfatidiletanolamina; NATs, N-aciltransferasas; PLC β , fosfolipasa C β ; PLD fosfolipasa D; 15-LOX, 15-lipoxigenasa; PTPN22, proteína tirosin fosfatasa no receptora tipo 22; PGF2a, Prostaglandina F2a; HETE, ácido hidroxicicosatetranoico; PGE2, Prostaglandina E2. Imágen adaptada de Petrosino *et al*, 2016.

La síntesis de 2-AG se produce principalmente a partir de la hidrólisis del diacilglicerol (DAG) que contiene ácido araquidónico en la posición 2, por cualquiera de las dos DAG lipasas (DAGL- α y DAGL- β) específicas para la posición 1 (Bisogno *et al*, 2003). Los precursores del DAG para la biosíntesis de 2-AG son a su vez el producto de la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, en particular de fosfoinositol-bisfosfato (PIP₂), por la fosfolipasa C β (PLC β) (Hashimoto *et al*, 2005; Maejima *et al*, 2005). Sin embargo, también se ha sugerido que pueden originarse precursores del DAG a partir de la hidrólisis de ácido fosfatídico (Bisogno *et al*, 1999) (Fig. 5).

La señalización desencadenada por los eCBs finaliza con el transporte de los mismos hacia el interior de la célula y su posterior degradación. A pesar del extensivo conocimiento que se tiene acerca del metabolismo del AEA y 2-AG por las diversas enzimas intracelulares

descriptas hasta el momento, todavía no se conoce con exactitud como los eCBs atraviesan la membrana plasmática. No obstante, se han propuesto varios modelos descriptos principalmente para el "uptake" (captación) de la AEA (Kaczocha *et al*, 2006), (Hillard y Jarrahian, 2003), (Fegley *et al*, 2004),. La hipótesis más aceptada actualmente es la de transporte mediado por un "transportador de endocannabinoides de membrana" (EMT), el cual también sería el responsable de la recaptación de 2-AG (Yates y Barker, 2009).

La AEA y el 2-AG se hidrolizan principalmente por dos serina hidrolasas: amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL), respectivamente (Fig. 5). FAAH presenta una secuencia rica en serina, glicina y alanina, y se expresa en gran medida en todo el cuerpo de un mamífero, con la densidad más alta en el cerebro y el hígado (Wei *et al*, 2006). Aunque AEA representa su sustrato preferencial, FAAH puede hidrolizar también a 2-AG (Goparaju *et al*, 1998; Maione *et al*, 2006) y otras N-aciletanolaminas de cadena larga como OEA y PEA (Saghatelian *et al*, 2004) además de otras amidas de ácidos grasos (FAAS) (Labar y Michaux, 2007). La serina hidrolasa con dominios α/β 6 (ABHD6) que reside en las terminales post-sinápticas y la serina hidrolasa con dominios α/β 12 (ABHD12) que se expresa principalmente en microglía, contribuyen a la hidrólisis de 2-AG en un 4 % y 9 %, respectivamente (Savinainen *et al*, 2012; Schlosburg *et al*, 2010). Los productos de estas reacciones no activan los receptores de cannabinoides, por lo que pueden reciclarse de nuevo en sus respectivas rutas biosintéticas (Di Marzo *et al*, 2005).

Alternativamente a las rutas de hidrólisis, los eCBs también son sustratos de enzimas que pueden oxigenarlos. Estas vías catabólicas representan un punto interesante a tener en cuenta, ya que conducen a la producción de nuevos metabolitos biológicamente activos. Tanto AEA como 2-AG pueden ser metabolizados por lipoxigenasas (LOXs) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), y oxidados por el citocromo P450 (Di Marzo, 2008; Cascio y Marini, 2015). Algunos productos de de estas reacciones son ligandos de los receptores CB1, CB2, PPARs y TRPV1 (Stella, 2009; Pacher y Kunos, 2013). Otros productos, como es el caso de la prostaglandina E2, derivado de la oxigenación de 2-AG por COX-2, son importantes mediadores inflamatorios. Por lo tanto, los resultados obtenidos utilizando inhibidores de FAAH/MAGL o ratones deficientes de estas enzimas son complejos de analizar, dado que los efectos observados no son causados solamente por el aumento de los niveles de eCBs, sino que también es consecuencia de los diversos metabolitos biológicamente activos que se produjeron en las distintas vías.

2.5 Perspectivas terapéuticas asociadas al SEC

Dada la importancia fisiológica que tiene el SEC en todos los tejidos en los que se expresan sus componentes, es lógico pensar que este sistema puede estar alterado de alguna manera en ciertas patologías que los afectan. De hecho, en la actualidad se cuenta con numerosas evidencias que sustentan esta hipótesis, habiéndose observado cambios en la concentración tisular de eCBs (en particular AEA y 2-AG) en varios desórdenes, incluyendo: inmunológicos (autoinmunes y alergias) (Lambert, 2007), cardiovasculares (Ashton y Smith, 2007), dolor e inflamación (Hohmann y Suplita, 2006; Jhaveri *et al*, 2007), condiciones neurológicas o neuropsiquiátricas (Bisogno y Di Marzo, 2007), obesidad y problemas metabólicos (Cota, 2006), cáncer (Bifulco *et al*, 2007), y patologías gastrointestinales y hepáticas (Mallat *et al*, 2007).

Dentro de un determinado tejido, ante un estímulo estresante o patológico dado, el SEC reacciona de maneras distintas dependiendo de la naturaleza y la duración de este estímulo y, por lo tanto, esa diferencia en la manera de reaccionar, conduce a más de un resultado funcional. La respuesta inicial ante un estímulo nocivo o tóxico, es ayudar a restaurar la homeostasis del organismo atenuando, mediante mecanismos alostáticos, la respuesta a nivel local por un lapso de tiempo determinado. Pero si el estado patológico continúa, el sistema tiende a desregularse de una manera tal que los eCBs actúan por un periodo de tiempo mayor al debido o empiezan a activar receptores en poblaciones de células que inicialmente no eran su *target*, lo que trae aparejado consecuencias negativas que, en general, contribuyen a la progresión del trastorno inicial. Debido a esto, las nuevas generaciones de fármacos se diseñan utilizando dos estrategias dependiendo la etapa de la patología: i) potenciar al SEC, utilizando agonistas de CBRs o inhibiendo las enzimas que degradan a los eCBs y ii) reducir la funcionalidad de los CBRs mediante antagonistas para atenuar la respuesta general del sistema.

En la actualidad, sólo tres cannabinoides fueron aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso clínico: Cesamet[®] (Nabilone), Marinol[®] (Dronabinol) y Sativex[®], utilizados para tratar las náuseas y vómitos severos asociados a la quimioterapia, o disminuir el dolor asociado al cáncer y fibromialgia. También son utilizados como estimulantes del apetito en pacientes que padecen HIV/SIDA, y como tratamiento contra los espasmos musculares asociados a la esclerosis múltiple. Como puede observarse, los tratamientos a base de

cannabinoides que existen hoy en día no se consideran curativos y sólo se utilizan en casos extremos, ya que todavía no pueden descartarse los efectos secundarios.

2.6 Inflamación

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos o cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Normalmente, se trata de una respuesta reparadora y es un proceso que implica un considerable gasto de energía metabólica. La respuesta inflamatoria está coordinada por una gran cantidad de mediadores que se organizan en complejas redes reguladoras. Los inductores, que pueden ser endógenos o exógenos, son señales que inician el proceso inflamatorio activando sensores especializados. Estos receptores, una vez activados, inician la producción de lotes específicos de mediadores (como citoquinas, prostaglandinas, interleuquinas, etc) que tienen como función alterar el estado de células, tejidos y órganos de manera tal que puedan adaptarse a ese daño infringido por el inductor, para luego poder repararse.

Cualquier agresión local a un organismo desencadena respuestas en tres niveles de organización: celular, tisular y orgánico. La respuesta celular es individual y aislada, y tiene por objetivos defender su acervo génico y mantener la conformación nativa de sus proteínas. La respuesta tisular a la agresión contempla, en principio, cuatro acontecimientos interrelacionados: i) la estimulación de las terminaciones nerviosas libres provoca dolor y liberación de péptidos inflamatorios, ii) las células dañadas liberan proteínas constitutivas intracelulares, iii) los microorganismos y sus diferentes productos incitan, en colaboración con los anteriores, una respuesta inmunológica innata, y iv) señales producidas en el foco inflamatorio reclutan leucocitos al lugar de la lesión.

Si bien el reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio es un mecanismo muy importante, para proporcionar una respuesta rápida se requiere de células centinelas estacionadas en los tejidos. Esta función la llevan a cabo los macrófagos y los mastocitos (Benoist y Mathis, 2002). Los mastocitos perivasculares responden a los neuropéptidos liberados por las terminaciones nerviosas dañadas y estimuladas, liberando histamina, triptasa y otras proteasas, TNF α , eicosanoides (prostaglandinas inflamatorias, tromboxanos y leucotrienos), citoquinas y quimioquinas (Schneider *et al*, 2002). La histamina, los eicosanoides

y las triptasas causan vasodilatación (responsable del calor y rubor inflamatorios) y extravasación (responsable del edema inflamatorio).

La cascada de mediadores induce la activación, proliferación, cambios del comportamiento y cambios metabólicos de una serie de células y de tejidos. Todo ello con el objetivo de neutralizar el agente agresor, controlar el proceso inflamatorio, promover el proceso de reparación y así, iniciar el retorno a la normalidad fisiológica. Es importante considerar la inflamación y la consiguiente respuesta de fase aguda como un mecanismo alostático dinámico que involucra a todos los principales sistemas del organismo, aparte de los sistemas inmunológico, cardiovascular y SNC.

2.6.1 Mediadores inflamatorios

El término citoquina se utiliza de manera genérica para referirse a un grupo diverso de proteínas o glicoproteínas solubles que actúan como reguladores humorales y que, en condiciones normales y patológicas, modulan las actividades de células y tejidos. Las citoquinas también median, de manera directa, interacciones intercelulares, y algunas de ellas se comportan como factores de supervivencia al prevenir la apoptosis. En general, las citoquinas actúan sobre una mayor variedad de células diana que las hormonas; y a diferencia de estas, no son producidas por células especializadas. En el sentido estricto, las citoquinas comprenden las interleuquinas (IL), linfoquinas, monoquinas, interferones (IFN), quimioquinas, factores estimulantes de colonias (CSF) y factores de crecimiento (GF). El término citoquinas de tipo 1 se refiere a aquellas producidas por células Th1 (células T helper-1): IL-2, IFN- γ (Interferón- γ), IL-12 o TNF- β). Las citoquinas de tipo 2 son las producidas por Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 o IL-13. Tras la expresión génica, la mayoría de las citoquinas son secretadas por las células utilizando las vías secretoras clásicas, existiendo formas que se asocian a las membranas y otras a la matriz extracelular. Existen complejas interacciones por las que las citoquinas inducen o suprimen su propia síntesis o la de sus receptores, o modifican la producción de otras citoquinas, generando un antagonismo o sinergismo entre ellas. Se denominan citoquinas pro-inflamatorias aquellas que favorecen la progresión inflamatoria, siendo prototípicas IL-1, IL-6 y TNF α . Actúan como pirógenos endógenos, inducen la síntesis de mediadores secundarios y de otras moléculas pro-inflamatorias por macrófagos y por células mesenquimales, estimulan la producción de proteínas de fase aguda y atraen células inflamatorias. Entre las anti-

inflamatorias se encuentran IL-4, IL-10 o IL-13. Naturalmente, el efecto neto de una respuesta inflamatoria va a estar determinado por el balance entre citoquinas pro y anti-inflamatorias.

2.6.1.1 Factor de Necrosis tumoral alfa

Los esfuerzos por comprender la relación entre el cáncer y enfermedades infecciosas condujeron al descubrimiento de las citoquinas antitumorales denominados "factor de necrosis tumoral (TNF)". El TNF α es producido por macrófagos, linfocitos, células endoteliales y otras células en dos formas: una precursora unida a membrana y otra soluble (sTNF α) (Horiuchi *et al.*, 2010). Se ha observado que tanto la forma soluble como la unida a membrana pueden ejercer un papel biológico inflamatorio: la unida a membrana lo hace de manera local y depende de la interacción entre células, mientras que el sTNF α ejerce sus funciones a distancia de las células que lo sintetizan (Wajant *et al.*, 2003). Debido a esto, se lo ha relacionado de manera directa con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias y enfermedades autoinmunes, entre otras (Scrivo *et al.*, 2001; Bultink *et al.*, 2012; Aggarwal *et al.*, 2012).

El TNF α es considerado una potente citoquina pleiotrópica que regula diversos eventos biológicos fundamentales de las células, tales como la activación de leucocitos, la liberación de diversas citoquinas y quimioquinas y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e intermediarios de nitrógeno (McKellar *et al.*, 2009). Para una mayor información acerca de las vías de señalización de TNF α , revisar anexo C.

2.6.1.2 Prostaglandina E2

Las prostaglandinas son lípidos oxidados e insaturados que tienen un ciclo con oxígeno y dos cadenas alifáticas. Pertenecen a un largo grupo de lípidos llamados eicosanoides. Son moléculas de señalización de vida media corta, que actúan como mensajeros autócrinos y parácrinos. Sus principales funciones fisiológicas en el SNC son la regulación de la memoria, el sueño, la fiebre y el dolor.

La producción de prostaglandinas comienza con la liberación de ácido araquidónico de fosfolípidos de la membrana por medio de la fosfolipasa A₂ en respuesta a un estímulo inflamatorio. El ácido araquidónico es convertido en PGH₂ por las enzimas ciclooxigenasas 1 y 2 (COX1 y COX2), el cual es precursor directo de las prostaglandinas PGE₂, PGF_{2a}, PGI₂ y PGD₂ (Fig. 6a). Existe un grupo de enzimas sintetasas isomerasas que transforman la PGH₂ en cada uno de sus derivados cuya expresión cambia según el tejido y el estado fisiológico

(Narumiya *et al*, 1999). Luego de su producción, las prostaglandinas son liberadas rápidamente de las células y actúan cerca del sitio de producción mediante la unión de receptores específicos de alta afinidad (Narumiya, 1994)

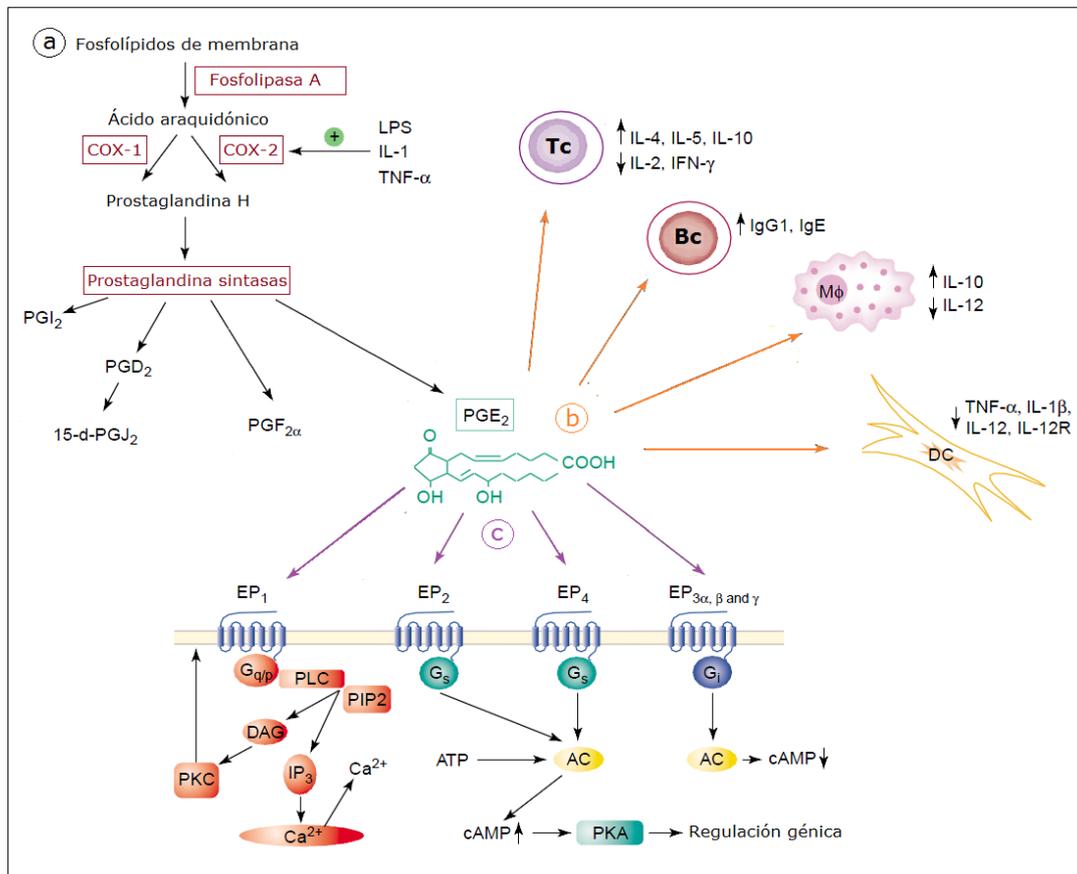


Figura 6. Vía de producción de las prostaglandinas, transducción de señales de los receptores de PGE₂ y consecuencias fisiológicas de su interacción con distintos tipos celulares. (a) Los distintos tipos de prostaglandinas provienen de un precursor común, la PGH₂, que es un derivado del ácido araquidónico liberado de la membrana plasmática por la fosfolipasa A₂. (b) Los receptores de PGE₂ (EP-Rs) son receptores tipo rodopsina y poseen siete dominios transmembrana. Los cuatro subtipos (EP₁-EP₄) se unen a diferentes proteínas G por lo que utilizan distintos segundos mensajeros para amplificar la señal. EP₁ interacciona con proteínas G_{q/p} y su activación conlleva a un incremento en los niveles de calcio intracelular. EP₂ y EP₄ se asocian a proteínas G_s e inducen la expresión de AMPc, lo que resulta en la regulación de determinados genes. Las tres isoformas de EP₃ se unen principalmente a G_i y generalmente inhiben la síntesis de AMPc. (c) Dependiendo el tipo celular con el que la PGE₂ interaccione, se producen resultados fisiológicos distintos, aunque principalmente conduce a incrementar la producción de anticuerpos y citoquinas del tipo 2. Abreviaturas: AC, adenilato ciclasa; DAG, diacilglicerol; IP₃, inositol trifosfato; PIP₂, fosfatidilinositol difosfato; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C; Tc, células T; Bc, células B; DC, células dendríticas; Mφ, macrófagos. Imagen adaptada de Harris *et al*, 2002.

Las ciclooxygenasas tienen un origen común y son muy parecidas en su estructura, están presentes en todos los mamíferos y se localizan en las membranas celulares. La COX1 es una enzima constitutiva mientras que COX2, si bien tiene un carácter constitutivo en bajas cantidades, incrementa su expresión frente a una amplia gama de estímulos, por lo que se

considera de naturaleza inducible (Smith *et al.*, 1994; FitzGerald, 2003). Entre los factores que aumentan la producción de COX2 se encuentran: la IL-1, el factor de crecimiento de fibroblastos b (bFGF), el factor de crecimiento de transformación (TGF), el TNF, el LPS y la activación del factor de transcripción nuclear kB (NFkB) mediante ROS.

Se han descrito muchos receptores de prostanoides, casi todos acoplados a proteínas G, entre los que se encuentran: el receptor de prostaglandinas D (DP) que regula el sueño, los de prostaglandinas E (EP), que regulan la adquisición de memoria, la respuesta inflamatoria y la fiebre, y el de prostaglandinas I (IP), que regula el dolor. La prostaglandina más común en el SNC es la PGE₂, la cual es producida por varios tipos celulares incluyendo macrófagos y fibroblastos. Sus mecanismos de transducción de señales se producen al unirse a uno (o una combinación) de sus 4 subtipos de receptores: EP₁ incrementa la concentración de Ca²⁺ y, mientras EP₂ y EP₄ aumentan la cantidad de AMPc, EP₃ la disminuye (Fig. 6c) (Narumiya, 1994; Breyer *et al.*, 2001).

El resultado fisiológico final va a depender del tejido o del tipo celular sobre el cual actúe: Cuanto la PGE₂ interacciona con células T, estas incrementan su producción de IL-4, IL-5 e IL-10, pero disminuyen la de IL-2 e IFN- γ (Mastino *et al.*, 1992; Porter y Malek, 1999). Actuando sobre células B, PGE₂ estimula la producción de IgG1 e IgE (Shimozato y Kincade, 1999; Fedyk *et al.*, 1997). La PGE₂ también actúa sobre células que presentan antígeno, tales como macrófagos y células dendríticas (DCs), para inducir la expresión de IL-10 e inhibir la expresión de IL-12, TNF α e IL-1 β (Hinz *et al.*, 2000; Ikegami *et al.*, 2001) (Fig 6b). El resultado global es una mejora en las respuestas de los linfocitos T *helper* del tipo 2 (Th2) y una inhibición en las respuestas de los Th1. Se ha reportado que al inhibir la producción de PGE₂ en el hipocampo y la corteza cerebral de las ratas, disminuye la adquisición de memoria espacial. Esto se debe a que la PGE₂ potencia la entrada de Ca²⁺ en la neurona, lo que facilita la formación de memoria de largo plazo (Rall *et al.*, 2003).

Cuando se produce una infección mediada por virus o bacterias los macrófagos producen citoquinas como la IL-1b, la IL-6 y el TNF α ; éstas influyen sobre células microgliales de la microvasculatura hipotalámica que induce la producción de PGE₂. Esta prostaglandina actúa sobre las neuronas del núcleo ventromedial preóptico y del núcleo paraventricular hipotalámico dónde se secreta hormona liberadora de tirotrópina (TRH). La TRH induce la secreción de la hormona estimulante de la tiroides en la adenohipófisis (TSH); ésta, a su vez,

activa la producción de hormonas tiroideas en la glándula tiroides. Esto tiene como consecuencia el aumento de la temperatura corporal (Schiltz *et al*, 2002).

Frente a un estado inflamatorio, un problema de hipoxia o una determinada exposición a agentes tóxicos oxidantes, las prostaglandinas se producen en cantidades inusuales y provocan daños oxidativos sobre las propias neuronas, tales como: peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas y de ácidos nucleicos; además, pueden activar la microglía fagocítica y la expresión de caspasas que llevan a las neuronas a una muerte vía apoptosis (Prabhakaran *et al*, 2002). Sin embargo, cuando la concentración local de PGE₂ se incrementa, consigue un efecto inhibitorio de la COX2 y de la 5-lipoxigenasa, a la vez que induce la expresión de 15-lipoxigenasa en los neutrófilos. Tal efecto, diferido, desplaza el metabolismo del araquidonato hacia la formación de lipoxinas en los propios neutrófilos. De esta manera, tras varias horas de acción, la señal pro-inflamatoria inicial de la PGE₂ se torna en una señal anti-inflamatoria (Harris *et al*, 2002)

2.7 Neuroinflamación

La neuroinflamación es el proceso inflamatorio que tiene lugar en el cerebro cuando la glía, especialmente astrocitos y microglía, es activada en respuesta a estímulos tales como una infección, o un episodio de daño o trauma. En condiciones normales, esta inflamación del SNC es generalmente beneficiosa y permite al cerebro responder a cambios en su ambiente y deshacerse de tejido dañado o sustancias no deseadas a través de procesos fagocíticos y de la producción de factores de protección o reparación (Perry *et al*, 2007). Sin embargo, en ocasiones este balance se altera y el proceso inflamatorio persiste, incluso cuando el estímulo que ha provocado la inflamación es eliminado, jugando un papel clave en la progresión del daño en las enfermedades denominadas "neurodegenerativas". Estos trastornos son un grupo heterogéneo de condiciones patológicas en las que se produce una degradación progresiva del sistema nervioso (tanto a nivel central como periférico), la cual lleva asociada una disminución de determinadas poblaciones neuronales. Naturalmente, dependiendo de la localización en la que se produzca la pérdida neuronal, los síntomas serán diferentes, siendo los más frecuentes las alteraciones en los procesos de memoria y aprendizaje, así como las afecciones motoras y desórdenes de conducta. Cada una de ellas posee una etiología diferente y actualmente los tratamientos descriptos para tratar sus síntomas eficazmente están en periodo de prueba. Dentro de este grupo podemos encontrar la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de

Parkinson (PD), la esclerosis múltiple (MS), isquemia, la enfermedad de Huntington (HD) y el accidente cerebrovascular (ACV) (Infante-Duarte *et al*, 2008).

El paradigma clásico asocia la neuroinflamación con una fuerte infiltración del SNC por leucocitos sanguíneos pro-inflamatorios mediante alteraciones de la barrera hematoencefálica (BHE) (Hickey, 1991). En este escenario, la llegada de leucocitos al SNC es seguida por la producción de ROS, citoquinas pro-inflamatorias y enzimas citolíticas, conduciendo a efectos perjudiciales en el funcionamiento neuronal. Sin embargo, las investigaciones realizadas en los últimos años han determinado que el SNC no es un sitio inmuno-privilegiado, ya que existe una vigilancia inmunológica que dirige la respuesta neuroinflamatoria en los desórdenes neurológicos. Estas publicaciones han logrado identificar a las células gliales, en particular microglía, como actores clave en trastornos neurológicos agudos y crónicos (Ransohoff y Perry, 2009). Se ha observado que, tras la lesión del SNC, la microglía se transforma en una forma activada, presentando un fenotipo fagocítico y ramificado, participando en la patogénesis de la enfermedad mediante la producción de ROS, citoquinas, glutamato y proteasas (Van Rossum y Hanisch, 2004). De esta forma, la inflamación no solo se produce por leucocitos que atraviesan la BHE sino por células pertenecientes al mismo SNC. La actividad de la microglía está controlada por múltiples factores, entre los que se incluyen el interferón- γ (IFN- γ), diversas citoquinas y el β -amiloide (A β), además de su compleja interacción con neuronas, astrocitos y células T (Lynch, 2009). Un actor clave en cuanto a las enfermedades infecciosas y no infecciosas del SNC es la familia de receptores tipo Toll (TLRs). Estas lipoproteínas transmembranas de tipo 1 implicadas en el reconocimiento de motivos microbianos conservados resultó tener una mayor complejidad en su accionar que el papel definido en la inmunidad innata (Moynagh, 2005). Las respuestas mediadas por TLR pueden ser beneficiosas o perjudiciales, dependiendo de la fuerza y el tiempo de la señal de activación. Con respecto a las condiciones neuroinflamatorias, se han demostrado papeles específicos de los TLRs en los modelos de enfermedades animales (O'Brien *et al*, 2008; Hoffmann *et al*, 2007), mientras que la expresión de TLRs, y sus proteínas de señalización relacionadas, se ha caracterizado en las neuronas y glia del SNC (Nishimura y Naito, 2005).

2.7.1 Respuesta inmune innata en el SNC

El sistema inmune innato representa la primera defensa contra patógenos, proporcionando protección contra infecciones y auto-antígenos. Este sistema está orquestado

por un número de células, incluyendo mastocitos, células dendríticas (DC), neutrófilos, células “natural killer” (NK) y macrófagos. Estas células actúan como iniciadores / efectores cruciales de las respuestas inmunes innatas y desempeñan diversos papeles en la patogénesis de las afecciones neuroinflamatorias mediante la secreción de citoquinas, la activación y diferenciación de células T *naive* y la producción de superóxido y otras ROS. Como se mencionó anteriormente, son las células gliales las que desempeñan un papel activo en la respuesta inmune innata dentro del SNC.

Las células inmunes innatas, a diferencia de los linfocitos T y B, no poseen receptores específicos de antígeno, sino que expresan unos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales reconocen firmas moleculares de microbios denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La señalización intracelular desencadenada por PRRs conduce a la expresión transcripcional de mediadores inflamatorios que coordinan la eliminación de patógenos y células infectadas (Akira *et al*, 2006). Estos receptores están presentes en la superficie celular, en organelas endocíticas, o en el citoplasma de células inmunes innatas y están implicados en diversas funciones como son: i) el reconocimiento o internalización de microbios mediante fagocitosis, ii) la activación celular en respuesta a diversos grupos microbianos (receptores de señalización) y iii) el reconocimiento de células apoptóticas (moléculas puente y receptores endocíticos). Los TLRs (un tipo particular de PRR) han sido involucrados en la detección de estructuras específicas de etiología viral, microbiana, parasitaria, micótica y a señales de peligro incluso endógenas (Kawai y Akira, 2009).

La activación de TLRs es un importante inductor de la neuroinflamación a través de la producción de citoquinas, óxido nítrico y quimioquinas (Lehnardt, 2010; Weber *et al*, 2007). Los dominios extracelulares de TLRs contienen repeticiones ricas en leucina para el reconocimiento de sus respectivos ligandos y tienen un dominio de Toll/Interleuquina-1 (TIR) citoplásmico altamente conservado que inicia la transducción de señales mediante el reclutamiento de proteínas adaptadoras (Moynagh, 2005). A la fecha, se han identificado en humanos 10 tipos de TLR que reconocen distintos sets de patrones moleculares dependiendo su dominio extracelular, los cuales se dividen en dos subfamilias en base a su ubicación celular: los TLRs que se encuentran en la superficie celular reconocen componentes de la pared celular de hongos (TLR2), LPS bacteriano (TLR4), lipoproteínas (TLR1, TLR2 y TLR6), flagelos (TLR5) o peptidoglicanos (TLR2). Por otro lado, los TLRs intracelulares son específicos para

ARN viral doble cadena (TLR3), ARN simple cadena (TLR7 y TLR8), ADN exógeno o CpG no metilado (TLR9). A pesar de que todos los TLRs tienen un dominio TIR similar, dependiendo el tipo pueden utilizar distintas moléculas adaptadoras para transducir la señal, entre las que se incluyen: MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM. De hecho, los diferentes adaptadores activan distintos factores de transcripción, influenciando directamente la naturaleza y el resultado de la respuesta inflamatoria. Respecto de TLR4, su activación puede conducir a dos vías de señalización diferentes: (i) La vía dependiente de MyD88, que incrementa la producción de óxido nítrico (NO) y citoquinas pro-inflamatorias, y (ii) La vía independiente de MyD88, que conduce a la síntesis de interferón de tipo I, especialmente interferón- β . Para una mayor información acerca de las vías de señalización de TLR4, revisar anexo D.

Los componentes del sistema inmune innato no sólo reconocen moléculas exógenas, sino también ligandos endógenos, denominados patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Particularmente, se conoce que TLR4 actúa frente a proteínas de shock térmico, proteína amiloide sérica A y lipoproteína oxidada de baja densidad. De este modo, las primeras investigaciones se enfocaron en los patrones de expresión de los TLRs en células inmunes (dentríticas, células T o macrófagos) y su rol en los mecanismos de eliminación de patógenos invasores. Con el tiempo, fue haciéndose más evidente que los TLRs tienen un papel distinto o adicional en la vigilancia inmune y en las respuestas inflamatorias en el SNC, por lo que los estudios más recientes se focalizaron en caracterizar los perfiles de expresión de TLRs en las células residentes del SNC, incluyendo microglia (TLRs 1-9) (Aravalli *et al*, 2007), astrocitos (TLRs 1-5, 9, 13) (Antel *et al*, 2005; Mishra *et al*, 2008; Teale *et al*, 2006) y neuronas (TLRs 2-5, 8, 9, 11 - 13) (Tang *et al*, 2007; Vartanian *et al*, 2006). Se realizaron estudios comparativos entre tejidos provenientes del SNC de humanos que sufrían enfermedades neurodegenerativas e individuos control, obteniéndose diferencias en los perfiles de expresión de los TLRs, resultados que confirman la hipótesis acerca de la participación de estos receptores en patologías neuroinflamatorias (Bsibsi *et al*, 2002).

2.7.2. Rol de los cannabinoides en neuroinflamación

En la mayoría de las perturbaciones fisiológicas y patológicas estudiadas, se ha demostrado que el SEC desempeña un papel pro-homeostático, facilitado por el hecho de ser los eCBs mediadores locales biosintetizados y liberados bajo demanda, permitiendo entonces activar sus targets sólo cuándo y dónde sea necesario. Como consecuencia, los niveles de eCBs

de los tejidos se alteran muy a menudo (y la actividad de sus targets se modifica) en casi todos los trastornos crónicos, lo que puede ocasionar una respuesta adaptativa dirigida a restaurar la homeostasis o un mecanismo desadaptativo que eventualmente contribuye a los síntomas o progresos de la enfermedad. En los trastornos neurodegenerativos, los eCBs estarían regulados primero para dirigirse solamente a las células que expresan CB1 glutamatérgico (Monroy *et al*, 2006) con el objetivo de reducir la excitotoxicidad, pero luego pasan a actuar sobre las neuronas GABAérgicas vecinas, que requieren mayores concentraciones de ligandos del receptor CB1 (Maione *et al*, 2006), produciendo efectos opuestos. La actividad de CB2 también parece producir efectos opuestos dependiendo la etapa en la que esté transcurriendo una determinada enfermedad. En condiciones normales, los receptores CB2 no se expresan en grandes cantidades en el SNC, sino que su expresión aumenta considerablemente en las células microgliales y gliales que se activan durante condiciones neuroinflamatorias. En una primera etapa, esta activación de CB2 puede causar efectos anti-inflamatorios, reduciendo la liberación de citoquinas, pero luego de un tiempo la respuesta se torna pro-inflamatoria, reclutando células inmunes de la sangre cuando se interrumpe la BHE (Lunn *et al*, 2007; Miller *et al*, 2007). Por estas razones, tanto agonistas como antagonistas podrían ser beneficiosos para tratar las consecuencias inflamatorias de los desórdenes neurodegenerativos. Los antagonistas de TRPV1 y CB2 podrían ser útiles en etapas tardías (Lunn *et al*, 2007; Starowicz *et al*, 2007) mientras que los agonistas de CB1 y los inhibidores de la hidrólisis eCBs podrían ser eficaces tanto en la fase inicial como en la tardía (Di Marzo, 2008).

Los cannabinoides están siendo investigados actualmente para el tratamiento de condiciones inflamatorias como esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoidea, (enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), epilepsia, enfermedad de Huntington (HD), isquemia cerebral, envejecimiento y glaucoma. Sin embargo, hoy en día, sólo el Sativex® se está utilizando para combatir los síntomas de alguna de estas enfermedades. Este producto ha sido aprobado en 24 países para tratar los espasmos musculares asociados con la MS. No se considera curativo, ya que su utilización se limita al alivio de algunos síntomas, con el agravante que puede producir efectos secundarios parecidos a los manifestados con el consumo de marihuana. No obstante, existen múltiples investigaciones que evidencian las propiedades anti-inflamatorias de los cannabinoides en distintos modelos, y actualmente se están desarrollando terapias utilizando diversas estrategias ya sea mediante agonistas/antagonistas de CBRs o

inhibidores de la recaptación celular de eCBs (Anexo E). Se cree que las acciones neuroprotectoras del SEC son mediadas a través de una variedad de mecanismos, que incluyen acciones anti-oxidantes (Hampson *et al*, 1998), inhibición del flujo de Ca^{2+} mediado por NMDA (Mackie y Hille, 1992; Nadler *et al*, 1993) e inhibición de la liberación de glutamato (Köfalvi *et al*, 2007). Los cannabinoides actúan sobre las neuronas y glía para inhibir la liberación de moléculas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1, $TNF\alpha$ y NO (Puffenbarger *et al*, 2000; Cabral *et al*, 2001), y aumentar la liberación de las citoquinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10 (Klein *et al*, 2000) e IL-1ra (Molina-Holgado *et al*, 2003). En resumen, los efectos beneficiosos del SEC en la neuroinflamación se deben a la inhibición de la producción de mediadores pro-inflamatorios, aumento de la producción de factores anti-inflamatorios, inhibición del reclutamiento de microglía y aumento de la supervivencia de astrocitos y oligodendrocitos.

2.7.3 Interacción entre cannabinoides y los TLRs.

Las células del sistema inmune innato que expresan TLRs son monocitos, macrófagos, células microgliales y células dentríticas. Todas estas células expresan CBRs y, por lo tanto, los cannabinoides influyen en sus respuestas. Los TLRs son cruciales en la respuesta innata neuroinmune que proporcionan estas células mieloides, y existe una vasta evidencia que indica que la activación de TLRs es un gran inductor de neuroinflamación (Lehnardt, 2010).

Para lograr profundizar los conocimientos acerca de la relación entre cannabinoides y TLRs, diversas investigaciones utilizaron como modelo clásico de inflamación la respuesta producida por TLR4 tras su activación con LPS. Se observó en varios estudios *in vitro* utilizando distintas líneas celulares que, en general, tanto cannabinoides exógenos como endógenos interfieren con la producción de NO y citoquinas pro-inflamatorias (Fig. 7) (Larsen *et al*, 2003; Klein, 2005; Cabral y Marciano-Cabral, 2005; Mestre *et al*, 2005; Chang *et al*, 2001). En cuanto a las citoquinas pro-inflamatorias, se observó en distintos modelos que los cannabinoides pueden disminuir su producción de manera directa (Baldwin *et al*, 1997; Zurier *et al*, 2003; More *et al*, 2013) o indirecta (Xu *et al*, 2007; Guzman, 2005; Rieder *et al*, 2010).

Con respecto al NO, pudo observarse en diferentes modelos que los cannabinoides atenúan su producción ya que disminuyen la actividad enzimática y expresión de la NO sintetasa (Jeon *et al*, 1999). Además, también se observó que atenúan la expresión del factor de

transcripción NF- κ B (Puffenbarger *et al*, 2000; Jeon *et al*, 1996; Coffey *et al*, 1996). En resumen, los experimentos *in vitro* demuestran que existen múltiples vías por las que los cannabinoides pueden atenuar o suprimir las respuestas producidas por el LPS.

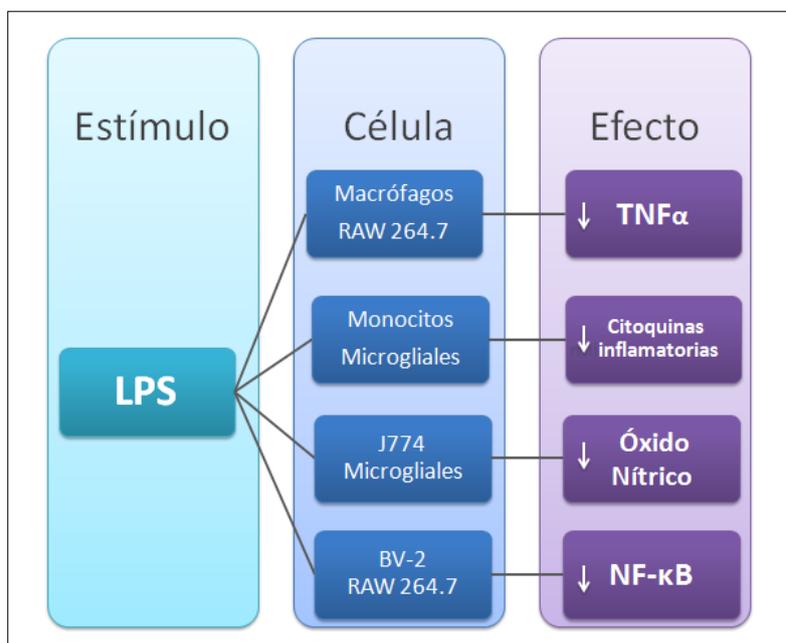


Figura 7. Efectos *in vitro* de los cannabinoides sobre las respuestas de los TLRs frente a su activación por LPS. Diversas investigaciones determinaron que, en general, tanto cannabinoides exógenos como endógenos, son capaces de disminuir la liberación de óxido nítrico, la producción de diversas citoquinas inflamatorias (incluyendo TNF α), y disminuir la actividad del factor de transcripción NF- κ B.

En cuanto a los estudios *in vivo*, en general los resultados concordaron con los obtenidos *in vitro*. Se observó que los cannabinoides pueden prevenir la acumulación de citoquinas pro-inflamatorias en sangre y cerebro de ratón luego de la administración de LPS vía intraperitoneal (Roche *et al*, 2006) e intra-cerebro-vascular (Marchalant *et al*, 2007). Además, se advirtió que pueden modular distintos eventos inmunosupresivos que colaboran para evitar la exacerbación de la inflamación, como son: disminuir la migración celular de macrófagos (Raborn y Cabral, 2010) y neutrófilos (Napimoga *et al*, 2009; Smith *et al*, 2001; McHugh *et al*, 2008), atenuar la actividad de células NK (Massi *et al*, 2000), impedir la diferenciación de monocitos en células dendríticas (Roth *et al*, 2015), reducir la capacidad de las células dendríticas diferenciadas de activar linfocitos T (Wacnik *et al*, 2008) o directamente inducirles la muerte (Do *et al*, 2004).

La utilización de ratones *knockout* o deficientes en la expresión de CBRs también brindó evidencias respecto a la participación del SEC en procesos neuroinflamatorios. Los ratones CB2^{-/-} mostraron una mayor susceptibilidad a contraer enfermedades inflamatorias, incluidas

la arterioesclerosis y la encefalomiелitis autoinmune experimental. Tanto la incidencia como la severidad de estas enfermedades se vieron exacerbadas en estos modelos comparados con ratones *wild-type* (Buckley, 2008; Malfitano *et al*, 2014). Los ratones carentes de ambos receptores también mostraron una respuesta exacerbada ante estímulos inflamatorios (Karsak *et al*, 2007; Karmaus *et al*, 2013). Células obtenidas de estos modelos (macrófagos alveolares y de médula ósea) presentaron un fenotipo más maduro y tenían una mayor expresión de moléculas clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que sugiere que la ausencia de las señales provenientes del SEC podría alterar la diferenciación y maduración de las células correspondientes al sistema inmune innato, tornándolas hiperreactivas (Buchewitz *et al*, 2008; Karmaus *et al*, 2013)

2.7.4 Impacto de la activación de los TLRs sobre el SEC.

La expresión de CBRs en células del sistema inmune no sólo varía dependiendo del tipo celular del que se trate, sino también de su estado de maduración, y si se encuentran o no activadas. Estas células tienen un marcado grado de plasticidad, y la expresión de CBRs puede ser manipulada intencionalmente. Tanto monocitos periféricos como células dendríticas y macrófagos expresan CB1 y CB2 constitutivamente, reportándose niveles bajos o incluso indetectables de los mRNA correspondientes (Walter *et al*, 2003; Matias *et al*, 2002; Han *et al*, 2009). Debido a la mencionada plasticidad de estas células mieloides, un estímulo particular puede inducir, aumentar o disminuir la expresión de los CBRs en distintos estadios, durante su diferenciación, maduración o activación, afectando notablemente su sensibilidad ante los cannabinoides circundantes. En general, la maduración de monocitos periféricos en macrófagos, o la diferenciación de células promielocíticas en macrófagos aumentan la expresión de CBRs (Daaka *et al*, 1995; Kishimoto *et al*, 2003). La activación de las células del sistema inmune parece aumentar la expresión de CB2 en particular, como se observó en macrófagos de ratón estimulados con tioglicolato (Carlisle *et al*, 2002) y células microgliales activadas mediante interferón- γ (Maresz *et al*, 2005).

Los resultados de estudios realizados estimulando TLR4 con LPS varían dependiendo el sistema experimental que se haya utilizado, lo que refleja la plasticidad de las células inmunes innatas a las señales de su microambiente. Se ha reportado que la adición de LPS puede

disminuir los niveles de ARNm de CB2 (Carlisle *et al*, 2002; Cabral *et al*, 2008) o aumentarlos (Walter *et al*, 2003; Mukhopadhyay *et al*, 2006; Concannon *et al*, 2015).

Se demostró en varios ensayos que la administración de LPS *in vivo* puede modificar la concentración de los eCBs mediante la activación de TLR4. En distintos tipos celulares se observó que los niveles de FAAH y MAGL disminuyen en respuesta al LPS, lo que conlleva a un aumento de AEA (Wolfson *et al*, 2013; Varga *et al*, 1998) y 2-AG (Szafran *et al*, 2015; Pestonjamas y Burstein, 1998), respectivamente. Por lo tanto, puede concluirse que ante una señal de peligro, ya sean PAMPs o DAMPs, las células del sistema inmune innato incrementan los niveles de eCBs de una manera particular (ya sea aumentando sólo AEA, 2-AG, o ambos). Por otro lado, dependiendo el estímulo, la duración del mismo, o el estado de la patología, la célula activada puede aumentar la expresión de CBRs o no, evento clave para mediar la inmunosupresión. Se determinó luego de compilar diversos ensayos, que las células que aumentan la expresión de CBRs pueden suprimir o atenuar la respuesta inflamatoria, mientras que las que mantienen niveles bajos de CBRs no consiguen ese efecto mediado por el SEC, y la respuesta inflamatoria se exagera (Fig. 8).

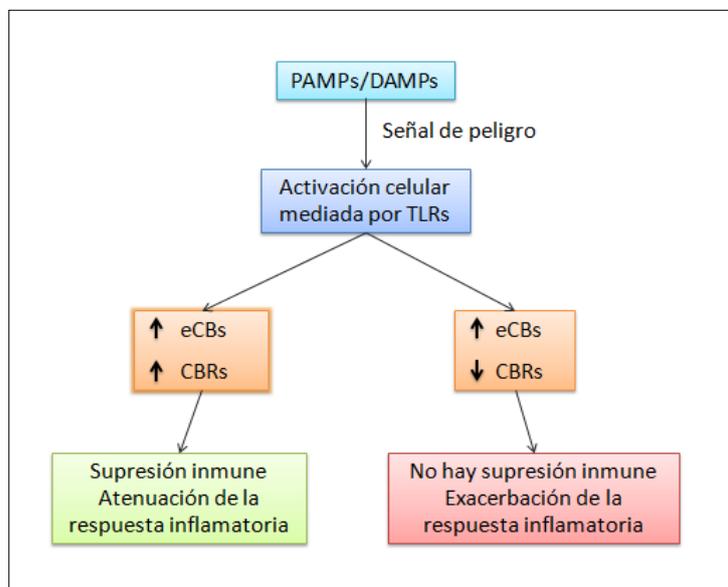


Figura 8. Interacción entre la activación celular mediada por TLRs y el SEC. Tanto PAMPs como DAMPs pueden activar, mediante su interacción con LTRs, las células pertenecientes al sistema inmune innato. Estas células elevan su producción de eCBs, pero solo pueden atenuar la respuesta inflamatoria si también aumentan la expresión de CBRs.

3. Hipótesis

El objetivo general del proyecto es reconocer el papel del SEC ante el desarrollo de procesos inflamatorios que se desencadenan en el SNC a partir de una endotoxemia inducida por LPS.

En estudios previos relacionados con procesos inflamatorios, se determinó que el SEC es capaz de interferir en la producción de óxido nítrico y diversas citoquinas inflamatorias (Larsen *et al*, 2003). Los resultados varían dependiendo del modelo y fármacos utilizados y la duración del estímulo, pudiéndose observar mayoritariamente una disminución en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Eljaschewitsch *et al*, 2006). No obstante, se han reportado algunos casos donde los mismos marcadores moleculares se encuentran aumentados, datos que se corresponden con una exacerbación de la inflamación (DeLaurentiis *et al*, 2010).

Los cannabinoides se sintetizan a demanda luego de un estímulo, y si bien tienen mayor afinidad por sus receptores denominados clásicos (CB1 y CB2), también pueden activar otros receptores como TRPV1, GPR55 y PPARs. A su vez, los productos que se generan en las distintas vías que inactivan a los cannabinoides son metabólicamente activos, pudiendo también estimular los receptores mencionados anteriormente. Se considera entonces que el resultado global de los cannabinoides como reguladores de la inflamación es una combinación de efectos producidos por la activación de las distintas vías, y que la elección de una u otra va a depender de los sustratos disponibles y la viabilidad o saturación de los diferentes receptores (Turcote *et al*, 2015).

De acuerdo a lo desarrollado anteriormente, se plantearon las siguientes hipótesis:

1. El SEC participa en la respuesta inflamatoria, por lo que deberían observarse diferencias significativas en las concentraciones de TNF α y PGE $_2$ en respuesta al LPS entre los animales no tratados y los aquellos que sufrieron un bloqueo farmacológico de los receptores de cannabinoides.
2. Dado que la inflamación aumenta los niveles de endocannabinoides, y estos pueden activar distintos receptores, el bloqueo farmacológico de un tipo de receptor debería influenciar los niveles de expresión de los receptores relacionados.

4. Materiales y métodos

4.1 Animales

Se utilizaron ratas adultas macho de la cepa Sprague Dawley obtenidas en el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la UBA, de peso corporal 250-300g, alojadas en grupos de 4-6 por jaula en una sala exclusiva para animales, iluminada artificialmente durante 12 hs (07:00-19:00hs.) a una temperatura controlada de 20-24°C, teniendo en todo momento acceso libre al alimento balanceado y agua. Para la realización de los diferentes experimentos, las ratas utilizadas fueron divididas al azar en diferentes grupos y transferidas en jaulas de transporte hacia las salas particulares donde se llevaban a cabo los mismos. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Odontología de la UBA, realizados de acuerdo con la Declaración de Helsinki y también en concordancia con el National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication N° 85-23, Rev. 1985, National Academy Press, Washington 1996).

4.2 Drogas

La mayoría de las drogas fueron obtenidas de Sigma Co. (St. Louis, MO, USA) incluyendo el LPS bacteriano (*Escherichia coli* serotipo 0055:B5), excepto: el antagonista de receptores CB1 (AM251) [N-(piperidin-1-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide] y el antagonista de receptores TRPV1 [N-(4-Chlorophenethyl)-7,8-dihydroxy-1,3,4,5-tetrahydro-2H-benzo[c]azepine-2-carbothioamide], [³H]PGE₂ de New England Nuclear Life Science Products (Boston, MA) y el líquido de centelleo en Wallac Oy, Fisher Chemicals (Reino Unido). Los insumos para PCR (Promega Corporation, Madison, WI, USA) fueron adquiridos en Biodynamics SRL, Argentina.

4.3 Experimentos *in vivo*

Para evaluar la participación del sistema endocannabinoide en los procesos inflamatorios en el hipotálamo, se administró por vía intracerebro-ventricular antagonistas de receptores de cannabinoides, en animales sometidos posteriormente a endotoxemia por una inyección intraperitoneal de LPS. En todos los casos las ratas fueron sacrificadas mediante

decapitación por guillotina, y las muestras almacenadas adecuadamente para su posterior análisis. (Fig. 9)

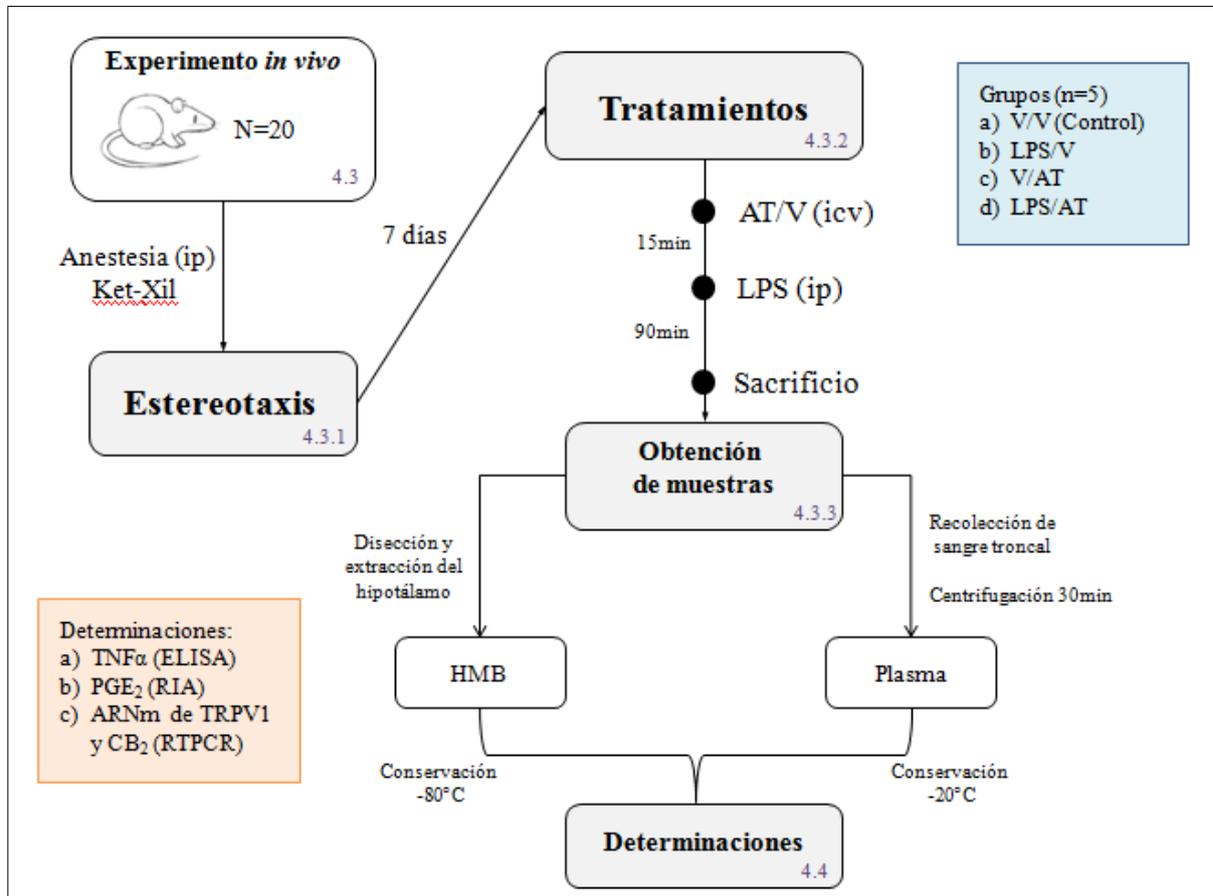


Figura 9. Diseño del experimento *in vivo*. Cada rata fue sometida al proceso de estereotaxis, que consiste en la implantación de una cánula en una región específica del cráneo. Siete días post implantación, se administró por vía icv el antagonista o su vehículo, y luego de 15 minutos el LPS para inducir la endotoxemia, o su vehículo, vía ip. Al cabo de 90 minutos los animales fueron sacrificados mediante decapitación y se almacenó el plasma y el hipotálamo para la determinación de los distintos parámetros bioquímicos. Para el experimento se utilizó un N=20 ratas, distribuidas en 4 grupos de n=5. Abreviaturas: Ket, Ketamina; Xil, Xilacina; icv, inyección intra-cerebrovascular; ip, inyección intraperitoneal; V, vehículo; AT, antagonista; LPS, lipopolisacárido bacteriano; RIA, radioinmunoensayo; HMB, hipotálamo medio basal.

4.3.1 Técnica de cirugía estereotáxica.

Esta cirugía consiste en realizar una cuidadosa perforación en el cráneo del animal con el fin de poder implantar una cánula que permita la administración de drogas directamente en un área específica del cerebro. Para tal cirugía se utilizó un Atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 2007), el cual posee información de las secciones frontales del cerebro de la rata tomadas a diferentes distancias anteriores y posteriores de un punto de referencia ubicado en el cráneo del animal; cada una de las secciones está asociada a coordenadas específicas que

permiten al investigador ubicar una determinada región del cerebro con un aparato estereotáxico. El punto de referencia externa que utiliza el manual y se utilizó para ubicar el espacio de los ventrículos laterales es el *bregma*, que es el punto de intersección de las suturas sagital y coronal del cráneo, el cual se puede visualizar como una Y invertida sobre el cráneo. Es importante destacar que debido a las variaciones entre las distintas cepas de ratas y la edad de los animales, los atlas indican sólo una localización aproximada; por esta razón, es necesaria la utilización de individuos control. Estos son sometidos al mismo procedimiento de estereotaxis que las que se utilizan para el experimento, pero en lugar de realizar la posterior aplicación de fármacos, se les administra azul de metileno, un colorante que es fácilmente rastreable. Cuando el animal es sacrificado, se le extrae el cerebro y mediante el uso de vibrátomo se realizan cortes en finas secciones, observándose con una lupa si la coloración aparece efectivamente en el ventrículo lateral.

Para implantar las cánulas de acero inoxidable (25 Gauge) se utiliza un aparato estereotáxico, instrumento que permite sujetar firmemente al animal anestesiado y traducir las coordenadas obtenidas del manual permitiendo situar la cánula en el lugar específico. Este dispositivo incluye un soporte para la boca y ajustes para ambos oídos, lo que posibilita mantener el cráneo del animal en la orientación adecuada. El soporte de la cánula es un brazo calibrado que puede desplazarse distancias exactas en los tres ejes espaciales: anterior-posterior (A-P), dorsal-ventral (D-V), y lateral-medial (L). Una vez conocidas las coordenadas estereotáxicas del espacio correspondiente al hipotálamo (A-P: 0.6 mm; L: -2 mm; D-V: -3.2 mm), se anestesia al animal con una mezcla de 2% hidrocloreuro de xilacina (5 mg/kg; i.p.) y 5% clorhidrato de ketamina (50 mg/kg; i.p.), se lo sujeta firmemente en el aparato, se le corta el cuero cabelludo y se elimina el tejido conectivo que quedara sobre el cráneo. Así, se deja expuesta la calota de forma que pueda observarse el bregma y colocarse el extremo de la cánula sobre el mismo. A partir de este punto inicial, se mide la localización para cada uno de los ejes y se desplaza la cánula a lo largo de la distancia adecuada en los ejes antero- posterior y latero-mediales, hasta situarlo en un punto exactamente por encima del objetivo, marcando adecuadamente esa posición. Luego, se realiza una cuidadosa perforación del cráneo en el lugar marcado donde fuere colocada la cánula, y otro en alguna región cercana al mismo donde se debe colocar un tornillo de fijación, cuya función es permitir que el cemento que se coloca después se adhiera mejor al cráneo. Para la colocación de la cánula en el sitio adecuado, se

desciende el dispositivo en el eje dorsal-ventral a través del tejido nervioso hasta la profundidad indicada. Posteriormente, se le agrega un recubrimiento plástico alrededor de la cánula para evitar que el animal se la quite y un mandril dentro para evitar la formación de coágulos en su interior que luego entorpezcan la administración de las diferentes drogas el día del experimento. El tornillo de fijación puede colocarse antes o después de la cánula. Una vez finalizada la colocación del instrumental, se recubre la zona con cemento odontológico compuesto de fosfato de zinc, que al solidificar fija la cánula a la calota del animal. Finalmente, el animal es retirado del aparato estereotáxico, colocado en una jaula individual con calor donde se le administra intramuscularmente antibiótico y calmantes para el dolor. Una vez recuperados totalmente de la anestesia, los animales retornan en jaulas individuales al bioterio donde permanecen una semana hasta el día del experimento. Diariamente, los animales son examinados y el mandril removido y vuelto a colocar en la cánula a fin de mantener la vía libre de coágulos.

4.3.2 Tratamientos

Los tratamientos fueron realizados en ratas conscientes y con libertad de movimiento una semana después de la cirugía estereotáxica. Para administrar las drogas vía intra-cerebro-ventricular (icv) se realizó una micro-inyección con una jeringa Hamilton, durante un periodo de 1 min. Esta vía de administración permite centralizar los efectos producidos por las drogas en el SNC, limitando así los efectos periféricos. Las drogas que modifican la actividad del SEC utilizadas en este proyecto fueron el antagonista de CB1, AM251 (500ng/ μ l) y el antagonista de TRPV1, capsazepina (500ng/5ul), ambas disueltas en etanol 1% en solución salina, también utilizado como vehículo en los grupos control.

Transcurridos 15 minutos luego de la aplicación icv, los animales recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de LPS disuelto en solución salina isotónica libre de pirógenos a una dosis de 5 mg/kg de rata, o sólo con su vehículo. 90 minutos luego de la administración ip, los animales fueron sacrificados.

Para la realización de los tratamientos, los animales fueron divididos en 4 grupos (5 réplicas biológicas por grupo): (i) ratas control que recibieron solución salina vía ip e icv; (ii) ratas a las que se le administró una solución salina vía ip y el antagonista AM251 vía icv; (iii) ratas que recibieron LPS via ip y solución salina vía icv; (iv) ratas que recibieron LPS vía ip y antagonista vía icv. En todos los casos las dosis de los fármacos administrados fueron determinadas en estudios previos por el grupo de trabajo.

4.3.3 Obtención de muestras

Inmediatamente después de la decapitación se recogió la sangre troncal en tubos Falcon heparinizados, y el suero fue separado por centrifugación a 3000rpm y 4°C durante 20 min. Las muestras fueron mantenidas a -80°C hasta el momento de la determinación de TNF α .

Paralelamente, el cerebro fue removido rápidamente y el hipotálamo medio basal (HMB) diseccionado. Este fragmento hipotalámico se obtuvo haciendo un corte transversal desde el quiasma óptico, extendiéndose dorsalmente 2.5 mm. Un corte horizontal se extendió caudalmente desde este punto hasta la parte posterior del tallo pituitario, donde fue realizado otro corte frontal. Cortes longitudinales fueron realizados bilateralmente al surco hipotalámico. Las muestras fueron conservados en tubos tipo Eppendorf libres de DNAsas y RNAsas a -60°C hasta el momento de su correspondientes determinaciones.

4.4 Determinaciones

4.4.1 Determinación de prostaglandina E2

Los niveles de prostaglandina E2 (PGE₂) en el hipotálamo fueron determinados por radioinmunoensayo (RIA). Para realizar este procedimiento, se homogeneizó el HMB en 1,5 ml de etanol absoluto y, luego de la centrifugación, el sobrenadante se secó en un Speedvac a temperatura ambiente. Los residuos se volvieron a suspender con buffer PBS-EDTA 0.025 M conteniendo gelatina 0.1%, timerosal 0.001%, albúmina sérica bovina 0.1%, pH 7.4.

Las muestras fueron incubadas en buffer y anticuerpo anti-PGE₂ durante 30 min a temperatura ambiente. Luego la PGE₂ marcada fue agregada como trazador e incubado durante 1 hora a 4°C. La reacción se frenó con la adición de una suspensión de carbón-dextran frío (0.5%:0.5% respectivamente) y luego de una incubación por 10 min a 4°C, los tubos fueron centrifugados a 3200rpm por 15 min a 4°C. Luego, 2 ml de cóctel de centelleo OptiPhase 3 fue agregado a los sobrenadantes y la cantidad de radioactividad determinada en un contador beta.

La sensibilidad del ensayo fue de 12,5 pg por tubo. La reactividad cruzada de PGE₂ y PGE₁ fue del 100%, mientras que la reactividad cruzada con otras prostaglandinas fue del 0,1%. Los coeficientes de variación intra e interensayo para PGE₂ fueron 8,2 y 12%, respectivamente. Los resultados se expresaron como picogramos por MBH total utilizado. Para una descripción detallada de esta metodología, revisar el anexo F.

4.4.2 Determinación de TNF α

El TNF α plasmático se determinó mediante ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) específico para ratas, usando anticuerpos y estándares obtenidos de BD Biosciences, San Diego, CA, USA.

Brevemente, se cubrieron placas de microtitulación MaxiSorp de 96 pocillos (Nalge Nunc International, Nueva York, EE.UU.) con anticuerpos anti-TNF α de rata diluidos 1: 250 en buffer de carbonato de sodio 0,1 M; pH 9,5, y se las dejó incubando *overnight* a 4°C. Las placas se lavaron cinco veces con buffer de lavado/dilución (0,05% de Tween-20 en PBS, pH 7,0) y se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora usando 200 μ l de diluyente de ensayo (PBS con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, pH 7,0). Después de cinco lavados, se añadieron alícuotas de 100 μ l de muestras o patrones (0-2000 pg/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Luego de cinco lavados, se añadieron 100 μ l de anticuerpo anti-TNF α biotinilado específico de rata (1: 250, diluido en diluyente de ensayo) a cada pocillo. Se llevó a cabo otra incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de cinco lavados, se añadieron 100 μ l de peroxidasa de rábano conjugado a estreptavidina (1:250, diluido en diluyente de ensayo) a cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de siete lavados, se añadieron 100 μ l de solución de sustrato de tetrametilbenzidina por pocillo y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Al final del período de incubación, se añadieron 50 μ l de H₃PO₄ 1 M por pocillo para detener la reacción y facilitar el desarrollo del color. La absorbancia se leyó inmediatamente a 450nm en un lector de microplacas (Modelo 3550, BIO-RAD Laboratories, California, EE.UU.). Los niveles de TNF α en el plasma e HMB se expresaron en pg / ml. Para una descripción detallada de esta metodología, revisar el anexo G.

4.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

Esta determinación se realizó sobre los fragmentos hipotalámicos obtenidos en los experimentos realizados previamente. La RT-PCR se llevó a cabo para analizar la expresión del ARNm de los receptores CB2 y TRPV1, utilizando como control la expresión del ARNm codificante para la proteína constitutiva actina.

4.4.3.1 Extracción del ARNm

Para realizar la extracción, los tejidos fueron procesados en un homogenizador de vidrio con embolo de teflón utilizando 500ul de RNazol. Para evitar la degradación del ARNm, el procedimiento se realizó en frío y sin demorar más de 2 min con cada muestra. El homogenato fue colocado en un tubo tipo Eppendorf libre de DNAsas y RNAsas y centrifugado durante 5 min a 12000 x g descartando el pellet al finalizar el proceso. El sobrenadante fue trasvasado a un tubo nuevo y se le adicionó 200µl de agua ultrapura libre de RNasa, DNasa y proteasa (Genbiotech cat: WAT500, 500ml). La mezcla se agitó 15 segundos con vortex y luego se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas con refrigeración (4°C) durante 15 min a 12000 x g, quedando bien definidas la fase acuosa que contiene el ARN y la orgánica que se descarta. Se transfirieron 600µl de la fase acuosa a otro tubo de centrífuga y se le agregó isopropanol en una proporción de 1:1, lo que hace precipitar el ARN. Inmediatamente después, las muestras se centrifugaron a 12000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado delicadamente teniendo cuidado de no desprender el pellet, el cual se lavó con etanol 75 % y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, procedimiento que se repitió 3 veces, para luego dejar secándolo a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet fue resuspendido delicadamente en 50µl de agua libre de nucleasas e incubado a 57 °C para facilitar su disolución.

La concentración y pureza de las muestras de ARN fueron evaluadas por absorbancia a 260 nm en un Nanodrop (Eppendorf, Hamburg, Germany) por el método de RNA-6000-NanoDrop, empleando el 2100 Bioanalyzer®, equipado con un 2100-Expert-Software® (Agilent Technologies, Palo alto, Calif., USA). El grado de pureza fue verificado por cuantificación de la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (260/280) sabiendo que relaciones inferiores a 1,7 indican presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes. En todas las muestras analizadas los valores de pureza del RNA fueron entre 1.8 a 2.0.

La integridad del ARNm fue verificada en las muestras mediante corridas en gel de agarosa (2 %) con agregado de 4µl de cyber green, utilizando buffer TMB y un voltaje constante de 110V. Para las corridas se tomaron 0.5 µg de cada muestra, se diluyeron a un volumen final de 5 µl con agua ultrapura y se les agregó 1 µl de *loading* buffer para su posterior visualización. Se sembraron 5µl de cada muestra y 2.5 µl de marcador de peso molecular. Al finalizar la

corrida, el gel se visualizó con luz UV. En todos los pasos de este procedimiento se utilizaron materiales y reactivos libres de nucleasas.

4.4.3.2 Obtención del ADNc

Con el objetivo de degradar el DNA genómico contaminante, se tomaron alicuotas de 4µg de cada muestra de ARN y se le agregaron 16µl de DNAsa libre de RNAsa (Invitrogen DNA-free™ kit). Luego de la digestión, se procedió a transcribir los ARNm totales utilizando 25 µl de una mezcla reactiva conteniendo: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM DTT, DNTPs (Invitrogen) y *random primers*. Esta mezcla se incubó 10 min a 65°C en un termociclador Boeco, Germany.

Una vez finalizada la transcripción se efectuó la síntesis del ADNc. Para llevar a cabo este procedimiento, se le adicionó a cada muestra 10 µl de una mezcla de: DNTP's 2µl, Oligo dT 1µl, Buffer MMLV RT 5X 4µl, enzima transcriptasa reversa M-MLVRT (Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase, Promega) 0.5µl y RNAsin 0.25µl (Invitrogen). La mezcla de reacción fue homogeneizada y colocada en el termociclador programado con un ciclo de tres estadios térmicos y finalmente enfriada (Tabla II). El ADNc obtenido fue diluido a una concentración final de 50ng/µl con agua libre de nucleasas.

1		2		3		4	
t (min)	T (°C)						
10	25	50	37	15	70	5	4

Tabla II. Programa del termociclador para la generación de ADNc.

4.4.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación, se agregaron en cada tubo colocado en el termociclador: 4 µl de muestra de ADNc, 5 µl de agua libre de nucleasa, 0.4µl de dNTPs mix, 0.5µl de *primers forward*, 0.5 µl de *primers reverse*, 0,1 µl de Gotaq y 4µl Buffer Green Go Taq 5X (Promega). En cada experimento fue incluido un control negativo carente de ADNc molde o transcriptasa reversa.

Puesta a punto de la RT-PCR

La secuencia de los *primers* específicos *forward* y *reverse* para cada receptor a analizar fue diseñada por el grupo de trabajo utilizando la bibliografía correspondiente y el Software Primer3 (Tabla III).

Primer	Secuencia	
TRPV1	Forward	5´ GACATGCCACCCAGCAGG 3´
	Reverse	5´ TCAATTCCCACACACCTCC 3´
CB2	Forward	5´ CTTGACTGAGCACCAGGACA 3´
	Reverse	5´ TAACAAGGCACAGCATGGAG 3´
ACTINA	Forward	5´ ACCCGCCGAGTACAACCTTC 3´
	Reverse	5´ ATGCCGTGTTCAATGGGGTA 3´

Tabla III. Secuencia de los primers forward y reverse utilizados en la PCR.

Con el objetivo de definir la temperatura de *melting* óptima para cada primer, se realizaron dos rampeos de temperatura. Para una primera aproximación, un pool conteniendo 2µl de ADNc de varias muestras al azar obtenidas en las primeras experiencias realizadas fue amplificado con los *primers forward* y *reverse* a testear utilizando un programa en el termociclador que abarcaba un rango de temperaturas bastante amplio, entre 56°C y 71°C. Luego de correr los productos de amplificación en un gel y observar las bandas, se advirtió que las temperaturas superiores a los 60°C eran inefectivas, con lo cual se programó otra corrida. En el nuevo procedimiento, se estableció un rango de temperaturas más acotado, entre 55°C y 62.4°C. Específicamente, las 7 temperaturas de prueba fueron: 55 °C; 55.3 °C; 55.9 °C; 57 °C; 58.4 °C; 60.3 °C y 62.4 °C. Esta corrida sí permitió determinar las temperaturas óptimas para cada primer, ya que los productos de PCR que fueron corridos en el gel de agarosa al 2% mostraron bandas bien definidas bajo la luz UV. En las muestras amplificadas con los *primers* de TRPV1 se observó una banda intensa a los **60.3 °C**, para CB2 se observó una banda muy tenue a los **57 °C** y por último, para los *primers* de actina, nuestro gen control, la temperatura óptima de amplificación fue de **58.4 °C**.

Uno de los parámetros modificados con el transcurso de las experiencias fue el número de ciclos programados en el termociclador. En los primeros ensayos se utilizaron 35 ciclos para las amplificaciones, lo que, utilizando las temperaturas de *melting* óptimas para cada *primer*, conducía a una saturación en la intensidad de las bandas. Tratándose de una técnica semi-cuantitativa basada en la comparación densitométrica de las diferentes bandas expuestas en el gel, una saturación en la densidad lumínica de la banda traería como consecuencia errores graves de cuantificación, influyendo directamente sobre los resultados. Luego de algunas pruebas, el número de ciclos que resultó óptimo fue 25. De esta manera, el protocolo de la PCR

en todos los casos quedó establecido como: (i) un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min; (ii) 25 ciclos de desnaturalización/hibridación/extensión; (iii) una etapa de elongación final a 72°C por 5 min y (iv) un paso de conservación a 4°C durante 5 min (Tabla IV).

Primer	Desnaturalización inicial		25 Ciclos						Elongación final		Conservación	
			Desnaturalización		Hibridación		Extensión					
	1		2		3		4		5		6	
	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
TRPV1	5	94	0,5	95	0,5	59	72	1	72	5	5	4
CB2	5	94	0,5	95	0,5	58	72	1	72	5	5	4

Tabla IV. Programa del termociclador para la la amplificación de los cDNA de los receptores.

4.4.3.4 Detección de la amplificación

Los productos que resultaron de la amplificación fueron sembrados en un gel de agarosa 2% (p/v) conteniendo 0.01% v:v de syber green, y separados mediante una corrida electroforética a 110 V. Una vez finalizada la corrida, las bandas fueron visualizadas mediante el uso de un transiluminador y los geles se fotografiaron con cámara digital bajo luz UV y cuantificados con software Image J, de modo de determinar la densidad óptica de cada banda. Los pesos moleculares de las bandas fueron determinados de acuerdo a los pesos moleculares de los marcadores utilizados.

4.5 Evaluación estadística de los resultados.

Los resultados fueron expresados como Media \pm Desvío Estándar. Los datos fueron procesados utilizando el Software de Infostat. Normalidad y homogeneidad de varianzas para los set de datos fueron testeadas mediante Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La significancia de las diferencias observadas entre las medias fue determinada mediante análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores, seguido por el test de Tukey en caso de ser necesario. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$. Todos los experimentos fueron llevados a cabo al menos 2 veces. Las figuras representan resultados de experimentos individuales.

5. Resultados

Objetivo A - Determinar la participación del SEC hipotalámico en la producción de mediadores inflamatorios.

El TNF α es considerado una potente citoquina pleiotrópica que regula diversos eventos biológicos fundamentales de las células, tales como la activación de leucocitos, la liberación de diversas citoquinas y quimioquinas y la producción de especies reactivas de oxígeno (McKellar *et al*, 2009). Se ha observado que tanto la forma soluble como la unida a membrana participan en la respuesta inflamatoria, por lo que se ha relacionado de manera directa con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias y enfermedades autoinmunes, entre otras (Scrivo *et al*, 2001; Bultink *et al*, 2012; Aggarwal *et al*, 2012). Por estas razones, es un marcador adecuado para determinar si el SEC participa en el desarrollo de procesos inflamatorios.

1- Determinar la concentración plasmática e hipotalámica de TNF α en respuesta a la endotoxemia y al bloqueo farmacológico del SEC.

Como se describió detalladamente en la sección 4.0 materiales y métodos, se realizaron dos experimentos en los cuales se administraron fármacos vía icv que interfieren en la función de los componentes del sistema endocannabinoide. En un ensayo se utilizó AM251, un antagonista para el receptor CB1, mientras que en el otro se administró Capsazepina (CPZ), un antagonista del receptor TRPV1.

En ambos experimentos, puede observarse que la inyección intraperitoneal (ip) de LPS provocó un aumento significativo en las concentraciones de TNF α en la fracción hipotalámica de los animales tratados con LPS, respecto a los animales tratados con solución fisiológica (Fig. 9a y b). Por otro lado, respecto a los animales a los que sólo se les administró el antagonista vía icv, se observó que el AM251 provocó un aumento significativo en la concentración de TNF α , en comparación con los individuos tratados con vehículo vía icv (Fig. 9a). Sin embargo dicho efecto no se observó en los animales tratados con CPZ (Fig. 9b). Esa diferencia puede deberse a que, a pesar que los endocannabinoides se sintetizan a demanda, haya un tono basal que mantenga la concentración de TNF α en niveles fisiológicos. No debe descartarse un posible efecto agonista inverso del AM251, ya que algunos autores han reportado dicho efecto en otros modelos experimentales (Ostadhadi *et al*, 2006). Teniendo en cuenta que los endocannabinoides median sus acciones en el SNC principalmente a través de CB1, es

coherente que el bloqueo farmacológico del mismo produzca el mencionado efecto y no se observe lo mismo bloqueando los receptores TRPV1.

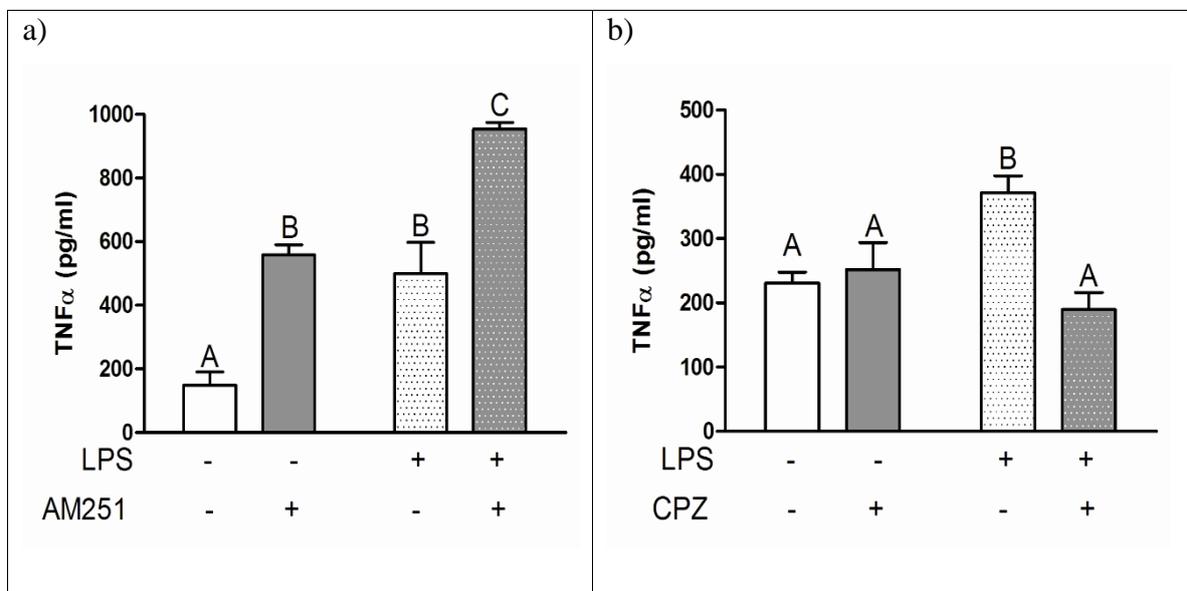


Figura 9. Determinación de TNF α en HMB de animales sometidos a endotoxemia y bloqueo farmacológico de receptores de cannabinoides. (a) Experimento utilizando AM251 como antagonista de CB1. (b) Experimento realizado utilizando Capsazepina (CPZ) como antagonista de receptores TRPV1. n= 5 animales por grupo. Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos factores seguido por test de Tukey. En ambos casos, letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05) dentro del mismo experimento.

En cuanto a los animales sometidos a endotoxemia, se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de TNF α entre los animales que sólo fueron sometidos a LPS y los que recibieron tanto el LPS como el antagonista (Fig. 9a y b). La participación del SEC en los procesos inflamatorios se manifiesta en ambos experimentos, aunque con resultados diferentes. Con la administración de AM251 se observa un aumento adicional de los niveles de TNF α aumentados por LPS (Fig. 9a), lo que permite hipotetizar que el bloqueo de CB1 exacerba la inflamación. En el caso del bloqueo selectivo de TRPV1 con Capsazepina, se advierte el efecto contrario, ya que la administración del antagonista restaura los niveles de TNF α a los que tenía el animal previo a la inyección de LPS, sugiriendo que el TRPV1 podría formar parte de la vía pro-inflamatoria inducida por LPS (Fig. 9b).

Con el propósito de observar el alcance del efecto de los antagonistas, se midieron los niveles plasmáticos de TNF α (Fig.10a y b).

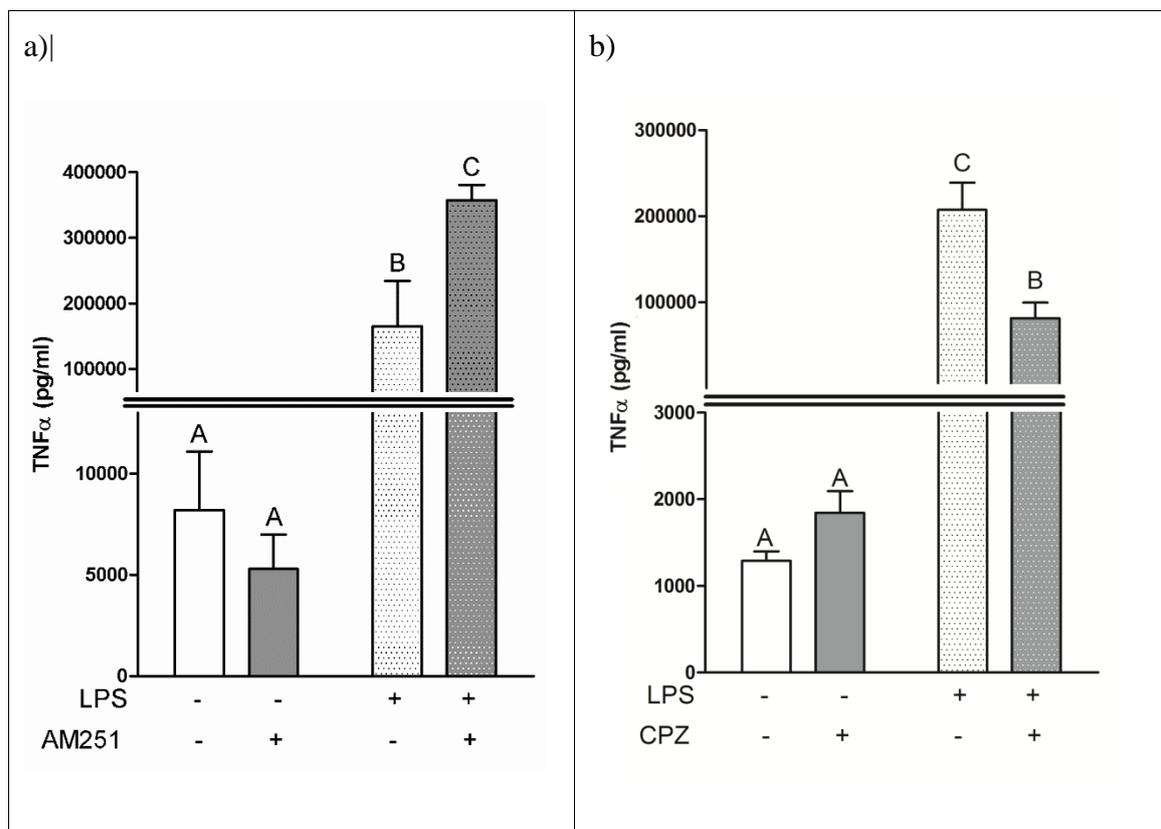


Figura 10. Determinación de TNF α en plasma de animales sometidos a endotoxemia y bloqueo farmacológico de receptores de cannabinoides.. (a) Experimento utilizando AM251 como antagonista de CB1. (b) Experimento realizado utilizando Capsazepina (CPZ), como antagonista de receptores TRPV1. n= 5 animales por grupo. Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos factores seguido por test de Tukey. En ambos casos, letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05) dentro del mismo experimento.

Debido a que el LPS se administró mediante una inyección ip, es lógico hipotetizar que si se detecta un aumento significativo en los niveles de TNF α en el hipotálamo también se observará este fenómeno en plasma. Efectivamente, en ambos casos los animales tratados con LPS manifestaron un aumento significativo en las concentraciones de TNF α (Fig. 10a y b).

Respecto de los animales tratados únicamente con los antagonistas, los resultados en plasma se correlacionan con los observados en HMB en la experiencia donde se utilizó CPZ, pero no así en los que se administró AM251. Mientras que en las mediciones realizadas en el hipotálamo, se observó un aumento en los niveles de TNF α en respuesta al AM251 respecto del control, en plasma ese fenómeno no fue observado (Fig.10a).

En cuanto a los animales tratados con LPS y el antagonista, puede observarse que los resultados se condicen con los obtenidos en las muestras de HMB: utilizando AM251, los niveles de TNF α mostraron un aumento aditivo significativo al del LPS, mientras que al

administrar CPZ los niveles de TNF α disminuyeron significativamente con respecto a los incrementados por la endotoxina. De esta forma, estos resultados demuestran que una modificación en alguno de los componentes del SEC, puede no sólo tener un efecto local, sino traducirse a uno sistémico, en condiciones de endotoxemia.

Conjuntamente, los resultados obtenidos sugieren que los TRPV1 podrían ser mediadores de las respuestas proinflamatorias del organismo a la endotoxemia, mientras que los CB1 podrían participar de las respuestas antiinflamatorias que intentan evitar una inflamación exacerbada que pudiera generar efectos deletéreos.

2- Determinar la concentración hipotalámica de prostaglandina E2 en respuesta a la endotoxemia y al control farmacológico del SEC.

Otro marcador inflamatorio utilizado en la presente tesis fue la prostaglandina E2 (PGE2), eicosanoide que participa en la regulación de la inflamación y en la adquisición de memoria (Rall *et al*, 2003). Por otro lado, en el hipotálamo en particular, tiene funciones adicionales: (i) estimula la secreción de la hormona liberadora de tirotrópina, evento que desencadena la producción de fiebre (Schiltz *et al.*, 2002), y (ii) estimula la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), actuando como gliotransmisor dentro del sistema neurosecretorio de GnRH (Clasadonte *et al*, 2011).

La determinación de PGE2 se realizó con muestras de HMB provenientes de distintos experimentos que las que se utilizaron para la determinación de TNF α .

En ambos experimentos puede observarse que no se encontraron diferencias significativas entre los animales control y los tratados únicamente con LPS (Fig. 11a y b). Estos resultados parecieran no estar en lineamiento con los obtenidos previamente en la determinación de TNF α ; sin embargo, las diferencias observadas en cada marcador podrían explicarse teniendo en cuenta la naturaleza de cada uno e ellos.

En el caso de la administración de antagonistas únicamente, no se encontraron diferencias significativas respecto de los controles. De todas formas, antagonizando CB1 se observó un pequeño incremento (aunque no significativo) de PGE2 (Fig.11a). Esto podría explicarse teniendo en cuenta que el bloqueo de CB1, como se explicó anteriormente, podría conducir a un aumento en los niveles de TNF α , citoquina que puede inducir la producción de

PGE2. Además, la acumulación de ligandos de CB1 como son la AEA y 2-AG, podría conducir a la producción de PGE2 mediante una de las vías de degradación los mismos.

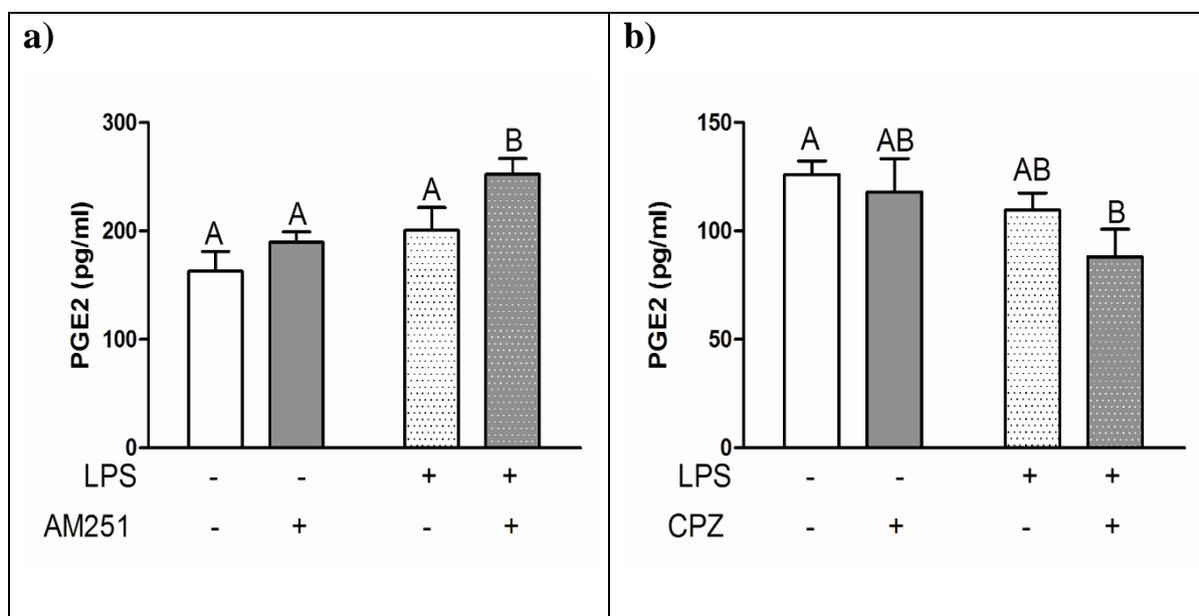


Figura 11. Determinación de PGE2 en HMB de animales sometidos a endotoxemia y bloqueo farmacológico de receptores de cannabinoides. (a) Experimento utilizando AM251 como antagonista de CB1. (b) Experimento realizado utilizando Capsazepina (CPZ), como antagonista de receptores TRPV1. n= 5 animales por grupo Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos factores seguido por test de Tukey. En ambos casos, letras distintas indican diferencias significativas ($P<0.05$) dentro del mismo experimento.

A pesar de que el tiempo de exposición al LPS no consiguió elevar significativamente los niveles de PGE2, pudo advertirse el efecto de los antagonistas cuando fueron administrados en ratas sometidas a inyecciones de LPS. En ambos casos, se produjeron diferencias significativas en los niveles de PGE2 que van de la mano con los resultados observados al medir TNF α . (Fig. 13a y b). El AM251 incrementó los niveles de PGE2 en ratas sometidas a LPS, mientras que la CPZ redujo sus valores por debajo de los valores control, apoyando la idea anterior de CB1 mediando una vía anti-inflamatoria y TRPV1, una pro-inflamatoria.

B- Estudiar la expresión del ARNm de los receptores CB2 y TRPV1 en el hipotálamo en respuesta a la endotoxemia y al bloqueo farmacológico del CB1.

Los endocannabinoides ejercen su acción a través de sus receptores específicos CB1 y CB2, pudiendo activar también los receptores vanilloides TRPV1. Si bien estos receptores exhiben distintos patrones de distribución (Matsuda L., 1990; Munro S., 1993), hay tejidos en particular donde se co-expresan en células vecinas e incluso en la misma célula. Dada la naturaleza local (paracrina, autocrina o incluso intracelular) de la acción de los

endocannabinoides con sus receptores, cualquier consideración sobre su función biológica potencial como mediadores inflamatorios debe tener en cuenta esta comunicación entre los receptores, ya que la actividad de uno puede influir directamente sobre los otros. Además, un estímulo particular puede inducir, aumentar o disminuir la expresión de los CBRs en distintos estadios del proceso inflamatorio, afectando notablemente su sensibilidad ante los cannabinoides circundantes.

Como se describió detalladamente en la sección de materiales y métodos, se realizaron dos RT-PCR con muestras de HMB obtenidas en el experimento donde se utilizó AM251 como antagonista. Se midieron semi-cuantitativamente los niveles de TRPV1 y CB2 con el objetivo de observar el impacto del bloqueo de CB1 en la expresión de los mismos.

Con respecto a la determinación en los niveles TRPV1, no se obtuvieron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos y los individuos control (Fig. 12). Estos resultados sugieren que los efectos mediados por TRPV1 en respuesta a la endotoxemia no involucrarían cambios en su expresión, sino en los niveles endógenos de los ligandos que los activan.

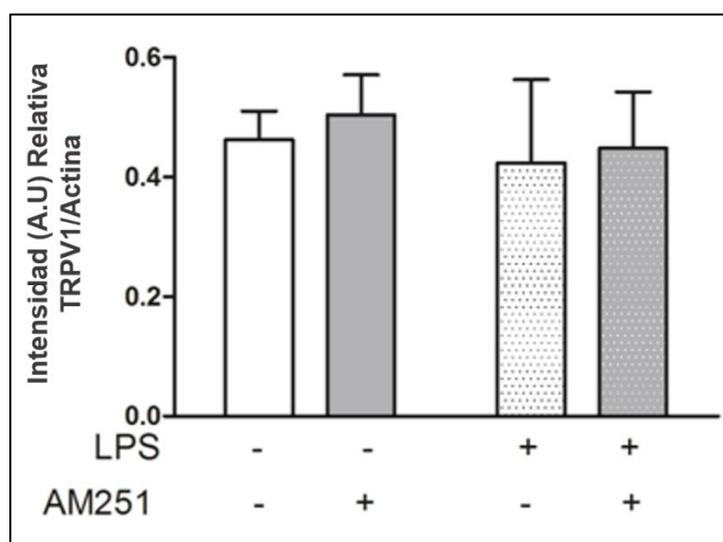


Figura 12. Determinación semicuantitativa de RNAm de TRPV1 en animales sometidos a endotoxemia y bloqueo farmacológico de CB1. Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos factores.

En la determinación de CB2, se observó un descenso significativo en los niveles de expresión del RNA mensajero del receptor en los animales que fueron tratados únicamente con AM251 o con LPS con respecto a los controles (Fig. 13).

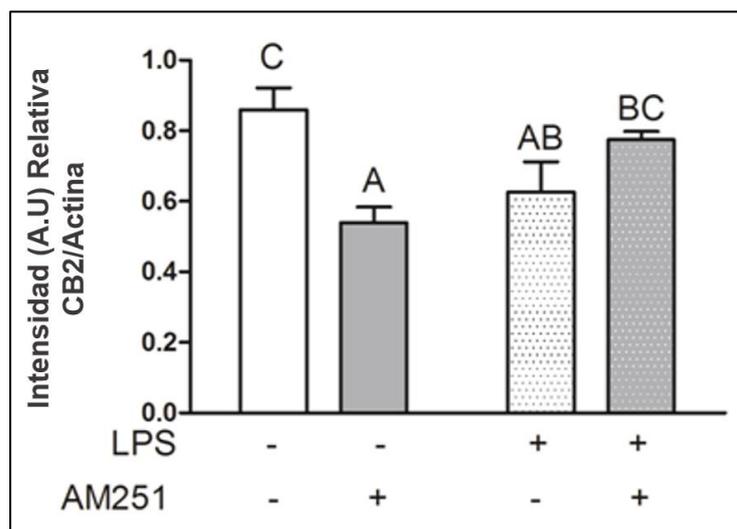


Figura 13. Determinación semicuantitativa de RNAm de CB2 en animales sometidos a endotoxemia y bloqueo farmacológico de receptores de cannabinoides. . n= 5 animales por grupo Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos factores seguido por test de Tukey. En ambos casos, letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) dentro del mismo experimento.

La relación entre CB1 y CB2 no está del todo definida, y actualmente no están descriptas las vías de comunicación directa entre ambos receptores, por lo que no se conocen los efectos directos que produce el bloqueo de uno sobre otro. Nuestros resultados mostraron que los niveles de RNAm de CB2 disminuyeron significativamente en los animales tratados con AM251 respecto del control, efecto que no puede deberse a un posible cruzamiento de AM251 con CB2, debido a que el antagonista es 300 veces más afin por CB1 (Fig. 13).

En los animales tratados con LPS y AM251 los niveles de RNAm de CB2 muestran tendencia a ser mayores con respecto a los que solo recibieron LPS (Fig. 13), efecto que podría deberse a que el bloqueo selectivo de CB1 acelera el proceso inflamatorio. Debido a la mencionada plasticidad de las células pertenecientes al sistema inmune que expresan receptores CB2, se han encontrado resultados diferentes en distintos modelos donde se indujo una neuroinflamación con LPS, por lo que actualmente no existe una respuesta esclarecedora en la literatura que pueda explicar los resultados obtenidos.

6. Discusión

Las enfermedades inflamatorias e infecciones sistémicas están generalmente asociadas con un desbalance en diversas funciones del organismo. Este efecto se explica mediante el concepto de alostasis, que refiere a los mecanismos adaptativos por los cuales el organismo provoca un reordenamiento interno que le permite “mantener la estabilidad a través del cambio” (McEwen y Wingfield, 2003). Los sistemas alostáticos le permiten al organismo responder al estrés psíquico o físico, interno o externo, activando el sistema nervioso autónomo, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, el sistema cardiovascular, el metabolismo y el sistema inmunitario. Particularmente, ante un desafío inmunológico, se induce un reordenamiento de la cantidad total de energía de los individuos, utilizando más energía en las respuestas inmunes y menos en otras funciones, como la reproducción (Zakharova y Izolskaia, 2012), hasta lograr restaurar la estabilidad fisiológica. Se trata de mecanismos dinámicos, ya que con el fin de mantener una adaptación ante demandas constantemente variables, el organismo se ve forzado a priorizar determinadas respuestas a expensas de descuidar otros procesos (McEwen, 2006). El hipotálamo, desde su posición central en el encéfalo y proximidad con la hipófisis, integra información procedente de regiones encefálicas anteriores, el tronco del encéfalo, la médula espinal y distintas neuronas quimiosensitivas intrínsecas. De esta forma, participa en diversas funciones entre las que se incluyen: (i) el control del flujo sanguíneo, (ii) la regulación del metabolismo energético, (ii) la regulación de la actividad reproductora y (iii) la coordinación nerviosa de respuestas en condiciones de amenaza. Este complejo sistema de comunicación entre el hipotálamo y el sistema inmune le permite al SNC desarrollar respuestas alostáticas específicas con el objetivo de recobrar la homeostasis a través de condiciones estresantes adversas (Verbug-van Kemenade *et al*, 2017). Los resultados obtenidos en la siguiente tesis sugieren que la respuesta hipotalámica al desafío inmunológico se encuentra modulada al menos en parte por los receptores hipotalámicos CB1 y TRPV.

El lipopolisacarido (LPS), un potente inductor de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, prostaglandinas y catecolaminas (Yoo *et al*, 1997), es ampliamente utilizado en diversos modelos para inducir una condición de estrés inmune. En la presente tesis se utilizó una dosis de LPS de 5mg/kg de modo de inducir un estado de endotoxemia capaz de alterar la fisiología del animal sin provocar un estado infeccioso irreversible como ocurre en el shock séptico (Tavares y Miñano, 2010). La activación del sistema inmune provocada por el LPS se

relaciona generalmente con la actividad del hipotálamo por distintas razones. Primero, la activación del sistema inmune modifica la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, promoviendo la liberación de corticosterona, que a su vez modula la respuesta de TNF α (Barber *et al*, 1993). Segundo, en respuesta al LPS, el hipotálamo juega múltiples roles, modulando el dolor inflamatorio (Eliava *et al*, 2016), la termoregulación (Fernández *et al*, 2016), hipotensión (Yilmaz *et al*, 2007), reproducción (Rivest y Rivier, 1993), y respuesta inflamatoria (Guerrero-Vargas *et al*, 2014). En cuanto a esto último, nuestros resultados indican que esta respuesta es de suma importancia para el organismo, ya que la respuesta hipotalámica repercute sobre la inflamación sistémica, observándose a nivel hipotalámico modulación de las cantidades de citoquinas a nivel plasmático. Esta modulación podría estar influenciada por el sistema endocannabinoide a nivel central.

En varios estudios *in vitro* utilizando distintas líneas celulares se observó que, en general, tanto cannabinoides exógenos como endógenos interfieren con la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Larsen *et al*, 2003; Klein, 2005; Cabral y Marciano-Cabral, 2005; Mestre *et al*, 2005; Chang *et al*, 2001). Particularmente, se vio que el Δ^9 -THC perturba el proceso post-transcripcional de TNF α en macrófagos de ratón activados (Zheng y Specter, 1996; Fischer-Stenger *et al*, 1993). Por otro lado, se registró que los cannabinoides disminuyen la producción de citoquinas pro-inflamatorias de manera directa en macrófagos alveolares (Baldwin *et al*, 1997), monocitos humanos (Zurier *et al*, 2003) y células microgliales activadas de ratón (More *et al*, 2013). Además, los cannabinoides pueden reducir la producción de citoquinas de manera indirecta, a través de los siguientes mecanismos: i) disminución en la reactividad de células dendríticas al LPS mediante un agonista selectivo para CB₂ que previene la desregulación de TLR4 (Xu *et al*, 2007) ii) inducción de la apoptosis, como mecanismo inmunosupresivo (Guzman, 2005; Rieder *et al*, 2010). iii) inducción de la producción de la citoquina inhibitoria IL-10 en células de mieloma activadas (Guaza *et al*, 2005; Correa *et al*, 2010).

Diversos experimentos *in vivo* revelaron además que los cannabinoides pueden disminuir la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Se observó que el cannabinoide sintético HU210 previene la acumulación de citoquinas pro-inflamatorias en sangre y cerebro de ratón luego de la administración intraperitoneal de LPS (Roche *et al*, 2006), mientras que WIN55 212-2 mostró un efecto similar cuando se le administró LPS directamente en el SNC

(Marchalant *et al*, 2007). Si bien ya se han realizado estudios que muestran la modulación de los endocannabinoides sobre el sistema inmunológico, nuestros resultados muestran que tal modulación puede ocurrir desde regiones específicas del SNC como el hipotálamo, impactando al organismo de forma sistémica. Si bien varios resultados argumentan que los eCBs participan en las respuestas anti-inflamatorias en el SNC (Eljaschewitsch *et al*, 2006; Facchinetti *et al*, 2003; Molina-Holgado *et al*, 2003), otros estudios indican que, en determinadas condiciones, los eCBs podrían exacerbar los efectos inflamatorios del LPS (DeLaurentiis *et al*, 2010; Villanueva *et al*, 2009). Roche y cols. revelaron la complejidad de los mecanismos de eCBs subyacentes a la modulación de los parámetros inflamatorios, encontrando que tanto agonistas como antagonistas de CB1, administrados por separado, fueron capaces de suprimir respuestas de citoquinas centrales y periféricas durante el estrés inmune (Roche *et al*, 2006). Los resultados controversiales obtenidos previamente, podrían sugerir que la respuesta inmunológica a los endocannabinoides depende del tipo de receptor que se vea estimulado.

Los resultados en nuestras condiciones experimentales revelaron un papel anti-inflamatorio del CB1 hipotalámico sobre la inflamación inducida por LPS. Dado que el SEC participa en la respuesta inmune, no es sorprendente encontrar que el CB1 hipotalámico module la respuesta inflamatoria a nivel sistémico. Sin embargo, esta influencia resultó ser alta en condiciones de endotoxemia pero baja en condiciones fisiológicas. Esta diferencia puede deberse a que, como el antagonista se administró localmente en el hipotálamo, los receptores CB1 distribuidos en todo el organismo podrían, en condiciones fisiológicas, permanecer activos y mantener los niveles basales de TNF α a nivel sistémico. Para poder evaluar este fenómeno con mayor precisión, deberían realizarse ensayos adicionales a tiempos más largos.

Se ha reportado previamente que la activación de TRPV1 incrementa la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Okada *et al*, 2011), por lo que la estimulación de esta vía se asocia con una exacerbación de la inflamación (Julius, 2013; Costa *et al*, 2010; Nilius *et al*, 2007). Por otro lado, diversos estudios sugieren que la activación de CB1 se traduce a una respuesta anti-inflamatoria (Larsen *et al*, 2003; Pernía-Andrade *et al*, 2009) ya que inhibe la producción de citoquinas inflamatorias. Nuestros resultados concuerdan con estas investigaciones, ya que el bloqueo selectivo de CB1 aumentó los parámetros inflamatorios medidos, mientras que el bloqueo selectivo de TRPV1 los disminuyó (Fig. 9a y b).

Si bien los resultados obtenidos en la medición de PGE2 no se correlacionan completamente con los de TNF α , sí se evidencia el efecto que producen los antagonistas. Lo que no se observa es un aumento significativo de este marcador cuando se somete al animal al estrés inmune mediante la administración de LPS. Esto podría deberse a la naturaleza pleiotrópica y el metabolismo de PGE2, atributos que hacen de esta molécula un parámetro complejo de analizar. El LPS media sus acciones a través de los receptores TLR4, que una vez estimulados generan una cascada río abajo que desencadena la producción de diversas citoquinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentra el TNF α . La PGE2 se produce por la conversión de ácido araquidónico en PGH2 mediante la enzima ciclooxigenasa 2. Esta enzima es de naturaleza inducible, y entre las moléculas que aumentan su expresión se encuentran citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y el mismo TNF α (FitzGerald, 2003). Es decir, la producción de TNF α en respuesta al LPS es inmediata, mientras que la producción de PGE2 es estimulada, entre otras cosas, por las citoquinas pro-inflamatorias producidas en primer lugar. Además, si bien la producción de PGE2 puede responder a un estímulo inflamatorio, en el hipotálamo en particular también regula otras funciones: estimula la secreción de la hormona liberadora de tirotrópina (Schiltz et al., 2002) y de la hormona liberadora de gonadotropina (Clasadonte et al, 2011), por lo que sus niveles hipotalámicos en las condiciones experimentales dadas no se relacionan únicamente con el desarrollo de la inflamación. Por otro lado, la concentración de esta molécula varía notablemente a lo largo del proceso inflamatorio: Comienza a aumentar a medida que la inflamación progresa, pero cuando la concentración local de PGE2 se incrementa en un nivel determinado, termina inhibiendo a la COX2, lo que desplaza el metabolismo del araquidonato hacia la formación de lipoxinas. De esta manera, tras un tiempo de acción, la señal pro-inflamatoria inicial de la PGE2 se torna en una señal anti-inflamatoria (Harris et al, 2002). Podría ser que una mayor exposición al LPS permitiera el progreso de la inflamación, disparando los niveles de PGE2 a concentraciones que resultarían significativamente mayores. No obstante, se necesitan más estudios a diferentes tiempos para corroborar esta hipótesis. En esta tesis, las ratas fueron sacrificadas 90min post inyección de LPS, tiempo suficiente para observar diferencias significativas en las concentraciones de TNF α , pero no en las de PGE2.

Los niveles de expresión de los CBRs dependen de varios factores, entre los que se encuentran: el contexto celular, las concentraciones de sus ligandos, y las vías de comunicación

entre los mismos. Los receptores CB1 y TRPV1 se co-expresan en el soma y/o axones de las neuronas centrales de varias regiones del cerebro, incluyendo el hipotálamo (Micale et al, 2009; Cristino et al, 2006), mientras que CB1 y CB2 co-expresan en astrocitos y células gliales (Busquets Garcia et al, 2016). En el caso de las células pertenecientes al sistema inmune, la expresión de CBRs no sólo varía dependiendo el tipo celular del que se trate, sino también de su estado de maduración y activación. Estas células tienen un marcado grado de plasticidad, y un estímulo particular puede inducir, aumentar o disminuir la expresión de los CBRs en distintos estadios (durante su diferenciación, maduración o activación) afectando notablemente su sensibilidad ante diferentes contextos. Dado que los receptores TRPV1 y CB1 se expresan en la misma célula, o en células vecinas, y pueden ser activados por el mismo mediador (AEA), se han realizado estudios acerca de los mecanismos de comunicación entre los mismos, observando que se producen diferentes impactos según el contexto: La activación de CB1 puede tanto potenciar como neutralizar la estimulación de TRPV1 por AEA, dependiendo de si estimula la activación intracelular de la fosfolipasa C o la inhibición de las vías de AC-PKA respectivamente (Di Marzo y De Petrocellis, 2011).

Estudios previos reportaron que la activación temprana de los receptores CB1 al inicio de reacciones inmunitarias contra agentes externos contrarresta la liberación de péptidos inflamatorios (factor de crecimiento nervioso y la sustancia P) y citoquinas pro-inflamatorias (Di Marzo, 2008). En este estadio, si bien los receptores TRPV1 podrían activarse para promover el efecto contrario, su actividad sería baja comparada con la de CB1. Esto es debido a que la AEA se une a TRPV1 con una potencia y eficacia menor que a CB1 (Starowicz et al, 2007), por lo que se necesitan concentraciones de AEA superiores a las necesarias para activar los receptores CB1, situación que no se presenta en esta etapa de la inflamación. En una etapa posterior, los eCBs comienzan a acumularse, aumentando su concentración al mismo tiempo que los receptores CB2 y TRPV1 comienzan a desregularse. Esto produce dos efectos: i) El receptor TRPV1 comienza a ser estimulado por eCBs disponibles que no llegaron a interactuar con CB1, lo que produce un aumento en sus niveles de expresión. Esta desregulación trae aparejado alguno de los efectos perjudiciales que se desencadenan durante los estados ansiogénico (Marsch et al, 2007), inflamatorio (Dinis et al, 2004; Singh Tahim et al, 2005) y dolor neuropático (Horvat et al, 2007); y ii) la sobreexpresión y activación de CB2 estimula la migración de los macrófagos, linfocitos B y células NK a través de la barrera

hematoencefálica hacia los tejidos nerviosos donde se encuentran los eCBs producidos tanto por células gliales como neuronales, exacerbando la respuesta inflamatoria que causa gliosis, actividad microglial exagerada y muerte neuronal (Maione et al, 2007; Miller y Stella, 2007).

Con respecto a los resultados correspondientes a los niveles de expresión de ARNm de TRPV1 medidos frente a la administración exclusiva de LPS por un lado, y la de AM251 por el otro, en nuestras condiciones experimentales no se encontraron diferencias significativas entre los animales control y los tratados. Esto podría deberse al tiempo que se dejó al animal expuesto al LPS previo a ser sacrificado que, en nuestro caso, fue de 90 minutos. Para poner a punto el tiempo que se deja actuar al LPS, nuestro grupo de investigación realizó previamente un estudio dinámico donde se analizó la concentración plasmática de TNF α a distintos tiempos en animales sometidos a endotoxemia y antagonizando el CB1 hipotalámico. Los resultados indicaron que el tiempo óptimo para realizar el procedimiento era de 90min, ya que fue cuando se observó la mayor concentración plasmática de TNF α (Anexo H, Fig. H1). Sin embargo, el HMB pareciera alcanzar un estado inflamatorio avanzado a tiempos mayores. Esta hipótesis concuerda con trabajos recientes realizados nuestro grupo de trabajo y con reportes de Kakizaki y cols., quienes encontraron un *retraso* en la respuesta de las citoquinas hipotalámicas al LPS (Kakizaki *et al*, 1999). Este retraso podría deberse a que el SNC es una estructura protegida y aislada de la periferia. No obstante, como se mencionó anteriormente, los efectos sistémicos del bloqueo de CB1 vía icv pueden aparecer antes de la inflamación hipotalámica, ya que la administración de AM251 incrementó significativamente los niveles plasmáticos de TNF α en ratas 90min post LPS.

Diversas evidencias indican que tanto la administración exclusiva de AM251 como la de LPS provocan un aumento en las concentraciones disponibles de AEA: en el primer caso, impidiendo la interacción con el receptor por el cual tiene mayor afinidad; y en el segundo, inhibiendo mediante la acción del LPS la enzima FAAH, encargada de degradar a este eCB (Wolfson et al, 2013; Varga et al, 1998). En nuestras condiciones experimentales, este aumento teórico de AEA parece no desencadenar un aumento significativo en la expresión de los receptores TRPV1. Cuando se administra el antagonista, si bien existe un tono basal de eCBs que no pueden interaccionar con los CB1 antagonizados, estos podrían dirigirse por otras vías, ser degradados rápidamente o activar TRPV1 sin el impacto suficiente como para aumentar su

expresión. Por otro lado, estudios previos demostraron que la administración de LPS estimula la expresión de ARNm de CB1 y la síntesis de AEA en el hipotálamo de ratas (DeLaurentiis et al, 2010; Fernandez-Solari et al, 2006), y que la activación de CB1 puede incluso disminuir la expresión de TRPV1 en este contexto inflamatorio (Yang et al, 2013). No podemos descartar que la falta de significancia en cuanto a los resultados pueda deberse a los tiempos a los que se estudiaron los niveles de expresión de estos receptores.

El bloqueo de CB1 puede provocar cambios por deficiencias en su propia respuesta, pero también por conducir a la sobreexpresión de otros receptores de eCBs para compensar su falta de su actividad. En estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación, se observó que la administración de AM251 produce una sobreexpresión de ARNm de CB1 en el HMB medido por qPCR (Anexo H, Fig. H2), efecto que se produce con el objetivo de sensibilizar al hipotálamo de los eCBs. En cuanto a la expresión de TRPV1, se observó que la administración de LPS no modificó significativamente sus niveles de ARNm, pero la administración AM251 sí lo hizo (Anexo H, Fig. H3). Estos resultados sugieren que la ausencia de señal de CB1 incrementa la expresión de TRPV1, lo que indica que la vía vanilloide se vuelve más activa cuando se antagoniza CB1, fenómeno que contribuye al progreso del estado inflamatorio. En la presente tesis, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de TRPV1 medidos por RT-PCR entre los animales control y los sometidos a las mencionadas condiciones experimentales. La diferencia entre los resultados obtenidos en el presente proyecto y los reportados por la otra línea de investigación de nuestro grupo podrían deberse al tiempo en que los animales estuvieron sometidos a los efectos del LPS: mientras que en un experimento se sacrificaron a los animales pasados 180 minutos de la inyección ip de LPS, en los experimentos del presente proyecto ese tiempo fue de 90 minutos. Si bien la activación de los receptores TRPV1 podría producirse en un estadio temprano del proceso inflamatorio, la desregulación de los mismos se produciría recién en un estado avanzado de la patología (Singh Tahim et al, 2005). Por lo tanto, y debido al tiempo de exposición al LPS, la inflamación podría no haberse desarrollado completamente, impidiendo advertir los efectos del antagonismo de CB1. No debe descartarse una diferencia debido a las distintas técnicas de PCR utilizadas (semicuantitativas vs cuantitativa).

Respecto de los niveles de expresión de ARNm de CB2, los resultados concuerdan con la hipótesis planteada en los resultados de TRPV1: la inflamación no se desarrolló hasta llegar

a un estadio tardío en el HMB. Como se mencionó anteriormente, las células pertenecientes al sistema inmune poseen una gran plasticidad, pudiendo modificar la expresión de sus receptores de manera diferente dependiendo el contexto. Es por esto que los resultados varían en las distintas investigaciones realizadas hasta la fecha. La adición de LPS disminuyó los niveles de ARNm de CB2 en macrófagos producidos por tioglicolato (Cabral et al, 2008), resultados que concuerdan con los obtenidos en este proyecto; sin embargo, en macrófagos de ratón de la línea celular RAW 264.7 los niveles de CB2 aumentaron (Walter et al, 2003; Mukhopadhyay et al, 2006), efecto que también se observó en células microgliales de ratón luego de la administración in vivo de LPS (Concannon et al, 2015). En otras investigaciones, la administración de LPS no produjo diferencias significativas en la expresión de CB2 entre los animales tratados y los controles (Malek et al, 2015).

Por otro lado, la relación entre CB1 y CB2 no está del todo definida en la literatura, y actualmente no están descriptas vías de comunicación directas entre ambos receptores, por lo que no se conocen los efectos directos que produce el bloqueo de uno sobre otro. Es por esto que los niveles de CB2 dependerían más del contexto celular e inflamatorio que de una posible interacción directa con CB1; pero al tratarse de células con una marcada plasticidad, los resultados se vuelven difíciles de predecir. En nuestro trabajo, los niveles de ARNm de CB2 disminuyeron significativamente en los animales tratados con AM251 respecto del control, resultado que por sí mismo no es posible interpretar.

Es en la etapa tardía del proceso inflamatorio cuando, debido a una desregulación general del SEC, se observa un incremento significativo en los niveles de expresión de CB2 (McCoy, 2016). Como se mencionó anteriormente, creemos que el tiempo de 90min post inyección de LPS no fue suficiente para alcanzar este estadio. En los animales tratados con LPS y AM251, los niveles de ARNm de CB2 aumentan respecto de las otras condiciones, situación que podría deberse a que el bloqueo selectivo de CB1 estaría acelerando el proceso inflamatorio; no obstante, ese aumento no es suficiente para producir una diferencia significativa.

En resumen, los resultados obtenidos en este proyecto se corresponden con la hipótesis planteada respecto de los parámetros inflamatorios, ya que se observó que el SEC participa en la modulación de los mismos en las condiciones fisiopatológicas estudiadas. En cuanto a la expresión de los receptores, no obtuvimos los resultados esperados, ya que el bloqueo selectivo

de CB1 no condujo a una modificación significativa en la expresión de los RNAm de los receptores CB2 y TRPV1. No obstante, los resultados adicionales aportados por el grupo de trabajo muestran que los efectos del bloqueo de CB1 pueden observarse en otras condiciones experimentales, por lo que se necesitan más estudios a distintos tiempos para confirmar si la hipótesis planteada es errónea o se trata de una cuestión técnica-experimental.

7. Conclusión

Las determinaciones realizadas en este proyecto, en conjunto con los resultados aportados por el grupo de trabajo, indican que el SEC hipotalámico participa en los mecanismos alostáticos inducidos por la activación del sistema inmune, los cuales intentan mantener los parámetros inflamatorios con el objetivo de combatir contra la infección sin dañar los tejidos del huésped. Este mecanismo parece ser crucial para la supervivencia, permitiendo que el sistema inmunológico utilice energía para recuperarse de la infección. Por otro lado, los resultados indican que la activación de los CB1 hipotalámicos sería necesaria para prevenir una excesiva respuesta inmune, mientras que la estimulación de TRPV1 contribuiría al estado inflamatorio. Además, nuestros resultados muestran que la modulación de la inflamación por parte del SEC puede ocurrir desde regiones específicas del SNC como el hipotálamo, impactando al organismo de forma sistémica.

Comprender los mecanismos asociados a la participación del SEC hipotalámico en la modulación de la inflamación podría conducir al desarrollo de nuevas terapias para paliar trastornos asociados a las funciones propias del hipotálamo (reproducción, metabolismo) en condiciones de endotoxemia. Además, constituye una evidencia más de que los cannabinoides interactúan con el sistema inmune innato impactando en los eventos mediados por la señalización de receptores TLRs. Un conocimiento más profundo acerca de estos mecanismos podría conducir a la identificación de nuevos blancos moleculares potenciales para el desarrollo de estrategias terapéuticas destinadas a combatir diversas enfermedades inflamatorias crónicas.

8. Bibliografía

- AGGARWAL, B. B.; GUPTA S. C.; KIM J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012, vol. 119, n.3, p. 651-65. EISSN: 1528-0020.
- AIZPURUA- OLAIZOLA, Oier; ELEZGARAI, Izaskun; RICO, Irantzu; ZARANDONA, Iratxe; ETXEBARRIA, Nestor y USOBIAGA, Aresatz. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. *Drug Discovery Today*. Enero 2017. vol. 22, n. 1, p. 105-110. ISSN: 1359-6446.
- ARAVALLI, R.; PETERSON, P.; LOKENSGARD, R. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *Neuroimmune Pharmacology*. 2007, vol. 2, n. 4, p. 297–312. EISSN: 1557-1904.
- BAUSINGER, Huguette; LIPSKER, Dan; HANAU, Daniel. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Trends in Immunology*. Julio 2002, vol. 23, n.7, p. 130-135. ISSN: 1471-4906.
- BOSIER, Barbara; MUCCIOLI, Giulio; HERMANS, Emmanuel; LAMBERT, Didier. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochemical Pharmacology*. Julio 2010. vol. 80, n.1, p. 1-12. ISSN:0006-2952.
- BOURINET, Emmanuel; ALTIER, Christophe, HILDEBRAND, Michael; TRANG, Tuan; SALTER, Michael, ZAMPONI, Gerald. Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiological Reviews*. Enero 2014. vol. 94, p. 81-140. ISSN 0031-9333.
- BUCKLEY, N.E. The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *British Journal of Pharmacology*. Enero 2008, vol. 153, n.2, p. 309–318. ISSN: 1476-5381.
- CABRAL, G. y MARCIANO-CABRAL, F. “Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance,” *Journal of Leukocyte Biology*. Diciembre 2005, vol. 78, n. 6, p. 1192–1197. EISSN: 1938-3673.
- CASADIEGO- MESA, Andrés Felipe y LASTRA- BELLO, Sara Margarita. Cannabis sintético: aspectos toxicológicos, usos clínicos y drogas de diseño. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2015. vol. 63, n. 3, p. 501-510. ISSN: 0120-0011.

- CASCIO, Maria Grazia y MARINI, Pietro. Biosynthesis and Fate of Endocannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2015, vol 231, p. 39-58. ISSN 0171-2004.
- CHANG, H.; LEE, S. T; LIN, W. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2001, vol. 81, n. 4, p. 715–723. EISSN: 1097-4644.
- CHEN, Guoqing y GOEDEL, David. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. Mayo 2002, vol. 296, n.5573, p. 1634-1635. ISSN: 1095-9203.
- CROXFORD, Ludovic y YAMAMURA, Takashi. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *Journal of Neuroimmunology*. 2005, vol. 166, n. 1-2, p. 3–18. ISSN: 0165-5728.
- DE LAURENTIIS Andrea; FERNANDEZ-SOLARI, Javier; MOHN, Claudia; BURDET, Berenice; ZORRILLA ZUBILETE, María y RETTORI, Valeria. The hypothalamic endocannabinoid system participates in the secretion of oxytocin and tumor necrosis factor-alpha induced by lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology*. Abril 2010. vol. 221, n. 2, p. 32–41. ISSN: 0165-5728.
- DE PETROCELLIS, Luciano; CASCIO, Maria Grazia; DI MARZO, Vincenzo. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *British Journal of Pharmacology*. 2004. vol. 141, p. 765–774. ISSN: 1476-5381.
- DEMUTH, Dirk y MOLLEMAN, Areles. Cannabinoid signalling. *Life Science*. Enero 2006. vol. 78, n. 6, p. 549-563. ISSN: 0024-3205.
- DEMUTH, D.; MOLLEMAN, A. Cannabinoid Signalling. *Life Science*. 2006, vol. 78, p. 549–563. EISSN: 2372-613X.
- DI MARZO, Vincenzo. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nature Reviews Drug Discovery*. Mayo 2008. vol. 7, p. 438-455. ISSN: 1474-1776.
- DI MARZO, Vincenzo; STELLA, Neph; ZIMMER, Andreas. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nature Reviews Neuroscience*. Enero 2015. vol. 16, n. 1, p. 30-42. ISSN: 1471-003X.
- DI MARZO, Vincenzo; BIFULCO Maurizio y PETROCELLIS, Luciano. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery*. Septiembre 2004. vol. 3, n.9, p. 771-784. ISSN: 1474-1784.

- DI MARZO, Vincenzo y DE PETROCELLIS, Luciano. Endocannabinoids as Regulators of Transient Receptor Potential (TRP) Channels: a Further Opportunity to Develop New Endocannabinoid-Based Therapeutic Drugs. *Current Medicinal Chemistry*. 2010. vol. 17, n. 14, p. 1430-1449. ISSN: 0929- 8673.
- DI MARZO, Vincenzo y DE PETROCELLIS, Luciano. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences*. Diciembre 2012. vol. 364, n. 1607, p. 3216-3228. ISSN: 0962- 8436.
- DI MARZO, Vincenzo. Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nature Neuroscience*. Enero 2011. vol 14, p. 9-15. ISSN: 1097-6256.
- DI MARZO, Vincenzo.; PETROSINO, Stefania. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Current Opinion in Lipidology*. Abril 2007, vol. 18, n.2, p. 129–140. EISSN: 1473-6535.
- DÍAZ-LAVIADA, Inés y RUIZ-LLORENTE, Lidia. Signal Transduction Activated by Cannabinoid Receptors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Julio 2005. vol. 5, n. 7, p. 619-630. ISSN: 1875-5607.
- DOWNER, Eric. Cannabinoids and Innate Immunity: Taking a Toll on Neuroinflammation. *The Scientific World*. Abril 2011 vol 11, p. 855–865. ISSN: 1537-744X.
- FERNÁNDEZ-RUIZ, Javier; ROMERO, Julián; RAMOS, José. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson’s Disease, Huntington’s Chorea, Alzheimer’s Disease, and Others. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2015. vol 231, p. 233-260. ISSN 0171-2004.
- FERNÁNDEZ-SOLARI, Javier; PRESTIFILIPPO, Juan; BORNSTEIN, Stefan; MCCANN, Samuel y RETTORI, Valeria. Participation of the endocannabinoid system in the effect of TNF-alpha on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Noviembre 2006. vol. 1088, p. 238–250. ISSN: 1749-6632.

- FEZZA, Filomena; BARI, Monica; FLORIO, Rita; TALAMONTI, Emanuela; FEOLE, Monica; MACCARRONE, Mauro. Endocannabinoids, Related Compounds and Their Metabolic Routes. *Molecules*. Octubre 2014. vol. 19, n. 11, p. 17078-17106. ISSN 1420-3049.
- FITZGERALD, Garret. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. Noviembre 2003, vol. 2, p. 879-890. ISSN: 1474-1776.
- GARCÍA BARRENO, Pedro. Inflamación. *Revista Académica de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2008. vol. 102, n.1, p.91-159. ISSN: 1578-7303.
- HARRIS, Sarah; PADILLA, Josue; KOUMAS, Laura; RAY, Denise y PHIPPS, Richard. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in immunology*. Marzo 2002. vol. 23, n.3, p.144-150. ISSN: 1471-4906.
- HARRIS, Sarah; PADILLA, Josue; KOUMAS, Laura; RAY, Denise; PHIPPS, Richard. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*. Marzo 2002, vol. 23, n.3, p. 144-50. ISSN: 1471-4906.
- HERKENHAM, Miles; LYNN, Allison; LITTLE, Mark; JOHNSON, Ross; MELVIN, Lawrence; DE COSTA, Brian; RICE, Kenner. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. Marzo 1990. vol. 87, p. 1932-1936. ISSN: 0027-8424
- HILLARD, Cecilia. The Endocannabinoid Signaling System in the CNS: A Primer. *International Review of Neurobiology*. 2015. vol. 125, p. 1-47. ISSN: 0074-7742.
- HORIUCHI, Takahiko; MITOMA, Hiroki; HARASHIMA, Shin-ichi; TSUKAMOTO, Hiroshi; SHIMODA, Terefumi. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*. Julio 2010, vol. 49, n.7, p. 1215-1228. EISSN 1462-0332.
- HU, Huangming; HO, Winnie; MACKIE, Ken; PITTMAN, Quentin; SHARKEY, Keith. Brain CB1 receptor expression following lipopolysaccharide-induced inflammation. *Neuroscience*. Diciembre 2012. vol. 227, p. 211-222. ISSN: 0306-4522.
- IANNOTTI, Fabio; DI MARZO, Vincenzo; PETROSINO, Stefania. Endocannabinoids and Endocannabinoid-Related Mediators: Targets, Metabolism and Role In Neurological

Disorders. Progress in Lipid Research. Abril 2016. vol. 62, p. 107-128. ISSN: 0163-7827.

- JACK, Carolyn; ARBOUR, Nathalie; MANUSOW, Joshua; MONTGRAIN, Viviane; BLAIN, Manon; MCCREA, Ellie; SHAPIRO, Aaron; ANTEL, Jack. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *The Journal of Immunology*. Octubre 2015, vol. 175, n. 7, p. 4320–4330.
- JEANNIN, P.; JAILLON, S.; DELNESTE, Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current Opinion in Immunology*. 2008, vol. 20, n. 5, p. 530–537. ISSN: 0952-7915
- KAWASAKI, Takumi y KAWAI, Taro. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*. Septiembre 2014, vol. 5, art. 461, 8 p. ISSN: 1664-3224.
- KLEIN, Thomas. “Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics,” *Nature Reviews Immunology*. Mayo 2005, vol. 5, n. 5, p. 400–411. EISSN: 1474-1741.
- KLEIN, Thomas; NEWTON, Cathy; LARSEN, Kellie; LU, Lily; PERKINS, Izabella; NONG, Liang; FRIEDMAN, Herman. The cannabinoid system and immune modulation,” *Journal of Leukocyte Biology*. Octubre 2003, vol. 74, n. 4, p. 486–496. EISSN: 1938-3673.
- LEHNARDT, SEIJA. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor mediated neuronal injury. *Glia*. Febrero 2010, vol. 58, n. 3, p. 253–263. ISSN: 1098-1136.
- LIGRESTI, Alessia; DE PETROCELLIS, Luciano; DI MARZO, Vincenzo. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiological Reviews*. Septiembre 2016. vol. 96, p. 1593-1659. ISSN 0031-9333.
- LIGRESTI, Alessia.; PETROSINO, Stefania.; DI MARZO, Vincenzo. From endocannabinoid profiling to “endocannabinoid therapeutics”. *Current Opinion in Lipidology*. Junio 2009, vol. 13, n.3, p. 321–331. EISSN: 1473-6535.
- LU, Hui-Chen y MACKIE, Ken. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biological Psychiatry*. Abril 2016. vol. 79, n. 7, p. 516-525. ISSN: 0006-3223.

- LUI, Jie; BÁTKAI, Sándor; PACHER, Pál; HARVEY-WHITE, Judith; WAGNER, Jens; CRAVATT, Benjamin; GAO, Bin; KUNOS, George. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF- κ B independently of plateletactivating factor. *The Journal of Biological Chemistry*. Noviembre 2003, vol. 278, n. 45, p. 45034–45039. EISSN: 1083-351X.
- LUTZ, Beat; MARSICANO, Giovanni; MALDONADO Rafael e HILLARD, Cecilia. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature Reviews Neuroscience*. Diciembre 2015. vol. 16, n. 12, p. 705-718. ISSN: 1759- 4758.
- MA, Yinhua; LI, Jianxue; CHIU, Isaac; WANG, Yawen; SLOANE, Jacob; LU, Jining; KOSARAS, Bela; SIDMAN, Richard; VOLPE, Joseph; VARTANIAN, Timothy. Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *Jornual of cell Biology*. Octubre 2006, vol. 175, n. 2, p. 209–215. ISSN: 1540-8140.
- MACARRONE, Mauro; BAB, Itai; BÍRO, Tamás; CABRAL, Guy; DEY, Sudhansu; DI MARZO, Vincenzo; KONJE, Justin; KUNOS, George; MECOULAM, Raphael; PACHER, Pal; SHARKEY, Keith y ZIMMER, Andreas. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years fter THC. *Trends Pharmacol Sci*. Mayo 2015. vol. 36, n. 5, p. 277-296. ISSN: 1471-4906.
- MACCARRONE, M.; BARI, M.; BATTISTA, N.; FINAZZI-AGRÓ, A. Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation and Allergy*. 2002, vol. 1, n. 1, p. 53–63. EISSN: 1568-010X.
- MACCARRONE, Mauro; GUZMÁN, Manuel; MACKIE, Ken, DOHERTY, Patrik; HARKANY, Tibor. Programing of neural cells by (endo) cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nature Reviews Neuroscience*. Noviembre 2014. vol. 15, p. 786-801. ISSN: 1471-003X.
- MACKIE, Ken. Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Abril 2008. vol. 286, n.1-2, suplemento 1, p.S60-S65. ISSN, 1872-8057.
- MALEK, Natalia y STAROWICZ, Katarzyna. Dual-Acting Compounds Targenting Endocannabinoid and Endovanilloid Systems- A Novel Treatmennt Option for Chronic

Pain Management. *Frontiers in Pharmacology*. Agosto 2016. vol. 7, art. 257. ISSN: 1663-9812.

- MARCHALANT, Y.; ROSI, S.; WENK, G.L. Anti-inflammatory property of the cannabinoid agonist WIN-55212- 2 in a rodent model of chronic brain inflammation. *Neuroscience*. Febrero 2007, vol. 144, n. 4, p. 1516–1522. ISSN: 0306-4522.
- MCCOY, Kathleen. Interaction between Cannabinoid System and Toll-Like Receptors Controls Inflammation. *Mediators of Inflammation*. Abril 2016, vol. 2016. ISSN: 0962-9351.
- MCEWEN, Bruce. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2006. vol. 8, n. 4, p. 367-381.
- MILLER, A. y STELLA, N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *British Journal of Pharmacology*. 2007. vol. 153, p. 765–774. ISSN: 1476-5381.
- NETZAHUALCOYOTZI- PIEDRA, Citlalli; MUÑOZ- ARENAS, Guadalupe, MARTÍNEZ- GARCÍA, Isabel; FLORÁN- GARDUÑO, Benjamín; LIMÓN- PÉREZ DE LEÓN, Ilhuicamina. La marihuana y el Sistema endocannabinoide: de sus efectos recreativos a la terapéutica. *Revista Biomédica*. 2009. vol. 20, n. 2, p. 128-153. ISSN: 2007-8447.
- NIMCZICK, Martín y DECKER, Michael. New Approaches in the Design and Development of Cannabinoid Receptor Ligands: Multifunctional and Bivalent Compounds. *Chem MedChem*. Mayo 2015. vol. 10, n.5, p. 773-786. ISSN: 1860-7187.
- O'NEILL, Luke. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of Toll-like receptor signal transduction. *Immunity*. Julio 2008, vol. 29, n. 1, p. 12–20. ISSN: 1074-7613.
- OKADA, Yuka; REINACH, Peter; SHIRAI, Kumi; KITANO, Ai; KAO, Winston; FLANDERS, Kathleen, MIYAJIMA, Masayasu, LIU, Hongshan, ZHANG, Jianhua; SAIKA, Shizuya. TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice. *The American Journal of Pathology*. Junio 2011. vol. 178, n.6, p. 2654–64. ISSN: 0002-9440.
- PACHER, Pál y KUNOS, George. Modulating the endocannabinoid system in human

- health and disease: successes and failures. *The FEBS Journal*. Mayo 2013, vol. 280, n. 9, p. 1918–1943. EISSN: 1742-4658.
- PARAMESWARAN, Narayanan; PATIAL, Sonica. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2010, vol. 20, n.2, p. 87-103. EISSN: 2162-6502.
 - PAXINOS, George y WATSON, Charles. *The Rat Brain in Stereotaxis Coordinates*. 6a. ed. ebook: Academic Press, 2007. 456p. ISBN: 9780080475158.
 - PERTWEE, Roger. Endocannabinoids and their pharmacological actions. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2015. vol 231, p. 1-37. ISSN 0171-2004.
 - PERTWEE, Roger. Pharmacology of cannabinoids CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 1997. vol 74, n.2, p. 129-180. ISSN: 0163-7258.
 - PRESTIFILIPPO, Juan Pablo; FERNANDEZ-SOLARI Javier; DE LA CAL Carolina, Iribarne Maria, SUBURO Ana María, RETTORI Valeria, McCANN Samuel, ELVERDIN Juan Carlos. Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptors. *Exp Biol Med* 2006. vol 231, pp 1421-9. ISSN 0037-9727.
 - QIAN, Cheng y CAO, Xuetao. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013, vol. 1283, n. 1, p. 67–74. ISSN: 1749-6632.
 - RAMOS, Javier; CRUZ, Víctor; MARTÍNEZ- SALAZAR, Javier; CAMPILLO, Nuria y PÁEZ, Juan. Dissimilar interaction of CB1/ CB2 with lipid bilayers as revealed by molecular dynamics simulation. *Physical Chemistry Chemical Physics*. Marzo 2011. vol. 13, n. 9, p. 3660-3668. ISSN: 1463-9076.
 - RICHARDSON, Kimberlei; HESTER, Allison y MCLEMORE, Gabrielle. Prenatal cannabis exposure - The "first hit" to the endocannabinoid system. *Neurotoxicology and Teratology*. 2016. vol. 58, p 5-14. ISSN: 0892-0362.
 - ROCHE, Michele; DIAMOND, Michael; KELLY, John; FINN, David. In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. *Journal of Neuroimmunology*. Diciembre 2006, vol. 181, n. 1-2, p. 57–67. ISSN: 0165-578.

- RYBERG E; LARSSON N; SJÖGREN S; HJORTH S; HERMANSSON N; LEONOVA. J; ELEBRING T; NILSSON K; DRMOTA T; GREASLEY P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*. Diciembre 2007. vol. 152, n.7, p. 1092–1101. ISSN: 1476-5381.
- SCRIVO, Rossana; VASILE, Massimiliano; BARTOSIEWICZ, Izabella; VALESINI, Guido. Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmunity Reviews*. Mayo 2011, vol. 10, n. 7, p. 369-374. ISSN: 1568-9972.
- SHU-JUNG HU, Sherry y MACKIE, Ken. Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2015. vol 231, p. 59-93. ISSN 0171-2004.
- SINGH TAHIM, A.; SANTHA, P.; NAGY, I. Inflammatory mediators convert anandamide into a potent activator of the vanilloid type 1 transient receptor potential receptor in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*. 2005, vol. 136, p. 539–548. ISSN: 0306-4522.
- SMITH, Sidney. TERMINELLI, Carol; DENHARDT, Georgetta. Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Abril 2000, vol. 293, n. 1, p. 136–150. EISSN: 1521-0103.
- SORIA-GOMEZ, Edgar; BELLOCCHIO Luigi; MARSICANO Giovanni. Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. *F1000Research*. Mayo 2016. ISSN 2046-1402.
- STAROWICZ, Katarzyna; NIGAM, Santosh; DI MARZO, Vincenzo. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacology & Therapeutics*. Abril 2007. vol. 114, n. 1, p. 13-33. ISSN: 0163-7258.
- STELLA, Neph. Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*. 2004, vol. 48, n. 4, p. 267–277. ISSN: 1098-1136.
- SUGIURA, Takayuki; KOBAYASHI, Y.; OKA, S.; WAKU, K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. Febrero 2002, vol. 66, n.2-3, p. 173–192. ISSN: 0952-3278.

- SZOLCSÁNYI, János y SÁNDOR, Zoltán. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends in Pharmacological Sciences*. Diciembre 2012. vol. 33, n. 12, p. 646-655. ISSN: 0165-6147.
- TANG, Sung-Chun; ARUMUGAM, Thiruma; XU, Xiangru; CHENG, Aiwu; MUGHAL, Mohamed; JO, Dong Gyu; LATHIA, Justin; SILER, Dominic; CHIGURUPATI, Srinivasulu; OUYANG, Xin; MAGNUS, Tim; CAMANDOLA, Simonetta; MATTSON, Mark. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. Agosto 2007, vol. 104, n. 34, p. 13798–13803. ISSN: 0027-8424.
- TANIMURA, Natsuko; SAITOH, Shinichiroh; MATSUMOTO, Fumi; AKASHI-TAKAMURA, Sachiko; MIYAKE, Kensuke. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Marzo 2008, vol. 368, n. 1, p. 94–99. ISSN: 0006-291X.
- TASKER, Jeffrey; CHEN, Chun; FISHER, Marc; FU, Xin; RAINVILLE, Jennifer; WEISS, Grant. Endocannabinoid Regulation of Neuroendocrine Systems. *International Review of Neurobiology*. 2015. vol 125, p. 163–201. ISSN 0074-7742.
- TURCOTTE, Caroline; BLANCHET, Marie-Reneé; LAVIOLETTE, Michel; FLAMAND, Nicolas. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Junio 2016. vol. 73, n. 23, p. 4449-4470. ISSN: 1420-682X.
- TURCOTTE, Caroline; CHOUINARD, François; LEFEBVRE, Julie y FLAMAND, Nicolas. Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl- glycerol and arachidonoyl- ethanolamide, and their metabolites. *Journal of Leukocyte biology*. Junio 2015. vol. 97, n. 6, p. 1049-1070. ISSN: 1938-3673.
- WAJANT, H; PFIZENMAIER, K; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation* . Enero 2003, vol. 10, p. 45-65. EISSN: 1476-5403.
- YANG Y, YANG H, WANG Z, VARADARAJ K, KUMARI SS, MERGLER S, OKADA Y, SAIKA S, KINGSLEY PJ, MARNETT LJ, REINACH PS. Cannabinoid receptor 1 suppresses transient receptor potential vanilloid 1-induced inflammatory

responses to corneal injury. *Cellular Signalling*. 2013. vol. 25, n. 2, p. 501–11.
ISSN: 0898-6568

- ZURIER, Robert y BURSTEIN, Sumner. Cannabinoids, inflammation, and fibrosis. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. Noviembre 2016. vol. 30, n. 11, p. 3682-3689. ISSN: 1530-6860.

9. Anexos

Anexo A - Descubrimiento del Sistema Endocannabinoide

La planta *Cannabis sativa* y muchas de sus preparaciones (por ejemplo, marihuana y hachís) se han utilizado durante miles de años en diferentes sociedades, tanto para recreación como en carácter medicinal. Su historia se remonta al año 2737 a.C. cuando fue incluida en la farmacopea china del emperador Sheng-Nung donde se prescribía para diversas dolencias. También existen menciones al cannabis en papiros médicos pertenecientes a los distintos gobiernos faraónicos de Egipto que datan del año 2350 a.C. En el imperio Asirio, alrededor de 800 a.C., ya conocían la dualidad de su actividad y, por lo tanto, sus efectos secundarios. No obstante, ya se utilizaba en aquella época para tratar los episodios de epilepsia nocturna (Wilson y Reynolds, 1990). Si bien se han encontrado registros del consumo de cannabis (recreativo y medicinal) en la India, la antigua Persia, y las sociedades árabes medievales, sus efectos farmacológicos en humanos recién se describieron con mayor precisión en la mitad del siglo XIX. En 1839, O'Shaughnessy descubrió que preparaciones de *Cannabis Sativa* podían ser utilizadas en el tratamiento de tétanos, ya que eliminaba la parálisis y los espasmos musculares que caracterizan a esta enfermedad (O'Shaughnessy, 1839). Desde aquellos tiempos y hasta principios de los 60, se la podía conseguir libremente y utilizarla para tratamientos tan diversos como el dolor, las convulsiones y espasmos. En la Convención de las Naciones Unidas sobre estupefacientes llevada a cabo en Génova en 1961, el cannabis se incluyó en la lista de drogas ilegales y peligrosas, lo que condujo a la prohibición de su consumo para cualquier actividad. Se lo consideró entonces como una sustancia con gran potencial tóxico y adictivo, sin uso médico demostrado, por lo que ingresó en la categoría conocida como "Schedule 1", restringiendo su acceso incluso a investigadores.

El primer constituyente activo identificado y aislado del cannabis fue el cannabinoide (CBN). Su estructura fue dilucidada en la década del 30, y a partir de la síntesis de un análogo, el $\Delta^{6a,10a}$ -tetrahidrocannabinol, fueron demostrados sus efectos psicotrópicos (Loewe y Adams, 1947). En el año 1964 se caracterizó la estructura química exacta del principal componente psicoactivo de la planta *Cannabis spp*, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Mechoulam y Gaoni, 1964). Debido a su naturaleza altamente lipofílica, se creía inicialmente que el Δ^9 -THC ejercía sus efectos mediante la interacción con la membrana plasmática, estimulando o

inhibiendo las enzimas asociadas a la membrana y alterando el estado físico de los canales iónicos. Sin embargo, luego se observaría que producía una reducción en los niveles de AMPc en células de neuroblastoma mediante la inhibición funcional de la adenilato ciclasa (Howlett y Fleming, 1984), efecto que era bloqueado con la adición de toxina pertussis (PTX), lo que sugería que en el mecanismo de acción participaba una proteína Gi/o (Howlett *et al.*, 1986). En 1988, Mechoulam y cols. reportaron que la acción del Δ^9 -THC era estereoespecífica (Mechoulam *et al.*, 1988), hipótesis que fue confirmada cuando se identificaron en membranas plasmáticas de cerebro de rata sitios específicos, saturables y de alta afinidad para un análogo sintético de Δ^9 -THC (Devane *et al.*, 1988). Éste fue el primer indicio de la existencia del SEC.

Mediante la síntesis de un análogo sintético de Δ^9 -THC marcado radiactivamente, se mapeó la localización de un posible receptor en varias especies de mamíferos, incluyendo humanos, donde se observó que su distribución en el SNC difería de cualquier patrón de receptor neurotransmisor conocido (Herkenham *et al.*, 1990). Además hallaron que estos posibles receptores se encontraban en las regiones responsables de los procesos fisiológicos que se ven afectados por la marihuana: el hipocampo (memoria), la corteza cerebral (la cognición superior), cerebelo (coordinación motora), los ganglios basales (movimiento), hipotálamo (apetito), la amígdala (emociones) entre otros.

En 1990, Matsuda y cols. anunciaron el descubrimiento de la secuencia de ADN codificante para un receptor de Δ^9 -THC en el cerebro de rata y, como se hipotetizaba, se trataba de un receptor acoplado a proteína G. Gracias a la utilización de métodos de separación de lípidos, en 1992 William Devane y Lumír Hanuš encontraron, en extractos de cerebro porcino, el primer agonista endógeno del receptor de cannabinoides descrito, identificado como *N*-araquidonoiletanolamina, y definido como Anandamida, que deriva del sánscrito *ananda* (alegría, felicidad suprema, en referencia a sus efectos psicoactivos) y la naturaleza amida de la molécula.

Dado que el receptor caracterizado se encontraba principalmente en el cerebro, no se explicaba todavía como el cannabis podía tener efecto sobre otros órganos. En 1993, Munro y cols. encontraron una proteína cuya secuencia tenía un 44% de homología respecto del receptor hallado por Matsuda, en macrófagos y en el bazo. Ensayos de unión a ligando confirmaron que este receptor tenía una alta afinidad por los cannabinoides sintéticos WIN 55.212 y CP 55.940,

la AEA y el Δ^9 -THC (Munro *et al*, 1993). Los autores sugirieron que el receptor hallado por Matsuda fuera llamado "receptor de cannabinoides 1" (CB1) (denominado además receptor "central", debido a su distribución) y que el recientemente descrito lo llamasen "receptor de cannabinoides 2" (CB2), considerado entonces como el receptor "periférico". Los receptores CB2, que hoy se sabe que también se encuentran en el SNC, están presentes principalmente en el sistema inmunológico, aunque se hallan además en el intestino, bazo, hígado, corazón, riñones, huesos, vasos sanguíneos, células de los ganglios, glándulas endocrinas y exócrinas, y en los órganos reproductivos. La clonación de CB2 no solo estableció a AEA como un potente cannabinoide endógeno, sino que también condujo a la identificación de otros ligandos específicos.

En 1995 fue incorporado como cannabinoide endógeno una molécula ya conocida, el 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Mechoulam y cols. aislaron 2-AG de intestino canino y comprobaron que este compuesto era capaz de unirse tanto CB1 como CB2 (Mechoulam *et al*, 1995). Además, determinaron que este compuesto inhibía la AC en células aisladas de bazo de ratón, con un nivel de potencia similar al Δ^9 -THC, y si era administrado intravenosamente a ratones, causaba efectos similares a los producidos por ese cannabinoide, aunque no con la misma potencia.

Finalmente se hallaron las enzimas involucradas en la síntesis y metabolismo de los ligandos endógenos y se desarrollaron ratones *knockout* carentes de los receptores de cannabinoides (CB1^{-/-} y CB2^{-/-}), los cuales permitieron profundizar los conocimientos acerca del SEC y las consecuencias fenotípicas de la carencia del mismo. Mediante el esfuerzo por entender las vías metabólicas del Δ^9 -THC, los científicos se encontraron con un sistema de señalización molecular hasta ese momento desconocido, que resultó ser crucial en la regulación de una amplia variedad de procesos biológicos. Se lo denominó "sistema endocannabinoide" por la planta que condujo a su descubrimiento.

Anexo B - Mecanismos de transducción de señales de los receptores CB1

El receptor CB1 modula sus funciones a través de:

- 1) **La modulación en la actividad de Adenilato ciclasa (AC):** La inhibición de la AC fue la primera señal de transducción caracterizada para CB1 (Howlett y Fleming, 1984), y fue reportada nuevamente en muestras de rata pertenecientes a hipocampo, cuerpo estriado, corteza cerebral y cerebelo (Bidaut-Russell *et al*, 1990). Sin embargo, luego se descubriría que la activación de CB1 puede activar a la AC en lugar de inhibirla. Esto se debe a que existen distintos tipos de isoenzimas de AC, que varían su nivel de expresión dependiendo el tejido, y se activan por distintos mecanismos. Las isoformas tipo I, V, VI y VIII se inhibieron ante la activación de CB1, mientras que las de los tipos II, IV y VII se estimularon. Estas interacciones con la AC, modulan la concentración intracelular de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), regulando así la actividad de la proteína quinasa A (PKA), lo que resulta en importantes cambios en la actividad celular (Childers y Deadwyler, 1996; Yea *et al*, 2000). Por ejemplo, canales de K⁺ tipo A en el hipocampo están sometidos a la fosforilación/desfosforilación regulada por PKA, por lo que, la activación/inhibición de esta vía modula un mecanismo de respuesta neuronal. (Hampson *et al*, 1995; Mu *et al*, 2000). Además, dado que la vía AC-AMPC-PKA regula la expresión génica a través del elemento de respuesta a AMPC (CRE), no sólo se estaría modulando una respuesta inmediata, sino también cambios a largo plazo en la expresión de genes (Childers y Deadwyler, 1996).
- 2) **Inhibición de canales de calcio sensibles a potencial (VSCC):** La vía más importante para la entrada de Ca²⁺ en las células excitables (Células musculares, neuronas y células de glándulas neuroendocrinas) son los canales de Ca²⁺ voltaje dependientes. Al abrirse, permiten el flujo selectivo de iones Ca²⁺ a través del poro del canal, iniciándose una variedad de procesos intracelulares entre los que se incluyen la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, entre otros. Se han descrito seis tipos funcionales de canales de Ca²⁺ (Zhang *et al*, 1993), denominados T, L, N, P, Q y R. Se ha observado que la activación de CB1 inhibe los canales tipo N (Mackie y Hille, 1992; Pan *et al*, 1996; Nogeron *et al*, 2001) y P/Q (Mackie *et al*, 1995; Twitchell *et al*, 1997). Esta inhibición es bloqueada con el agregado de PTX, lo que sugiere que se produce vía Gi/o. También se observó la inhibición de canales tipo L (Gebremedhin *et al*, 1999; Rubovith *et al*, 2002), aunque en estos casos, se determinó

que la inhibición se producía vía Gs, dado que el tratamiento con PTX no bloqueaba la inhibición, pero sí lo hacía el agregado de anticuerpos anti-Gs. Dado que estos canales están principalmente situados pre-sinápticamente y son necesarios para la liberación de neurotransmisores, se cree que la modulación de los canales de calcio por CB1 es un mecanismo por el cual los cannabinoides pueden disminuir la liberación de neurotransmisores en las neuronas presinápticas (Jarvis y Zamponi, 2001).

- 3) **La regulación de cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK):** Existen evidencias que demuestran que los receptores CB1 regulan esta vía de comunicación tanto *in vivo* como *in vitro* (Bouaboula *et al*, 1995; Guzman y Sanchez, 1999; Sanchez *et al*, 2003). La vía de la MAP quinasas es un mecanismo de señalización clave que regula muchas funciones celulares tales como el crecimiento celular, la transformación y la apoptosis. La familia MAPK de mamíferos consiste en tres subfamilias con múltiples miembros: quinasas regulada por señales extracelulares (ERK), las quinasas del extremo N-terminal de c-Jun/quinasas activadas por estrés (JNK/SAPK), y las p38. Mientras ERK está implicada en la regulación de la división celular y el crecimiento, las otras dos subfamilias son activadas por señales de estrés y citoquinas inflamatorias y se han relacionado con la muerte celular y trastornos del sistema inmune (Johnson y Lapadat, 2002).
- 4) **Activación de canales rectificadores de potasio (Kir):** Los Kir pertenecen a una superfamilia de canales de potasio que tienen la capacidad de actuar como válvula favoreciendo la entrada de iones potasio durante hiperpolarizaciones de la membrana y bloqueando la salida frente a despolarizaciones de la misma. Además, permiten la salida de potasio en un rango de voltaje de unos cuantos milivoltios por encima del potencial de equilibrio para este ión. De esta forma, mantienen el potencial de membrana cercano al del potasio; sin embargo, cuando se produce una despolarización, estos canales se cierran. Su función fisiológica es muy importante, dado que definen el potencial de membrana en reposo y establecen el umbral que debe ser superado por estímulos excitadores para generar y propagar el potencial de acción. Esta superfamilia de canales se divide en siete subfamilias las cuales difieren en el grado de rectificación (debil/fuerte) y su distribución tisular. De las siete subfamilias descritas, sólo los miembros de la kir3 son capaces de unirse a proteínas G provenientes de la estimulación de GPCRs, los cuales se conocen como GIRK (canales rectificadores de potasio activados por proteínas G). Diversas investigaciones demostraron

- que los cannabinoides activan estos canales GIRK regulando de alguna manera la excitabilidad de las neuronas (Henry *et al*, 1995; McAllister *et al*, 1999; Izumi *et al* 1999).
- 5) **La generación esfingolípido ceramida:** Se observó que los cannabinoides producen un incremento considerable en los niveles de ceramida, mecanismo por el cual pueden, en conjunto con otras vías, inducir la apoptosis de células malignas (Guzman *et al*, 2001; Galve-Roperh *et al*, 2000).
 - 6) **Modulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular:** Se ha demostrado que diferentes agonistas de CB1 inducen una elevación rápida y transitoria de Ca^{2+} intracelular (Sugiura *et al*, 1999; Yamamoto *et al*, 1997). Existen evidencias que sugieren que la liberación de Ca^{2+} se produce por el aumento de IP3 como consecuencia de la activación de la fosfolipasa C (PLC), dado que si se realiza un pre-tratamiento con un inhibidor de PLC (PI-U73122), no se observa el mencionado aumento.
 - 7) **Interacción con Óxido Nítrico:** El óxido nítrico (NO) es un radical libre de corta duración producido a demanda por varios tejidos, incluyendo las células endoteliales, neuronas, células astrogliales y macrófagos. Está implicado en numerosas funciones celulares tales como el control de la homeostasis vascular (Thomas *et al*, 2003) y la transmisión sináptica (Dawson y Snyder, 1994). La producción de NO también puede ser inducida por factores pro-inflamatorios en condiciones patológicas (Nelson *et al*, 2003). En las células vivas, el NO se sintetiza a partir de L-arginina a través de la acción catalítica de la enzima NO sintasa (NOS). Se han identificado y caracterizado tres tipos de enzimas. Dos de las tres son constitutivas (cNOS) y se expresan en tipos de células específicas (NOS I o neuronal y NOS III o endotelial), mientras que la expresión de la tercera isoforma (NOS II o iNOS) puede ser inducida por citoquinas. Se ha observado en distintos modelos utilizados que la producción de NO es estimulada por la AEA (Pervot *et al*, 1998; Fimiani *et al*, 1999; Maccarrone *et al*, 2000). Sin embargo, en respuesta a LPS e interferon- γ , los cannabinoides producen una inhibición de la transcripción de iNOS con la consecuente disminución en la producción de NO en diferentes tejidos (Jeon *et al*, 1996).

Anexo C - Vías de señalización de TNF α .

La señalización intracelular mediada por TNF α se da a través de interacciones con 2 receptores triméricos de membrana: el TNFR1 (p55) y TNFR2 (p75). El TNFR1 se expresa en células nucleadas, mientras que el gen TNFR2 sólo se expresa en células del sistema inmune,

células endoteliales y nerviosas (Chen y Goeddel, 2002). Debido a su expresión constitutiva, se sabe que el TNFR1 es el principal receptor regulador de las funciones de TNF α . Si bien los receptores comparten similitudes en su estructura proteica, el TNFR1 contiene, en su región intracelular, un dominio (TRADD o FADD) que regula la muerte celular programada a través de la activación de diversas caspasas (Fig. C1).

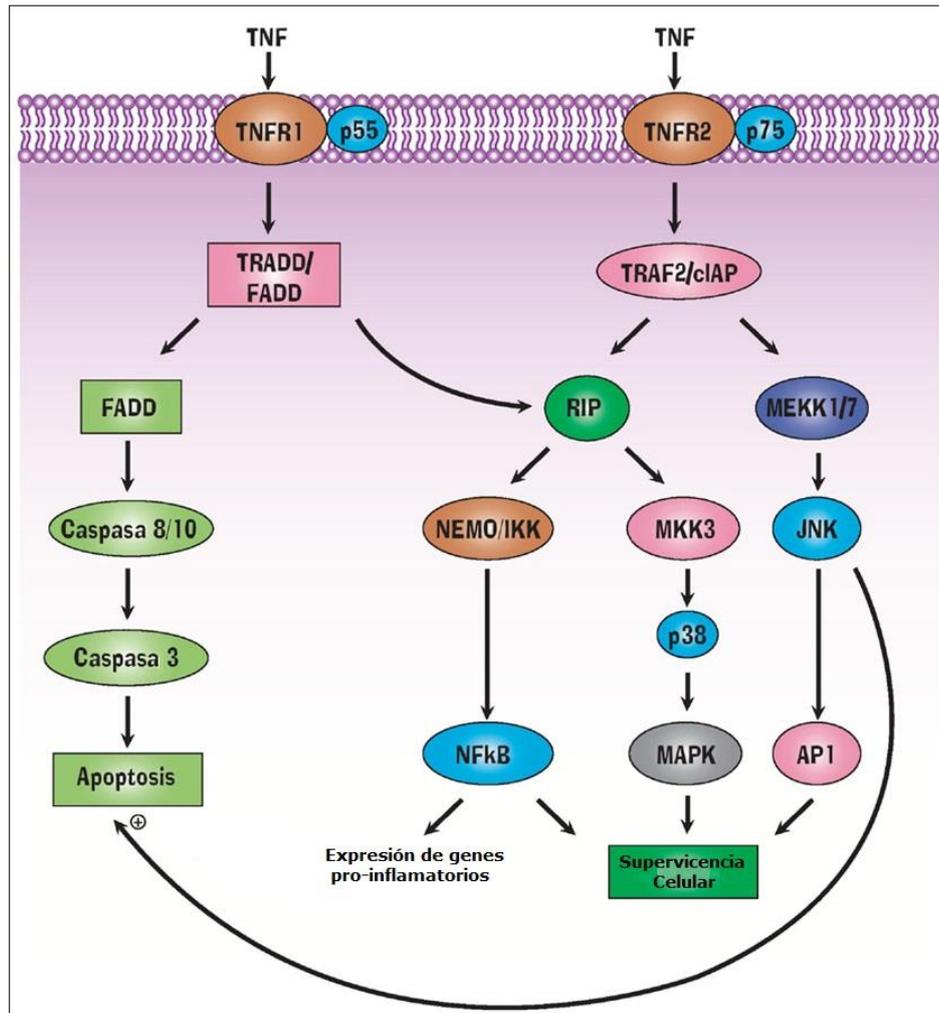


Figura C1. Señalización de TNF α a través de TNFR1 y TNFR2. El TNF α puede activar tanto a TNFR1 como a TNFR2, vías de señalización que tienen como consecuencia resultados opuestos, por lo que, la proporción de su co-expresión es una de las causas que modifica el equilibrio entre la supervivencia celular y la apoptosis. TRADD, dominio de muerte asociado a TNFR1; FADD, dominio de muerte asociado a Fas; AP1, proteína de activación 1; JNK, quinasa terminal Jun NH2; MEKK, quinasa MEK. Imagen adaptada de Faustman y Davids, 2013.

Otra vía que TNRF1 puede activar mediante TRADD, es la activación de RIP, evento que también se produce vía TNRF2. La señalización celular de RIP produce, mediante diversas quinasas, la fosforilación de los inhibidores del factor nuclear κ B (NF- κ B). Este evento lleva a la liberación y translocación del factor de transcripción NF- κ B desde el citoplasma al núcleo,

donde se une a secuencias específicas de ADN y expresa genes involucrados con la síntesis de proteínas relacionadas con la inmunidad, inflamación y maduración de respuesta inmune innata y adaptativa (Fig. C1).

La estimulación de TNFR2 se ha relacionado con distintas vías que conducen a la supervivencia celular: la activación de la proteína de activación-1 (AP1) a través de JNK y MEKK 1/7; la activación mediante p38 de la vía MAPK (ERK 1 ERK 2); y la mencionada activación de NF- κ B (Fig. 10). Se ha observado que el p55 dispara la respuesta inflamatoria mediada por TNF α . mientras que el p75 está involucrado en la proliferación de las células del sistema inmune, citotoxicidad y activación de NF- κ B. (Thomas, 2001).

Anexo D - Vías de señalización de TLR4.

La activación de TLR4 puede conducir a dos vías de señalización diferentes:

a) Dependiente de MyD88: Como se mencionó anteriormente, el ligando clásico de TLR4 es el LPS proveniente de bacterias Gram (-) que causa shock séptico. La respuesta del LPS requiere un complejo molecular que consiste en el homodímero TLR4, la proteína de unión a LPS (LBP), CD14 y la proteína de diferenciación mielóide 2 (MD2) que es necesaria para la dimerización del receptor (Kagan *et al*, 2008; Santoni *et al*, 2015). Luego de la exposición al LPS, el complejo TLR4-MD2 interacciona con lípidos ricos en colesterol que contienen CD14 anclados en la membrana plasmática. BDP, una proteína de suero soluble que se une al resto del lípido A, inicia la transferencia secuencial de monómeros de LPS al CD14 y luego a MD2. El adaptador TIRAP se une al dominio TIR de TLR4 pero carece de un dominio de señalización (Tanimura *et al*, 2008, Qian y Cao, 2013), por lo que tiene que reclutar al adaptador MyD88 al complejo TLR4 (Figura D1). La vía de señalización dependiente de MyD88 desencadena quinasas asociadas a IL-1R y MAPKs que culminan en la activación de factores de transcripción como NF- κ B y proteína activadora 1 (AP-1). Estos factores de transcripción inducen la producción de óxido nítrico y citoquinas pro-inflamatorias.

b) Independiente de MyD88: TLR4 puede señalizar con otro par de proteínas adaptadoras que resulta en la producción de interferón tipo I y una segunda forma de activar NF- κ B (Kawasaki y Kawai, 2014; Lee y Barton, 2014). En esta vía, las moléculas adaptadoras TRAM y TRIF son las que impulsan la activación celular (Fig. D1). Análogamente a TIRAP, TRAM carece de un dominio de señalización y recluta una segunda molécula adaptadora, en este caso TRIF, a la membrana plasmática. El TRIF recluta moléculas de señalización que, a su vez, reclutan al complejo a la quinasa inducible I κ B y la quinasa 1 de unión a TANK. En última instancia, se activa el factor de transcripción IRF3 (factor de regulación del interferón) para la síntesis de interferón de tipo I, especialmente interferón- β . La actividad de proteína quinasa-1 que interacciona con el receptor conduce finalmente a la activación de MAPK dependientes de TRIF y la activación de NF- κ B.

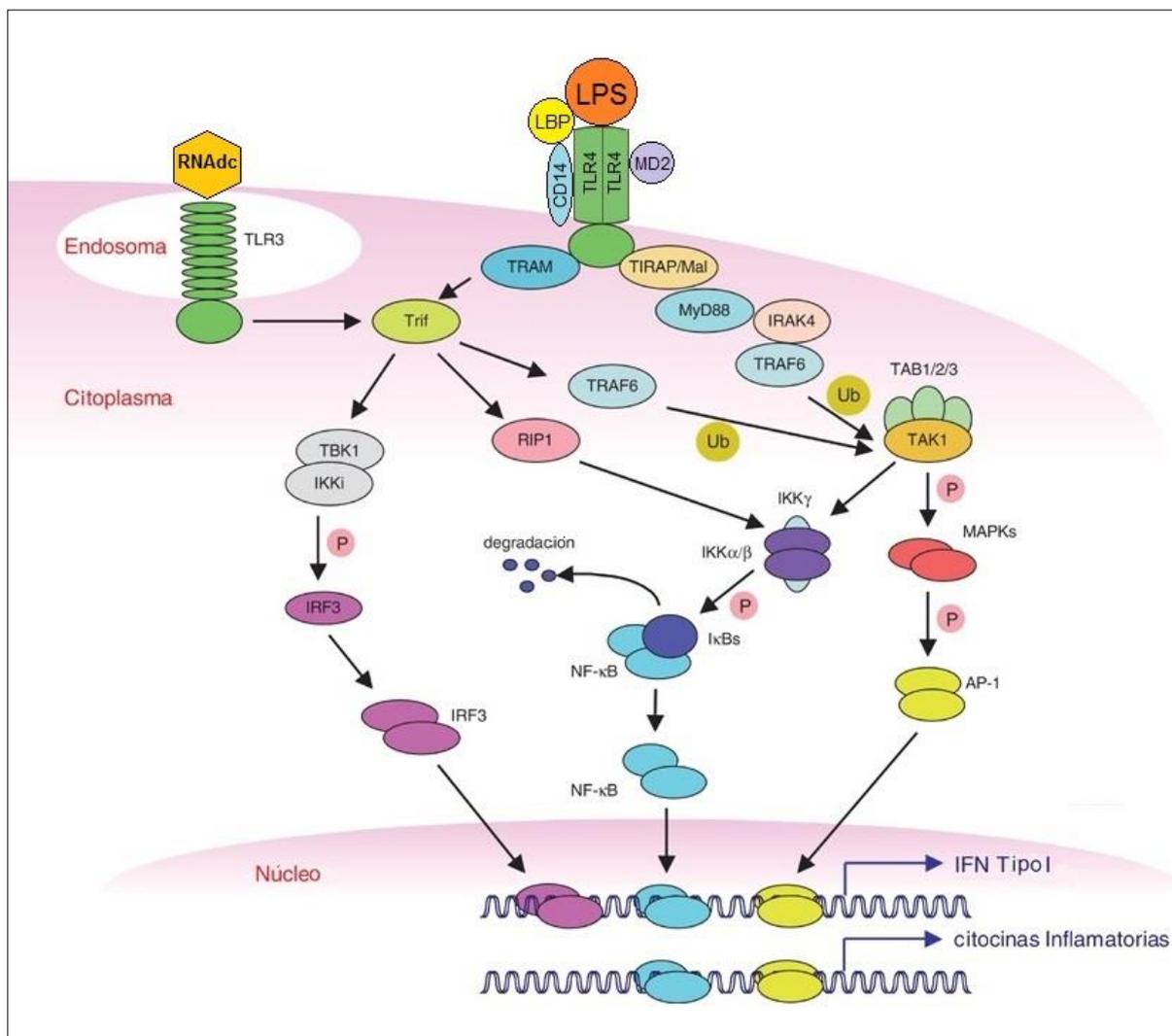


Figura D1. Vía de señalización de TLR4 tras interacción con LPS. TLR4 forma un complejo con LBP, MD2 y CD14. Cuando el LPS se une al receptor, dos complejos distintos son reclutados. La vía dependiente de MyD88 recluta a IRAK4 y TRAF6 que conducen a la activación de TAK1, que activa al complejo IKK, el cual fosforila a IκBs. IκBs es destruido por el proteasoma, permitiéndole a NF-κB translocarse al núcleo. Simultáneamente, TAK1 estimula las vías MAPK, lo que resulta en la fosforilación y activación del factor de transcripción AP-1. NF-κB y AP-1 controlan la respuesta inflamatoria induciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias. En la vía independiente de MyD88, TLR4 recluta TRAM y Trif, que interactúan con TBK1. En conjunto con IKKi, TBK1 media la fosforilación de IRF3, que una vez fosforilada, puede ser translocada al núcleo para unirse al ADN. Trif también interactúa con TRAF6 y RIP1, evento que media la activación de NF-κB. La activación de IRF3, NF-κB y AP-1 son necesarias para la inducción de IFN tipo 1, particularmente IFNβ. Estas vías pueden ser estimuladas también por la señalización del receptor TLR3, el cual se encuentra en vesículas endosomales y responde a otro tipo de ligando, como ARN doble cadena. Imágen adaptada de Kawai y Akira, 2006.

Anexo E - Usos experimentales de elementos del SEC para potenciales terapias frente a desordenes neurológicos

Actualmente, se están desarrollando diversas investigaciones con el objetivo de desarrollar terapias para paliar diversos trastornos neurodegenerativos. Las estrategias más utilizadas incluyen la utilización de agonistas o antagonistas de los CBRS e inhibidores de las enzimas degradadoras de eCBs (Tabla EI).

Enfermedad	Target	Tipo de Droga		Efecto	Modelo	Referencia
Enfermedad de Alzheimer	CB2	A	JWH-133	Neuroprotección	Toxicidad nducida por A β en ratas	Ramirez <i>et al</i> , 2005.
	CB1 CB2	A	WIN 55,212-2	Neuroprotección	Toxicidad nducida por A β en ratas	Fakhfour <i>et al</i> , 2012.
			MDA7	Neuroprotección	Toxicidad nducida por A β en ratas	Henstridge <i>et al</i> , 2009.
			HU210	Neuroprotección	Toxicidad nducida por A β en ratas	Ramirez <i>et al</i> , 2005.
Enfermedad de Parkinson	CB1	N	SR141716	Neuroprotección	Ratas lesionadas con 6-OHDA	Cerri <i>et al</i> , 2014.
		N		Neuroprotección	Marmosets lesionados con MPTP	Van der Stelt <i>et al</i> , 2005
	CB1 CB2	A	WIN 55,212-2	Neuroprotección	Ratas lesionadas con 6-OHDA o MPTP	Song <i>et al</i> , 2014.
Esclerosis Múltiple	CB2	A	JWH-133	Neuroprotección	CREAE en ratón	Baker <i>et al</i> , 2001
			Gp1a	Neuroprotección	EAE en ratón	Kong <i>et al</i> , 2014.
	CB1 CB2	A	WIN 55,212-2	Neuroprotección	EAE y CREAE en ratón	De Lago <i>et al</i> , 2012.
	MAGL	I	JZL184	Neuroprotección y reducción de la inflamación	EAE en ratón	Bernal-Chico <i>et al</i> , 2015.
	FAAH	I	CAY100400	Anti espasticidad	EAE en ratón	Pryce <i>et al</i> , 2013
		I	URB597	Anti espasticidad	EAE en ratón	Pryce <i>et al</i> , 2013

Enfermedad	Target	Tipo de Droga		Efecto	Modelo	Referencia
Enfermedad de Huntington	CB1	N	SR141716	Neurotóxico	Toxicidad inducida por malonato en ratas	Lastres-Becker <i>et al</i> , 2003
	CB2	A	HU308	Neuroprotección	Toxicidad inducida por malonato en ratas	Sagredo <i>et al</i> , 2009
		N	SR144528	Neuroprotección	Toxicidad inducida por malonato en ratas	Sagredo <i>et al</i> , 2009
	CB1 CB2	A	HU210	Neurotóxico	Ratón R6/1	Dowie <i>et al</i> , 2010
	DAGL	I	O-3841	Neuroprotección	Ratas lesionadas con malonato	Valdeolivas <i>et al</i> , 2013
	MAGL	I	JZL184	Neurotóxico	Ratas lesionadas con malonato	Valdeolivas <i>et al</i> , 2013
I		OMDM169	Neurotóxico	Ratas lesionadas con malonato	Valdeolivas <i>et al</i> , 2013	
Epilepsia	CB1	N	SR141716 (Rimonabant)	Pro-convulsiónante	Convulsiones inducidas por KA en ratones	Wallace <i>et al</i> , 2003
			AM251	Pro-convulsiónante	Convulsiones inducidas por PTZ en ratas	De Lago <i>et al</i> , 2005
		A	ACEA	Anti-convulsiónante	Convulsiones inducidas por PTZ en ratas	Luszczki <i>et al</i> , 2006
			ACPA	Anti-convulsiónante	Convulsiones inducidas por PTZ en ratas	Wallace <i>et al</i> , 2003
	CB1 CB2	A	WIN 55,212-2	Anti-convulsiónante	Convulsiones inducidas por PTZ en ratas	Naderi <i>et al</i> , 2011
	MAGL	I	URB602	Pro y anti-convulsiónante	Convulsiones inducidas por PTZ en ratas	Manna <i>et al</i> , 2012
		I	AM404	Pro y anti-convulsiónante	Convulsiones inducidas por PTZ en ratas	Manna <i>et al</i> , 2012
	FAAH	I	URB597	Anti-convulsiónante	Convulsiones inducidas por PTZ en ratas	Vielä <i>et al</i> , 2013
I		AM374	Anti-convulsiónante	Convulsiones inducidas por KA en ratas	Karanian <i>et al</i> , 2005	

Tabla EI. Usos experimentales de agonistas/antagonistas de receptores de cannabinoides e inhibidores de enzimas relacionadas para potenciales terapias frente a desordenes neurológicos. Tipo de droga: A, Antagonista; N, Antagonista; I, Inhibidor. A β , β -amiloide KA, ácido kaínico; PTZ, pentilentetrazol; 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; CREA, encefalomyelitis autoinmune experimental crónica; EAE, encefalitis autoinmune experimental. Tabla adaptada de Ianotti *et al*, 2016.

Anexo F – Protocolo de RIA para Prostaglandina E₂

Preparación de la curva standard.

Se parte de una solución Madre de PGE₂ (prostaglandina fría-sin marcar) de concentración 100µg/ml, a la que se diluye 1:100 (10µl de sc Madre en 1ml de etanol) para obtener la Solución Stock. Se diluye la sc Stock 1:25 en buffer de ensayo (40µl de sc Stock en 1ml de buffer) obteniéndose una concentración de 4000pg/µl (Solución A)

Diluciones:

Nº	Solución	Diluyente	Concentración (pg/µl)
1	Sc "A"	-	4000 pg/µl
2	500µl de "A"	500µl de Buffer	2000 pg/µl
3	500µl de 2	500µl de Buffer	1000 pg/µl
4	500µl de 3	500µl de Buffer	500 pg/µl
5	500µl de 4	500µl de Buffer	250 pg/µl
6	500µl de 5	500µl de Buffer	125 pg/µl
7	500µl de 6	500µl de Buffer	62,5 pg/µl
8	500µl de 7	500µl de Buffer	31,25 pg/µl
9	500µl de 8	500µl de Buffer	15,63 pg/µl
10	500µl de 9	500µl de Buffer	7,815 pg/µl
11	500µl de 10	500µl de Buffer	3,908 pg/µl
12	500µl de 11	500µl de Buffer	1,954 pg/µl
13	500µl de 12	500µl de Buffer	0,977 pg/µl

Una vez realizadas las diluciones del Standard se prepara la curva por duplicado

Curva Standard:

N° de tubo		Concentración	Muestra o Standard	Ab		PGE ₂ *		Carbon-dextran	
1	2	T (total)	400µl Buffer	-	30'	100µl	60'	-	10'
3	4	Background	200µl Buffer	-	30'	100µl	60'	200µl	10'
5	6	0	100µl Buffer	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
7	8	2000pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
9	10	1000pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
11	12	500 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
13	14	250 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
15	16	125 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
17	18	62,5 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
19	20	31,25 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
21	22	15,63 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
23	24	7,815 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
25	26	3,908 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
27	28	1,954 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'
29	30	0,977 pg	100µl Std	100µl	30'	100µl	60'	200µl	10'

Procedimiento:

1- Preparado de las muestras y reactivos para el desarrollo del ensayo:

- a. Preparado de muestras:
- b. Preparado de la prostaglandina marcada (PGE₂*): Se prepara la solución de manera de tener alrededor de 10.000cpm en 100µl. Para ello se miden aproximadamente 15µl de PGE₂* concentrada (como viene del proveedor) y se lo diluye en 10ml de buffer. Debe controlarse los cpm midiendo la solución en el equipo, ajustar en caso de ser necesario.

- c. Preparado de la solución de anticuerpo (Ab): El Ab se resuspende en 5ml de buffer (solución Madre). Esta se puede guardar a 20°C. Conviene preparar 4 alícuotas madre de 1,25ml. La solución de trabajo es 1:8 de la sc Madre, es decir 1,25ml + 75ml de buffer de ensayo.

2- Desarrollo del ensayo:

- Agregar en los tubos numerados 400µl Buffer para el total (T), 200µl Buffer para el background (Bkg) y 100µl de cada punto de la curva.
- Agregar 100µl de la solución de Ab (exceptuando los totales y Bkg) e incubar durante 30min.
- Agregar 1 de PGE₂* e incubar 1 hora a 4°C.
- Agregar 200µl del reactivo carbón-dextrán (exceptuando los totales) en tandas no mayores de 60-70 tubos para no exceder el tiempo de incubación.
- Incubar en hielo 10min y centrifugar por 15min a 3200rpm sin freno.
- Añadir 2ml de líquido centellador OptiPhase 3 y volcar el sobrenadante en viales.
- Agitar hasta eliminar opacidad y medir en el contador beta.

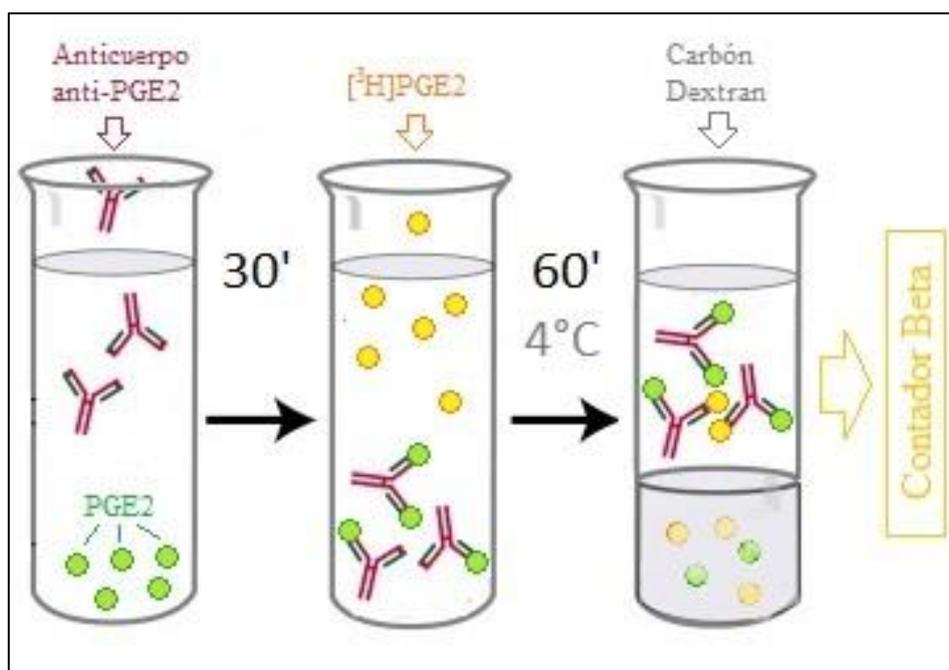


Figura F1. Esquema simplificado para el desarrollo del radioinmunoensayo

Reactivos

1- Buffer de resuspensión del Ab y ensayo:

- PBS 0,01M pH 7,4
- BSA 0,1%
- Azida sódica 0,1%

2- Carbon-Dextran (1% carbón-0,1% dextran):

Se resuspenden 50mg de dextran en 50ml de buffer. Agregar 500mg de carbón activado. Agitar durante no menos de 45min y añadirlo frío con agitación constante.

Anexo G – Protocolo de ELISA para TNF α

Reactivos:

a. Standard: Recombinant rat TNF. El liofilizado (90ng) es reconstituido en 1ml de agua deionizada, fraccionado en 10uL y guardado a -70°C(90pg/uL). Agregar 440ul Buffer Assay a los 10ul Std =2000pg/ml

b. Capture antibody: anti-rat TNF, diluído 1:250 en coating buffer.

c. Detection antibody: biotinylated anti-rat TNF, diluído 1:250 en assay diluent.

d. Enzyme reagent: SAV-HRP streptavidin horse radish peroxidase conjugate, diluído 1:250 en assay diluent. PROTEGER DE LA LUZ

e. TMB: 1:100 del stock en buffer citrate/acetate pH6.0

f. Buffer de ensayo concentrado (assay buffer)

- PBS concentrado 10x
- NaCl, 8,0g
- Na₂HPO₄ 11,6g
- KCl 2,0g

Resuspender en 900ml de H₂O destilada, llevar a pH 7,0 y completar a volumen final de 1 litro.

g. Buffer de dilución (assay diluent): PBS 1x (1litro). Agregar 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (30min a 56°C). Se tiene que preparar en el día.

h. Buffer de lavado (wash buffer): PBS 1x con 0,005% de Tween 20 (0,5ml de Tween en 1 litro de buffer). Preparar en el día.

i. Solución de Stop: H₃PO₄ 1M. Diluir H₃PO₄ 1 en 10.

Curva Standard:

1 (pg/ml)	2 (pg/ml)	3 (pg/ml)	4 (pg/ml)	5 (pg/ml)	6 (pg/ml)	7 (pg/ml)
2000	1000	500	250	125	62,5	31,25

Preparar 2000pg/mL con 22.2uL del TNF Stock (90pg/uL) llevarlo a 1mL con assay diluent. Luego hacer diluciones seriadas al medio. Puede hacerse en tubos o directamente en la placa.

En tubos: poner 300uL de assay diluent en cada tubo (6). Una vez que se prepara el tubo de 2000pg/mL tomar 300uL y colocarlos en el tubo siguiente y así sucesivamente. Vortexear bien cada tubo.

En placa: poner 100uL de assay diluent en cada well (por duplicado). Tomar 100uL del tubo de 2000pg/mL y agregarlo a la placa y hacer diluciones sucesivas al medio. Importante!!!! Mezclar bien en el well. Recordar descartar los 100uL extra que queden en el well de dilución 31.25pg/mL. Usar 100uL de assay diluent como punto 0 de la curva.

Procedimiento:

1. Agregar 100uL de capture antibody diluido a cada well, sellar la placa con parafilm y taparlo. Incubar OVERNIGHT a 4°C.
2. Aspirar y lavar 5 veces con 200uL de wash buffer, hacer un lavado más con 200uL de PBS 1x. Escurrir bien apoyando la placa invertida sobre papel absorbente.
3. Bloquear la placa con 200 uL de assay diluent por well. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
4. Aspirar y lavar 5 veces con 200uL de wash buffer, hacer un lavado más con 200uL de PBS 1x. Escurrir bien apoyando la placa invertida sobre papel absorbente.
5. Agregar 100ul de Standard (curva) o muestra. Sellar la placa con parafilm y taparla. Incubar 2 horas a temperatura ambiente u overnight a 4°C.
6. Aspirar y lavar 5 veces con 200µl de wash buffer, hacer un lavado más con 200µl de PBS 1x. Escurrir bien apoyando la placa invertida sobre papel absorbente.
7. Agregar 100µl de *detection antibody*. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
8. Aspirar y lavar 5 veces con 200µl de wash buffer, hacer un lavado más con 200µl de PBS 1x. Escurrir bien apoyando la placa invertida sobre el papel absorbente.

9. Agregar 100µl de SAV-HRP a cada well. Incubar 1 hora a temperatura ambiente. Proteger de la luz.
10. Aspirar y lavar 7 veces con 200µl de wash buffer agitando muy suavemente casi 1 minuto en cada lavado, hacer un lavado más con 200µl de PBS 1x. Escurrir bien apoyando la placa invertida sobre papel absorbente.
11. Agregar 100µl del reactivo TMB de BD OptEIA (compuesto del reactivo “A” y el “B” en una relación 1:1. Dejar 30min en oscuridad total.
12. Agregar 50µl de solución stop (H₃PO₄ 1M). Leer a 450nm

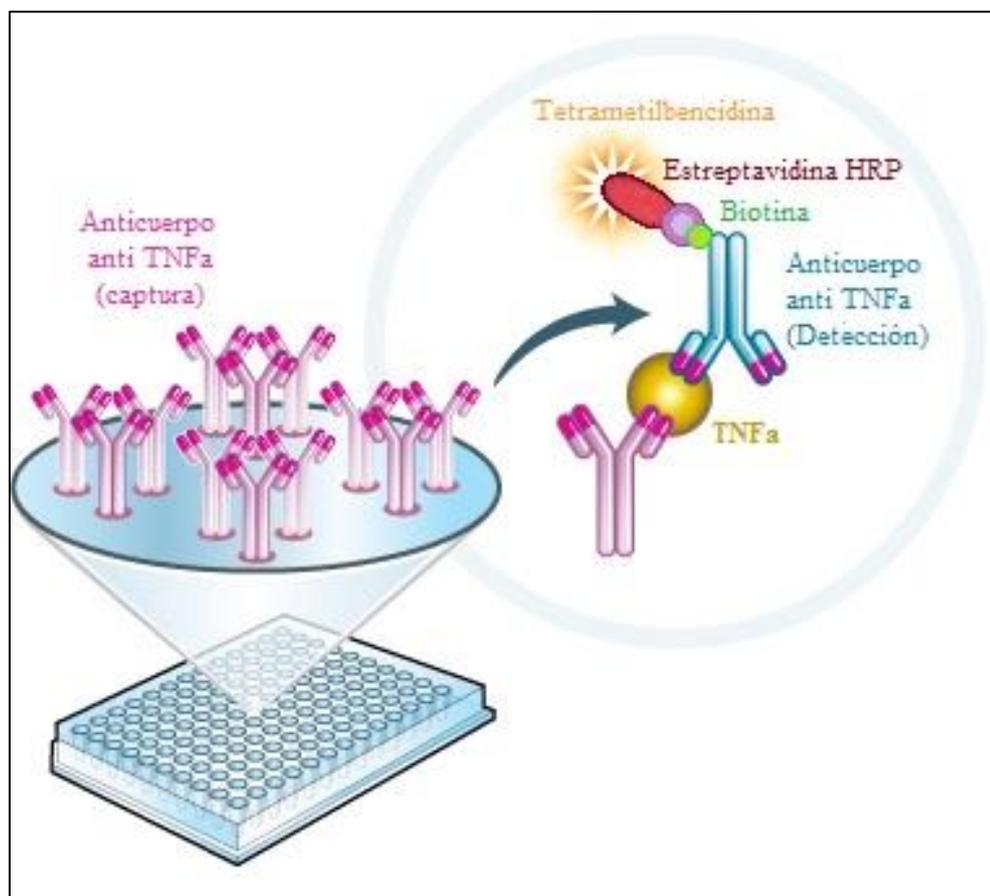


Figura J1. Esquema simplificado del procedimiento de ELISA “Sandwich” para la determinación de TNFα. Imagen adaptada de la web de abcam®.

Anexo H - Resultados complementarios obtenidos por el grupo de trabajo.

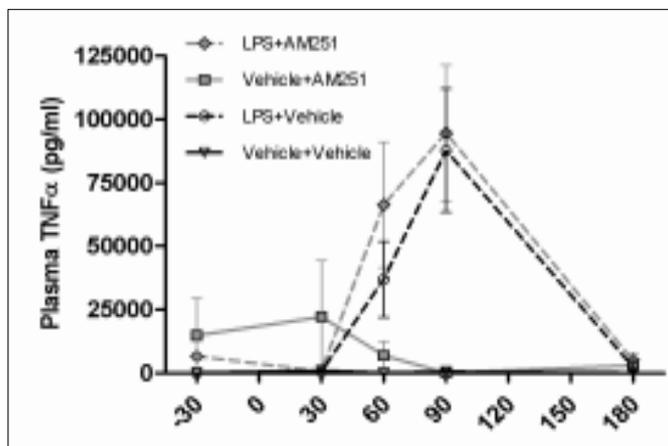


Figura H1. El bloqueo de CB1 hipotalámico exacerba la concentración de TNFα plasmático en ratas sometidas a endotoxemia. Perfil plasmático de TNFα en ratas sometidas a LPS (5mg/kg, ip) o salina, y a AM251 (5µl, 100 ng/µl) o su vehículo vía icv, a -30, 30, 60, 90, and 180 min relativo a la administración ip. n=5 animales por grupo.

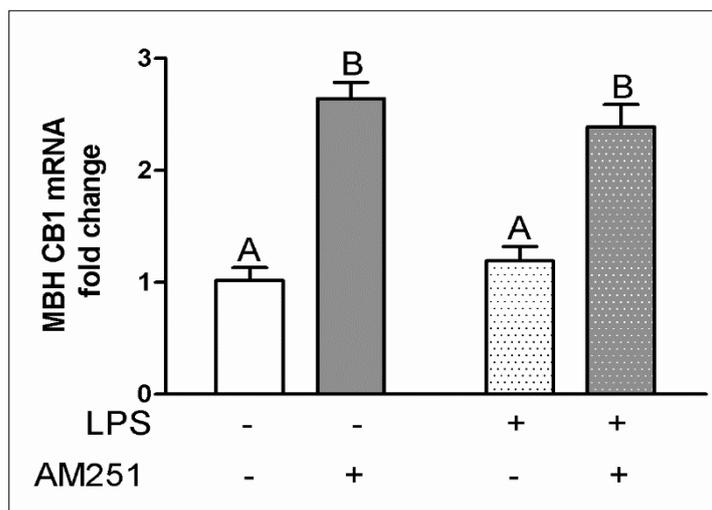


Figura H2. Efecto del bloqueo de CB1 en los niveles de expresión de RNAm de CB1 hipotalámico en ratas sometidas a endotoxemia. Los animales fueron tratados con LPS (5mg/kg, ip) o solución salina, y con AM251 (5µl, 100 ng/µl) o su vehículo vía icv, y 180min post administración ip se determinó la expresión de TRPV1 en el HMB. n=5 animales por grupos. Houskeeping: Actina. Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos factores seguido por test de Tukey. En ambos casos, letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05).

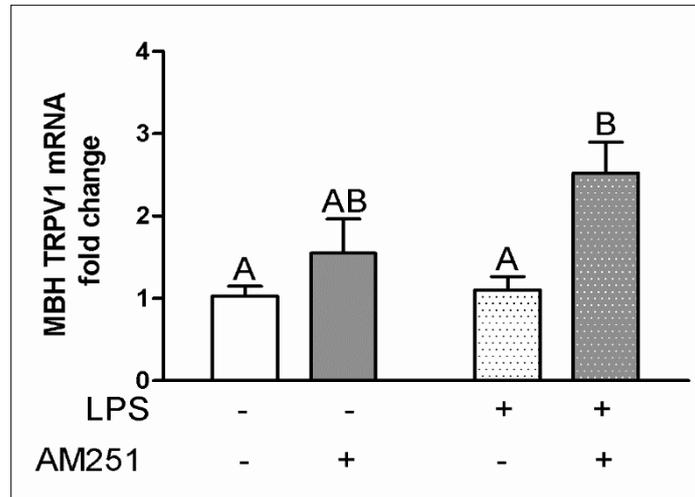


Figura H3. Efecto del bloqueo de CB1 hipotalámico sobre la expresión de RNAm de TRPV1 en el HMB de ratas sometidas a endotoxemia. Los animales fueron tratados con LPS (5mg/kg, ip) o solución salina, y con AM251 (5µl, 100 ng/µl) o su vehículo vía icv, y 180min post administración ip se determinó la expresión de TRPV1 en el HMB. n=5 animales por grupos. Houskeeping: Actina. Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos factores seguido por test de Tukey. En ambos casos, letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05).