



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Posible efecto neuroprotector de URB597 en un modelo
in vivo de 6-hidroxidopamina**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

HIPOLITO ALIOSSHA RUIZ CONTRERAS



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. , 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos alumno

Ruiz

Contreras

Hipolito Aliossha

56 08 85 38

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

309217521

2. Datos del tutor

Dr.

Abel

Santamaría

Del Ángel

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Jiménez

García

Luis Felipe

4. Datos del sinodal 2

M. en F. C.

Parra

Cid

María del Carmen

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Ramírez

Jarquín

Josué Orlando

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Ortega

Gómez

Alette

7. Datos del trabajo escrito

Posible efecto neuroprotector de URB597 en un modelo *in vivo* de 6-hidroxidopamina.

48 p

2017

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas a un mundo que poco a poco se ganó mi fascinación, mis días y horas en el campus me deja recuerdos, vivencias y sobretodo el orgullo de decir que soy azul y oro.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" por encontrar en sí las instalaciones con las cuales pude desarrollar este trabajo de tesis.

Al Dr. Abel Santamaría del Ángel por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio, por la guía de él y su equipo de trabajo, en especial de la Dra. Ana Colín al irme guiando en el proceso de la maduración de las ideas y por permitirme una proyección profesional con el impulso de la publicación de los resultados obtenidos en lapso de trabajo que ahí tuve.

A la M. en C. Carmen Parra por la generosidad de poder obsequiarme un poco de su tiempo para la retro alimentación de ideas, procesamiento de muestras y por el interés en este proyecto.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez por la crítica y revisión de este trabajo escrito, además de la oportunidad de conocerlo y por las palabras de apoyo.

Al Dr. Josué Ramírez por el tiempo y el interés invertido en la crítica y revisión del trabajo escrito, además de las agradables horas en clase y por la confianza que tiene en mí.

A la Dra. Alette Ortega por sus criticas y sugerencias en este trabajo escrito.

DEDICATORIAS

Primero a todos los profesores que forman parte de la Facultad de Ciencias y en su momento fueron educándome, perturbando con nuevas ideas mis ganas de hacerme más preguntas y tratar de resolverlas, a todos mis compañeros que me dieron ideas, que me impulsaron retándome a mejorar y tratar de resolver de una manera más sencilla los problemas académicos que la carrera nos presentó a todos ellos gracias.

A mi familia, desde mis tíos y tías por preocuparse por mí, por siempre tener una palabra de apoyo, a veces las que no deseas ni quieres oír pero que te sirven para forzarte a conocerte y mejorar, a mis primos desde la más grande, Daniela, Misael, Dayin, Manuela, Ivan, María, Emilio, Ollin, Axel (H), Ximena, Sebastián, Alejandro, Regina y Matías por llenar mi vida de risas, platicas de interminable incertidumbre, por forjar en mi valores y enseñarme que la diversidad es lo que nos hace tan únicos y especiales, por sus sonrisas, enojos y en ocasiones peleas, gracias, los quiero.

En especial a mi tía Marina por ser compañera de mil batallas, por los grandes viajes para jugar basquetball por todo eso y más gracias, a mi primo Emilio por ser mi escudero dentro y fuera de la duela, por las peleas (cambio de ideas y mas) gracias, Dayin (gordi) y pato por solo hacerme sonreír con tantas cosas que dicen y hacen, a Axel (H) por la increíble capacidad de siempre sorprenderme por sus ocurrencias y todos ustedes por impactar mi vida gracias.

A mis amigos Alan, Pato, Fer, Yisus, Tainoko, Omar, gracias, en verdad gracias por las increíbles platicas de arte, música, ciencias, política, películas, e ideas a futuro sobre viajes interestelares y más.

En especial a Alan por las interminables noches de música, sorpresas en notas y acordes por ser mi maestro en artes y por brindarme una amistad que ha hoy día llega a 11 años, a Pato por soportar mis preguntas sobre cálculos, teorías, teoremas y más, por permitirme entrar a sus clases y salir con mil dudas las cuales aunque no sean respondidas hacen una plática más amena, por las platicas de teorías de juegos, hoyos negros, gravedad, agujeros de gusano y más, por ser mi maestro en física y matemáticas e igual por una amistad de 11 años gracias, a los dos por ser mis amigos y tratar de entenderme, gracias.

A Ollin Renee, a ti por ser la mejor compañera de sueños, por permitirme conocerte con el tiempo entenderte aunque no del todo en ocasiones, para ti y por ti palabras me sobran, no existe algo que describa lo que siento cuando reímos, platicamos e incluso peleamos, eres más que una prima para mí, eres como mi hermana, solo puedo decirte que siempre estaré para ti, gracias por ser mi familia y gracias por siempre ser "movimiento", te amo.

A mi hermano, en ti reside mi existencia, algunas ideas vagas de lo que soy, te veo crecer y me da gusto que seas diferente, que tu forma de plantarme cara sea

a veces la misma que yo tengo, por compartir mis sueños, pláticas, risas, llanto, enojo, un balón y una duela, porque por ti soy y trato de ser mejor, siempre recuerda que eres y serás uno de los primeros que ocupa un lugar en mi mente y corazón, por ti y para ti, gracias, te amo.

A mi padre, a ti no hay mucho que decir, en ti reside mi forma de tratar de volverme un hombre, la capacidad de razonar y analizar, si este logro ha sido conseguido es gracias a ti, por las pláticas, consejos, regaños y enfrentamientos gracias, ya que eso hoy me define con las ideas que tengo para ser un hombre de provecho en la vida, por impulsar mis sueños y mucho más gracias, te amo papá.

A mi madre, a ti palabras no las encuentro, solo se me ocurre decirte que en ti reside mi vida, palabras más o menos no interesan si hablo de ti, guerrera de corazón, luchadora de mil batallas, eres tu mi más grande fan y crítica, por ponerme suelo pero nunca techo, por perseguir mis sueños, por invitarme a ser mejor, por aceptarme como soy y siempre estar ahí, si alguien se lleva las palmas eres tú, solo puedo decirte GRACIAS por ser tú el ser más hermoso que me encontré en esta tierra, por tu amor y dedicación TE AMO mama.

INDICE

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción	3
3.1 Enfermedad de Parkinson	3
3.2 Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson	4
3.2.1 MPTP	4
3.2.2 6-hidroxidopamina	7
3.3 Sistema endocannabinoide	8
3.4 Receptores cannabionides	9
3.4.1 CB ₁	9
3.4.2 CB ₂	9
3.4.3 TRPV	10
3.4.4 PPAR	10
3.4.5 GPR55 (receptor huérfano acoplado a proteína G)	11
3.5 Ligandos cannabinoideos	11
3.5.1 Endocannabionoides	11
3.5.2 N-araquidonil-etanolamida (AEA)	11
3.5.3 2-araquidonil-glicerol (2 AG)	12
3.5.4 N-araquidonil-dopamina (NADA)	13
3.6 Fitocannabinoideos	14
3.6.1 Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)	14
3.6.2 Cannabinol (CBN)	14
3.6.3 Cannabidiol (CBD)	14
3.7 Cannabinoideos sintéticos	14
3.8 Transducción de señales celulares	15
3.9 URB597 (KDS-4103)	18
3.10 Cross-talk del sistema endocannabinoide y la dopamina, posible aplicación terapéutica	18
4. Antecedentes	23
5. Justificación	25
6. Hipótesis	26
7. Objetivo general	27
7.1 Objetivos particulares	27
8. Metodología	28
8.1 Animales de experimentación	28
8.2 Administración de fármacos y lesión intraestriatal	28
8.3 Medición de conducta	28
8.4 Inclusión de parafina	29
8.5 Inmunohistoquímica	29
8.6 Pruebas bioquímicas	30
8.6.1 Cuantificación de proteínas (Lowry)	30
8.6.2 Peroxidación lipídica (TBARS)	30
8.6.3 Proteínas oxidadas (carbonilación)	31
8.7 Densitometría	31
8.8 Análisis estadístico	31

9. Resultados	32
9.1 Conducta de giro	32
9.2 Inmunoreactividad a TH	33
9.3 Pruebas bioquímicas de daño oxidativo	35
9.3.1 TBARS en SNpc	35
9.3.2 Carbonilación en SNpc	36
10. Discusión	36
11. Conclusión	41
12. Bibliografía	42

1. ABREVIATURAS

*2-AG	2-Araquidonil-glicerol
*6-OHDA	6-hidroxidopamina
*AEA	Anandamida
*AIM's	Movimientos anormales involuntarios
*AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
*APM	Apomorfina
*BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
*CB ₁	Receptor cannabinoide 1
*CB ₂	Receptor cannabinoide 2
*COX-2	Ciclooxigenasa 2
*D1	Receptor para dopamina 1
*D2	Receptor para dopamina 2
*DA	Dopamina
*DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
*EP	Enfermedad de parkinson
*EtOH	Etanol
*FAAH	Hidrolasa amida de ácidos grasos
*GABA	Ácido γ-aminobutírico
*GSH	Glutatión peroxidasa
* <i>i.p</i>	Intraperitoneal
*IHQ	Inmunoquímica
*iNOS	Óxido nítrico sintasa
*L-Dopa	Levodopa
*MAO-B	Monoamino-oxidasa B
*MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio
*MTT	3-2 5-difeniltetrasodio bromidio
*NDA	Neuronas dopaminérgicas
*PPARγ	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas γ
*PQ	Paraquat
*ROS	Especie reactivas de oxígeno
*RT	Rotenona
*SN	Sustancia nigra
*SNpc	Sustancia nigra pars compacta
*SOD	Superóxido dismutasa
*TBA	Ácido tiobarbitúrico
*TBARS	Sustancias reactivas al TBA
*TCA	Ácido tricloroacético
*TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta 1
*TH	Tirosina hidroxilasa
*THC	Δ ⁹ -tetrahidrocannabinol
*TRPV1	Receptor transitorio de potencial vaniloide 1
*VTA	Área ventral tegmental

2. Resumen

El sistema endocannabinoide (SE) se ha visto últimamente como un objetivo de estudio para las enfermedades crónicas neurodegenerativas por los diversos componentes que lo conforman y su amplia localización, siendo de importancia 3 puntos de partida:

1. Los elementos del SE son de amplia distribución y expresión en regiones cerebrales como lo son los ganglios basales, mismos que se ven afectados por trastornos neurodegenerativos.
2. En el SE, el principal papel es de los endocannabinoides, que juegan un rol de suma importancia en la modulación de los diferentes neurotransmisores (glutamato, GABA, dopamina) y que actúan en la vía nigro estriatal en condiciones normales y patológicas.
3. La activación o inhibición del SE tiene consecuencias en respuestas motoras que se pueden mejorar o mantener estables en condiciones de mal funcionamiento motor y neurodegeneración. (Fernández-Ruiz, 2009).

Bajo estos conceptos, la administración de inhibidores de las enzimas degradadoras de endocannabinoides (MAGL y FAAH) pueden activar el SE a nivel de SNC, generando una protección en las áreas afectadas por 6-OHDA y su vía de acción, disminuyendo el estrés oxidativo intracelular (Morgese et al., 2007).

Los diferentes trabajos como los de Martínez et al., en el 2014, Pelição et al., 2016, Mounsey et al., 2015, nos permiten afirmar que el SE es una vía de modulación de la conducta (Movimientos anormales involuntarios (AIM's) y discinesias), protección contra radicales libres (peróxido de hidrogeno), y protección a nivel nigral de las neuronas dopaminérgicas, las cuales se ven afectadas por la 6-OHDA.

En este trabajo mostramos que la administración crónica de URB597 (inhibidor de FAAH) por 7 días, activa el SE, y con el la prevención del daño de la vía nigroestriatal, específicamente de las neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, una mejora conductual y la modulación de sistemas finos como el estrés oxidativo.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden crónico degenerativo que exhibe síntomas motores y no motores. La EP afecta a una gran diversidad de regiones celulares en el sistema nervioso central, entre los que sobresalen el núcleo motor dorsal del vago, el núcleo del rafe, el *locus coeruleus*, el núcleo pedúnculo pontino, el núcleo retrorrubral, el núcleo parabranquial, el área ventral tegmental (VTA) y la *substancia nigrapars compacta* (SNpc). La EP es idiopática, un signo indiscutible de que es multicausal, presenta la degeneración gradual de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, la presencia de cuerpos de Lewy y daño generalizado de los circuitos neuronales que controlan el movimiento (Hernandez et al, 2006).

La EP es un trastorno progresivo originado por la muerte neuronal en la sustancia nigra (SN), declive de la neurotransmisión dopaminérgica, y la existencia de α -sinucleína (inclusiones proteicas, cuerpos de Lewy) (Chavéz et al, 2013). Los síntomas primordiales del Parkinson podrían ser bradicinesia asimétrica, rigidez, temblor en reposo y postura inestable. Algunos otros síntomas no motores producen diferentes discapacidades que también han sido señaladas incluyendo la fatiga, dolor, demencia por cuerpos de Lewy, psicosis, depresión y apatía (Chavéz et al, 2013). Ya que es inexistente una cura para la enfermedad, el fármaco más empleado por ser un recurso accesible económicamente para el tratamiento de la EP sigue siendo la Levodopa, precursor del neurotransmisor dopamina. Sin embargo, se tiene un registro de que 40% de los pacientes desarrolla fluctuaciones motoras y no motoras después de la administración del tratamiento durante 4 o 6 años, por lo que es necesario investigar sus posibles efectos secundarios. Por ello, el tratamiento con agentes dopaminérgicos de acción prolongada o el estímulo farmacéutico continuo en el cuerpo estriado se ha asociado a algunas dificultades motoras que presentan los pacientes con el tratamiento de L-Dopa o combinaciones de fármacos. (Chavéz et al., 2013)

Como se ha mencionado, la causa exacta de la EP es aún desconocida. Las diversas mutaciones de proteínas ricas en leucina, como la repetición de quinasa 2 (LRRK2), parkina (PARK2), de transporte de tipo ATPasa 13a2 (ATP13A2), fosfatasa y tensina homóloga (PTEN), quinasa (PINK1), y la EP hereditaria (autonómica recesiva presenta 7 proteínas (DJ-1) que se han documentado en caso familiares de la EP. Extraordinariamente, LRRK2, PINK1 y DJ-1 se encuentran presentes en las membranas mitocondriales, por lo cual han sido asociadas a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la conservación del potencial de membrana mitocondrial, el cual se ve alterado, volviéndose positivo, y produciendo así una alteración en el flujo de electrones de la cadena respiratoria aumentando la producción de ROS cuando se presentan dichas mutaciones.(Chavéz et al, 2013).

El inicio y el avance de la EP es multifactorial, dependiente de diferentes eventos celulares, entre los que se comprenden las fallas de la degradación de proteínas, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, acumulación de α -sinucleína, y células gliales que a través de la liberación de factores de inflamación conducen a la neurona a apoptosis (Chavéz et al, 2013).

3.2 Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson

Se han reportado que diversas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la gradual atrofia o muerte selectiva de poblaciones neuronales específicas, lo cual promueve el declive funcional de circuitos neuronales específicos y por consecuencia la existencia de distintos déficits neurológicos, manifestándose a través de diversos síntomas (Alarcón et al, 2010).

Por ello se realiza la continua búsqueda a nivel experimental y clínico de fármacos en la aplicación y uso de modelos *in vivo* (animales: ratas, ratones, primates no humanos, anélidos, etc.) y modelos *in vitro* (líneas celulares) que asemejan las características patológicas que presenta la EP para comprender su origen y causas. Algunos de los modelos *in vivo* son los siguientes: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio (MPTP), paraquat, rotenona y 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

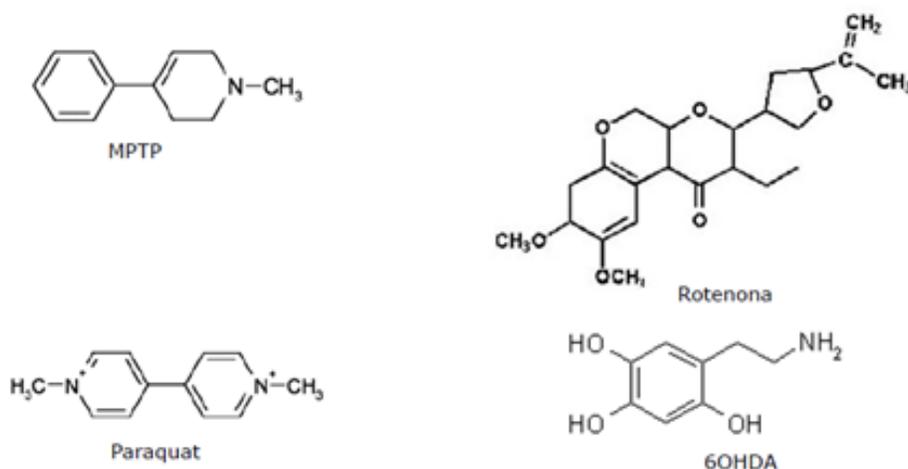


FIG.1. Estructuras químicas de los agentes neurotóxicos. Tomado y modificado de Alarcón et al, 2010.

3.2.1 MPTP

Este agente tóxico se descubrió cuando una gran cantidad de jóvenes adictos a la heroína comenzaron a presentar síntomas de Parkinson al consumir accidentalmente 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio (MPTP), lo cual fue llamado síndrome parkinsoniano. El cuadro de síntomas parkinsoniano que presentan las personas, es caracterizado por; temblor, acinesia, rigidez, postura en flexión, alteración de reflejos posturales, y esto puede ser revertido con la

administración de L-DOPA o agonistas dopaminérgicos. La conclusión de los estudios realizados, fue demostrado que el responsable de dichos síntomas era el MPP+, un metabolito directo por la degradación del MPTP (Chio, 2009; Alarcón et al, 2010). En este momento tenemos el conocimiento que este compuesto traspasa la barrera hematoencefálica, siendo degradado (oxidado) en las células de la glía, en específico de los astrocitos. La enzima responsable de este proceso es la monoamino-oxidasa B (MAO-B), produciendo una oxidación al MPTP en 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio (MPDP+), el cual también puede ser transformado en MPP+ por oxidación espontánea. El MPP+ es liberado de los astrocitos e incorporado por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina de forma selectiva, ejerciendo allí su acción neurotóxica, la cual consiste en la inhibición del complejo I mitocondrial (Przedborski et al, 2003., Alarcón et al, 2010).

La vía principal de acción de este agente neurotóxico es iniciada por la producción intracelular de radicales superóxido, entre otros, altamente tóxicos que son producidos por la oxidación intracelular del MPP+. (Alarcón et al, 2010). Esta oxidación de MPP+ produce la auto oxidación de DA, aumentando a su vez los niveles de ROS. (Zhang et al, 2010; Alarcón et al, 2010).

Otra hipótesis se ha centrado en la actividad inhibitoria mitocondrial que genera el agente oxidado MPP+. *In vivo*, se requiere de una concentración mayor a 10mM para producir una inhibición de la cadena transportadora de electrones, lo que comprueba que este metabolito (MPP+) es transportado del citoplasma al interior mitocondrial en contra de gradiente. Los efectos generados sobre la mitocondria se saben son: en altas concentraciones se bloquea la oxidación de NADH, lo que permite entender la correlación directa entre la acumulación de MPP+ y la disminución de ATP. Sin embargo, la inhibición del transporte de electrones mitocondrial induce una disminución en la producción de ATP, generando una desorganización de los microfilamentos del citoesqueleto celular, provocando una modificación del potencial membranal y disminución de GSH, principal defensa celular frente al estrés oxidativo, conduciendo por ultimo a apoptosis. (Nicklas et al, 1992; Alarcón, 2010).

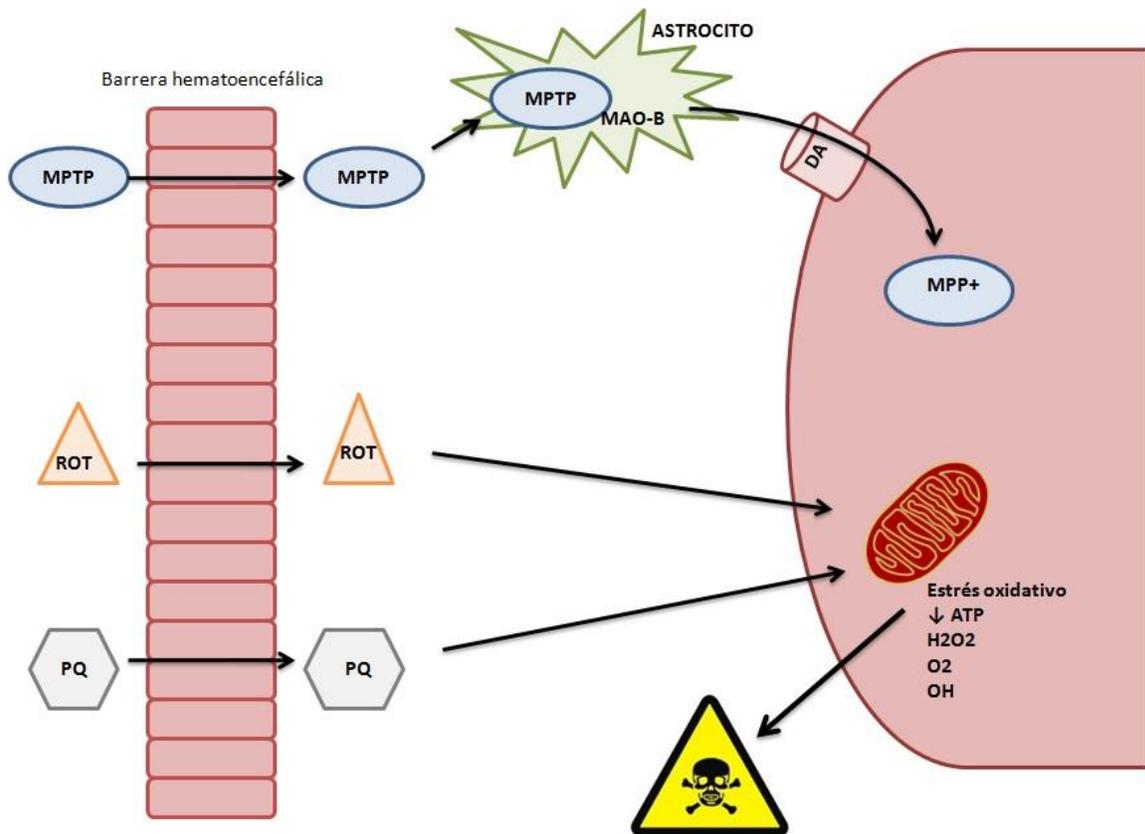


FIG.2. Vía de daño producida por los diferentes agentes neurotóxico. El MPTP es tomado por el astrocito donde es degradado por la enzima MAO B, y es metabolizado en (MPP+), el cual es liberado en el espacio presináptico y es introducido en las neuronas dopaminérgicas por el transportador de dopamina (DA); allí actúa inhibiendo el complejo mitocondrial I. La ROT y el PQ, permean la membrana de las neuronas dirigiéndose a la mitocondria. Estos agentes tóxicos actúan inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, generando un aumento de los ROS, disminuyendo el potencial redox y bajando la síntesis de ATP. Todo esto induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Tomado y modificado de Alarcón et al, 2010).

3.2.2 6-hidroxidopamina

La 6-OHDA es una neurotoxina de las más empleadas para la denervación del modelo nigral. La 6-OHDA es un análogo hidroxilado del neurotransmisor dopamina. Originalmente fue descrito en 1959. En modelos de la EP, la 6-OHDA es administrada directamente en el cuerpo estriado y SNpc, induciendo la muerte de las neuronas nigrales dopaminérgicas y reduciendo la transmisión dopaminérgica al cuerpo estriado, reproduciendo así la fisiopatología responsable de los impedimentos motores de la EP (Blum et al, 2001).

Por otra parte la melanina puede aumentar los niveles de hierro libre al desplazarlo de la enzima ferritina, amplificando así la reacción química entre el hierro y la dopamina. En presencia de iones nitrito, la dopamina puede ser oxidada por una variedad de sistemas de peróxido dependiente de hidrógeno para dar pequeñas cantidades de 6-OHDA. La relevancia de 6-OHDA para imitar modelos de PD se ve reforzada por el hecho de que la generación de ROS y defectos mitocondriales son inducidos por esta neurotoxina (Blum et al, 2001).

La generación intracelular y/o extracelular de ROS se debe a dos posibles mecanismos: una desaminación por MAO B, o una auto-oxidación probablemente iniciada por el hierro por la reacción de Fenton. Algunas líneas de investigación sugieren que la producción de peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo es por auto-oxidación de 6-OHDA.(Blum et al, 2001). Sin embargo, se ha visto que la 6-OHDA induce un colapso en el potencial de membrana mitocondrial relacionado con ROS (Lotario et al., 1999; Blum et al 2001) y que es un fuerte desacoplante de la fosforilación oxidativa, como el dinitrofenol (Wagner y Trendelenburg, 1971; Blum et al, 2001). Estas alteraciones podrían conducir a cambios no sólo de potencial de membrana, sino también a un defecto en la formación de vesículas de dopamina, lo que puede aumentar los niveles citoplasmáticos de dopamina, y ambos acontecimientos conducen a la muerte celular (Blum et al, 2001).

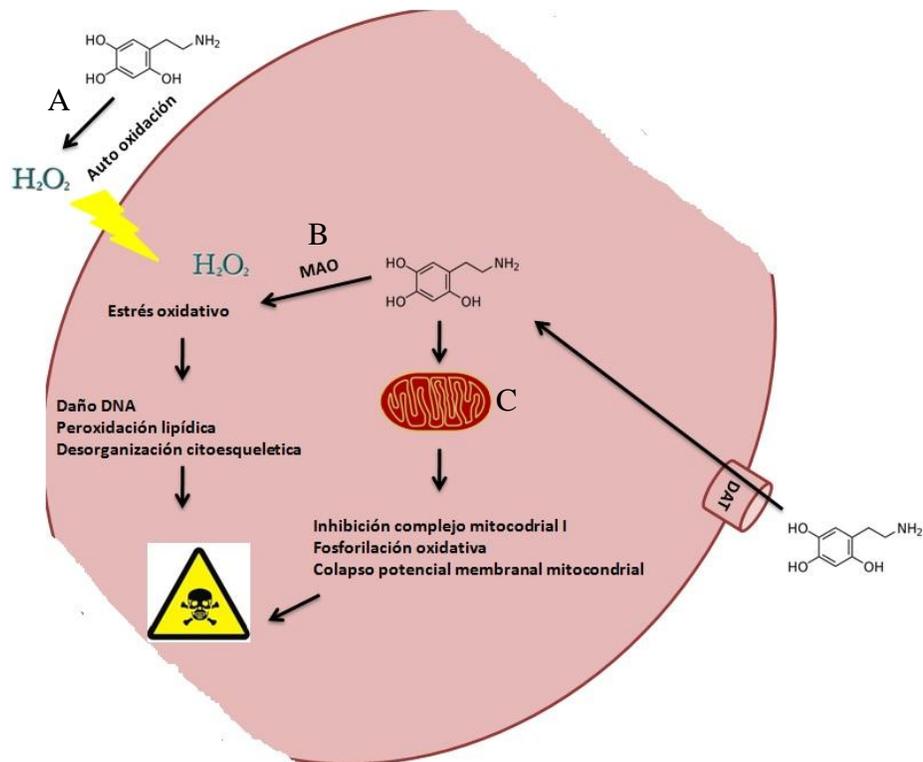


FIG.3. Vías de daño que conlleva la administración de 6-OHDA. La 6-OHDA produce 3 mecanismos de daño: (A) la auto-oxidación intra o extracelular generando ROS, (B) producción de peróxido de hidrógeno por degradación por la enzima MAO, (C) y la inhibición del complejo mitocondrial I; esto es amplificado por una disminución en la formación de ATP que conlleva a muerte celular.

3.3 Sistema endocannabinoide

Como ya se ha reportado, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) es el cannabinoide con mayor actividad farmacológica de la planta de *Cannabis*, en diferentes formas, como es su caso en forma de hierba (marihuana o cannabis en bruto), así como también en el hashish (resina de cannabis). La mayoría de los efectos producidos por el THC son mediados por sus acciones como agonista de los receptores cannabinoideos (Grotenhermen, 2006; Sastre, 2009).

Tanto los ligandos como los receptores son sintetizados por el propio cuerpo, formando el sistema endocannabinoide, el cual cumple una función moduladora en la regulación motora, ciclos circadianos entre otros siendo reportado en mamíferos, aves, anfibios, peces, erizos de mar, moluscos, sanguijuelas, etc. Por ello la acción tanto del THC y otros cannabinoideos y sus receptores ha sido investigado y reportada, sin embargo, su aplicación y modo de acción de los endocannabinoideos con importancia terapéutica han sido pocos reportados (Grotenhermen, 2006).

El sistema endocannabinoide incluye una familia de moléculas de señalización proveniente de lípidos (endocannabinoideos), su biosíntesis y enzimas

degradadoras, además de los receptores cannabinoides asociados. Como se ha reportado en la literatura, los endocannabinoides pueden activar múltiples receptores, comprendiendo no solo CB₁ y CB₂, sino también receptores nucleares (Giuffrida et al, 2010).

3.4 Receptores cannabinoides

3.4.1 CB₁

En el SNC hay dos subtipos de proteínas G acopladas a receptores endocannabinoides, CB₁ y CB₂; los receptores CB₁ son mayormente expresados en los ganglios basales, cerebelo, hipocampo y corteza (Glass et al, 1997), y su activación ha sido asociada a los efectos psicotrópicos de los cannabinoides. (Ashton et al, 2006; Van Sickle et al, 2005). Estas áreas del cerebro están relacionadas con la actividad motora, capacidad cognitiva, memoria y coordinación, respectivamente, de modo que algunos de los efectos farmacológicos ejercidos por cannabinoides están vinculados a la distribución del receptor CB₁. En humanos, esta distribución se mantiene, aunque se encuentra una expresión mayor del receptor en la corteza límbica que en regiones motoras y sensoriales, lo que sugiere que CB₁ desempeña un papel importante en el procesamiento de la información motivacional cognitiva (Glass et al, 1997).

Se encuentran expresados mayoritariamente en los botones presináptico, en axones y terminales nerviosos, donde modulan la inhibición de la liberación de neurotransmisores, aunque también puede estar presente en las dendritas y soma de neuronas (Howlett, 2002).

3.4.2 CB₂

Los receptores CB₂ están localizados primordialmente en células involucradas en respuestas inmunes e inflamatorias (Munro et al, 1993). Estos están expresados en el cerebelo y tallo cerebral (Ashton et al, 2006), y modulan la función mitocondrial en células *in vitro* (Walter y Stela, 2004) e *in vivo* (Ramirez et al, 2005).

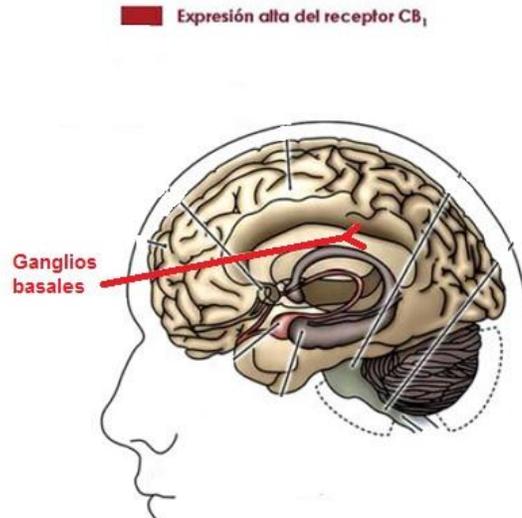


FIG.4. Expresión del receptor CB₁ en el SNC. El receptor CB₁ es expresado de una manera abundante en la zona de los ganglios basales (controla comportamiento motor) (Tomado y modificado de Guzman et al., 1998).

3.4.3 TRPV

Los canales receptores transitorios de potencial (TRP) son canales iónicos que generan un flujo de entrada al ser activados (Patapoutian et al, 2009). Evidencia experimental indica que los cannabionoides y endocannabionoides interactúan directamente al menos con cinco tipos distintos de canales TRP, entre los que se encuentran los receptores vaniloides TRPV1 (Caterina et al, 1997), los cuales son los receptores cannabionoides inotrópicos mejor caracterizados. Son activados por el vaniloide capsaicina, actuando como agonista del receptor, y su activación permite la entrada de Ca²⁺ y Na⁺ (Akopian et al, 2008).

Los receptores TRPV1 están altamente expresados en nervios sensoriales, donde participan en el proceso de inflamación y dolor (Starowicz et al, 2007). Dentro del cerebro, están presentes en el cuerpo estriado, el globo pálido y la sustancia nigra (Moran et al, 2004).

3.4.4 PPAR

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) se unen a secuencias específicas de DNA (Giuffrida et al, 2010), a elementos de respuesta específicos, induciendo la transcripción de genes diana involucrados en la regulación del metabolismo lipídico, diferenciación celular e inflamación como es el caso de la unión y activación de la zona ARE (respuesta antiinflamatoria) (Sastre, 2009; Ferre, 2004; Moraes et al, 2006; Stienstra et al, 2007). Existen tres isoformas: α, β/δ, γ. Todos estos subtipos se encuentran expresados en células neuronales y gliales del sistema nervioso periférico y central (Moreno et al, 2004;

Cimini et al, 2005). Diversas evidencias nos sugieren en los últimos años que los endocannabinoides, diferentes vías directas o indirectas de activación, mediando diversas respuestas fisiológicas como lo son alimentación (saciedad), control de peso, lipólisis, analgesia y efecto anti-inflamatoria, siendo estos últimos de vital importancia para la protección neuronal (Sastre, 2009; Sun y Benett, 2007).

3.4.5 GPR55 (receptor huérfano acoplado a proteína G)

Este receptor huérfano o candidato a receptor cannabinoide fue caracterizado recientemente, clonado y determinada su secuencia en modelos murinos (rata, ratón) y humano. GPR55 se encuentra expresado en cerebro, con un patrón de expresión diferente en rata y humano, como también en tejido periférico, se considera que tiene un función similar (inhibición de la neurotransmisión) a la de CB₁ (Sawzdargo, 1999; Ryberg et al, 2007).

3.5 Ligandos cannabinoides

3.5.1 Endocannabinoides

Tras la identificación de los receptores cannabinoides se descubrieron los ligandos endógenos para los mismos, conocidos como endocannabinoides. En el cerebro actúan como neuromoduladores, y en comparación de los neurotransmisores clásicos, no son transportados en vesículas (Schmid et al, 2000; Sastre, 2009). Todos los endocannabinoides son derivados de ácidos grasos poli-insaturados, lo que los diferencia en estructura química de los fitocannabinoides de la planta de *Cannabis*. Entre los endocannabinoides identificados hasta ahora se encuentran la anandamida (N-araquidonil-etanolamida, AEA), el 2-araquidonil-glicerol (2-AG), el éter del 2-araquidonil-glicerol (éter de noladín), el O-araquidoniletanolamina (virodhamina), y la N-araquidonil-dopamina (NADA)(Grotenhermen, 2006 y Sastre, 2009).

3.5.2 N-araquidonil-etanolamida (AEA)

Conocida también como anandamida, fue aislado por primera vez de cerebro porcino y se identificó como endocannabinoide en 1992 por Devane y cols. AEA actúa como ligando de los receptores CB₁, CB₂, TRPV1 (Zygmunt y cols., 1999) y PPAR γ (Bouaboula et al, 2005; Sastre, 2009). Tiene una afinidad por CB₁ similar a Δ 9-THC (Pertwee, 2004; Sastre, 2009), comportándose como agonista parcial o completo del receptor CB₁. Como agonista parcial de CB₂ teniendo muy baja eficiencia, actuando en ocasiones como antagonista (Gonsiorek et al, 2000; Sastre, 2009).

Su producción no solo está restringida a neuronas, puede ser sintetizada también en astrocitos y microglía. (Felder et al, 1996; Schmid et al, 1997; Walter et al, 2003; Sastre, 2009).

La síntesis de AEA es a partir de fosfolípidos de membrana, donde se produce la transferencia enzimática de ácido araquidónico de la posición *sn*-1 de fosfatidilcolina (PC) al grupo amino de fosfatidiletanolamina (PE), formando *N*-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). Esta reacción es catalizada por una trans-acilasa dependiente de Ca²⁺ que no ha sido clonada hasta este momento. El precursor NAPE es entonces hidrolizado a AEA por una fosfolipasa D (PLD). Esta fosfolipasa es selectiva para NAPEs (NAPE-PLD) y se ha clonado recientemente. (Sastre, 2009).

3.5.3 2-araquidonil-glicerol (2 AG)

Este endocannabinoide fue aislado por primera ocasión en 1995 en intestino canino (Mechoulam et al, 1995; Sastre, 2009) y cerebro de rata (Sugiura et al, 1995; Sastre 2009). El 2-AG actúa como agonista de CB1 y CB2.

El nivel basal de 2-AG en el SNC es mucho mayor que el de AEA, aunque sabemos que sólo una pequeña fracción está involucrada en la señalización cannabinoide, ya que 2-AG también interviene en el metabolismo lipídico (Sugiura et al, 2006; Sastre, 2009).

El 2-AG se sintetiza a partir de la hidrólisis de diacilglicerol (DAG) por una DAG lipasa selectiva para la posición *sn*-1. Por su parte, DAG puede generarse a partir de la hidrólisis de fosfoinosítidos (PI) -catalizada por una fosfolipasa C selectiva para PI (PI-PLC)-, o bien de ácido fosfatídico (PA) -catalizada por una PA fosfohidrolasa- (Sugiura et al, 2006; Sastre, 2009).

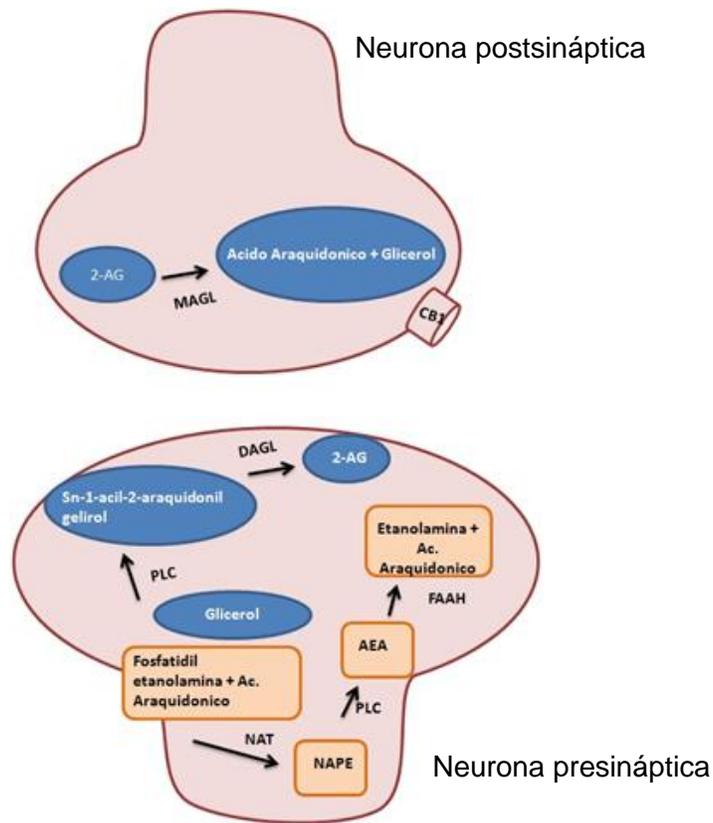
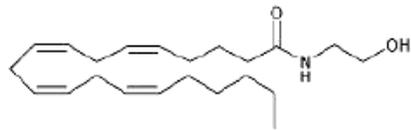


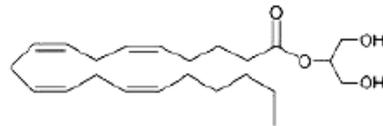
Fig.5. Síntesis y degradación de AEA y 2-AG en el botón sináptico. La anandamida (AEA) comienza su síntesis por la enzima N-aciltransferasa (NAT), catalizando la reacción entre el fosfatidil-etanolamina con el ácido araquidónico para producir N-acilfosfatidil-etanolamina (NAPE), que posteriormente es catalizada por una fosfolipasa D (PLD) en AEA, siendo degradada por la enzima ácido graso amida hidrolasa (FAAH). Estas reacciones parecen ocurrir en la terminal postsináptica; sin embargo, para el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), su biosíntesis comienza con el fosfolípido glicerol por la fosfolipasas C (PLC), siguiendo con el producto sn-1-acil-2-araquidonil glicerol, siendo transformado por diacilglicerol lipasa (DAGL), y dando por resultado el 2-AG. La enzima encargada de degradar a 2-AG es la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Tomado y modificado de Di Iorio et al, 2013).

3.5.4 N-araquidonil-dopamina (NADA)

Fue descubierto por primera vez en cerebro bovino y de rata, tiene acción de ligando comportándose como agonista sobre los receptores TRPV₁ (Huang et al, 2002; Sastre, 2009) y se comporta igual que el receptor CB₁ (Bisogno et al, 2000; Sastre, 2009).



N-araquidonil-etanolamida (AEA)



2-Araquidonil glicerol (2-AG)

FIG.6. Estructuras químicas de los endocannabinoides. Se observan las estructuras químicas de los principales endocannabinoides (Tomado y modificado de Sastre, 2009).

3.6 Fitocannabinoides

Dentro de la planta *Cannabis sativa* se tienen registrados más de 60 elementos a los cuales se les clasifica como fitocannabinoides; los siguientes son los de mayor importancia:

3.6.1 Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)

Fue el primer cannabinoide aislado y contiene las propiedades psicoactivas de la planta *Cannabis*. Es un agonista parcial de los receptores CB₁ y CB₂. Su efecto y eficacia pueden ser mediados por la activación de otros cannabinoides (Gaoni et al, 1964; Pertwee, 2008; Sastre, 2009).

3.6.2 Cannabinol (CBN)

Se encuentra registrado como el primer cannabinoide completamente aislado y en una forma pura (Mechoulman et al, 2000; Sastre 2009); este ligando presenta una mayor afinidad por el receptor CB₂ que por CB₁, y algunas de sus propiedades son psicoactivas (Munro et al, 1993; Sastre, 2009).

3.6.3 Cannabidiol (CBD)

Se presenta como el producto que no tiene una acción psicoactiva de la planta de *Cannabis* y también como un posible agente anti-oxidante. La afinidad que posee es muy baja para los receptores CB₁ y CB₂; algunas investigaciones lo mencionan como posible antagonista de estos mismos receptores (Pertwee, 2008; Sastre, 2009).

3.7 Cannabinoides sintéticos

Por su posible aplicación en enfermedades neurodegenerativas, y gracias a la investigación de algunas empresas privadas y laboratorios de investigación, se han desarrollado cannabinoides análogos que presentan una estabilidad metabólica y potencia farmacológica. Su producción o síntesis se ha basado en la estructura química que presentan los fitocannabinoides. Todos estos fármacos son de útiles para estudiar la interacción que presentan los ligandos con los

receptores, permitiéndonos estudiar las estructuras de los ligandos y los receptores, la activación del SE, además de su aplicación terapéutica a diversos modelos animales. (Méndez et al, 2008). En la siguiente figura (Fig. 7) se muestran algunos cannabinoides sintéticos y sus acciones sobre los receptores.

COMPUESTO	CARACTERISTICA
CP-55940	Agonista CB
HU-210	Agonista CB ₁ completo
WIN-55,212-2	Agonista CB ₁
JWH-133	Agonista CB ₂
URB 597	Inhibidor FAAH
AM251	Agonista CB ₁
AM404	Inhibe recapturadores, agonista TRPV
SR144528	Agonista CB ₂

FIG.7. Cannabinoides sintéticos. Tabla donde se observan los nombres de los compuestos sintéticos del SE y la función de cada uno de ellos, siendo de los más empleados el compuesto WIN 55, 212-2 y URB597. (Tomado y modificado de Méndez et al, 2008).

3.8 Transducción de señales celulares

Como se ha mencionado antes, los receptores CB₁ y CB₂ son receptores metabotrópicos; es decir, que al activarse tendrán una interacción con las proteínas G_{i/o}, lo que conlleva la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, y la estimulación y activación de la vía de MAP cinasas.

Cabe mencionar que los receptores CB₁ y CB₂ se encuentran ubicados en las terminales presinápticas y postsinápticas de las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en el SNC, en base a esta ubicación; el receptor CB₁ se encuentra acoplado a proteínas G_{i/o}, aunque en algunos casos puede también unirse a proteínas G_s; por lo tanto, uno de los múltiples efectos de su activación es la modulación de AMPc y la regulación fosforilativa de la proteína cinasa A (Childers et al, 1996;Sastre, 2009).

La inhibición de la adenilato ciclasa específicamente por la interacción con las isoformas I, VI, VII, VIII, produce una baja producción del segundo mensajero AMPc, y esta acción es llevada a cabo por la subunidad Gi_α (Pedroza, 2013; Sastre, 2009; Matsuda et al, 1990; Howlett et al, 2011). Sin embargo, si los

endocannabinoides estimulan las isoformas II, IV, VII de la enzima por la liberación de la subunidad $G\beta\gamma$, producen el efecto contrario, es decir el aumento en la producción de AMPc (Sastre, 2009; Rhee et al, 1998).

Es fundamental mencionar que la activación de este receptor CB_1 provocará la inhibición total de la liberación de neurotransmisores en el botón presináptico; principalmente se ha visto este efecto en terminales glutamatérgicas y GABAérgicas, aunque en últimos estudios también se observa en colinérgicas y noradrenérgicas (Pedroza, 2013; Lovinger, 2008).

Los diferentes ligandos endocannabinoides, a través de la subunidad $G\beta\gamma$, inhiben los canales iónicos de Ca^{2+} tipo N y P/Q (los cuales favorecen la movilización de las vesículas sinápticas al botón sináptico), y activan los canales de K^+ tipo A (equilibrio del potencial de membrana) (Mackie y Hille, 1992; Mackie et al, 1995; Sastre, 2009). Aunado a estos eventos, algunos ligandos inhiben los canales de K^+ tipo D (Mu et al, 1999; Sastre, 2009) y M (involucrados en la repolarización membranar) (Schweitzer, 2000; Sastre, 2009). La activación del receptor CB_1 favorece la apertura de canales de K^+ dependientes de las proteínas G (GIRK's), lo que hiperpolariza el botón sináptico (Demuth et al, 2006; Pedroza, 2013; Piomelli, 2003 y Sastre 2009)

El Ca^{2+} y sus niveles intracelulares son regulados por la activación del receptor CB_1 , ya que su activación y acoplamiento a proteínas G_i/o activa la fosfolipasa C (PLC) y libera Ca^{2+} al citosol proveniente de los reservorios sensibles a inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) como lo es la mitocondria (Sugiura et al, 1997; Sastre, 2013). Un ejemplo de esto lo produce la administración de WIN55,212-2, el cual se comporta como agonista del receptor CB_1 , teniendo la capacidad de aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular, el acoplamiento de $G_q/11$, y el aumento de la actividad de PLC (Lauckner et al, 2005; Sastre, 2013).

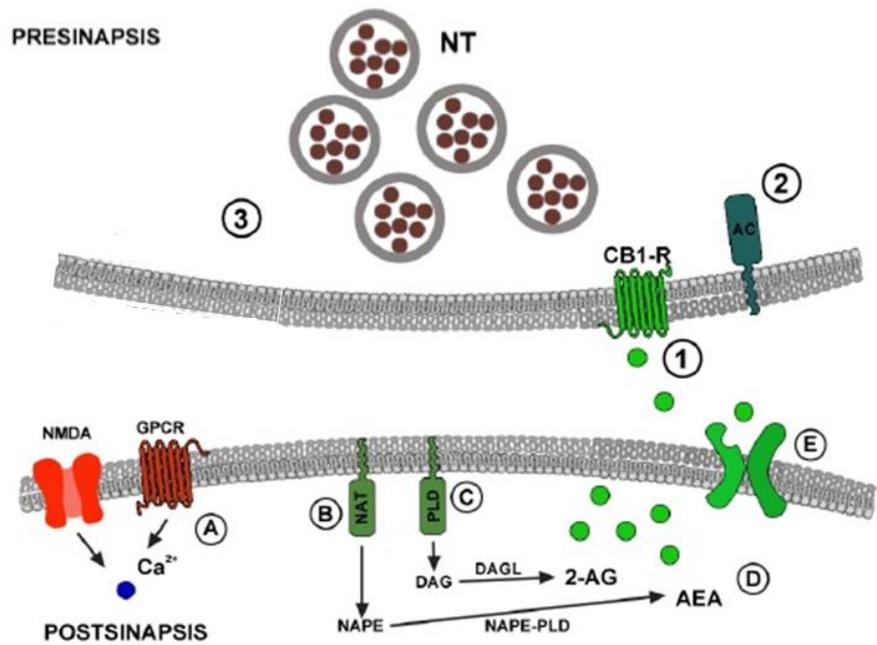


FIG.8. Eventos en la neurotransmisión mediada por el SE en el botón sináptico. A) Ingreso de Ca²⁺ en el espacio intracelular, por la apertura de canales NMDA y proteínas G. B) y C) Biosíntesis de AEA y 2-AG por la entrada de Ca²⁺. D) y E) Liberación de endocannabinoides. 1) Acoplamiento del ligando endocannabinoide a CB₁. 2) Inhibición de adenilato ciclasa, efecto de la cascada de señalización por la activación del receptor CB₁. 3) Se inhibe la liberación de neurotransmisores por la disminución de AMPc y liberación de Ca²⁺ de la mitocondria para la fusión de la vesícula sináptica y la membrana del botón sináptico (Tomado y modificado de Pedroza, 2013).

La vía que sigue la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) es el proceso de señalización que regula funciones celulares como el crecimiento celular, la transformación y la apoptosis. Los receptores CB₁ activan algunos factores positivamente en la ruta, como p42/p44 MAPK (conocida como ERK 1/2) (Bouaboula et al, 1995; Sanchez et al, 1998; Sastre, 2009), cinasa c-JUN N-terminal (Rueda et al, 2000; Sastre, 2009) y p38 cinasa (Rueda et al, 2000; Derkinderen et al, 2001; Sastre, 2009). Este mecanismo de modulación de MAPK por la activación de CB₁ todavía no es conocido, aunque han sido propuestas dos posibles rutas a seguir: la primera ruta de modulación es activando la 3 cinasa/proteína cinasa B (PI3k/PKB) la cual modera la fosforilación de tirosina y la activación de Raf (Gómez del Pulgar et al, 2000; Sastre, 2009). La segunda ruta ha sido propuesta por la liberación de ceramidas, que al ser mensajeros lipídicos secundarios activan la cascada Raf MAPK (Sanchez et al, 1998; Sastre, 2009).

La activación del receptor CB₂ inhibe la adenilato ciclasa a través de su interacción con proteínas Gi/o (Bayewitch et al, 1995; Sastre, 2009); sin embargo, este nunca se presenta acoplado a proteínas Gs (Felder et al, 1995; Sastre, 2009). La activación de CB₂ puede modular la ruta MAPK por la activación de PI3k/PKB,

lo que induce la translocación de Raf-1 a la membrana y la fosforilación de p42/p44 MAPK (Sánchez et al, 2003; Sastre, 2009). La activación de CB2 provoca que los niveles de Ca^{2+} aumenten, y esto es por la activación de PLC y la liberación de Ca^{2+} de los reservorios que serán activados y permitan su liberación por la producción de IP3 (Zoratti et al, 2003; Sastre, 2009).

3.9 URB597 (KDS-4103)

El fármaco conocido como KDS 4103 (URB597) es un inhibidor altamente potente y selectivo de la enzima hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH), que mediante un reacción catalítica efectúa la hidrólisis intracelular del endocannabinoide AEA, en otras palabras inhibe la enzima encargada de la degradación del endocannabinoide AEA.. En los modelos *in vitro*, URB597 inhibe la actividad de FAAH a concentraciones de 5 nM en las membranas de cerebro de rata y 3 nM en microsomas de hígado humano. Por otra parte, en los modelos *In vivo*, URB597 inhibe la actividad de FAAH del cerebro de ratas después de su administración intraperitoneal (i.p.); el efecto inhibitorio se presenta a partir de una dosis de 0.15 mg/kg. Este fármaco no interactúa con receptores, transportadores o enzimas. Por ende, las dosis que inhiben la actividad de FAAH aumentan significativamente los niveles intracelulares de AEA, activando de esta manera el SE, además de que no provoca los efectos clásicos (como son catalepsia, hipotermia, hiperfagia), además de no contar con los efectos psicoactivos de la A9-THC.

3.10 Cross-talk del sistema endocannabinoide y la dopamina, posible aplicación terapéutica

Como se ha mencionado anteriormente, por diversos estudios bioquímicos, anatómicos, fisiológicos y farmacológicos se ha demostrado que:

1. Los elementos del SE son de amplia distribución y expresión en las regiones cerebrales, como lo son los ganglios basales, mismos que se ven afectados por trastornos neurodegenerativos.
2. El SE juega un papel importante en la modulación de los diferentes neurotransmisores (glutamato, GABA, dopamina) que actúan en la vía nigroestriatal en condiciones normales y patológicas.
3. La activación o inhibición del SE tiene consecuencias en respuestas motoras que se pueden mejorar o mantener estables en condiciones de mal funcionamiento y degeneración (Fernández-Ruiz, 2009).

Antes de tocar los sistemas de interacción y crosstalk entre el SE y la dopamina, debemos mencionar que se tienen en la literatura dos posibles teorías de cómo actúan los endocannabinoides a nivel del SNC para poder ejercer un efecto neuroprotector: el primero es la regulación y modulación de los neurotransmisores en la vía nigroestriatal que se ve afectada en la EP, lo cual puede ser por la regulación de CB₁ a nivel presináptico, regulando la liberación de glutamato, GABA e incluso de dopamina por la interacción y activación del receptor TRPV1 en conjunto (García et al, 2015; Fernández-Ruiz, 2009; Vasant et al, 2015);

incluyendo además la formación de un receptor heteromérico entre el receptor CB₁ con los receptores de dopamina D1 y D2, modulando la síntesis, liberación y recaptura de la dopamina y de las proyecciones que esta tiene en la SNpc hacia el cuerpo estriado. La otra teoría es la activación de la microglía y astrocitos; esto es primordialmente por el receptor CB₂ y en ocasiones CB₁ en astrocitos. A través de estos procesos se puede observar de una manera general la activación de procesos antioxidantes, tales como la síntesis de superóxido dismutasa, la producción de interleucina 10 -mediador anti-inflamatorio- y TGF-β por un lado; por su parte, la acción de la microglia favorece la disminución de enzimas pro-inflamatorias y citosinas inflamatorias (Vasant et al, 2015), y estos efectos se presentan en el siguiente esquema:

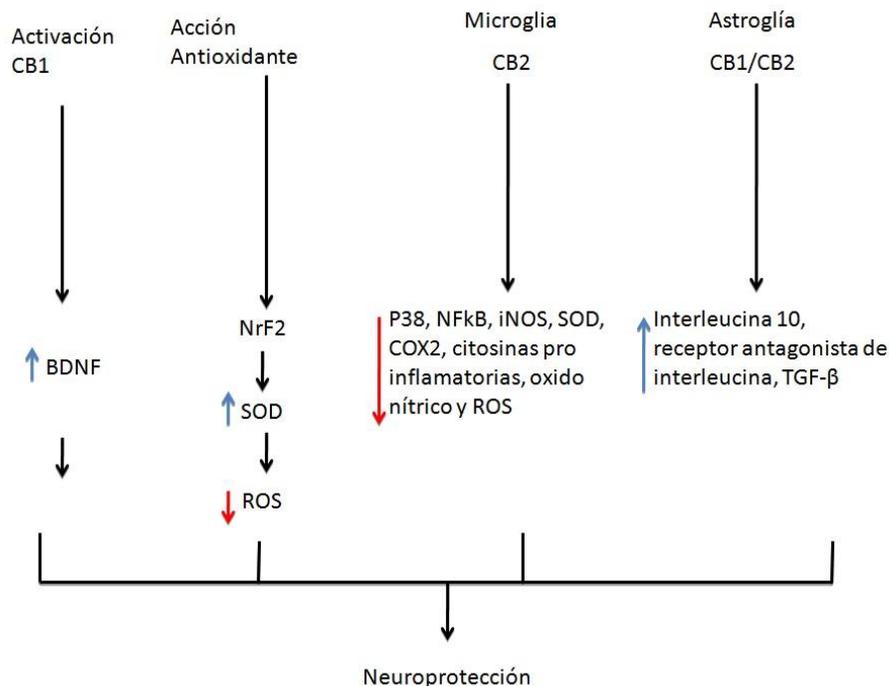


FIG.9. Esquema de eventos resultantes de la activación de CB₂ y CB₁ (flecha azul aumento, flecha roja disminución). Podemos observar que la activación de de CB₁ aumenta la expresión de BDNF, y la respuesta antioxidante generada por factor el de transcripción NrF2 aumentando la enzima SOD y disminuyendo la producción de ROS evitando el daño neuronal. En el caso de la microglía la cual se activa por CB₂, se ve disminuida la enzima COX-2, y se reduce la producción de óxido nítrico, ROS, y p38 por mencionar algunos (citosinas y procesos pro inflamatorios) generando una neuroprotección; además de que la activación en astrocitos produce un aumento en procesos y metabolitos de acción antioxidante como interleucina 10, provocando al final un junto con el efecto neuroprotector (Tomado y modificado de Vasant et al, 2015).

Entrando en materia del "crosstalk" entre el SE y la vía nigroestriatal, este se desarrolla a través de sitios de relevo, los cuales permiten la modulación de los movimientos finos en la condición normal, pero cuando existe una patología, esta

vía se ve afectada permitiendo observar ciertos síntomas característicos en humanos, entre ellos, temblores, rigidez, etc. Sin embargo, en modelos animales se observa una pérdida de peso y conducta de giro (continua rotación de los animales).

La vía nigroestriatal tiene en uno de estos núcleos de relevo al cuerpo estriado, el cual contiene proyecciones GABAérgicas y algunas de estas proyecciones se llaman MSN's (neuronas espinosas medianas (siglas en inglés)). Estas conexiones se proyectan en dos direcciones: una vía directa que conecta al STN (núcleo subtalámico) y una vía indirecta que tiene sus proyecciones hacia el GPe (globo pálido interno). Los efectos fisiológicos de la dopamina generados en la SNpc en específico sobre las MSN's es compleja y en estos momentos todavía no ha sido revelada. La intensidad con la que la despolarización de la membrana en el receptor de dopamina dicta el tipo de efecto que se produce puede ser de dos tipos: la activación o inhibición. Los receptores de dopamina D1 están acoplados positivamente a la adenilato ciclasa; por ello, su activación aumenta el nivel de AMPc y posteriormente provoca numerosos efectos cascada abajo; entre ellos, un aumento en los receptores y corrientes mediadas por los receptores NMDA. En contraste, los receptores de dopamina D2 se acoplan negativamente a la adenilato ciclasa y su activación disminuye la excitabilidad neuronal y la regeneración neuronal a las entradas glutamatérgicas. Con esto en mente, la teoría clásica menciona que las MSN's en la vía directa contienen receptores dopaminérgicos D1, mientras que en la vía indirecta se ubican los receptores D2 (Vasant et al, 2015; García et al, 2015).

La liberación de dopamina a través de estas dos vías produce efectos motores opuestos, y es por estos efectos que se modula la actividad de los núcleos de salida que se cree poseen una función normal motora. En los últimos años se han hecho investigaciones y numerosos resultados de estos "entrecruzamientos" en la vía han sido descubiertos; entre ellos está la formación de un complejo receptor el cual ha sido denominado heterómero, con los receptores D1/D2. (Muñoz et al, 2014). La activación de D1/D2 media o regula mecanismos intracelulares como el incremento de Ca^{2+} intracelular, activación de calcio-calmodulinas dependientes de proteína cinasa II (CaMKII), y la liberación del factor neurotrófico derivado de cerebro por mencionar algunos. Una serie de experimentos bioquímicos, anatómicos y electrofisiológicos establecen que el SE está presente en los "circuitos" de la vía nigroestriatal. Como ejemplo, las dendritas y la terminación axonal presináptica de MSN's que tiene sus proyecciones hacia GPi y SNpr expresa receptores CB_1 . Estos receptores CB_1 también se encuentran en terminales glutamatérgicas excitatorias cortico estriatales y también en proyecciones excitatorias del STN hacia Gpi/SNpr y SNpc (Vasant et al, 2015).

La señalización retrógrada es el modo principal por el cual el SE facilita las cortas y largas formas de plasticidad en las sinapsis excitatorias e inhibitorias que interactúan con el sistema dopaminérgico. La activación de receptores CB_1 a nivel presináptico por la liberación endocannabinoide postsináptico disminuye la liberación de neurotransmisores; de hecho, la estimulación de CB_1 presináptico en

terminales corticoestriatales disminuye la liberación de glutamato. De la misma manera, la estimulación de CB₁ en la salida del cuerpo estriado antagoniza tanto la liberación de glutamato de las proyecciones aferentes de STN, como la liberación de GABA a partir de las fibras aferentes del cuerpo estriado. Estimulando el receptor CB₁ presináptico en el GPe, se incrementan los niveles de GABA por la reducción de su recaptura de las proyecciones aferentes del estriado a este sitio de relevo. La señalización dopaminérgica es bidireccional; de hecho, los receptores D1 y D2 están colocalizados con receptores estriatales CB₁ en neuronas GABAérgicas de la vía directa (nigroestriatal) y vía indirecta (palido estriatal), y es por este tipo de interacciones que los heterómeros entre CB₁ y D1/D2 a nivel de proteínas G activan o promueven la cascada de señalización a través de AMPc, donde podemos tener dos casos: la activación de D1 y CB₁ causa una disminución de la adenilato ciclasa, lo que se traduce en una señalización de actividad inhibitoria de la SNpr que produce una respuesta motora excitatoria (movimiento); sin embargo, la co-estimulación de D2 y CB₁ aumenta la actividad de la adenilato ciclasa, lo que incrementa la actividad indirecta que estimula el STN, lo cual produce una disminución de la actividad motora (no movimiento) (Vasant et al, 2015). Aunado a la activación de los receptores CB₁ y sus efectos en la vía, se tiene en vista la investigación del único receptor endocannabinoide en la neuronas dopaminérgicas en la SNpc, el TRPV1, el cual podría tener una función de regulador de la síntesis y liberación de dopamina, además del posible metabolito NADA (N-araquidonil dopamina), el cual puede intervenir en la liberación de dopamina (Vasant et al, 2015; Bosier et al, 2012), este metabolito NADA se piensa ejerce función sobre neuronas dopaminérgicas en los receptores TRPV1 o CB₁, produciendo un efecto excitatorio por un aumento de la entrada de glutamato a través del receptor TRPV1, y la disminución de la transmisión GABAérgica por la inhibición a través de CB₁, o en su defecto inhibiendo la transmisión glutamatérgica a través de CB₁ (Bosier et al, 2012).

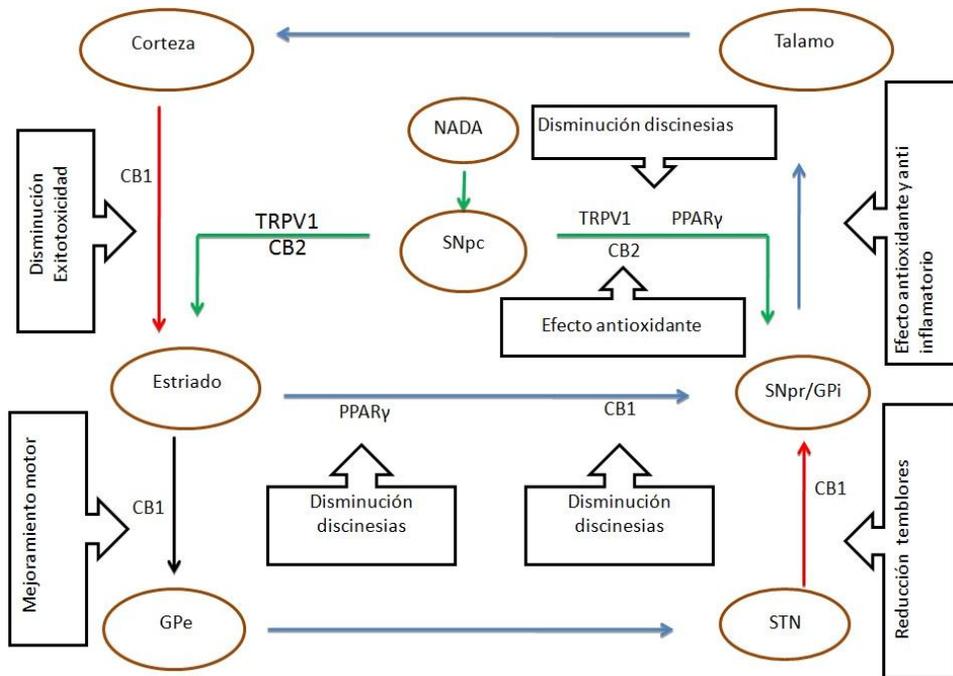


FIG.10. Posible vía de acción del SE en la vía nigroestriatal (flecha roja (glutamato), azul (GABA) y verde (dopamina)). Se presenta la activación de los receptores endocannabinoides (CB1, CB2, TRPV1, PPARγ) y las posibles acciones de cada receptor al ser activado para disminuir las condiciones o síntomas en el modelo de la enfermedad de Parkinson. Esto ocurre por el aumento de anandamida (AEA) por la inhibición de FAAH debido a la administración de URB597, además de la posible síntesis de NADA (N-araquidonil dopamina) por la adición de ácido araquidónico y dopamina, activando la liberación de dopamina, y este efecto podría ser a través de receptores D1, lo que podría resultar en la correcta inhibición del tálamo y el buen funcionamiento de la vía nigroestriatal (Tomado y modificado de Vasant et al, 2015).

4. Antecedentes

Existen pocos estudios donde se compruebe los efectos provocados por el aumento en la concentración de anandamida por la inhibición de su enzima degradadora FAAH, favoreciendo la activación del sistema endocannabinoide y induciendo efectos antioxidantes o neuroprotectores.

Se tiene conocimiento de diversos modelos con neurotoxinas que permitan reproducir algunos síntomas o condiciones de la enfermedad de Parkinson; en este caso en específico, el modelo por 6-OHDA antes descrito por Blum (2001) donde se observa una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

Con poca información de referencia en modelos de daño neuronal, en particular de neurodegeneración, cabe mencionar los experimentos realizados por Morgese et al (2007) utilizando un modelo de administración crónica en el cual los animales recibieron tratamiento con levodopa (L-DOPA) -el precursor de la dopamina a nivel de SNC, además de una lesión intracraneal por operación esterotáxica mediante la lesión de 6-OHDA ($4\mu\text{g}/\mu\text{l}$) el cual produjo una pérdida de neuronas dopaminérgicas. Para estimular el sistema endocannabinoide, se administró intraperitonealmente el fármaco URB597 para producir la inhibición de la enzima FAAH (degradadora de AEA), obteniendo como resultados dos puntos importantes: 1. El primero es una contradicción con lo esperado, ya que el fármaco URB597 no disminuyó por sí solo los AIM's (siglas en ingles), ni tampoco hubo mejoría en la manifestación de discinesias provocadas por la administración de L-DOPA. 2. El segundo es la aplicación de capsazepina (CPZ, $10\text{mg}/\text{kg}$ i.p.), un antagonista del receptor TRPV1, el cual al ser inhibido junto con el aumento en la concentración de AEA producida por la inhibición de FAAH debida a URB597, produce una disminución de discinesias y de AIM's, dando como resultado, que solo al inhibir este canal y activar simultáneamente el receptor CB₁ por el aumento de AEA, una mejora en las conductas errantes (discinesias) en los animales tratados con L-DOPA y lesionados con 6-OHDA (Morgese et al, 2007).

Un segundo trabajo reportado por el grupo de Morgese en el 2010 en donde emplea un modelo de neurodegeneración por 6-OHDA ($4\mu\text{g}/\mu\text{l}$), además de volver a administrar L-DOPA induciendo discinesias, y URB597 como agente neuroprotector. En el dividen en dos sus grupos de animales: el primero al cual administran el antagonista del receptor TRPV1, Capsazepina (CPZ, $10\text{ mg}/\text{kg}$, i.p.), y un segundo donde incorporan un agonista del receptor PPAR γ , Rosiglitazona (RGZ 5 y $10\text{mg}/\text{kg}$, i.p.). Los resultados fueron esperados en el caso de CPZ, pues se comprobó una disminución en la cantidad de AIM's y discinesias provocadas por la L-DOPA tras la administración de URB597 y la inhibición del receptor TRPV1; sin embargo, en el caso de RGZ, hubo una mejoría dosis-dependiente en los movimientos involuntarios (AIM's), y una implicación directa de los receptores PPAR en el proceso motor, ya que al ser peroxisomales y unirse al DNA, se podría pensar en un silenciamiento de genes o regulación de cascadas de señalización que estos pudieran inducir regulación conductual. Gonzalez-Aparicio et al, en el 2013, demuestran que el bloqueo de TRPV1 y la

administración del agonista OEA del receptor PPAR α para producir una disminución de discinesias en el mismo modelo tóxico. Por su parte, el grupo de Morgese demuestra la unión en heterómero de los receptores PPAR γ /RXR, lo cual parece activar la proteína 1 (AP-1), un importante modulador de la expresión de sitios denominados "AP-1", relevantes para entender el origen de la EP y las discinesias, con acción sobre receptores D1 (dopaminérgicos 1) y de la enzima limitante catecolaminérgica tirosina hidroxilasa (Martinez et al, 2014).

Demostrando el poder antioxidante del fármaco URB597, está el trabajo realizado por el equipo de Pelicão en el año 2016, en el cual se realizó una administración aguda y crónica a dos dosis de 3 y 6 g/kg de EtOH (etanol) vía i.p., y se realizó una cuantificación de ROS, particularmente del anión superóxido (O₂), observándose que la administración de URB597 (0.3mg/kg) disminuyó la producción del anión superóxido en un 44 % en el tratamiento agudo, y por su parte en el tratamiento crónico se obtuvo una disminución del 45 % (Pelicão et al, 2016).

Uno de los últimos trabajos publicados sobre este tema, y que se podría comparar con el modelo que se presentara en este proyecto, es el realizado por el grupo de Mounsey et al en el 2015, en el cual se emplearon diferentes tratamientos, entre ellos 2-AG (3 y 5mg/kg), URB602 (10mg/kg) y DFU (25mg/kg); el primero un ligando endocannabinoide, el segundo un fármaco que inhibe a la enzima degradadora de 2-AG, que es MAGL; el tercero, un fármaco el cual es el inhibidor de la enzima COX-2 con el fin de incrementar la concentración de 2-AG. Esto se probó ante la administración intraperitoneal de MPTP en un modelo de la EP. Se observó una preservación de neuronas dopaminérgicas en los grupos de URB602 y DFU en animales tratados con MPTP, evidenciados por inmunohistoquímica y un conteo celular de neuronas TH-positivas en la SNpc, pero no un aumento en los niveles dopaminérgicos en el cuerpo estriado; con esto el equipo de Mounsey concluye que la protección inducida por 2-AG tuvo un mejor efecto en el modelo gracias al inhibidor de la enzima COX-2, al cual se le atribuyen rutas de procesos inflamatorias, además de que el 2-AG puede actuar como un antioxidante al disminuir los niveles de ROS, a la par de citosinas y prostaglandinas (Mounsey et al, 2015).

5. Justificación

Dada la limitada información sobre el efecto del sistema endocannabinoide y el valor terapéutico de su activación en modelos de neurodegeneración, proponemos en este trabajo que la activación del sistema endocannabinoide, específicamente por el fármaco URB597, en un modelo de neurodegeneración producido por 6-OHDA *in vivo*, induzca una neuroprotección del cuerpo estriado y sustancia nigra.

6. Hipótesis

El tratamiento sistémico con URB597 en ratas lesionadas con 6-OHDA ejercerá un efecto neuroprotector sobre el cuerpo estriado y la sustancia nigra pars compacta, evitando la degeneración estructural y funcional de las neuronas de dichas zonas.

7. Objetivo general

Determinar el grado de neuroprotección generado por el URB597 en ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina sobre la sustancia nigra y el cuerpo estriado.

7.1 Objetivos particulares

- i. Analizar cuantitativamente el grado de daño estriatal de las ratas a través de la conducta de giro.
- ii. Determinar el efecto neuroprotector por URB597 en las ratas lesionadas con 6-OHDA mediante IHQ.
- iii. Determinar la neuroprotección por activación del SE mediante pruebas bioquímicas.

8. Metodología

8.1 Animales de experimentación

En este estudio se utilizaron 24 ratas Wistar macho con un peso de 250-300g provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", estos fueron mantenidos en jaulas de acrílico (n=6 por caja) con cama de aserrín, con libre acceso a alimento y agua, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 hrs a una temperatura de 21±23°C. El manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, de acuerdo a las especificaciones técnicas para su producción, cuidado y uso de los animales de experimentación.

8.2 Administración de fármacos y lesión intraestriatal

Las 24 ratas fueron divididas en dos grupos de 12 ratas cada uno igual dividido en 4 subgrupos para la experimentación que aquí se describirá, estos grupos con una n=3 serán SHAM, URB597, 6-OHDA y URB597+6-OHDA.

La administración del fármaco URB597, en una dosis de 0.3mg/kg (disuelto en solución salina 0.9%, Tween 80% y DMSO 10%) vía intraperitoneal, se realizó durante 7 días (2 días antes de la lesión, el día de la lesión (una hora antes) y 4 días después de la lesión) a los grupos URB597 y URB597+6-OHDA, mientras tanto los grupos SHAM y 6-OHDA se les administró *i.p.* solución salina con una n=3 por cada grupo.

Se realizó una cirugía esterotóxica, donde los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico vía *i.p.* (0.3mg/kg). Se empleó un equipo estereotáxico para la denervación del cuerpo estriado con las siguientes coordenadas: AP=+0.5 a partir de bregma, L=+2.8 a partir de bregma, y P= -4.5 mm a partir de la dura, de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (1998).

Durante la cirugía los grupos SHAM y URB597 a través de una jeringa Hamilton de 10µl fueron administrados con 2µl de solución de ácido ascórbico al 0.01%, y a los grupos 6-OHDA y URB597+6-OHDA les fueron administrados 2µl de 6-OHDA (1mg/100µl) disuelto en ácido ascórbico a 0.01%. Después de la operación, los animales fueron colocados bajo luz cálida para minimizar la hipotermia causada por la anestesia, hasta su recuperación total.

8.3 Medición de conducta

Se evaluó la conducta rotacional 21 días después de que se administró intraestriatalmente la 6-OHDA. Cada animal fue administrado con apomorfina (APM) a una dosis de (1mg/kg) vía subcutánea; se dejó un tiempo de latencia de 5

minutos, pasando los 5 minutos se registró durante 60 minutos los números de giros de 360° sobre su propio eje que realizaron (Arratia, 2012; Silva et al, 2008).

8.4 Inclusión en parafina

Concluida la evaluación, se realizó una perfusión intra cardíaca con heparina y PFA al 4%, posteriormente se obtuvo los cerebros de cada rata.

Los tejidos obtenidos fueron deshidratados por alcoholes graduales después de la perfusión los cuales fueron usados de la siguiente manera; alcohol al 70% por treinta minutos, posteriormente al 80%, 90% I, 90% II, 100% I, 100% II, Alcohol/Xilol, Xilol I, y Xilol II, con el fin de deshidratar el tejido, permitiendo así preservarlo adecuadamente.

Posteriormente los tejidos fueron incluidos en parafina I y parafina II durante una hora respectivamente, y terminado el tiempo, los tejidos son incluidos en un bloque al cual se vierte parafina nueva, almacenada a temperatura ambiente hasta ser usada.

8.5 Inmunohistoquímica

Se realizaron cortes seriados de 5µm de la SNpc y el cuerpo estriado. Los cortes se realizaron en un microtomo (Leica, USA), estos fueron montados en portaobjetos tratados con silano, posteriormente los cortes fueron hidratados de acuerdo al siguiente procedimiento; se sumergieron en xiloles, alcoholes y agua destilada bajo el siguiente orden, Xilol II durante treinta minutos, xilol I, alcohol-xilol, alcohol 100% II, alcohol 100% I, alcohol 90% II, alcohol 90% I, y H₂O₂ durante 3 minutos cada uno, se realizó una recuperación antigénica con Citrato de Sodio (10M, pH 6) + Tritón. Colocando en un köplin las laminillas y 50ml de buffer de citratos de sodio, en baño maria y a punto de ebullición durante 20 minutos, terminando este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se hizo un lavado con PBS (pH 7.4) por 5 minutos, al finalizar se realizó una eliminación de peroxidasa durante 15 minutos, en el mismo köplin, al terminar el tiempo, se secaron las laminillas y se agregó una gota de PBS para lavar el tejido, secando y agregando 35 µl de albumina por cada corte, cubriendo las muestras, y colocándolas dentro de una caja húmeda durante 20 minutos, se retiró la albumina y se lavo con PBS, para después agregar el anticuerpo primario TH (1:500, Sigma aldrich, USA); se agregaron 35µl de la dilución del anticuerpo primario en albumina, dejando en incubación toda la noche en cámara húmeda, al día siguiente se retiro y lavo con PBS cada corte, se agregó el anticuerpo secundario (anti rabbit 1:5000 Sigma Aldrich, USA), dejando en incubación en la cámara húmeda durante 1 hora, al finalizar el tiempo se retiró y lavo con PBS, secando el anticuerpo secundario y agregando al tejido estreptavidina y dejándose en incubación en la cámara húmeda 1 hora, la estreptavidina fue retirada y lavada con PBS, para posteriormente incubar con diaminobencidina (LSAB kit, DAKO, USA) hasta observar el color café, siendo en este caso por 10 minutos. La

diaminobencidina se desechó en cloro y se agrego una gota de resina dejándolo secar durante a temperatura ambiente durante toda la noche.

8.6 Pruebas bioquímicas

Después de llevar a punto muerto, al segundo grupo de 12 ratas después de 12 horas de la lesión con 6-OHDA, se extrajo el cerebro de cada uno, este fue manipulado por espátulas y pinceles retirándoles la SNpc, obteniendo el tejido este fue acumulado de cada grupo para formar un pool de SNpc, este fue homogenizado en un homogenizador de tejidos en 500 μ l de buffer de lisis, se centrifugaron a 12000 rpm por 20 minutos, al finalizar se retiro y alícuoto el sobrenadante (sinaptosomas) tomando 10 μ l para realizar cuantificación de proteínas por Lowry, 50 μ l para peroxidación de lípidos(TBA) y 200 μ l para proteínas oxidadas.

8.6.1 Cuantificación de proteínas (Lowry)

Se utilizaron 10 μ l de cada muestra al cual se le agrego 1 ml de solución C en tubo de ensayo de 3ml, se agitaron en el vortex y se dejo reposar por 10 minutos, al finalizar el tiempo se agrego a cada tubo de ensayo 100 μ l de Folin (1:1) con agitación continua, al terminar la agitación se dejó reposar los tubos durante 30 minutos, terminando el tiempo de reposo se tomaron 200 μ l para ser cargados en una placa de 36 pozos y leer su densidad óptica a 660nm en un espectrofotómetro (BioTek, USA).

*(Para preparar 1L de Sol A se mezcló carbonato de sodio al 2% (20g), NaOH 0.4% (4g) y tartrato de sodio 0.02% (0.2g), Sol B: sulfato cúprico pentahidratado ($\text{Cu}_2(\text{SO}_4)_3$) 1.25g + 250 ml agua), Sol., C: 50ml de solución A + 1ml de Solución B al momento)

8.6.2 Peroxidación lipídica (TBARS)

Se realizó una curva estándar con los siguientes volúmenes:

Curva	TMPO (μ L)	Buffer lisis (μ L)
A	0	200
B	1	189
C	2	188
D	5	185
E	10	180

F	20	170
G	40	150

Además de realizar la curva estándar se utilizaron las alícuotas de 50 μ l de las muestras del pool de SNpc, a cada tubo eppendorf de 1.5ml, se agregaron 100 μ L del reactivo TBA, se incubaron las muestras en baño maría y a punto de ebullición, finalizando dicho tiempo se obtiene como resultado un cromóforo rosado cuya intensidad de color está relacionada directamente con la cantidad de productos peroxidados, terminando el baño maría los tubos fueron enfriados a temperatura ambiente, por último se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos, y al terminar se tomó el sobrenadante (100 μ L) para leer densidad óptica a 530nm en un espectrofotómetro (BioTek, USA).

8.6.3 Proteínas oxidadas (carbonilación)

Se prepararon 50 mg de sulfato de estreptomycin en 0.5 ml de buffer de lisis, esta estreptomycin se adhirió a cada tubo eppendorf de 1.5ml de cada muestra y se dejó incubar por 24 horas, se añadieron 300 μ l de DNPH por tubo y se dejaron incubando por 1 hora en oscuridad, finalizando el tiempo se adicionaron 600 μ l de TCA al 2% y se dejaron incubando por 10 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante, se agregó 600 μ l TCA a 1%, luego se centrifugó a 5000rpm durante 10 minutos y al terminar se desechó el sobrenadante, se agregó Acetato de etilo y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos; este procedimiento se realizó tres veces, y en cada ocasión se desechó el sobrenadante con el fin de poder agregar Acetato de etilo, por último, los tubos fueron puestos a secar durante 10 minutos, y al término se añadió 400 μ l de Guanidina, resuspendiendo el pellet para poder leerse a dos medidas de 280 y 370nm en espectrofotómetro (BioTek, USA).

8.7 Densitometría

Las imágenes utilizadas fueron tomadas en un microscopio estereotaxico (Zeiss, USA) y analizadas en el programa Image J 1.1.4 para realizar la densitometría, lo primero que se realizó fue guardar el documento en formato TIFF y se elimino el ruido de dichas imágenes, posteriormente se marco el área que se deseaba cuantificar (inmunoreactividad a TH), después de ser marcadas se analiza la imagen y el programa nos arroja un histograma y tabla con los valores graficados de cada medición, se tomaron en cuenta 3 mediciones de cada grupo para realizar pruebas estadísticas y obtener un valor significativo.

8.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm SEM. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba de comparaciones múltiples post hoc Tukey,

para todas las pruebas se consideraron estadísticamente significativas con diferencias $p < 0.05$, el software empleado para realizar las pruebas estadísticas fue GraphPad Prisma v6.

9. Resultados

9.1 Conducta de giro

En la Figura 11 se presenta la alteración conductual a los 21 días post lesión con 6-OHDA, conjuntamente con el efecto que se presentó al administrar URB597. El número de giros inducidos por el agonista dopaminérgico apomorfina administrado antes de realizar la evaluación es elevado en el grupo 6-OHDA (115 ± 3) (media \pm SEM) en comparación al grupo SHAM y URB597 (0 ± 0) (media \pm SEM) de manera significativa, donde los giros son prácticamente inexistentes; sin embargo, en comparación el grupo URB597+6-OHDA (38.6 ± 29.8) (media \pm SEM) donde se presentó una disminución significativa del número de giros en los animales con respecto a 6-OHDA, sugiriendo una protección de la vía nigroestriatal y una mejora conductual en los animales lesionados con 6-OHDA y tratados con URB597.

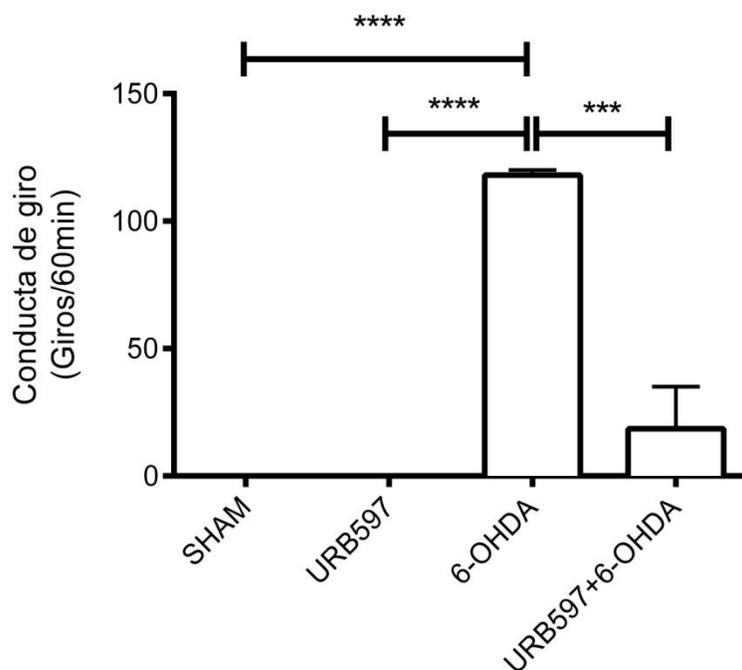


FIG. 11. Efecto de URB597 sobre la conducta de giro. Cada barra representa el promedio del número de giros en cada grupo experimental \pm SEM ($n=3$). *** $P < 0.01$ grupo URB597+6-OHDA, en comparación al grupo 6-OHDA, **** $P < 0.001$ grupo 6-OHDA en comparación al grupo SHAM y URB597, se realizó una ANOVA de una vía, posteriormente una *post hoc* de Tukey.

9.2 Inmunoreactividad a TH

La lesión provocada por la administración de 6-OHDA y la posible protección por URB597 en el cuerpo estriado, se observa y compara entre los 4 grupos: SHAM, URB597, 6-OHDA, URB597+6-OHDA mediante la expresión de TH tanto en el cuerpo estriado como para la SNpc, como se muestra en la Figura 12.

Es posible observar en el panel de imágenes la inmunoreactividad producida para TH en el cuerpo estriado y SNpc. Es en el grupo SHAM y URB597, donde se muestra la inmunoreactividad en toda el área en estas regiones; en contraste, con la 6-OHDA se observa la pérdida de la inmunoreactividad para TH en el área lesionada tanto en el cuerpo estriado como en la SNpc; por último, podemos apreciar en el grupo URB597+6-OHDA una posible protección en el cuerpo estriado y una protección parcial en la SNpc, lo que podría demostrar una neuroprotección parcial por la administración del fármaco URB597, con estos resultados podemos hacer un correlato entre los cambios en la conducta motora con respecto a la expresión de TH en los diferentes grupos y de esta manera se puede dar una posible explicación a la mejora motora debido a la probable neuroprotección otorgada por URB597.

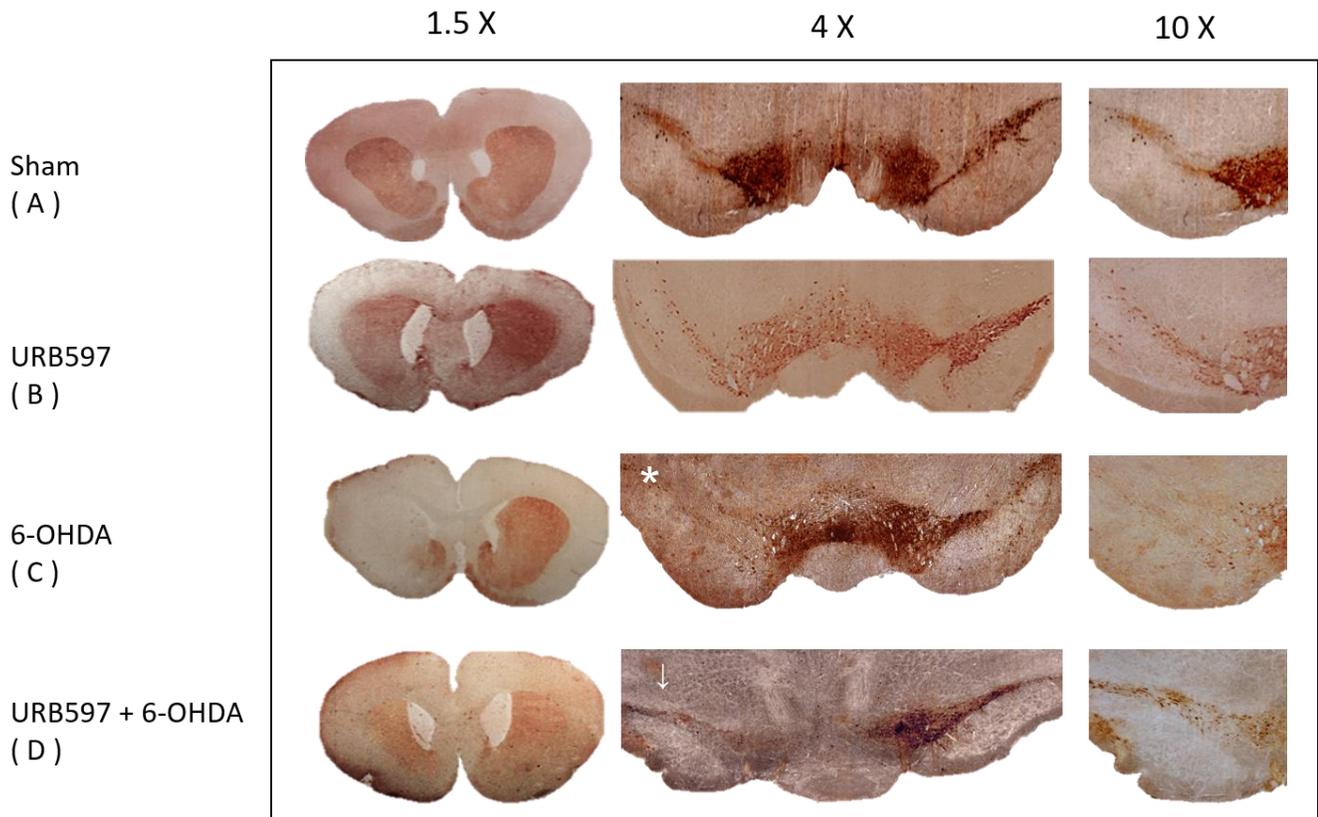


FIG. 12. Panel de imágenes de inmunoreactividad a TH en cortes coronales de cuerpo estriado y SNpc (1.5x, 4x, 10x). A) Grupo SHAM. B) Animales tratados con URB597. C) Inyección de 6-OHDA y pérdida de reactividad de TH en la región lesionada (*). D) Animales lesionados con 6-OHDA y fueron tratados con URB597 (↓).

Tomando como referencia la SNpc, en la cual se produjo una muerte celular consistente, se realizó una densitometría, para cuantificar la marca de inmunoreactividad y así determinar la neuroprotección parcial por la administración de URB597. Lo que es posible observar en la gráfica del porcentaje de neuronas TH positivas en la SNpc, es una presencia sin cambios estadísticos entre los grupos SHAM y URB597 (724524.300 ± 175035) (media \pm SEM), como era de esperarse, sin embargo el grupo 6-OHDA ($641320.500 \pm 170317.400$) (media \pm SEM) muestra una disminución significativa de neuronas TH positivas lo cual es producido por la lesión con 6-OHDA, en contraste a este grupo el grupo tratado con URB597 y lesionado con 6-OHDA muestra una presencia significativa de neuronas TH positivas permitiendo visualizar la neuroprotección dada por la administración de URB597 ($807861.500 \pm 221291.700$) (media \pm SEM).

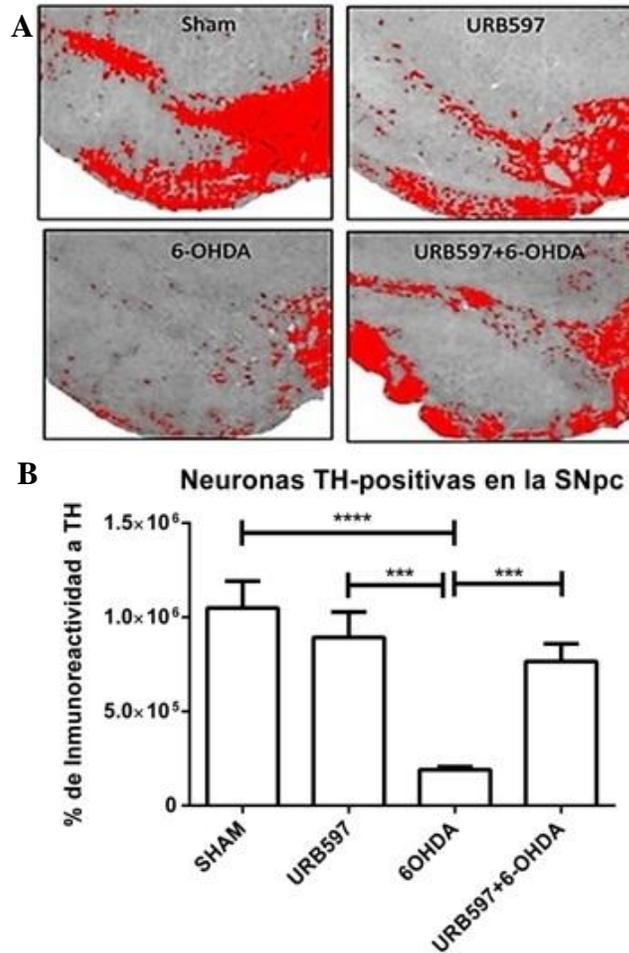


FIG. 13. Densitometría de la SNpc a 10x. A) Se muestra en rojo el área a cuantificar por cada grupo experimental. B) El grafico muestra la densidad de la inmunoreactividad a TH en SNpc. Cada barra representa el número medio de densidad integrada en cada grupo experimental \pm SEM. *** $P < 0.01$ grupo URB597+6-OHDA en comparación al grupo 6-OHDA y el grupo URB597 en comparación al grupo 6-OHDA, **** $P < 0.001$ grupo 6-OHDA en comparación al grupo SHAM, se realizo una ANOVA de una vía y posteriormente una *post hoc* de Tukey.

9.3 Pruebas bioquímicas de daño oxidativo

En la Figura 14 se puede observar que de una manera natural (estado basal), las membranas sufren el proceso de lipoperoxidación como se observa en el grupo SHAM, mostrando una similitud con el grupo URB597 en el cual se observa una ligera disminución en la lipoperoxidación, en contraste, el valor medio por 6-OHDA se aumento, el cual se observó en la SNpc, en comparación al grupo URB597+6-OHDA el cual tuvo una tendencia a disminuir la lipoperoxidación de lípidos, sugiriendonos una protección por parte del URB597 a la membrana celular de las neuronas.

9.3.1 TBARS en SNpc

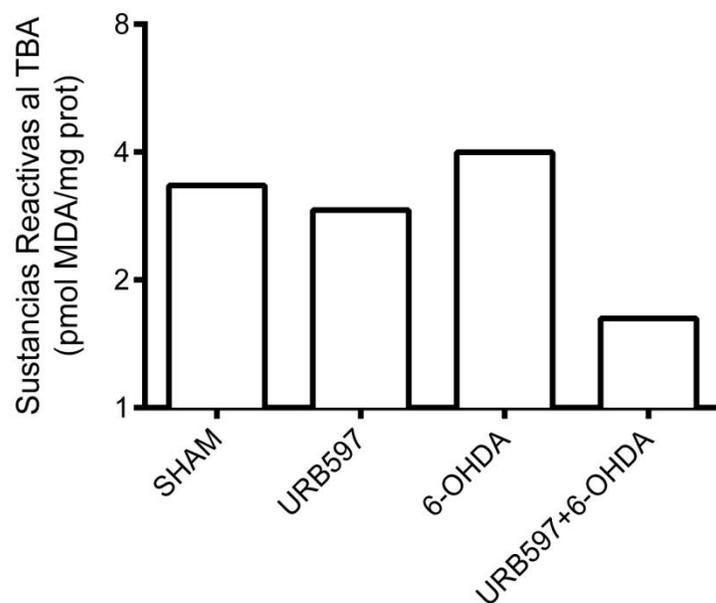


FIG. 14. Efecto de URB597 sobre la lipoperoxidación buscando la formación de sustancias reactivas al TBA. Cada barra representa el valor medio del pool de sustancia nigra de cada grupo (n=3).

9.3.2 Carbonilación en SNpc

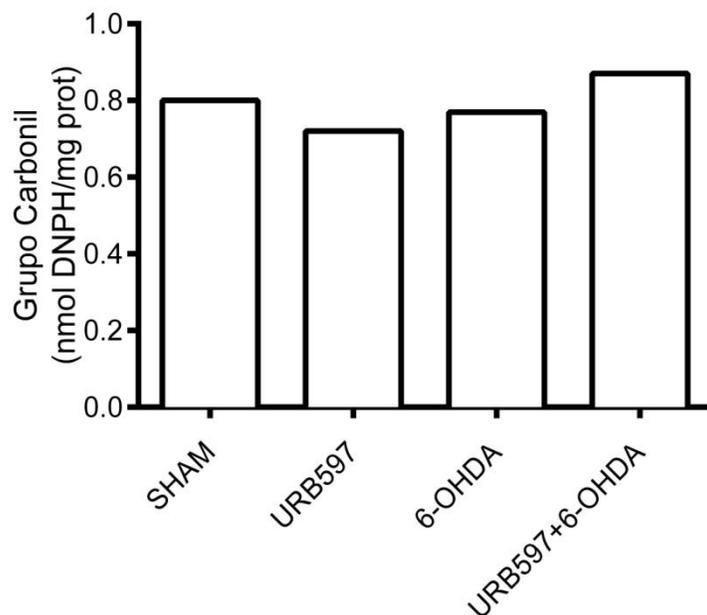


FIG. 15. Efecto de URB597 en los niveles de oxidación proteica. Cada grupo representa el valor medio de la oxidación proteica del pool de sustancia nigra de 3 animales.

En contraste con la técnica de lipoperoxidación, el ensayo de carbonilación nos muestra al grupo SHAM como un estado basal en la oxidación proteica, sin embargo, tanto el grupo URB597 y 6-OHDA muestra una tendencia a la disminuir la producción de grupos carbonilos (ketaminas, ketaldehídos y deosiosonas) generados por la oxidación proteica de residuos de lisinas por el aumento de ROS (Dalle-Donne et al, 2003) producida por la administración de 6-OHDA, en contraste el grupo URB597+6-OHDA tuvo una tendencia al aumento de la oxidación proteica, lo que nos muestra que esta prueba no arrojó diferencias entre los tratamientos, sugiriendo que este proceso no tuvo lugar en las muestras de SNpc. Cabe mencionar que no hay prueba estadística en ninguno de los dos ensayos bioquímicos (lipoperoxidación y carbonilación) ya que dichos ensayos fueron realizados en un pool de Snpc, por lo cual se entiende que el experimento ya lleva un error estandar, sin embargo, se buscaba en este estudio observar el efecto sobre la sustancia nigra, el cual es un núcleo celular afectado por la lesión de 6-OHDA

10. Discusión

En el presente estudio, se evaluó la eficacia de URB597 como posible agente neuroprotector al ser administrado vía *i.p.* en un modelo de parkinsonismo inducido por un efecto toxico de 6-OHDA. Estos resultados nos confirman lo reportado anteriormente, al administrar 6-OHDA, con el cual se genero un efecto toxico, en especial, la inducción de muerte celular de neuronas dopaminérgicas, por el aumento en la concentración de ROS, su propia auto-oxidación formando

H₂O₂ (peróxido de hidrogeno), inhibición del complejo mitocondrial (daño mitocondrial) y posible daño excitotóxico por liberación del Ca²⁺ resguardado en este reservorio. La 6-OHDA activa mecanismos que dirigen al SNC a una neurodegeneración (Walsh et al, 2010), y entre estos efectos encontramos una reducción en la expresión del receptor CB₁ por la muerte de neuronas que contengan este receptor, como lo son las neuronas GABAérgicas del cuerpo estriado.

El uso de URB597 como pre tratamiento, tratamiento y pos-tratamiento de acuerdo a nuestros resultados, protege contra los efectos tóxicos producidos por la 6-OHDA a través de diferentes mecanismos. Los resultados aquí presentados son novedosos ya que podemos hacer mención entre ellos a una protección a nivel funcional, morfológico y estructural (integridad celular), observable en términos de conducta motora (medición de conducta de giro), morfológica (inmunoreactividad) e integridad celular por pruebas bioquímicas (TBARS y carbonilación).

La medición de la conducta de rotación no puede tomarse como un parámetro de referencia absoluta del daño que se ha generado en los cerebros de los animales lesionados. Más que ser un referente cuantitativo, se hace una aproximación cualitativa, ya que la presencia de giros es un indicativo de una descompensación neuroquímica y funcional. Esta descompensación es resultado de una lesión unilateral en el cuerpo estriado de las ratas y representa el déficit neuroquímico que se ve reflejado como un desbalance en la transmisión dopaminérgica (Perez-De La Cruz et al, 2005; Arratia, 2010). Este desbalance no es producido de manera espontánea, esta inducción es provocada por agonistas de los receptores dopaminérgicos D1, D2 ante una lesión unilateral en el lado del estriado que conserve sus componentes (no lesionado), como lo es la administración subcutánea de la apomorfina.

Como podemos observar en la figura 11, los grupos SHAM y URB597 no presentaron ningún giro en los 60 minutos que fue medida esta conducta, por el contrario, el grupo 6-OHDA presentó una mayor cantidad de giros alcanzando un promedio de 115, sin embargo, el grupo URB597+6-OHDA mostró una mejoría al presentar una disminución significativa que alcanza un promedio de 38 giros, estos resultados nos demuestran una neuroprotección de la conducta motora cuando son tratados con URB597, este tipo de conducta nunca antes ha sido medida en un modelo de 6-OHDA y animales tratados con URB597, la única conducta que apoya nuestros resultados son los producidos por el grupo de trabajo de Morgese en el cual se demostró el efecto neuroprotector de URB597 al disminuir las discinesias producidas por una lesión con 6-OHDA, lo que nos permite afirmar que el tratamiento con URB597 promueve una neuroprotección a la vía nigroestriatal o que la activación del SE por acumulación de AEA actúa produciendo una mejoría (modulación) o correcta señalización en la vía nigroestriatal.

Al administrarse URB597 como tratamiento crónico (7 días), podemos sugerir un posible efecto de prevención de los efectos producidos por la lesión de 6-OHDA (aumento de ROS, auto-oxidación, etc.) además de involucrar posiblemente una acción terapéutica. Este efecto neuroprotector puede deberse a la posible captura

de radicales libres (H_2O_2) por el URB597, que presenta hidrógenos que pueden ser donados para el arresto de los radicales libres; el endocannabinoide AEA, al no ser metabolizado, también podría ser parte de esta actividad protectora, ya que en su estructura presenta hidrógenos que también pudieran servir como donantes para atenuar el efecto de los radicales libres, además de la activación de los receptores PPAR γ , desencadenando una cascada de señalización a nivel nuclear, concluyendo con la síntesis y producción de factores antioxidantes, anti-inflamatorios y anti-excitotóxicos (Pelição et al, 2016), además de la activación de receptores PPAR α los cuales se encuentran expresados a nivel de SNpc y al ser activados promueven una respuesta anti-inflamatoria y antioxidante (Gonzalez-Aparicio et al, 2016). La activación de receptores CB1 formando heterodímeros CB $_1$ -D1/D2 y TRPV1 promueve la activación y modulación de la vía nigroestriatal, principalmente de blancos como lo son el cuerpo estriado, permitiendo la regulación de la actividad motora en la conducta de giro. (Vasant et al., 2010 y Muñoz-Arenas et al., 2014).

La inmunoreactividad a TH nos permitió visualizar la neuroprotección parcial en el cuerpo estriado y la SNpc por la administración de URB597. Se ha observado que la administración de 6-OHDA en el cuerpo estriado causa pérdida funcional y celular en los animales lesionados. Estos eventos de muerte celular podrían explicar la pérdida de DA en el cerebro de ratas lesionadas (Kirik et al. 1998; Gainetdinov et al, 2001). En este trabajo se propone que los animales tratados con URB597 y previamente lesionados con 6-OHDA muestran una neuroprotección parcial del cuerpo estriado y la SNpc, haciendo la comparación contra los grupos SHAM y 6-OHDA como se muestra en la figura 12, por otro lado el grupo URB597 presenta una disminución en la inmunoreactividad de TH, esto podría explicarse por la regulación de los genes de TH a la baja por la activación de receptores PPAR α (Bosier et al., 2013), sin embargo, este resultado no compromete la funcionalidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc ya que no hay una alteración en la conducta de giro de este grupo. Este tipo de tinciones se han hecho en otros trabajos como el de Pelição, donde la administración crónica y aguda de EtOH en dos dosis (3y 6mg/kg) producen anión superóxido (aumento de ROS), favoreciendo una protección a nivel de la corteza prefrontal por la administración de URB597. A este trabajo se suma el de Gonzalez-Aparicio, en el cual la administración de OEA (oleiletanolamida) a diferentes dosis (0.5, 1, and 5 mg/kg) activa al receptor PPAR α promoviendo una protección a nivel de cuerpo estriado y SNpc ante la lesión con 6-OHDA, esto lo demuestran con ensayos conductuales e inmunoreactividad a TH, obteniendo dos resultados; una mayor protección (dosis-dependiente) y una protección de los núcleos celulares; cuerpo estriado y SNpc. (Gonzalez-Aparicio et al, 2016).

Haciendo una analogía y comparación con un modelo semi-parkinsoniano producido por MPTP comprobando el efecto protector del SE por la administración de URB602 (inhibidor de la enzima degradadora de 2-AG, MAGL), también se observa una neuroprotección de la SNpc al determinar la inmunoreactividad a TH (Mounsey et al, 2015). Ante esto, al analizar la inmunoreactividad a TH de la SNpc por densimetría demostramos un efecto protector de las neuronas GABAérgicas

del cuerpo estriado y las dopaminérgicas de la SNpc, lo cual podría correlacionar con la mejoría en la conducta rotacional.

Posteriormente en las Figuras 14 y 15 se observa que de manera natural (estado basal) en la lipoperoxidación, en condiciones control (SHAM), los lípidos membranales tienden a sufrir peroxidación, sin embargo, como es de esperarse el grupo 6-OHDA aumenta esta peroxidación por la lesión provocada por este agente neurotóxico, en contraste, existe una drástica disminución en el grupo URB597+6-OHDA, lo cual sugeriría una disminución en la formación de peroxidación lipídica, mostrando una tendencia a la protección antioxidante del propio fármaco sobre la integridad de la membrana celular, observando este efecto en la sustancia nigra como podemos verlo en la Figura 14. Por su parte, la carbonilación evaluada en sustancia nigra, al no ser diferente entre los grupos, sugiere que este proceso no participa en este modelo en el tiempo evaluado. Esto provee de información relevante y nueva ya que los experimentos realizados por Pinto., et al en el 2010, en los cuales se buscaba la prevención de marcadores de estrés oxidativo por la administración de Δ^9 -THC en líneas celulares, obteniendo como resultados una falta de marcadores de estrés oxidativo (SOD, catalasa) sin ningún cambio en todos sus grupos y solo una pequeña tendencia al aumento de producción de GSH en su grupo Δ^9 -THC, por lo cual sus resultados contrastan con los nuestros pero debe recordarse que sus experimentos son en células y que por ello, no todas las condiciones son comparables.

Este trabajo arroja resultados interesantes y novedosos, que apoyan la teoría de tener al SE como un posible blanco de estudio como tratamiento para pacientes con una enfermedad crónico-neurodegenerativa como lo es la EP. Aunque no podemos afirmar de una manera puntual que el sistema endocannabinoide está involucrado en la neuroprotección en nuestro modelo, podemos hablar de su parcial involucramiento, ya que los resultados de conducta e inmunoreactividad a TH y densitometría son claros y proveen de una respuesta puntual de protección que se asume esté relacionada con la presencia de AEA (por probar). Deben entonces estudiarse en más detalle en un futuro cercano vías de compensación (cascadas de señalización) con el fármaco probado y sobre diferentes marcadores de toxicidad que involucren la activación del sistema endocannabinoide.

Con estos resultados completamente nuevos, se proponen 3 vías de protección por la administración de URB597: la primera de estas vías es la protección inferida de forma antioxidante, ya que la molécula posee hidrógenos que puedan ser donados para inactivar los radicales libres formados por la lesión de 6-OHDA, y también podría apoyarse el papel antioxidante de la AEA, la cual igual que el fármaco posee y provee de hidrógenos con capacidad de ser donados para inactivar el aumento en la producción de ROS.

La segunda vía, implica la protección integral de la vía nigroestriatal y estriatopalidal por la conjugación de fármacos con receptores, la formación de heterodímeros los cuales activarían cascadas de señalización de los receptores acoplados a proteínas G (CB_1 y CB_2), desencadenando una acción en los receptores D1 y D2, como ha sido ya mencionado por autores como Vasant (2010)

y Limon (2014), infiriendo una excitación y liberación de dopamina al heterodímero CB₁/D2. Simultáneamente, la inhibición y no liberación de dopamina al heterodímero CB₁/D1 transmitiría una señal para sintetizar y liberar dopamina al globus pallidus interno y STN (núcleo subtalamico), promoviendo así la correcta inhibición del talamo, lo cual es el objetivo que se busca el disminuir gradualmente los síntomas característicos de la EP, como son los síntomas motores (temblores, rigidez, etc). Además de esto, la posible producción de NADA y activación de los receptores TRPV1, los cuales son exclusivamente localizados a nivel de SNpc y juegan un papel importante en esta transmisión, puede contribuir a la neuroprotección; sin embargo, lo antes visto por Morgese en el 2007 y 2014 no solo pone en perspectiva a los TRPV1, sino también a los receptores PPAR γ , siendo estos en los últimos años muy estudiados ya que su activación y acción a nivel nuclear puede añadir protección por diferentes vías antioxidantes, antiinflamatorias y anti-excitotóxicas, principalmente a través del aumento de factores antioxidantes y neurotróficos como BDNF, Interleucina 10, TGF- β y Nrf2. (Morgese et al., 2007, A. A. Martínez et al., 2014, Vasant et al., 2010 y Muñoz-Arenas., 2014).

Ante estas posibles interacciones se podría sumar la activación de receptores NMDA generado por una dependencia de cannabinoide LTD (depresión sináptica de largo plazo) la cual nos provee de dos vías de acción; 1) el estado inhibido o inactivado de los receptores NMDA permiten una recaptura de dopamina en la vía directa lo cual facilitarían la producción de movimientos motores, 2) en contraste, en el momento en el cual el receptor NMDA es activado produce un efecto LTD en la sinapsis, disminuyendo el movimiento motor en los organismos, esto apoyaría la teoría de acción hetero reguladora entre el SE y la vía nigroestriatal. (Aceves J. et al., 2016).

Por último, la activación de receptores CB₁ y CB₂ y el posible rol que se tiene en las células gliales (astrocitos y microglía) podría convocar diversas acciones tras el estímulo por endocannabinoides, que a su vez podría producir una disminución en enzimas y metabolitos pro-oxidantes como son iNOS, COX-2, citosinas pro-inflamatorias, o un aumento en vías de proliferación y sobrevivencia celular como lo es TGF- β , SOD, y BDNF, por mencionar algunos. (Vasant et al., 2010).

Estas diferentes vías y acciones pueden verse como un conjunto de rutas que permiten el "entrecruzamiento" entre el sistema endocannabinoide y la síntesis y liberación de dopamina, además de la posible vía de acciones anti-inflamatorias, anti-oxidantes y anti-excitotóxicas, las cuales proveen a un organismo de protección contra enfermedades degenerativas. Es de suma importancia tener como objetivo el estudiar e investigar a fondo este sistema (SE) y su implicación e importancia en las enfermedades del SNC, particularmente de la enfermedad de Parkinson, promoviendo un campo amplio de oportunidad, además de dejar en claro que hace falta la investigación de diferentes componentes de este sistema y de sus acciones (neurotransmisión, activación, cascadas de señalización, etc.).

11. Conclusión

- ❖ El tratamiento crónico con URB597 disminuye la conducta de giro en ratas lesionadas con 6-OHDA en la vía nigroestriatal.
- ❖ El tratamiento crónico con URB597 incrementa parcialmente la inmunoreactividad de TH en la SNpc de ratas lesionadas con 6-OHDA.
- ❖ El tratamiento con URB597 activa parcialmente el SE de ratas lesionadas con 6-OHDA.
- ❖ El tratamiento con URB597 induce un efecto neuroprotector en un modelo de lesión con 6-OHDA en la vía nigroestriatal.

12. Bibliografía:

- Aceves J., et al., 2016. Bidirectional plasticity in striatonigral synapses: A switch to balance direct and indirect basal ganglia pathways. *Learn & memory*. 18:764–773.
- Akopian AN., et al., 2008. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral anti nociception and antihyperalgesia. *Trends in Pharmacology Science*.
- Alarcón A., et al. 2010. Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y Disfunción Mitocondrial. *REB* 29(3): 92-100.
- Arencibia M., et al. 2009. Cannabinoids and Parkinson's Disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, Vol. 8, No 6. 432-439
- Ashton JC. et al., 2006. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neuroscience Letters*;396(2):113–6.
- Ashton JC., et al., 2007. The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Current Neuropharmacology*, 5(2):73-80.
- Betarbet, et al. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3:1301–1306.
- Bisogno T., et al. 2000. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochemical Journal*, 351 Pt 3:817-24.
- Blum D, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65, 135-172.
- Bosier B., et al. 2013. The FAAH inhibitor URB597 efficiently reduces tyrosine hydroxylase expression through CB1- and FAAH-independent mechanisms. *British Journal of Pharmacology* 169. 794–807
- Bouaboula M., et al. 2005. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *European Journal of Pharmacology*, 11;517(3):174-81.
- Calabrese V., et al. 2010. Cellular Stress Responses, The Hormesis Paradigm, and Vitagenes: Novel Targets for Therapeutic Intervention in Neurodegeneration, Volume 13, No 11. 1764-1811.
- Caterina MJ., et al. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389:816–24.

- Chavéz-León., et al. 2013. La enfermedad de Parkinson: neurología para psiquiatras. *Archivo Salud Mental*, 36:315-324.
- Chio JS., et al. 2009. AMP-activated protein kinase is activated in Parkinson's disease models mediated by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391:147-151.
- Cimini A., et al. 2005. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. *Neuroscience*, 130(2):325–37.
- Dalle-Donne I., et al. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329. 23–38.
- Di Filippo., et al. 2008. The Endocannabinoid System in Parkinson's Disease. *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 14, No. 003. 1-10
- Di Iorio G., et al. 2013. The Endocannabinoid System: A Putative Role in Neurodegenerative Diseases. *International Journal High Risk Behaviors and Addicttion*, December; 2(3): 100-6.
- Felder CC., et al. 1996. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Letters*, 393:231-235.
- Fernández-Ruiz J., et al. 2011. Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *British Journal of Pharmacology* 163. 1365–1378.
- Fernández-Ruiz J., et al. 2008. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Molecular Cell Endocrinology*, 286:S91-6.
- Fernández-Ruiz J., et al. 2007. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(1):39-45.
- Fernández-Ruiz J. 2009. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *British Journal of Pharmacology* 156, 1029–1040
- Fernández-Ruiz J., et al.,2015. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others. *Endocannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology*, 231. 233-259
- Fernández-Ruiz J., et al. 2011. Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *British Journal of Pharmacology* 163. 1365–1378
- Gaoni Y., et al. 1964. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of Hashish. *Journal of the American Chemistry Society*, 86:1646-1647.
- García C., et al. 2015. Cannabinoid-dopamine interactions in the physiology and physiopathology of the basal ganglia. *British Journal of Pharmacology*, 13215. 1-11.
- Giuffrida A., et al. 2010. In vivo pharmacology of endocannabinoids and their metabolic inhibitors: therapeutic implications in Parkinson's disease

and abuse liability. Prostaglandins Other Lipid Mediators, April, 91(3-4): 90–103

- Glass M., et al. 1997. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, 77:299-318.
- Glass M., et al. 1997. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, 77:299-318.
- Gonsiorek W., et al. 2000. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Molecular Pharmacology*, 57(5):1045-50.
- Gonzalez-Aparicio., et al. 2016. The systemic administration of oleoylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17, 455–468.
- Grotenhermen F. 2005. Cannabinoids. *CNS & Neurological Disorders-Drugs Targets*, 4(5):507-30.
- Grotenhermen F. 2006. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*;1(1):10-14.
- Guzman M., et al., Endocannabinoides: un nuevo sistema de comunicación del cerebro. Madrid, España. 177-196
- Hanus L., et al. 2001. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7):3662-5.
- Hernández-Montiel H. 2006. Enfermedad de Parkinson: aspectos moleculares, terapia restaurativa y neuroprotección. *Archivo Neurociencia (Mex)*; 11:100-11.
- Howlett AC., et al. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, 54, 161-202.
- Howlett AC. 1984. Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantadol compounds. *Life Sciences*, 35(17):1803-10.
- Howlett AC. 2004. Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *British Journal*.
- Huang SM., et al. 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12):8400-5.
- Hussain A., et al. 2015. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 74. 101–110
- Jayamanne A., et al. Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *British Journal of Pharmacology* 147, 281–288.

- Lopez S., et al. 2008. Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Revista Facultad de Medicina, UNAM* Vol. 51 No. 3 Mayo-Junio. 104-107
- Martínez C., et al. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *MG Rev Fac Med UNAM* Vol.46 No.6 Noviembre-Diciembre. 229-235
- Martinez A., et al., 2014. Activation of PPAR gamma receptors reduces levodopa-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. *Neurobiology Disease*, 1-10.
- Mechoulam R., et al. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50:83-90.
- Méndez M., et al. 2008. Mighty cannabinoids: A potential pharmacological tool in medicine. *Neural Mechanisms of Action of Drugs of Abuse and Natural Reinforcers*. India.
- Milman G., et al. 2006. N-arachidonoyl L-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7):2428-33.
- Moran MM., et al. 2004. TRP ion channels in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(3):362–9.
- Moreno S., et al. 2004. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 123(1):131–45.
- Morgese M.G., et al., 2007. Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB(1) and TRPV1 receptors. *Experimental Neurology*, 208 (1), 110–119.
- Mounsey B., et al. 2015. Increasing levels of the endocannabinoid 2-AG is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 273. 36–44.
- Muñoz-Arenas G, Limón ID, et al. 2014. Cannabinoid CB₁ receptors activation and coactivation with D2 receptors modulate GABAergic neurotransmission in the globus pallidus and increase motor asymmetry. *Synapse*, 69(3): 103-14.
- Munro S., et al. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441):61-5.
- Niso-Santano M., et al. 2010. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 is a key factor in paraquat-induced cell death: Modulation by the Nrf2/Trx axis. *Free Radical Biology & Medicine*, 48:1370-1381.
- Parra-Cid C., et al. 2014. An enteric nervous system progenitor cell implant promotes a behavioral and neurochemical improvement in rats with a 6-OHDA-induced lesion. *Neurotoxicology and Teratology* 43. 45–50
- Patapoutian A., et al. 2009. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(1):55–68.

- Pedroza R., Regulación del núcleo accumbens, a través del sistema endocannabinoide, en el condicionamiento de miedo. (tesis doctoral), Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Pelicão R., et al. 2016. URB597 inhibits oxidative stress induced by alcohol bingeing in the prefrontal cortex of adolescent rats. *Neuroscience Letters*.
- Pertwee RG. 1999. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Current Medicinal Chemistry*, 6(8):635-64.
- Pinto C., et al. 2010. Effect of (-)-D9-tetrahydrocannabinoid on the hepatic redox state of mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, March 2010, Volume 43(4) 325-329
- Piomelli D., et al. 2006. Pharmacological Profile of the Selective FAAH Inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Reviews* Vol. 12, No. 1, pp. 21–38
- Przedborski S, Ischiropoulos H. 2005. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7:685–693.
- Ramirez BG., et al. 2005. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglia activation. *The Journal of Neuroscience*, 25(8):1904–13.
- Robledo Y. Rescate de la función mitocondrial y la actividad antioxidante en sinaptosomas en dos modelos in vivo de la enfermedad de Huntington: QUIN y 3-NP. (Tesis de pregrado), Universidad Nacional Autónoma de México, México, Ciudad de México.
- Ryberg E., et al. 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, 152(7):1092-101.
- S M.L. 2005. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *The Journal of Neuroscience*, 25:1904-1913.
- Sastre C. Estudio neuropatológico y funcional del sistema endocannabinoide glial en proceso neuroinflamatorios. (tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Sawzdargo M., et al. 1999. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Research; Molecular Brain Research*, 64(2):1938.
- Schmid PC., et al. 1997. Anandamide and other N-acyl ethanolamine in mouse peritoneal macrophages. *Chemistry Physics Lipids*, 87:103-110.
- Starowicz K., et al. 2007. Tonic vanilloid facilitation of glutamate release in brain stem descending anti-nociceptive pathways. *The Journal of Neuroscience*, 27(50):13739–49.
- Sugiura T., et al. 2006. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Progress in Lipid Research*, 45(5):405-46.

- Sugiura T., et al. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(1):89-97.
- Sun Y, Bennett A. 2007. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Research*, 23513.
- van der Stelt M. 2002. Acute neuronal injury, excitotoxicity, and the endocannabinoid system. *Molecular Biology*, Vol. 26. 317-346.
- Van Sickle MD., et al. 2005. Identification and functional characterization of brain stem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310(5746):329–32.
- Vasant S., et al. 2015. Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection. *Molecular Degeneration*, 10:17.
- Walsh S., et al. 2010. Loss of cannabinoid CB1 receptor expression in the 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal terminal lesion model of Parkinson's disease in the rat. *Brain Research Bulletin*, 81(6): 543–548
- Walter L, Stella N. 2003. Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia*, 44:85-90.
- Walter L, Stella N. 2004. Cannabinoids and neuroinflammation. *British Journal of Pharmacology*, 141(5):775–85.
- Zhang X., et al. 2010. Region-specific protein abundance changes in the brain of MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *Journal of Proteome Research*, 9:1496-1509.
- Zygmunt PM., et al. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400:452-457.