



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA

PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA  
ACCIÓN NEUROPROTECTORA DE CANNABINOIDES EN LA  
MUERTE NEURONAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN NEUROCIENCIAS

P R E S E N T A :

MICHELLE MARTÍNEZ PÉREZ

Asesor

JULIO MORÁN ANDRADE

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2023



NEUROCIENCIAS  
UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



## **Agradecimientos**

Este trabajo estuvo financiado por los proyectos No. 285184 de CONAHCyT y IN216422 de DGAPA-PAPIIT.

Agradezco a mi equipo de compañeros del laboratorio BL-301, al Doctor Julio Eduardo Morán Andrade y a María Guadalupe Domínguez Macauzet, por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización del trabajo experimental, sin las cuales no pudiera haberse realizado este proyecto.

*A mi madre y a mi hermana, las que siempre me han brindado su apoyo en todos los sentidos, que creyeron en mí más que nadie al estudiar esta carrera, y a las que les debo todo lo que soy.*

*A mis amigos que conocí en esta carrera, sin los cuales no hubiera podido llegar hasta el final, que me han acompañado y reconfortado en cada momento. Ustedes son como mi familia.*

# Contenido

Abreviaturas .....	6
Resumen.....	9
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Marco Teórico .....	10
<b>Muerte Celular</b> .....	10
<i>Apoptosis</i> .....	11
<i>Necrosis</i> .....	11
<i>Oncosis</i> .....	12
<i>Autofagia</i> .....	13
<i>Piroptosis</i> .....	14
<i>Necroptosis</i> .....	15
<b>Excitotoxicidad en muerte celular</b> .....	16
<i>Mecanismos moleculares de la excitotoxicidad</i> .....	16
<i>Papel de la NOX en la excitotoxicidad</i> .....	17
<i>Papel de la mitocondria en la excitotoxicidad y producción de ERO</i> .....	18
<b>Cannabinoides</b> .....	19
<i>Cannabinoides y muerte celular</i> .....	20
<b><i>Cannabinoides como tratamiento clínico en patologías asociadas a muerte neuronal</i></b> .....	21
<i>Cannabinoides en tratamiento de Enfermedad de Alzheimer</i> .....	22
<i>Cannabinoides en tratamiento de Enfermedad de Parkinson</i> .....	22
<i>Cannabinoides en tratamiento de Enfermedad de Huntington</i> .....	23
<i>Cannabinoides en tratamiento de Esclerosis Lateral Amiotrófica</i> .....	24
<i>Cannabinoides en isquemia</i> .....	26
<i>Cannabinoides en enfermedades neuropsiquiátricas</i> .....	27
<i>Cannabinoides y patologías cerebelares</i> .....	28
<b>Antecedentes</b> .....	29
<i>Mecanismos moleculares de la neuroprotección por cannabinoides</i> .....	29
<i>Cannabinoides y mitocondria</i> .....	31
<i>Cannabinoides y ERO</i> .....	32

Cannabinoides y excitotoxicidad.....	34
<i>Cannabinoides, excitotoxicidad y NOX</i> .....	36
<i>Cannabinoides y células granulares de cerebelo</i> .....	37
Hipótesis.....	38
Objetivos.....	39
<i>Objetivo general</i> .....	39
<i>Objetivos específicos</i> .....	39
Metodología .....	39
<i>Modelo experimental</i> .....	39
<i>Animales</i> .....	39
<i>Activación y bloqueo del receptor CB1 y muerte excitotóxica</i> .....	40
<i>Viabilidad Celular</i> .....	41
<i>Determinación de las ERO</i> .....	41
<i>Medición de la actividad de NOX</i> .....	42
<i>Análisis estadístico</i> .....	42
Resultados .....	42
• Curva de concentración de glutamato y excitotoxicidad.....	42
• Curva de concentración ACEA y AM-251 y excitotoxicidad.....	43
• Efecto combinado de ACEA y AM-251 en la muerte por excitotoxicidad .....	45
• Efecto de un agonista y un antagonista del receptor CB1 en la producción de especies reactivas del oxígeno en condiciones de muerte por excitotoxicidad.....	50
• Efecto de la estimulación del receptor CB1 en la activación de la enzima NADPH-oxidasa por condiciones de muerte por excitotoxicidad.....	53
Conclusiones y perspectivas.....	57
Referencias .....	58

## Abreviaturas

2-araquidonil glicerol (2-AG)

Accidente Cerebro Vascular (ACV)

Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Ácido quinolínico (QUIN)

Adenil trifosfato (ATP)

Anandamida (AEA)

Araquidonil-2-etilamida (ACEA)

B-cell lymphoma 2 (BCL-2)

Cadena de Transporte de Electrones (CTE)

Canales de potencial receptor transitorio (TRP por sus siglas en inglés)

Cannabidiol (CBD)

Componentes Lisosomales ligados a Endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares (LE/MVBs)

Depresión a largo plazo (LTD)

Dihidroetidio (DHE)

Dimetil sulfóxido (DMSO)

Dominio de quinasa de linaje mixto (MLKL)

Dominio Proteínico de Muerte Asociado a Fas (FADD)

Enzima poli-ADP-ribosa Polimerasa (PARP)

Error Estándar (EE)

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN)

Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Estreptozotocina (STZ)

Extracto de *Cannabis sativa* L. (ECS)

Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1)

Factor de Necrosis Tumoral (TNF)

Factores asociados a TNFR (TRAF, por sus siglas en inglés)

Inhibidores celulares de la proteína de apoptosis (cIAP)

Kainato (KA)

Monoacilglicerol lipasa (MAGL)

Monoamina oxidasa (MAO)

Muerte Celular inmunogénica (ICD, por sus siglas en inglés)

NADPH Oxigenasa (NOX)

N-araquidonilfenolamina (AM404)

Neuronas Granulares de Cerebelo (NGC)

NO sintasa (nNOS)

N-terminal (NT)

Oclusión de la arteria cerebral media (MCAo)

Oleamida (ODA)

Óxido Nítrico (NO)

Óxido nítrico sintasa (NOS)

PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos)

Patrones Moleculares Asociados a Daños (DAMP)

Peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)

Poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP)

Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP)

Potenciación a largo plazo (LTP)

Proteína 8 con dominio de reclutamiento de caspasa (CARD8, por sus siglas en inglés)

Proteína de cilindromatosis (CYLD, por sus siglas en inglés)

Proteína quinasa C (PKC)

Proteínas gsdemina D ejecutoras de piroptosis (GSDMD)

Receptor 1 de factor de necrosis tumoral (TNFR1)

Receptor Cannabinoide tipo 1 (CB1)

Receptor cannabinoide tipo 2 (CB2)

Receptor tipo Toll 3 (TLR3)

Receptor tipo Toll 4 (TLR4)

Receptores tipo NOD (NLRs, por sus siglas en inglés)



Serina/treonina-proteína quinasa 1 que interactúa con el receptor (RIPK1)

Serina/treonina-proteína quinasa 3 que interactúa con el receptor (RIPK3)

Sistema Endocannabinoide (SEC)

Sistema Nervioso Central (SNC)

Yoduro de propidio (IP)

$\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC)

$\Delta^9$ -tetrahidrocannabivarin ( $\Delta^9$ -THCV)

## Resumen

El Sistema Endocannabinoide (SEC) se encuentra en gran abundancia en el Sistema Nervioso Central (SNC) y se ha visto involucrado en varios procesos biológicos importantes relacionados con la neuroprotección, la muerte celular, la neuroinflamación y la neuroexcitotoxicidad, todos ellos relacionados con las enfermedades neurodegenerativas. El SEC y sus componentes han demostrado tener efecto protector en estas enfermedades, aunque aún se desconoce por completo el mecanismo por el que actúan. En este trabajo buscamos identificar si existe efecto neuroprotector en casos de neuroexcitotoxicidad inducida por el tratamiento con glutamato en neuronas granulares de cerebelo (NGC), y si este está relacionado con las especies reactivas de oxígeno (ERO), en especial con una de sus fuentes, la enzima NOX (NADPH Oxidasa). Para ello se utilizó un agonista selectivo del receptor cannabinoide de tipo 1 (CB1), Araquidonil-2-cloretilamida (ACEA) y un agonista inverso de este receptor, AM-251. Los resultados indicaron que ACEA mejora la viabilidad en comparación con el grupo de glutamato, al ser coadministrado con este último, y que AM-251 contrarresta este efecto al ser administrado con glutamato, pero no al ser coadministrado con ACEA. Así mismo, ACEA logra disminuir la producción de ERO, aunque no de manera significativa, y lo mismo ocurre con la actividad de la enzima NOX. En contraste, AM-251 aumentó de manera significativa la actividad de NOX, incluso sin ser coadministrado con glutamato, sugiriendo que el bloqueo de CB1 tiene un efecto directo sobre dicha actividad. Estos resultados sugieren una relevancia de estos componentes, por lo que podrían ser utilizados como blancos terapéuticos en el futuro, aunque hacen falta más estudios al respecto.

## Abstract

The endocannabinoid system (ECS) has been gaining attention in the studies of the Nervous Central System (NCS) because it's found in most of it in great abundance, which involves it in many biological processes of importance, some of them being neuroprotection, cellular death, neuroinflammation and neuroexcitotoxicity, all of them taking place in neurodegenerative diseases. The ECS and its components had shown protective effect in these diseases, though it remains unknown the mechanism where they act. In this work, we tried to identify if there's a neuroprotective effect in neuroexcitotoxicity environments provoked by glutamate in granular cerebellar neurons (GCN), and if this effect is related to the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and one of its main sources, the NOX enzyme, this by applying a selective agonist of the receptor CB1, Arachidonyl-2-chlorethylamide (ACEA) and a reverse antagonist of the same receptor, AM-251. Our results showed that, ACEA could improve the viability and survival of these cells when it was coadministered with glutamate, and that AM-251 was able to counter this effect, but not when it was administered with ACEA. Our results also showed that, in relation to the ROS production, ACEA can decrease it, though it was not significant, and these also applied to the NOX activity. Nevertheless, AM-251 enhanced both the ROS production and the NOX activity, even without the coadministration of glutamate, this suggesting that the blocking of CB1 receptor has a direct effect on this activity. These results could imply that there's a relevance in these components to be used as therapeutic targets in the future, but we need to study further about how they work molecularly.

## Introducción

Entre las patologías más relevantes del sistema nervioso central se encuentran las enfermedades de Alzheimer (Hynd et al., 2004) y de Parkinson (Mironova et al., 2018), así como los eventos cerebrovasculares de tipo isquémico (Tehse et al., 2019), los cuales se encuentran entre los primeros lugares de causas de incapacidad y muerte, a nivel mundial (D'Arcy, 2019). En la mayoría de las patologías asociados a daño neurológico, el mecanismo celular consiste en un daño excitotóxico relacionado con una desregulación de la activación de los receptores sinápticos glutamatérgicos (Thapa and Jewett, 2018). El aumento en la concentración extracelular de glutamato, por un exceso de liberación o por fallas en su recaptura, promueve un daño excitotóxico que provoca muerte neuronal, así como una activación de la microglía y de astrocitos que empeora el cuadro neurológico. Todo esto, en su conjunto, lleva a una consecuente pérdida de la función cerebral (MacDermott et al, 1986; Lai et al, 2014).

Por otro lado, se ha encontrado que el sistema endocannabinoide y los fitocannabinoides pueden tener propiedades neuroprotectoras en respuesta a diversos estímulos nocivos, ayudando así a proponer terapias para el tratamiento de estas neuropatologías (Casajeros et al, 2013; Khaksar and Bigdeli, 2016). El objetivo de nuestro proyecto es investigar el mecanismo de neuroprotección de los cannabinoides y el sistema cannabinoide, particularmente evaluar la posibilidad de que compuestos ejerzan su acción protectora a través de la regulación de las ERO y una de sus fuentes, NOX.

## Marco Teórico

### Muerte Celular

La muerte celular es un proceso importante dentro del ciclo de vida de las células, y a diferencia de lo que se creía hace unas décadas, esta puede estar programada o ser accidental, y en ambos casos, inicia y se ejecuta a través de vías moleculares diferentes. Dentro de los tipos de muerte más estudiados se encuentran la apoptosis, un tipo de muerte celular programado, es decir, que está genéticamente controlado, y la necrosis, que a pesar de que se consideraba una muerte accidental, puede estar modulada por mecanismos programados en ciertas circunstancias (Hotchkiss et al., 2009). Sin embargo, recientemente se ha encontrado que hay otros tipos de muerte celular, como la piroptosis, la autofagia, la necroptosis y la oncosis, entre otros que juegan un papel importante en la fisiología y patología del SNC. La diferencia entre estos tipos de muerte se encuentra en su proceso y los aspectos morfológicos, bioquímicos y moleculares (ídem).

A pesar de que se creía que muertes como la apoptosis, necrosis y la autofagia no tenían relación entre sí, recientemente se ha encontrado que están reguladas por vías similares, que ocurren en sitios subcelulares y organelos en común y que incluso, comparten moléculas iniciadoras, efectoras y moduladoras (Nikoletopoulou et al., 2013). La regulación correcta de todos estos mecanismos es esencial para un mantenimiento correcto de la homeostasis de la célula y del organismo en general y una falla en estos mecanismos puede afectar el inicio y/o desarrollo de enfermedades como las de Alzheimer, Parkinson y cáncer (D'Arcy, 2019).

## **Apoptosis**

La apoptosis, es un tipo de muerte celular programada, en el que la muerte se encuentra controlada, sin que se afecte la homeostasis de las células vecinas. Se creía que se encontraba sólo en animales, sin embargo, esta también se ha descrito en células eucariotas. Es un tipo de muerte muy identificable, pues cuando inicial, existe una transición de la permeabilidad de la membrana, que se caracteriza por una desregulación del potencial de la membrana mitocondrial, después, ocurre una condensación de la cromatina y una fragmentación nuclear y, finalmente, ocurre un rompimiento de la célula (Kaczanowski, 2016). Ocurre de manera controlada para eliminar células específicas para el beneficio del organismo (Xu et al., 2019).

La iniciación de la apoptosis depende de la activación de las enzimas caspasas, de las cuales hay dos categorías: las caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 9) y las ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7). Las caspasas iniciadoras se encuentran como procaspasas que al activarse procesan a las caspasas ejecutoras que se activan e inician una cascada de eventos que provoca entre otros procesos, la fragmentación del ADN de la célula, a través de la activación de endonucleasas, la degradación de proteínas del núcleo celular y del citoesqueleto, la expresión de ligandos para células fagocíticas y, finalmente, de la formación de cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos pueden ser fagocitados por las células que se encuentran alrededor (D'Arcy, 2019; Fricker et al., 2018). La apoptosis también puede ser iniciada por p53, un supresor tumoral, en algunos tipos celulares, su vía apoptótica es activada por el daño en ADN, hipoxia y la expresión de algunas oncoproteínas, así como activando factores proapoptóticos como Bax, y reprimiendo la expresión de factores antiapoptóticos como BCL-2 (Xu et al., 2019).

La apoptosis puede iniciarse por la activación de la vía intrínseca, también llamada mitocondrial, a través de sensores intracelulares, esta ocurre por la oligomerización de la familia de proteínas BCL-2, Bax y Bak (Bertheloot et al., 2021), esto ocurre a través de la expresión de las proteínas BH3 que activan Bax, y esto forma poros en la membrana externa de la mitocondria, lo cual libera citocromo c, que se une a APAF-1, activando caspasa 9 y activando la vía apoptótica por caspasas (Fricker et al., 2018), o puede llevarse a cabo por la vía extrínseca que detecta señales extracelulares (Dickson, 2004). La vía extrínseca es motivada a través de la unión del factor de necrosis tumoral (TNF por sus siglas en inglés) a la superficie celular, lo cual provoca la activación del dominio proteínico de muerte asociado a Fas (FADD, por sus siglas en inglés), lo cual provoca una activación de la caspasa 8, que a su vez, activa a la proteína BH3. Además de la activación de la apoptosis por caspasa 8, TNF- $\alpha$  y Fas pueden inducirla durante la inflamación, donde se involucran también p38, óxido nítrico (NO) y las vías clásicas de apoptosis dependientes de caspasas (Fricker et al., 2018). Este tipo de muerte se ha asociado a patologías como la enfermedad de Alzheimer por un exceso de muerte o al cáncer donde ocurre una apoptosis por diferentes causas (D'Arcy, 2019), así como que ha sido de gran interés en el cáncer (Bertheloot et al., 2021).

## **Necrosis**

Hasta hace unos años, aún se creía que la necrosis era una forma de muerte celular que, a diferencia de la apoptosis, no estaba controlada ni programada, sin embargo, en años más recientes, se ha encontrado que, en algunos casos, está puede estar regulada (Hotchkiss et al., 2009). Esta es inducida por lesiones externas, como la hipoxia o la

inflamación (D'arcy, 2019). Se define como la ruptura e hinchamiento de la superficie membranal (Hotchkiss et al., 2009). Las diferencias principales entre la necrosis regulada y la no regulada, son que la regulada está genéticamente controlada e involucra procesos celulares activos que pueden ser bloqueados, mientras que la no regulada involucra procesos pasivos, que pudiesen ser imposibles de bloquearse (Fricker et al., 2018).

Los principales mediadores de la necrosis son las ERO, iones de calcio, la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), las proteasas no lisosomales activadas por calcio, o calpaínas y las catepsinas. La inhibición de PARP mitiga la necrosis en la isquemia, y el incremento de los iones de calcio activa proteasas que degradan a proteínas esenciales. Cuando la muerte por necrosis es regulada, ciertos patrones moleculares asociados a daños (DAMP por sus siglas en inglés), como la proteína HMGB1, entran a la circulación y activan a las células inmunes, provocando que las primeras células mueran por trauma o infección, alertando a las demás para activar respuestas defensivas. Además de esto, los niveles altos de TNF pueden producir necrosis. (Hotchkiss et al., 2009).

Este proceso involucra, la mayoría de las veces, la regulación activa de varias proteínas y componentes proinflamatorios que provocan la ruptura de la membrana celular, lo que ocasiona que los restos celulares se distribuyan en el tejido en el que se encuentran, resultando en una cascada de inflamación y daño del mismo tejido. Este tipo de muerte celular, cuando es no regulado, no depende de energía, pues se da por un daño repentino en la célula, como el calor, la radiación, químicos tóxicos, hipoxia, etcétera, lo que provoca que ésta deje de funcionar y se inicie el proceso inflamatorio de la necrosis (D'Arcy, 2019).

### **Oncosis**

La oncosis es un tipo de muerte neuronal que surge de una vía preletal, que termina en una muerte celular. Se sugirió este nombre y la existencia de este tipo de muerte celular en 1995, por Manjo y Joris, donde propusieron este tipo de muerte como una alternativa a la apoptosis y necrosis; se le dio este nombre debido a que el daño y muerte celular estaba acompañado de hinchamiento en la célula, un tipo de muerte accidental y contraparte de la apoptosis, que fue observada en isquemia, donde la muerte celular ocurre mayoritariamente por oncosis (Manjo y Joris, 1995). Oncosis se refiere principalmente a la fase preletal que sigue a un daño celular como isquemia o efectos de toxinas químicas (Weerasinghe y Buja, 2012).

Se caracteriza por provocar hinchamiento tanto en la célula en general como en los organelos de manera específica, así como por incrementar la permeabilidad membranal. Oncosis también se refiere como la muerte necrótica mediada por la reducción de ATP que provoca hinchamiento celular, aunque normalmente es provocada por isquemia, también puede ser inducida por la disfunción mitocondrial y consumición excesiva de ATP (Ficker et al., 2018). Se ha propuesto que la muerte por oncosis involucra daño progresivo membranal por tres etapas, en la primera, la célula se compromete al proceso oncótico como resultado del daño membranal con fugas de iones y agua debido al gasto de ATP, lo que induce un hinchamiento celular sin incrementar la permeabilidad membranal. En la etapa dos, la membrana celular empieza a volverse permeable a yoduro de propidio (IP, por sus siglas en inglés), lo que indica un incremento de la permeabilidad membranal no selectiva, permitiendo el paso de IP, en la etapa tres, ocurre finalmente la disrupción de la membrana celular y empieza la fase necrótica (Weerasinghe y Buja, 2012).

La reducción de ATP intracelular genera una falla en los canales iónicos de la membrana plasmática, ocurre el hinchamiento celular, que puede provocar la ruptura de la membrana plasmática, existe una despolarización de los canales de Na<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup>, y provoca un fallo en las bombas de Ca<sup>2+</sup>, lo que induce necrosis a través de la activación de proteasas, fosfolipasas y la transición de la permeabilidad mitocondrial (Ficker et al. 2018). Todo esto resulta en liberación de detritos celulares al exterior generando un daño en las células que se encuentran alrededor, lo que provoca un proceso inflamatorio (D'Arcy, 2019).

### **Autofagia**

La autofagia es un proceso autodegradativo importante para balancear los niveles de energía en el sistema en momentos críticos del desarrollo y en respuesta al estrés (Glick et al., 2010), esta define como el proceso en el cual, los componentes celulares como las macroproteínas u organelos completos son degradados y pueden ser reutilizados por la célula.

Aunque la autofagia se produce normalmente para reciclar componentes celulares, puede provocar la destrucción de la célula y ha sido asociada a la eliminación de células envejecidas y la destrucción de lesiones neoplásicas. Hasta la fecha se han identificado tres formas de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas, en todas se involucra la degradación proteolítica de los componentes citosólicos en el lisosoma (D'Arcy, 2019). En la macroautofagia se liberan los componentes citoplásmicos en el lisosoma a través de un autofagosoma, lo que se fusiona con el lisosoma para convertirse en un autolisosoma, se diferencia de los otros tipos de autofagia debido a que ocurre en la membrana limitante del lisosoma, e involucra la formación de vesículas citosólicas que transportan los componentes a este organelo (Parzych y Klionsky, 2014). Cuando inicia la macroautofagia, la membrana se expande y toma el nombre de fagóforo, y se pliega hasta formar un autofagosoma esférico, esta formación está regulada por el complejo Atg1-Atg13-Atg17-Atg31-Atg29 cinasa (en levaduras), en mamíferos, los homólogos a este complejo son ULK1 y ULK2, así como ATG13, estos complejos contienen proteínas vacuolares como PI3K, VPS34, PI3P (Fricker et al., 2018), estos complejos son forforilados por MTORC1. Una vez formado, se une al lisosoma y empieza la degradación (Parzych y Kionsky, 2014, Kim y Lee, 2014).

En la microautofagia, los componentes citosólicos entran directamente por el lisosoma a través de la invaginación de la membrana lisosomal (Glick et al., 2010), la microautofagia en levaduras puede degradar organelos como mitocondria, retículo endoplásmico, peroxisomas, y fragmentos nucleares. Las vías de microautofagia en mamíferos etiquetan sus componentes lisosomares ligados a endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares (LE/MVBs por sus siglas en inglés). En la microautofagia, se requiere la identificación de un motivo tipo KFERQ por HSC70, HSC70 se une a la fosfatidilserina en las membranas LE/MVB, lo que induce una internalización del sustrato al lumen por medio de invaginaciones (Fleming et al., 2022). Aún no se sabe mucho sobre la regulación de la microautofagia en mamíferos, no obstante, en *Drosophila*, se regula a través de estrés oxidativo y genotóxico (Flemig et al., 2022).

En cuanto a la autofagia mediada por las chaperonas, proteínas específicas y etiquetadas están forman un complejo con las proteínas chaperonas (Hsc-70, por ejemplo), se translocan a través de la membrana lisosomal, lo que provoca su desplegamiento y degradación (Glick et al., 2010). A diferencia de la macro y microautofagia, la autofagia

mediada por chaperonas es muy específica, y todos sus sustratos son pentapéptidos que etiquedan a motivos bioquímicos relacionados a KFERQ. Las proteínas blanco que contienen el motivo KFERQ se despliegan a través de la acción de chaperonas citosólicas y se translocan directamente a través de la membrana lisosomal, donde se degradan en el lumen. En la membrana lisosomal, el sustrato se une a los monómeros del receptor del sustrato de la autofagia mediada por chaperonas, la proteína membranal asociada a lisosoma 2A (LAMP2A, por sus siglas en inglés). Una vez que pasa esto, se estabilizan las subunidades del complejo por HSP90. El complejo de traslocación formado en el lumen lisosomal es activamente desmontado por HSPA8, y LAMP2A vuelve a su estado monomérico, donde puede iniciar este ciclo otra vez (Parzych y Klionsky, 2014). Se ha encontrado en años más recientes que las ERO y las Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN) está entre los principales transductores de señales intracelulares en la autofagia y provocan la iniciación de esta (Filomeni et al., 2015).

La autofagia puede iniciarse por distintas fuentes de estrés, como la restricción calórica o puede ser resultado de señalizaciones presentes en la diferenciación celular y la embriogénesis. También se ha demostrado que está involucrada en el sistema inmune, donde degrada patógenos intracelulares y proporciona antígenos a la célula (D'Arcy, 2019).

La autofagia y la apoptosis pueden estar divididas en dos mecanismos diferentes, los cuales pueden ocurrir al mismo tiempo o de manera secuencial. La autofagia puede promover o antagonizar la apoptosis, lo que sugiere que hay una correlación entre ambos procesos. Dependiendo del tipo de célula en el que se active, la autofagia puede actuar como una vía de supervivencia al suprimir la apoptosis, promover la cascada apoptótica o garantizar una muerte celular eficiente cuando la apoptosis tiene deficiencias y actuar como una forma de muerte celular programada. Ambos mecanismos están regulados por factores en común porque comparten componentes y uno puede regular y modificar la actividad del otro (Costa et al., 2016).

### ***Piroptosis***

El término piroptosis se acuñó en 2001, por Cookson y Brennan, pero fue en los 90s cuando ocurrieron las primeras observaciones de este tipo de muerte celular, al principio se confundió con una apoptosis, sin embargo, después se identificó como un tipo de muerte programada distinta (Ketelut-Carneiro y Fitzgerald, 2022). Es una forma alternativa de la apoptosis que se asocia a un mecanismo proinflamatorio que puede resultar de una infección, por ejemplo, generándose una activación de macrófagos y por ende la producción de citocinas que activan a la cascada apoptótica.

El evento que inicia la piroptosis es la activación de inflamomas, que activan a la caspasa-1. Los inflamomas se unen cuando los sensores celulares, como los receptores tipo NOD (NLRs, por sus siglas en inglés), entre las que se encuentran NLR1, NLR3, NLR4 (Fricker et al., 2018), pirina, o la proteína 8 con dominio de reclutamiento de caspasa (CARD8 por sus siglas en inglés), detectan DAMPs y PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos). Esto activa a la enzima efectora, caspasa-1. Una vez activada, la caspasa-1 puede anclar las proteínas gasdemina D ejecutoras de piroptosis (GSDMD) al dominio N-terminal (NT) y generar poros en la membrana celular (Ketelut-Carneiro y Fitzgerald, 2022; Du et al., 2021). Al mismo tiempo que ocurre esto, caspasa-1 también activa los precursores de IL-1 $\beta$  e IL-18, que se filtran por los poros e inducen, finalmente, la piroptosis (Du et al., 2021). A pesar de que caspasa-1 es considerada la enzima iniciadora

principal de la piroptosis, las caspasa-11/4/5 también se relacionan a este tipo de muerte (Yu et al., 2021).

A diferencia de la apoptosis típica, en la piroptosis se mantiene la integridad del núcleo, pero sigue habiendo condensación nuclear. Una característica importante es que, en la piroptosis, la célula se hincha y aparecen protrusiones en la superficie de la membrana celular que asemejan a burbujas antes de su ruptura, caspasa-3 es importante para este proceso, además de esto, en la piroptosis ocurre un aplanamiento del citoplasma debido a la fuga en la membrana plasmática (Yu et al., 2021). Este tipo de muerte celular se ha observado en el sistema nervioso central y en el sistema cardiovascular (D'Arcy, 2019).

### ***Necroptosis***

La necroptosis fue introducida por primera vez en 2005 por el grupo de trabajo de Degterev, y es un tipo de muerte celular inmunogénica (ICD, por sus siglas en inglés), en la que receptores de muerte específicos, como FAS y TNFR1 (receptor 1 de factor de necrosis tumoral), cuya activación ocurre por  $TNF\alpha$ , entre otros, que se encargan de reconocer señales no favorables del microambiente intra y extracelular para así, iniciar la necroptosis (Gao et al., 2022). Entre los otros receptores que provocan la necroptosis se encuentran los receptores tipo Toll (TLR4 y TLR3) y los sensores citosólicos de ácidos nucleicos como RIG-I y STING, que inducen al interferón tipo I, la serina/treonina proteína quinasa 3 que interactúa con el receptor (RIPK3, por sus siglas en inglés) y MLKL (dominio de quinasa de linaje mixto), así como la producción de  $TNF\alpha$ , desencadenando así la necroptosis en un bucle autocrino retroalimentativo. La mayoría de las vías activadoras de necroptosis desencadenan señales proinflamatorias y prosupervivencia dependientes de NF $\kappa$ B (Bertheloot et al., 2020). Al inicio de la necroptosis, serina/treonina-proteína quinasa 1 que interactúa con el receptor (RIPK1) fosforila y activa RIPK3, que fosforila y activa MLKL, formando un complejo llamado necrosoma, que, al activarse, oligomeriza y fosforila MLKL en la membrana plasmática, causando ruptura celular y necrosis (Fricker et al., 2018).

Cuando la necroptosis inicia por TNFR1, se forma un complejo I en el lado citosólico de este receptor, compuesto de TRADD, FADD, RIPK1 y TRAF (factores asociados a TNFR), así como también inhibidores celulares de la proteína de apoptosis 1 y 2 (cIAP1 y cIAP2). Cada componente del complejo tiene su propia función, TRAF ubiquitina y estabiliza RIPK1 en la membrana plasmática, FADD recluta a la procaspasa-8, y RIPK1 moviliza RIPK3, aquí es donde la célula se compromete a uno de tres destinos: el primero, si RIPK1 se ubiquitina, la muerte celular no ocurre. En cambio, si la inhibición de cIAP en conjunto con la desubiquitinación de RIPK1 por medio de la proteína de cilindromatosis (CYLD, por sus siglas en inglés) ocurre o si RIPK3 está ausente o presente en niveles bajos, RIPK1 deja de formar parte del complejo I y forma un complejo II, con FADD y TRADD, activando así a caspasa-8 y provocando apoptosis (Ketelut-Carneiro y Fitzgerald, 2022).

La necroptosis es en sí, un tipo de necrosis que está altamente regulada, controlada generalmente en un ambiente deficiente de apoptosis por las enzimas RIPK1, RIPK3 y MLKL (D'Arcy, 2019). Es un tipo de muerte celular relevante en la neurodegeneración y neuropatologías (Fricker et al., 2018 (D'Arcy, 2019).



## Excitotoxicidad en muerte celular

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro, por lo mismo, está muy establecido su papel en la postsinapsis a través de sus receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Su acción termina al ser removido por los transportadores de glutamato, y por los astrocitos, donde se recicla para pasar a las neuronas presinápticas a través del ciclo glutamato-glutamina, su neurotransmisión está mediada por el flujo de  $\text{Na}^+$  a través de los receptores AMPA, y la interacción de los receptores NMDA y AMPA, participan en procesos como la Potenciación a Largo Plazo y la Depresión a Largo Plazo (LTP y LTD, respectivamente), donde se regula el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Rueda et al., 2016).

Durante la excitotoxicidad hay una activación excesiva de los receptores de glutamato, que provoca una liberación excesiva del neurotransmisor, desregulación en la recaptura y degradación de este, lo que provoca daño neuronal. Las vías de señalización iniciadas por la acción rápida del glutamato e involucradas en la plasticidad y supervivencia celular, se ven afectadas por el exceso de producción de  $\text{Ca}^{2+}$ , este desregulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo genera radicales libres y estrés oxidativo, pues se provoca una desregulación de la recaptura de este ion en la mitocondria, desencadenando fallas en la producción de ERO y una disrupción de los gradientes iónicos transmembranales, causando una limitación en la producción de ATP, pues existe una falla en la CTE (cadena transportadora de electrones), lo que no permite la correcta función de las bombas iónicas en la membrana celular, ocurre un colapso en los gradientes electroquímicos transmembranales, se pierde la función nerviosa y, finalmente, muerte celular, ya sea por apoptosis o por necrosis (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017; Rueda et al., 2016) o algunos de los otros tipos de muerte descritos arriba. El tipo de muerte que se presente dependerá de la causa que la origine, así como del contexto celular donde ocurra.

La muerte excitotóxica involucra, además, la producción temprana de ERO que parece tener una acción de regulación redox de las vías de señalización temprana involucradas en la muerte (Valencia y Moran, 2001). Se sabe también que una de las fuentes primarias de estas ERO es el complejo de NADPH-oxidasas (NOX). Finalmente, un elemento que participa en el proceso global de la muerte neuronal es la activación de procesos neuroinflamatorios, lo que desencadena una serie de respuestas celulares y moleculares que provocan a su vez más degeneración axonal y muerte neuronal adicional (Olloquequi et al., 2018).

### ***Mecanismos moleculares de la excitotoxicidad***

El estrés oxidativo es uno de los eventos dañinos más relevantes de la excitotoxicidad; es un proceso en el cual los sistemas antioxidantes de la neurona se rebasan por las especies reactivas de oxígeno, lo cual puede ocasionar daño oxidativo a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Olloquequi et al., 2018).

Además de las ERO, también se generan ERN, las cuales se producen de manera directa por la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), enzima encargada de sintetizar NO, a través de niveles altos de  $\text{Ca}^{2+}$  que se dan después del aumento de glutamato. Una vez que el NO es sintetizado, puede reaccionar con radicales superóxidos para crear un agente radical fuertemente oxidante y nitrante, el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que tiene la capacidad de iniciar una gran cantidad de reacciones tóxicas y oxidantes en la célula, entre ellas la peroxidación de lípidos, rompimiento de ADN, inhibición de las enzimas

de la cadena respiratoria en la mitocondria, la inactivación de canales de  $\text{Na}^+$  y la inhibición de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Se ha demostrado en estudios recientes que, a pesar de que la producción de ERO involucra a la mitocondria, la principal fuente de estos compuestos es una NOX (Olloquequi et al., 2018).

Por otro lado, el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma provoca un aumento de la entrada de este ion a la mitocondria, lo que provoca un aumento en la generación de radicales libres y la apertura de un poro inespecífico en la membrana mitocondrial, conocido como el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP). La apertura del mPTP provoca que una disrupción de los gradientes mitocondriales entre la mitocondria y el citosol, así como un aumento anormal y acumulativo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto provoca depleción del ATP e incremento en la generación de ERO y empieza la cascada de caspasas, lo cual deriva en daño al ADN y finalmente, muerte celular (Olloquequi et al., 2018).

A pesar de que la excitotoxicidad dependiente de glutamato es la más común y la más estudiada, existe la excitotoxicidad independiente de glutamato, que al igual que la primera, resulta de una excitación excesiva de las neuronas que lleva a una entrada masiva de calcio. Esta excitación ocurre sin necesidad de que haya un aumento del neurotransmisor glutamato, aunque sigue activando las mismas vías de muerte celular inducidas por calcio. Aunque la excitotoxicidad dependiente de glutamato es el principal mecanismo de apoptosis neuronal, la excitotoxicidad independiente de glutamato también contribuye a la muerte neuronal (Tehse et al., 2018). Esto apoya la idea de que la muerte excitotóxica requiere un incremento temprano de calcio intracelular.

Este tipo de excitotoxicidad opera a través de mecanismos distintos que incluye la activación de los receptores NMDA independiente de glutamato, la mecanoporación de las membranas neuronales y la liberación intracelular de calcio a partir de las reservas intracelulares de este ion, entre otros (Tehse et al., 2018).

### ***Papel de la NOX en la excitotoxicidad***

A pesar de que se cree que las ERO pueden ser letales para las células bajo ciertas condiciones, éstas son necesarias para la regulación del estado redox y para la señalización de las funciones fisiológicas. Algunos procesos que involucran a las ERO incluyen el envejecimiento celular y la adaptación de la célula a los cambios ambientales. La resultante de la amplia gama de acción de las ERO depende del contexto celular, la selectividad de las ERO, de su compartimentalización y su concentración local. Estas circunstancias determinarán una acción señalizadora o dañina de las ERO (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017).

Más allá de la producción ERO en la fisiología celular, las NOX son la principal responsable del estrés oxidativo en las patologías neurológicas. Estas enzimas se encargan de regular la señalización neuronal y están involucradas en el procesamiento de la memoria y la homeostasis cardiovascular central. Sin embargo, cuando hay una producción excesiva de NOX se genera una condición de neurotoxicidad y neurodegeneración, entre otros, y se ha visto relacionada con un papel importante en enfermedades neurodegenerativas y en el traumatismo craneoencefálico (Barua et al., 2016).

Esta enzima produce ERO a partir del oxígeno molecular como sustrato. Hasta la fecha, se han encontrado 7 homólogos de NOX, de los cuales son los más predominantes la NOX2, NOX1 y NOX4. Estos homólogos están extensamente distribuidos en la corteza, hipocampo y cerebelo (Barua et al., 2016). Las NOX producen superóxido a través de la transferencia los electrones de NADPH dentro de la célula a través de la membrana plasmática y los combina con el oxígeno molecular para formar el  $O_2^-$ .

Se ha sugerido que las ERO mitocondriales y las ERO producidas por las NOX (NOX-ERO) están interrelacionadas entre sí y pueden incrementar la producción de la otra. Tanto las ERO mitocondriales como las producidas por NOX-ERO están relacionadas con el sistema endoplásmico y, son muy específicas tanto en funciones como en señalización. La interacción entre ambos contribuye a un ciclo de retroalimentación positiva, donde las ERO mitocondriales promueven la producción de las NOX-ERO.

### ***Papel de la mitocondria en la excitotoxicidad y producción de ERO***

En condiciones fisiológicas normales, la mitocondria contribuye a la recuperación postesimuladora rápida de  $Ca^{2+}$  al tomar cantidades grandes de este, para después liberarlo de manera gradual al citosol. La mitocondria también ayuda a la recaptura de  $Ca^{2+}$  a través de las bombas de  $Ca^{2+}$  dependientes de ATP, así como con el complejo proteínico uniportador mitocondrial de  $Ca^{2+}$  (MCU, por sus siglas en inglés) (Verma et al., 2022).

La generación de ERO en la mitocondria ocurre debido a la oxidación de intermediarios metabólicos de CTE y está regulada para prevenir el daño oxidativo en los procesos celulares. Las ERO mitocondriales son producidas en la CTE en forma de superóxido, mayormente en el complejo I, aunque no se descarta la producción de estas por medio de otro complejo de la CTE. Las ERO citosólicas, ya sea generadas por mitocondria o por NOX, pueden estimular una producción de ERO adicional a través de la activación de las isoformas de la proteína quinasa C (PKC). La activación de PKC y de quinasas de la familia Src por las ERO mitocondriales derivan a la producción de NOX2 (Dunn et al., 2015).

En las células endoteliales vasculares, las ERO producidas por NOX2 en respuesta a la señalización de la angiotensina II, incrementan la producción de ERO mitocondriales de forma ríto abajo a través de la activación de PKC del canal mitocondrial de  $K^+$  sensible a ATP (Dunn et al., 2015). Además de la CTE, la mitocondria puede producir ERO a través de la enzima monoamina oxidasa (MAO) y la citocromo b5 reductasa (Angelova y Abramov, 2018).

La mayor producción de ERO ocurre en la mitocondria, esto provoca que la mitocondria sea blanco de la exposición elevada de ERO, teniendo consecuencias de muerte celular, principalmente por excitotoxicidad, la cual genera daño en el ADN mitocondrial (Sinha et al., 2013). Los mecanismos de excitotoxicidad están fuerte conectados a la función mitocondrial, entre los que se incluye la activación de la NO sintasa (nNOS), esto en consecuencia de la estimulación de los receptores ionotrópicos NMDA. Esto es facilitado al cerrar la yuxtaposición espacial de los receptores NMDA con nNOS a través de la proteína PSD-95, que provoca que nNOS se vea expuesto a los microdominios  $Ca^{2+}$  y se active. Los mecanismos del daño mediado por NO también pueden incluir la inhibición del complejo IV de la CTE. Otro contribuidor de la excitotoxicidad es la NOX, la cual cataliza la producción de los radicales libres de superóxido, así como también la

poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), la cual se activa al haber una ruptura de ADN, usualmente causada por niveles altos de superóxido, al haber una sobreactivación de PARP, existe un consumo de las reservas de NAD<sup>+</sup> intracelular, que provoca un fallo en la glucólisis, provocando una despolarización mitocondrial y un colapso energético (Sihna et al, 2013; Plotegher et al., 2021). La sobre carga de Ca<sup>2+</sup> (Nicholls y Budd, 1998; Plotegher et al., 2021), y la apertura del mPTP también están involucrados en los procesos excitotóxicos. Estos mecanismos ocurren a niveles altos de concentración de glutamato, que causan una cascada patológica de muerte neuronal (Plotegher et al., 2021).

### **Cannabinoides**

El término cannabinoide se refiere a un grupo heterogéneo de compuestos clasificados en tres grupos: endógenos, sintéticos y fitocannabinoides. Los fitocannabinoides son sustancias terpenofenólicas derivadas de la planta *Cannabis sativa*. Esta planta produce al menos 66 compuestos bioactivos, de los cuales los más importantes son el Δ<sup>9</sup>-tetrahidrocannabinol (THC), el cual es responsable de sus efectos psicotrópicos, y el cannabidiol (CBD), que es el componente no-psicotrópico más abundante en la planta (Campos et al., 2016).

El CBD es el compuesto más importante por sus propiedades terapéuticas y por tener potencial como fármaco, pues tiene acciones ansiolíticas, antidepresivas, neuroprotectoras, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Particularmente, el CBD disminuye la producción de las citocinas inflamatorias, la activación de la microglía y la infiltración de leucocitos en el cerebro. Actualmente está siendo utilizado en pruebas clínicas en conjunto con otros cannabinoides, en especial el THC, para investigar su funcionamiento en esquizofrenia, la enfermedad de Huntington, la esclerosis múltiple y el traumatismo craneoencefálico de tipo isquémicos (Accidente Cerebro Vascular, AVC). Sin embargo, los mecanismos responsables de los cannabinoides como potenciales fármacos neuroprotectores en enfermedades psiquiátricas y neurológicas no están completamente entendidas. No obstante, si algo se sabe es que los mecanismos de neuroprotección están controlados por la activación del sistema endocannabinoide endógeno (Campos et al., 2016).

El sistema endocannabinoide abarca principalmente los receptores cannabinoides CB1 y CB2, sus agonistas endógenos, la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) y las proteínas responsables de su recaptura, síntesis y su degradación. Los receptores cannabinoides están acoplado a proteínas Gi/o que, al activarse, incrementan el flujo de K<sup>+</sup> intracelular, lo que provoca una hiperpolarización de la membrana plasmática, lo que provoca que la probabilidad de que se libere el neurotransmisor de la terminal presináptica decaiga. De esta forma, los endocannabinoides actúan como mensajeros retrógrados (Costa et al., 2016).

El 2-AG está involucrado en una gran cantidad de funciones fisiológicas, como las emociones, la cognición, el balance energético, la sensación del dolor y la neuroinflamación, en el SNC funciona como un lípido de señalización en la regulación de neurotransmisión, además de ser la proteína G acoplada a receptor (GPCR, por sus siglas en inglés) dentro del SNC. En comparación con la AEA, 2-AG se encuentra en el cerebro en niveles 170 veces más alto. Este endocannabinoide se sintetiza bajo demanda, y actúa como mensajero retrógrado inhibiendo la liberación de neurotransmisores en las sinapsis inhibitorias y excitatorias, mediando procesos como la plasticidad a largo y corto plazo

(Baggelaar et al., 2018). Su síntesis ocurre cuando aumenta el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la activación neuronal, esto induce la estimulación la fosfolipasa Cb dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ (PLC<sub>b</sub>, por sus siglas en inglés), lo que provoca una hidrólisis del fofatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>, por sus siglas en inglés), y la generación de 1,2-diacilglicerol (DAG), la cual pasa a 2-AG a través de la diacilglicerol lipasa a (DAGLa) (Lutz, 2020; Baggelaar et al., 2018).

El lugar dominante donde se encuentra el receptor CB1 es en la presinapsis, donde su activación puede reprimir la liberación presináptica de los neurotransmisores, un mecanismo que se ha estudiado sobre todo en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas, donde 2-AG se genera en la postsinapsis y viaja de forma retrograda hacia la presinapsis para estimular a CB1, lo que resulta en una disminución del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en la terminal presináptica, esto a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Este mecanismo generalmente conlleva al proceso de la represión de la excitación inducida por la despolarización (DSE, por sus siglas en inglés) y a la represión de la inhibición inducida por la despolarización (DSI, por sus siglas en inglés), esto en las sinapsis GABAérgicas (Lutz, 2020). En el caso de que las neuronas postsinápticas se activen, iniciará una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de endocannabinoides, que activará, en consecuencia, los receptores CB1 presinápticos e inhibirá la liberación de GABA, introduciendo, así, la DSI (Kaczocha y Haj-Dahmane, 2022).

Además de la señalización retrograda que, tanto 2-AG como AEA provocan en la neurotransmisión, también funcionan como mensajeros autocrinos que controlan la excitabilidad neuronal intrínseca al activar los receptores CB1 postsinápticos, de esta forma, abriendo corrientes membranales (Kaczocha y Haj-Dahmane, 2022).

### ***Cannabinoides y muerte celular***

El sistema endocannabinoide está involucrado en procesos de muerte celular en procesos patológicos, sobre todo en apoptosis en casos de cáncer, donde existe un aumento de AEA que provoca la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y la activación de la vía ERK y la inhibición de p21<sup>ras</sup>, que provoca la inhibición del crecimiento del tumor dependiente de la cascada de *ras*. Estos efectos apoptóticos se han visto en células de glioma, neuronas primarias, en cortes de hipocampo y células de próstata (Macarrone y Finazzi-Agro, 2003).

En contraste al apartado anterior, hay evidencia de que el sistema endocannabinoide también puede producir muerte celular en neuronas y otro tipo de células por medio de apoptosis, algunos de los mecanismos que este sistema utiliza para producir apoptosis son la inhibición del ciclo celular, la inhibición de la producción de AMPc e inhibiendo la vía Akt o estimulando la síntesis de ceramida, un esfingolípido proapoptótico, que activa la vía JNK/p38 MAPK, que provoca muerte celular (García-Arencia et al., 2018).

La apoptosis mediada por el sistema endocannabinoide no sólo ocurre por la activación y mediación de los receptores cannabinoides, también puede ser mediada por la estimulación de TRPV1, que incrementa el estrés oxidativo, el flujo de calcio y la activación de caspasa (Macarone y Finazzi-Agro, 2003), y de manera independiente a los receptores, pues AEA puede causar apoptosis por regulación al alza de COX-2 y por la producción de PGE<sub>2</sub> (García-Arencia et al., 2018).

Se ha visto en modelos de citotoxicidad que el uso de cannabinoides sintéticos aumenta la citotoxicidad en cerebro anterior y que ésta es mediada por la activación de los

receptores CB1 e inhibida por los antagonistas de este receptor, a través de apoptosis, pero que el papel de CB2 en este proceso es casi nulo (Tomimaya y Funada, 2014).

El sistema endocannabinoide puede regular la autofagia en células transformadas y no transformadas, en cáncer provoca muerte celular, pero en células no cancerígenas tiene efectos terapéuticos. La activación de CB1 por AEA induce la autofagia, que provoca la inhibición del inflamasoma NLRP3 en modelos de encefalomiелitis (García-Arencibia et al., 2018).

Pese a que la mayoría de los estudios hechos sobre cannabinoides están relacionados con su participación en la neuroprotección, también se ha visto que tiene efectos neurotóxicos. Se ha visto que las células de placenta, los citotrofoblastos, tratadas con AEA entran en apoptosis asociada a una disminución del potencial de membrana mitocondrial y a un aumento en la producción de ERO (Costa et al., 2015), lo que confirma la participación de los endocannabinoides en la muerte celular. En el caso de la isquemia, la AEA tiene un papel neuroprotector; sin embargo, un exceso del compuesto produce un ambiente excitotóxico que provoca la muerte celular (Pellegrini-Giampietro et al., 2008). A su vez, se ha visto que un exceso de AEA y de THC en neuronas primarias resultan tóxico en concentraciones mayores que las necesarias para activar los receptores CB1, y que cuando se les administra de manera intracerebroventricular, se produce una pérdida de neuronas en hipocampo (Fowler et al., 2010). Estos datos resultan interesantes pues reflejan que a pesar de los efectos neuroprotectores reportados mediados por AEA, un exceso de la producción de este endocannabinoide puede ser mortal para las neuronas.

### ***Cannabinoides como tratamiento clínico en patologías asociadas a muerte neuronal***

Las enfermedades neurodegenerativas que afectan el SNC, como son la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la Esclerosis Múltiple, se han caracterizado por pérdidas de neuronas específicas, provocando afecciones en regiones del cerebro, médula espinal y neurotransmisores, lo que genera problemas de nivel clínico características de estas enfermedades (Aymerich et al., 2018). A la fecha, ninguna de estas enfermedades tiene cura, sin embargo, existen algunos fármacos y tratamientos que pueden proveer mejoras, en especial si se usan en etapas tempranas de la enfermedad, pero que no conservan los mismos efectos una vez que estas progresan (Aymerich et al., 2018).

Durante las últimas décadas, los cannabinoides han tomado gran atención por sus potenciales efectos protectores, antioxidantes y antiinflamatorios en muchas enfermedades (Pellati et al., 2018), esto debido a que el SEC tiene un rol vital en las funciones de todo el cuerpo pero, en especial, del SNC, pues está involucrado en funciones como el metabolismo, la respuesta al estrés, la inmunomodulación, reproducción, activa vías de protección, modula los neurotransmisores, entre otros (Baul et al., 2019). La razón principal por la que han obtenido tanta atención los cannabinoides y el SEC en general, es que la mayoría de estas enfermedades neurodegenerativas comparten las mismas características: excitotoxicidad, estrés oxidativo, acumulación proteínica y neuroinflamación, y se ha reportado que el SEC podría modularlas y ser un blanco farmacológico para tratar enfermedades en cualquier etapa de estas (Aymerich et al., 2018).

### ***Cannabinoides en tratamiento de Enfermedad de Alzheimer***

Una de las enfermedades en las que se ha investigado el papel que tienen los endocannabinoides y el SEC en general, como futuros blancos farmacológicos y terapéuticos es Alzheimer, en donde se está buscando desarrollar un tratamiento que pueda ser efectivo y pueda retardar el progreso de la enfermedad en el periodo prodrómico. Dentro de los efectos que podría tener el SEC en esta enfermedad, se ha registrado que los cannabinoides pueden actuar contra las placas  $\beta$ -Amiloides en estudios *in vitro* e *in vivo*. En estos estudios, al administrar endocannabinoides como AEA, 2-AG, o éter de noladina, incrementaba la viabilidad de las neuronas expuestas a estas placas (Aymerich et al., 2018).

Los fitocannabinoides también han demostrado tener efectos benéficos en esta enfermedad, como el CBD y el THC, los cuales han demostrado tener propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y neuroprotectoras, pues pueden disminuir la producción de las placas  $\beta$ -Amiloides y promover la neurogénesis, esto reportado en modelos murinos, donde estos dos compuestos han mejorado la cognición en esta enfermedad y alentado el progreso de la misma (Coles et al., 2022).

Una investigación reciente también apunta a las pruebas de micro dosis de cannabinoides para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que podría estar mejorando los síntomas mnemónicos y no-mnemónicos, esto utilizando un extracto de cannabis (Ruver-Martins et al., 2022).

El agonista sintético del receptor CB1, ACEA, así como los agonistas selectivos de CB2, JWH-015 y JWH-133, redujeron la toxicidad producida por  $\beta$ -AAmiloide, y la administración de agonistas selectivos a estos receptores y CBD, redujeron las fallas en la memoria en modelos de ratón. El tratamiento crónico con ACEA, JWH-133, WIN55,212-2, CBD y una combinación de CBD y D<sup>9</sup>-tetrahidrocannabinol, redujeron los fallos cognitivos en modelos de ratones transgénicos (Aymerich et al., 2018).

Experimentos como estos se han reportado varios, sobre todo en los últimos 15 años, sin embargo, aún falta investigar bastante al respecto sobre cómo estos fármacos y el SEC podrían usarse como blanco terapéutico en esta enfermedad, pues falta bastante evidencia y concordancia en ellos (Aymerich et al., 2018).

### ***Cannabinoides en tratamiento de Enfermedad de Parkinson***

Los efectos terapéuticos del SEC también han sido estudiados en Parkinson, la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente. A la fecha, el medicamento más utilizado para este padecimiento es levodopa (L-dopa), una terapia que reemplaza la dopamina que lleva décadas siendo utilizada. No obstante, conforme avanza la enfermedad y la pérdida de neuronas dopaminérgicas se pierden, la eficacia de este medicamento disminuye y presentan discinesia inducida por L-dopa (Aymerich et al., 2018), es por eso por lo que se siguen buscando fármacos terapéuticos para esta enfermedad tanto a etapas tempranas como avanzadas.

Los efectos neuroprotectores que pudiese tener el SEC en Parkinson han comenzado a ser estudiados por su gran potencial; se ha encontrado, por ejemplo, que la activación de los receptores CB1 y CB2 puede atenuar las respuestas inflamatorias, en especial el receptor CB2, el cual su activación también ha demostrado atenuar la degeneración de neuronas dopaminérgicas en el estriado, activación de células gliales y una regulación a la baja de citosinas inflamatorias (Baul et al., 2019).

ACEA también ha mostrado tener efectos terapéuticos en Parkinson, en específico en el modelo de ratón MPTP, donde este agonista de CB1 redujo la toxicidad glutamatérgica en células mesencefálicas, THC mostró un efecto parecido (Baul et al., 2019). Otros agonistas de CB1, como WIN-55,212-2, demostraron ser agentes neuroprotectores en esta enfermedad, en especial al tener la capacidad de suprimir la excitotoxicidad, la activación glial, y los daños oxidativos que generan pérdidas de neuronas dopaminérgicas (Vasant More y Choi, 2015).

Otros cannabinoides sintéticos que han mostrado efectos terapéuticos importantes son el CE-178253, oleoiletanolamida, nabilona y HU-210, los cuales han demostrado ser efectivos contra la bradicinesia y la discinesia inducida por *levo* dopa en Parkinson (Vasant More y Choi, 2015). Estudios en modelos animales sugieren que algunos de los efectos neuroprotectores son receptor-dependientes, una razón de esto es que al bloquear los receptores CB1 se facilitan los mecanismos independientes de dopamina, en específico del receptor D2, lo que sugiere que al usar un antagonista de CB1 se podría aumentar la transmisión dopaminérgica. Esto fue probado al usar antagonistas de este receptor como rimonabant, AM251,  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinivarín ( $\Delta^9$ -THCV), todos en dosis pequeñas, en el modelo 6-OHDA en rata, estos tratamientos mejoraron la movilidad de estos animales (Aymerich et al., 2018).

La popularización del uso del fitocannabinoide también ha estado presente en estudios clínicos de pacientes con Parkinson, donde se registraron disminución de los síntomas psicóticos que provoca este padecimiento, mejoras cognitivas, mayores niveles de BDNF, mejoras motoras, disminución de la ansiedad y del temblor en reposo de estos pacientes (Patricio et al., 2020). En general, los cannabinoides han representado un blanco de interés terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en especial el receptor CB1, sin embargo, aún se necesita más investigación al respecto.

### ***Cannabinoides en tratamiento de Enfermedad de Huntington***

Otro padecimiento en el que se han estudiado los cannabinoides y el SEC como tratamiento, es en la enfermedad de Huntington, caracterizada por sus movimientos coreicos (corea de Huntington) que se producen por una degeneración de las neuronas espinales del estriado que proyectan al globo pálido y la sustancia *nigra*. Las terapias para los pacientes con Huntington son muy limitadas y están destinadas para los movimientos coreicos, actualmente, el único fármaco autorizado es el inhibidor del transportador vesicular de monoaminas 1, tetrabenazina. (Aymerich et al., 2018).

Aunque ya se habían empezado a investigar antes como fármacos para aliviar algunos síntomas de esta enfermedad, hasta 2009 empezaron a ser investigados como posibles agentes neuroprotectores en este padecimiento (Aymerich et al., 2018). Una de las razones por las que el SEC tomó importancia en investigaciones de Huntington es porque se han encontrado muchos cambios en este sistema durante la enfermedad, uno de ellos es que hay una disminución de los receptores CB1 en el globo pálido (Richfield, 1994), estos receptores en condiciones normales se encuentran a niveles muy altos en los ganglios basales, pero la pérdida de estos en Huntington podría ser causada por una falla asociada a la mutación en huntingtina que afecta la expresión del gen CB1, y esto podría constituir un factor patogénico importante de la enfermedad, la ablación de este receptor agrava los



síntomas de Huntington y su patología, mientras que la activación de este receptor los atenúa (Blázquez et al., 2011). Por otra parte, en tejidos postmortem de pacientes con enfermedad de Huntington, se confirmó también la pérdida de estos receptores y defectos en la señalización, esto fue evidente incluso antes de la muerte neuronal y los síntomas coreicos (Aymerich et al., 2018).

En cuanto al receptor CB2, la activación y señalización de este puede disminuir la velocidad con la que progresa la enfermedad y disminuye los déficits motores, la pérdida sináptica, la inflamación en el SNC y regula la producción de interleucinas en la sangre, como IL-6, de la cual los anticuerpos neutralizadores mejoran parcialmente los déficits motores y la pérdida de peso en modelos de ratón de Huntington, esto apoya la idea de que CB2 también podría ser un blanco terapéutico para tratar la enfermedad de Huntington (Bouchard et al., 2012).

En un modelo experimental de malonato, agonistas de CB2 fueron capaces de proteger las proyecciones neuronales en el estriado de la muerte inducida por este compuesto, mientras que al ser tratados con el antagonista de CB2, SR144528, y en ratones deficientes de este receptor, estos eran más sensibles al malonato que los animales wild-type. La activación de CB2 también es capaz de proteger reducir los niveles de TNF- $\alpha$ , que incrementan por el tratamiento con malonato, y disminuye la toxicidad provocada por el mismo (Sagredo et al., 2009).

En otras investigaciones, se ha probado que la expresión de CB2 incrementa en la microglía estriatal de los ratones transgénicos de Huntington y en pacientes con la enfermedad, cuando se elimina este receptor de manera genética en los ratones R6/2, aumenta la activación glial y, a su vez, esto agrava la sintomatología y reduce la esperanza de vida de los mismos, algo similar ocurre cuando se induce la excitotoxicidad por ácido quinolínico en el estriado en ratones deficientes de CB2, donde también se presenta edema cerebral y degeneración neuronal. No obstante, al tratar a estos ratones con agonistas de CB2, se redujo la neuroinflamación, el edema cerebral, la pérdida de neuronas en el estriado y los síntomas motores, lo que apunta, una vez más, a CB2 como un blanco terapéutico importante para la enfermedad (Palazuelos et al., 2009).

En cuanto a fitocannabinoides, CBD ha mostrado tener efectos neuroprotectores en la enfermedad en modelos de ratas intoxicadas con nitropropionato, modelo que presenta estrés oxidativo, daño mitocondrial y activación de calpaína, se cree que este efecto puede deberse a la activación de PPAR- $\gamma$ . Una combinación de CBD y  $\Delta^9$ -THC, también fue estudiada en modelos animales de Huntington, esta combinación pudo proteger las neuronas estriatales en modelos como el de malonato y 3-nitropropionato (Aymerich et al., 2018).

Como estos ejemplos, hay muchos, lo que nos confirma que el SEC y los fármacos agonistas de los receptores CB1 y CB2 podrían significar un nuevo modelo terapéutico importante para la enfermedad, lo cual representará un retro para poder implementar pruebas clínicas bien diseñadas para obtener efectos positivos en pacientes con enfermedad de Huntington.

### ***Cannabinoides en tratamiento de Esclerosis Lateral Amiotrófica***

El papel de este sistema y sus receptores también ha sido estudiado en Esclerosis ELA, una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta las neuronas motoras

superiores e inferiores derivando a denervación muscular, atrofia y parálisis, la cual la mayoría de sus casos son esporádicos, y un 20% por fallas genéticas (hereditarias), en las que hay mutaciones en los genes codificantes para SOD-1. Esta enfermedad, tanto la que se da de forma esporádica como la que es hereditaria, son clínica e histológicamente indistinguibles, por lo que comparten intervenciones terapéuticas (Aymerich et al., 2018). A la fecha, esta enfermedad no tiene cura ni un tratamiento efectivo para la progresión de esta, siendo el agente antiexcitotóxico, riluzol el único fármaco aprobado por mucho tiempo. Actualmente, el agente antioxidante Edaravone y el inhibidor de la tirosina quinasa también se han aprobado como tratamientos para esta enfermedad, sin embargo, aún se están investigando nuevos tratamientos para ella debido a la poca eficacia de los ya mencionados (Aymerich et al., 2018).

Así como en las enfermedades anteriormente mencionadas, esta enfermedad también comparte las características de pérdida neuronal, inflamación, estrés oxidativo y neuroexcitotoxicidad, por lo que el SEC empezó a ser investigado para tratamientos alrededor de esta enfermedad. Los fitocannabinoides y los componentes sintéticos agonistas a CB2, así como inhibidores de la inactivación endocannabinoide, han mostrado proveer neuroprotección en modelos de ratón SOD1, los cuales podrían estar involucrando la activación de PPAR- $\gamma$  (Rodríguez-Cuesto et al., 2018). Dentro del SEC, existe un endocannabinoide antiinflamatorio, 2-araquidonilglicerol (2-AG), el cual es degradado por la MAGL, este endocannabinoide se encuentra en niveles altos en la médula espinal, por lo que surgió como un blanco terapéutico importante dentro de la ELA. Al usar un inhibidor de la MAGL, KML29, en el modelo de SOD-1, redujo las citosinas proinflamatorias e incrementó los niveles de BDNF en la médula espinal, y un tratamiento con 2-AG confirmó estos efectos (Pasquarelli et al., 2017).

Otro estudio, usando ratones SOD1G93A de 90 días de edad con WIN55,212-2, retrasó de manera significativa el progreso de la enfermedad, y la ablación de la enzima FAAH, degradadora de AEA, otro de los dos endocannabinoides principales, resultó en una prevención de la aparición de los signos de la enfermedad en los mismos ratones (Bilsland et al., 2006).

Otro compuesto cannabinoide, el derivado de cannabigerol VCE-003.2, que funciona como neuroprotector al activar PPAR- $\gamma$ , se utilizó para tratar ratones SOD1 de 60 días y hasta etapas avanzadas de la enfermedad (18 semanas de edad), los resultados que se obtuvieron en esta investigación fue que VCE-003.2 pudo mejorar los signos neuropatológicos de la enfermedad, como pérdida de peso y deterioración neurológica, y también fue capaz de preservar las neuronas motoras colinérgicas en médula espinal y reducir los niveles de reactividad astrogliar, así como la disminuir las elevaciones de la interleucina IL-1 $\beta$  y la generación de TNF- $\alpha$  en astrocitos (Rodríguez-Cueto et al., 2018).

En general, el receptor que resulta de más importancia en la investigación médica y farmacológica para ELA es el receptor CB2 por su capacidad antiinflamatoria y mayor evidencia encontrada alrededor de él, sin embargo, CB1 también podría ser importante debido a sus capacidades de disminuir el daño excitotóxico, aunque aún faltan muchos estudios preclínicos para que puedan ser aprobados estos fármacos, en especial los que tienen fitocannabinoides, como es el caso de Sativex (Aymerich et al., 2018).

### ***Cannabinoides en isquemia***

La isquemia es otro padecimiento en el que el SEC ha tomado gran relevancia, sobre todo en cuestiones de excitotoxicidad. El interés surge de la evidencia de que la señalización endógena de los cannabinoides se ve alterada durante la isquemia y esto está relacionado con las lesiones inducidas por la isquemia (Hillard, 2008).

En la isquemia se produce una pérdida de oxígeno y glucosa, que viene acompañada de un cese del flujo sanguíneo, lo que provoca cambios en los iones intracelulares y la homeostasis de los metabolitos en el cerebro, esto tiene como consecuencia generación de radicales libres y un aumento del calcio y sodio intracelular, cambios que, como consecuencia, provocan muerte apoptótica y necrótica. Además de esto, se produce un aumento de la generación de NO y un aumento de la liberación de glutamato (Hillard, 2008).

Esta lesión isquémica, también provoca una elevación de los niveles de cannabinoides endógenos, en donde también se ha encontrado evidencia de que la activación del receptor CB1 resultó en una disminución de la excitabilidad del SNC, por lo que se cree que este receptor puede tener efectos protectores en isquemia (Muthian et al., 2004). La activación de estos receptores también disminuye la probabilidad de la apertura de canales de calcio, lo que provoca una reducción del calcio intracelular, así como que están presentes en las terminales de los nervios glutamatérgicos, y su activación provoca una inhibición de la liberación de glutamato, lo que apoya la idea de que tiene efectos neuroprotectores en eventos excitotóxicos. En cuanto al receptor CB2, se cree que su activación podría disminuir la liberación de mediadores proinflamatorios y disminuir la inflamación provocada por la isquemia (Hillard, 2008).

El receptor CB1 también juega un papel importante en la protección del accidente cerebro vascular (ACV) isquémico a través de la señalización de las vías ERK1/2, P13K/Akt/GSK-3b y la translocación y activación de PKC $\epsilon$ . El usar agonistas de CB1 puede provocar efectos neuroprotectores en isquemia y funcionar como un blanco terapéutico (Zhuang et al., 2017).

Al utilizar el agonista selectivo de CB1, WIN 55,212-2 en un modelo de rata de isquemia, este pudo atenuar la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) en una isquemia cerebral focal, este efecto se vio contrarrestado al ser tratadas con el antagonista de CB1, rimonabant, lo que sugiere que CB1 sí está implicado en este proceso (Z Chi et al., 2012).

Un pretratamiento de WIN 55,212-2 indujo tolerancia isquémica en isquemia focal cerebral de manera dosis dependiente en un modelo de rata, y también puede regular al alza los niveles de ERK1/2, lo que sugieren que su efecto protector puede ser a través de la activación de estas cinasas fosforiladas (Hu et al., 2010).

En modelos de oclusión de la arteria cerebral media (MCAo), el contenido del cerebro de AEA incrementó de manera significativa después de 30, 60 y 120 minutos de la MCAo, siendo localizado este incremento en el hemisferio isquémico contralateral. No obstante, al administrarles un antagonista de CB1, SR141716 previo a la MCAo, se redujo el volumen del infarto en un 50% y mejoró la función neuronal en un 40%, este efecto fue igual con otro antagonista de CB1, LY320135 (Muthian et al., 2004). Como vemos, estos resultados son contradictorios con los anteriores, pues sugieren que al bloquear CB1 y no

al activarlo, se generan los efectos neuroprotectores, pero esto es cierto sólo en etapas tempranas del evento isquémico.

En cuanto a CB2, la activación del receptor juega un papel importante en la cascada de inflamación que surge después de una lesión isquémica, donde los receptores TLR4 y MMP9 están involucrados en la disfunción del ACV isquémico. Se ha encontrado que al tratar a modelos de rata de isquemia con el agonista de CB2 JWH-133 puede atenuar la disfunción motora producida por la isquemia, así como que reguló a la baja la actividad de TLR4 y MMP9 después de la lesión isquémica, sugiriendo un papel antiinflamatorio de este receptor (Jing et al., 2020).

### ***Cannabinoides en enfermedades neuropsiquiátricas***

Además de en enfermedades neurodegenerativas, se han estudiado los efectos del SEC y los compuestos cannabinoides en otras enfermedades, un ejemplo de esto es la depresión, aunque aún no se entiende por completo el mecanismo con el que funciona en esta enfermedad, ya que se han registrado tanto efectos pro y antidepresivos al consumir cannabis, así como que tanto los agonistas y antagonistas de ambos receptores pueden actuar como antidepresivos. La activación específica de los receptores CB1 han mostrado tener un potencial antidepresivo, mientras que en modelos de ratón con depresión se muestra un déficit de este receptor (Poleszak et al., 2018). La falta de estos receptores provocaba a su vez cambios en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el receptor de adenosina A2B, el receptor de somatostatina 1, neurotensina y el receptor de neurotensina, el receptor  $\alpha$ -2c-adrenérgico, los receptores GABA-A, entre otros registrados en el hipocampo, la corteza frontal y los núcleos de Rafé, áreas implicadas en la depresión (Poleszak et al., 2018).

El uso tanto de agonistas de CB1 como de inhibidores de FAAH, lograron efectos positivos en modelos murinos, tanto conductuales como moleculares, donde se reportaron datos entre los que se encuentran aumento de los niveles de BDNF, menor desregulación en la corteza frontal y el hipocampo, menores niveles de estrés, pérdida de anhedonia (Poleszak et al., 2018).

Por otra parte, en estudios clínicos postmortem se ha demostrado, que existe una regulación al alza de los receptores CB1, acompañada de un incremento en la señalización de los receptores CB1 en la corteza prefrontal dorsolateral en víctimas de suicidio por depresión (Hundgund et al., 2004). También se han reportado niveles incrementados de AEA y 2-AG en la corteza prefrontal de víctimas alcohólicas de suicidio (Vinod et al., 2005). Aunque en otras investigaciones, se han reportado niveles reducidos de 2-AG y AEA en suero, así como una disminución de la densidad de los receptores CB1 en las células gliales y materia gris de pacientes con depresión mayor, y una reducción de estos en pacientes con depresión menor, lo que podría indicar que estos factores en distintos y dependientes del tipo de depresión (Poleszak et al., 2018).

Al existir tantas inconsistencias con los resultados obtenidos en distintas investigaciones realizadas en depresión, podemos concluir que se necesitan muchos estudios en el futuro para determinar qué tipo de pacientes pueden beneficiarse de las terapias basadas en el SEC y sus componentes, sin embargo, es una terapia novedosa prometedora que podría significar un cambio en la terapia con antidepresivos que conocemos hasta el momento (Poleszak et al., 2018).

En otras enfermedades psiquiátricas, el CDB ha sido motivo de interés por sus posibles efectos terapéuticos en conductas psicóticas, ansiosas y depresivas. En modelos murinos de esquizofrenia se ha demostrado que es capaz de disminuir la activación de microglía, y en modelos de ansiedad, tiene efectos ansiolíticos a través de la mediación de la neurotransmisión de serotonina a través de 5HT1A (Campos et al., 2016).

### ***Cannabinoides y patologías cerebelares***

Los receptores del SEC, CB1 y CB2, se encuentran distribuidos por todo el cuerpo en distintos tejidos y tipos celulares, este sistema y sus endocannabinoides funcionan como mensajeros retrógrados y, en el SNC, contribuyen a la transmisión sináptica por medio de los receptores cannabinoides, en especial, CB1, encontrados en la membrana presináptica, este receptor se encuentra en gran densidad en el cerebelo (Kawamura et al., 2006; M.A. Pacheco et al., 1992;), encontrados en su mayoría en las vesículas presinápticas de las células de Purkinje, donde son los principales responsables de la transmisión excitatoria cannabinoide-dependiente (Kawamura et al., 2006).

En el cerebelo, los endocannabinoides funcionan como mensajeros retrógrados y están involucrados en la plasticidad tanto a corto plazo como a largo plazo, también juega un papel importante en la regulación del movimiento y las neuro adaptaciones del control y el aprendizaje motores (Suárez et al., 2008). Se encuentran con mayor densidad en las células de Purkinje, donde se encargan de modular las señales excitatorias e inhibitoras, que permiten las respuestas motoras del cerebelo (Suárez et al., 2008).

El que haya una gran densidad de este receptor en la corteza cerebelar, hace de este un blanco terapéutico importante, sobre todo para controlar y proveer supervivencia en casos de neuroexcitotoxicidad al funcional como modulador de la transmisión excitatoria de glutamato en estas células (Barnes et al., 2020). Uno de los escenarios donde se ha investigado el papel que tiene el SEC en el cerebelo es el de las ataxias, específicamente las ataxias cerebeloespinales. Las ataxias cerebeloespinales son una enfermedad neurodegenerativa genética, caracterizada por un mal plegamiento de proteínas y fallas en la proteólisis, que provocan agregados proteínicos que causan la enfermedad; e este tipo de ataxias, los niveles de CB1 y CB2 se ven alterados en el cerebelo, en especial en las células de Purkinje, lo que sugiere que una alteración del SEC podría estar relacionado con la patogénesis de esta enfermedad, representando un blanco terapéutico importante (Rodríguez-Cueto et al., 2013). Además de los niveles de los receptores CB, también hay una alteración en el metabolismo de los endocannabinoides, pues los niveles de FAAH, la enzima encargada de degradar AEA, se ven incrementados en los ratones transgénicos SCA-3, algo que además de afectar en general al SEC, también puede ser responsable de la pérdida de neuronas en los núcleos pontinos debido a la reducción de la protección en la homeostasis celular que tienen estos endocannabinoides (Rodríguez-Cueto et al., 2019).

Otro abordaje que ha tenido el papel del SEC en ataxias es a través de los canales de potencial receptor transitorio (TRP por sus siglas en inglés), los cuales están altamente expresados en el cerebelo, en especial en células de Purkinje; estos canales pueden ser activados por los endocannabinoides y su activación puede modular la actividad de GABA y la transmisión de glutamato en cerebelo. Al estar alterado el SEC en ataxia, este podría a su vez estar cambiando la actividad de los canales TRP, lo que provocaría una alteración

en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en esta enfermedad, es por eso por lo que hay evidencia de que al usar antagonistas de CB1 se ha visto que hay una reducción de la actividad excitatoria mediada por los TRP, que podría a su vez, reducir la excitotoxicidad que existe en este padecimiento (Ranjbar et al., 2022).

En otros estudios hechos en cerebelo, se observó que la ausencia de receptores CB1 impacta de manera distintiva la arquitectura ultraestructural de las fibras paralelas de las células de Purkinje, lo cual puede afectar las funciones motoras del cerebelo (Buceta et al., 2019).

## **Antecedentes**

### ***Mecanismos moleculares de la neuroprotección por cannabinoides***

El sistema endocannabinoide se ha considerado como un sistema neuroprotector que funciona en respuesta a un evento neurotóxico (Fowler et al., 2010). Los estudios sobre el sistema endocannabinoide se han enfocado en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, neurológicas y psiquiátricas, pues media la neuroprotección en enfermedades como esquizofrenia, ansiedad (Campos et al., 2015), depresión (Poleszack et al., 2018), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, epilepsia y dolor crónico o agudo y en isquemia o traumatismo craneoencefálico.

Se ha visto que, en condiciones patológicas experimentales, los agonistas de CB1 como WIN-55,212-2 reducen la muerte celular producida por un ambiente de concentración de magnesio alto, este agonista también reduce los volúmenes de infarto cerebral producidos por isquemia (Fowler et al., 2010). En modelos experimentales donde el receptor CB1 es bloqueado por antagonistas o agonistas inversos, como es rimonabant, se bloquean sus efectos neuroprotectores en modelos de lesión neuronal, trauma o esclerosis múltiple (Fowler et al., 2010). La principal diferencia entre un antagonista y un agonista inverso es que, el antagonista bloquea la acción de un receptor, impidiendo que el agonista ejerza su acción, mientras que el agonista inverso produce un efecto contrario al del agonista, resultando en una actividad del receptor por debajo del nivel basal.

El receptor CB1 está involucrado, de igual manera, en la producción de factores neurotróficos como BFGF y BDNF, de óxido nítrico y ciclooxigenasa-2 en modelos de excitotoxicidad, así como en la inhibición de NFκB y la expresión de citocinas inflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$  (Fowler et al., 2010).

Los cannabinoides no se encuentran en reservas, sino que son sintetizados a demanda en respuesta a estímulos. En condiciones patológicas, como en el caso de trauma o isquemia, se ha reportado que existe un aumento de los niveles cerebrales de endocannabinoides (Fowler et al., 2010), la síntesis de AEA y 2-AG incrementa sustancialmente después de estos dos eventos, esta liberación a demanda se ve en estos casos, pues AEA se encuentra expresado a concentraciones bajas en el cerebro, pero incrementa de manera dependiente a calcio después de una lesión neuronal grave (Viscomi et al., 2010). En casos de excitotoxicidad, también se ha visto un aumento en la expresión del receptor CB1, así como un aumento de endocannabinoides. Esto se relaciona con el

hecho de que el sistema endocannabinoide es un regulador de la neurotransmisión de glutamato, el cual es el responsable de la excitotoxicidad (Fowler et al., 2010).

En modelos de neurodegeneración retinal, los endocannabinoides también han mostrado efectos neuroprotectores. Un ejemplo de esto son los modelos de isquemia retinal, donde la concentración de calcio aumenta a la vez de que aumenta la actividad de NOS, lo que provoca excitotoxicidad y muerte de células de la retina, es entonces cuando aumenta la concentración de AEA y se produce un efecto neuroprotector contra la muerte de estas células, ya que se activan los receptores CB1 y TRPV1. Estos efectos también ayudan a la preservación de fotorreceptores, esto debido a la función antioxidante y antiinflamatoria del sistema endocannabinoide (Rapino et al., 2018).

Ambos receptores CB están involucrados en procesos antiinflamatorios, en especial los receptores CB2, ya que se encuentran altamente expresados en células del sistema inmune, sin embargo, hay varios reportes que indican que la activación de CB1 está relacionada con a las alteraciones de la reactividad de células inmunes y gliales mediadas por el sistema endocannabinoide (S. Rossi et al., 2010).

Los cannabinoides ejercen sus propiedades inmunosupresoras de 5 maneras principales: al inhibir la proliferación celular, la inducción de apoptosis, la inhibición de células mieloides derivadas de la médula ósea, la inhibición de la producción de citosina y quimiocina y la inducción de células T reguladoras, pero son los receptores CB2 los que tienen el papel más importante, pues son estos los que afectan a las citosinas y quimiocinas cuando se encuentran activas (S. Rossi et al., 2010), y que su estimulación protege a las neuronas después de una lesión, pues inhibe las fallas mitocondriales (Viscomi et al., 2010).

Como se mencionó, la activación de CB1 en condiciones patológicas, incrementa la expresión de factores neurotróficos como BDNF, lo que potencia la supervivencia celular, estos procesos de supervivencia también aumentan al activar vías de supervivencia celular como la PI3K/Akt, en cuanto a otro efecto neuroprotector de los receptores CB2, estos se han identificado en células del tallo neural donde regulan la proliferación de células precursoras, que provocan a su vez neurogénesis y reparación del tejido dañado (S. Rossi et al., 2010). CB2 al ser activado, protege a las células de la apoptosis (Viscomi et al., 2010).

Los cannabinoides también tienen propiedades autofágicas, un ejemplo de esto es la metanandamida, cuya inducción en embriones de ratón produce una respuesta autofágica. Por otro lado, se ha visto que los análogos de CBD, como ACEA y el AEA inducen autofagia en células Caco-2 diferenciadas. ACEA y AEA inducen autofagia a través de la activación del receptor CB1, mientras que CBD es independiente a este receptor (Costa et al., 2016).

Se ha incrementado la investigación en un fármaco llamado Sativex<sup>®</sup>, que contiene una combinación de THC y CBD, el cual actúa a través de los receptores CB1 y CB2. Este fármaco tiene propiedades neuroprotectoras y reduce la deposición de tau y Amiloide, dos proteínas que funcionan como biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, en el hipocampo y corteza cerebral en modelo de ratón. Esto lo hace a través de la reducción de radicales libres, de mejorar la actividad mitocondrial y de estimular el proceso de autofagia (Costa et al., 2016). Este mismo fármaco también mejora el comportamiento al disminuir la ansiedad en un modelo de taupatía en ratón. Este efecto concuerda con que los cannabinoides pueden modular la memoria emocional y no emocional en el hipocampo y

da pauta al entendimiento de los cannabinoides en trastornos emocionales y de ansiedad. Sativex® también modificó el metabolismo de la dopamina, los niveles de estrés oxidativo, y la función glial, lo cual contribuyó a mejorar enfermedades relacionadas con las proteínas tau y Amiloide (Casajeros et al., 2013).

### ***Cannabinoides y mitocondria***

Los efectos que tiene el sistema endocannabinoide en la mitocondria han sido estudiados de manera constante, y los primeros estudios al respecto, sugieren que los cannabinoides afectan las funciones mitocondriales por medio de acción lipofílica (Fisar et al., 2014). Los receptores CB1 se encuentran expresados en la membrana externa de la mitocondria, donde su activación provoca la disminución de la concentración de AMPc, la actividad de PKA, la actividad del complejo I de la CTE, y la respiración mitocondrial y energía metabólica (Fisar et al., 2014).

Los receptores endocannabinoides, en especial el CB1, modulan procesos neuropatológicos como la neuroinflamación y la muerte excitotóxica (Aso y Ferrer, 2014). Se sabe también que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo asociados a estos procesos pueden ser regulados por el sistema endocannabinoide, ya que se ha encontrado que tanto AEA como 2-AG alteran la señal de transducción dependiente de la mitocondria y, por tanto, participan en la regulación de la homeostasis de la energía celular y la apoptosis. Además, el aumento de la actividad de CB1 se asocia con un incremento de la fluidez de la membrana mitocondrial, la disipación de su potencial de membrana, una liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial acumulado y la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Fisar et al., 2014).

Los endocannabinoides pueden transmitir efectos deletéreos en la mitocondria en la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, así como que tanto AEA como 2-AG inhiben la síntesis de ATP al nivel de  $F_0/F_1$  de la ATP sintasa, y los fitocannabinoides han causado fallas en la respiración mitocondrial al reducir el consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial (Lipina et al., 2014). Por otro lado, los CBD, por medio de la activación de los receptores CB1 y TRPV1 también regula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas hipocampales, lo cual representa un posible mecanismo en la neuroprotección de este por este tipo neuronal (Ryan et al., 2009).

Asimismo, se ha reportado que los endocannabinoides alteran la morfología y fisiología mitocondrial, en especial AEA, pues de manera dosis-dependiente incrementa el hinchamiento de la mitocondria, así como que reduce el potencial de membrana mitocondrial y aumenta la fluidez mitocondrial (Lipina et al., 2014). De igual manera, los endocannabinoides modulan las funciones de la mitocondria al inhibir los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, la activación de las Kir, la activación de vías MAPK, eNOS, iNOS y la activación de PKA, así como la modulación de la producción de ceramida y mTOR (Nunn et al., 2012).

Otra forma que tiene el sistema endocannabinoide de modular la función mitocondrial es a través de la regulación del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  por distintos mecanismos. Por ejemplo, la AEA inhibe los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y tanto la AEA como 2-AG pueden incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre. Por otra parte, la activación de TRPV1 por AEA incrementa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mientras que la activación de CB1 la



disminuye (Nunn et al., 2012). Esta regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  es la encargada de la vía apoptótica activada por el sistema endocannabinoide, pues un incremento de este ion podría causar fallas en la función mitocondrial que desencadenarían la liberación de ERO. Estos dos receptores incrementan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en neuronas hipocampales, y se ha encontrado que CBD puede modular negativamente este incremento (Ryan et al., 2009). El sistema endocannabinoide también podría estar regulando las funciones mitocondriales a través de NO (Nunn et al., 2012).

Todos los cannabinoides pueden afectar la actividad de los complejos I, II/III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. AEA incrementó de manera significativa la actividad del complejo I, al igual que WIN, un cannabinoide sintético, por otra parte, la actividad del complejo II/III y IV disminuyeron con todos los tipos de cannabinoides, lo que habla de que los cannabinoides podrían causar disfunciones mitocondriales (Singh et al., 2015).

Los cannabinoides también interrumpen la respiración celular a través de la mitocondria para limitar la actividad neuronal, al encontrarse los receptores CB1 expresados en la membrana externa de la mitocondria. Principalmente, al disminuir la concentración de AMPc y provocar la subsecuente inhibición de PKA y del complejo I, se reduce la respiración neuronal (Harkany y Horvath, 2016).

La excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la inflamación están todos relacionados con el agotamiento de la energía mitocondrial, todos relacionados con la muerte neuronal por apoptosis o necrosis. Se ha demostrado que el SEC controla la actividad del receptor NMDA, involucrado en el proceso de excitotoxicidad, reduciendo su sobreactivación y brindando protección a las neuronas en contra de la excitotoxicidad. Los receptores CB pueden controlar la función glutamatérgica de los receptores NMDA al reducir la liberación presináptica de glutamato, al controlar la función exógena de estos receptores a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rangel-López et al., 2015).

La relación entre la excitotoxicidad, mitocondria y la regulación de esta a través del SEC, se ha observado en varios estudios. En isquemia, por ejemplo, ACEA pudo regular la expresión de la proteína del receptor CB1 mitocondrial en neuronas hipocampales y en tejido, este agonista mejoró la viabilidad celular, inhibió la generación de ERO y disminuyó la lactato deshidrogenasa, también mejoró la función mitocondrial. La activación de este receptor también disminuyó la producción de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondria (Ma et al., 2015)

Así, el papel que tiene sistema endocannabinoide en la regulación de la mitocondria y su funcionamiento en eventos como el daño excitotóxico y otros relacionados con la muerte neuronal de diferentes tipos que involucran alteraciones en la homeostasis de calcio y la generación de especies reactivas de oxígeno.

### ***Cannabinoides y ERO***

Con respecto a las ERO y cómo trabajan en conjunto con los cannabinoides, se ha evidenciado que cannabinoides como el CBD inducen la formación de MPTP, la despolarización del potencial de membrana mitocondrial (MMP), la oxidación de cardiolipina y a la generación de ERO en monocitos, lo que conlleva a una cascada apoptótica, sugiriendo así a que CBD provoca apoptosis en las células utilizando a la mitocondria como

blanco y utilizando a las ERO como herramienta para desatar este mecanismo de muerte celular (Wu et al., 2018). Estos datos confirman la complejidad de los mecanismos involucrados en la acción de los cannabinoides que involucran a las ERO provenientes de la mitocondria y de las NOX.

Se ha establecido un vínculo importante entre el estrés oxidativo, NOX, el sistema endocannabinoide y la producción de ERO en aterosclerosis, donde al producirse un ambiente excitotóxico, se regula al alza el sistema endocannabinoide, aumentan las concentraciones de AEA, de 2-AG, y la activación selectiva de CB2 produce una producción de citosinas inflamatorias. A pesar de que las ERO tienen propiedades tóxicas bien estudiadas, también tienen papeles fundamentales en la señalización de vías que permiten a las células adaptarse al estrés (Matthews y Ross, 2015).

Las propiedades neuroprotectoras de los ligandos cannabinoides tienen una conexión crucial entre el sistema endocannabinoide y la homeostasis redox. AEA, por ejemplo, atenúa la neurotoxicidad en respuesta al estrés oxidativo y tanto fitocannabinoides como cannabinoides sintéticos protegen a astrocitos contra la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno. Asimismo, varios reportes que involucran al receptor CB1 con la mediación de acciones antioxidantes y antiapoptóticas (Lipina y Hundal, 2016).

En cuanto a CB2, al tratar a células con su agonista AM1241, puede bloquear casi por completo la generación de ERO en respuesta a lipopolisacárido en células BV-2, así como atenuar el estrés oxidativo en cerebro, riñón, corazón e hígado y proteger en isquemia. La respuesta de ambos receptores puede promover respuestas diferenciales en la homeostasis celular redox y disminuir la producción de ERO (Lipina y Hundal, 2016).

Se cree que la habilidad del sistema endocannabinoide de mediar la producción de ERO es mediada a través de las enzimas NOX, sobre todo en neuronas, astrocitos y microglía, en condiciones patológicas. Se ha observado que AEA suprime la producción intracelular de ERO y la expresión de NOX2. Sin embargo, en otros tipos celulares, la inhibición de CB1 atenúa la formación de ERO al reprimir la expresión de las isoformas de NOX. Esto sugiere que la vía involucrada en mediar los efectos de los receptores CB1 y CB2 en la formación de ERO podría ser específica en diferentes células. Agonistas de ambos receptores reprimen la expresión/actividad de la ciclooxigenasa, una enzima implicada tanto en la generación de ERO como en la degradación de AEA. ACEA, un agonista selectivo de CB1, incrementa la expresión de la proteína del receptor CB1 en la membrana mitocondrial, inhibe la generación de ERO y atenúa la lesión mitocondrial inducida por  $Ca^{2+}$  (Lipina y Hundal, 2016).

Por otro lado, existe un control negativo de la activación de CB1 sobre la acción de leptina, pues esta hormona tiene la capacidad de elevar los niveles de ERO en neuronas hipotalámicas, lo que ha surgido como una señal importante de los efectos mediadores anoréxicos de la leptina, pues las ERO producidas por leptina en neuronas hipotalámicas son reducidas con tratamiento de ACEA. Esto puede indicar un papel de este sistema y sus receptores en los efectos mediados por leptina en la ingesta de comida y almacenamiento de energía y otras funciones fisiopatológicas como su papel en la neuroinflamación (Palomba et al., 2015).

Como vemos en la literatura, existe una conexión importante entre la excitotoxicidad y los eventos que la desencadenan, la producción de ERO, la función mitocondrial y el papel

neuroprotector y neurotóxico que tiene el sistema endocannabinoide. Poder entender estas correlaciones podría ayudarnos a encontrar blancos terapéuticos más exactos.

## Cannabinoides y excitotoxicidad

Entre las funciones más importantes, relevantes y estudiadas del SEC es la habilidad de modular mecanismos celulares y moleculares como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la apoptosis y muerte celular y la inflamación, teniendo un papel neuroprotector en estos procesos (Crunfli et al., 2018). Se cree que esta modulación podría ocurrir a través de la inhibición de la liberación de glutamato provocada por la activación del receptor CB1 de manera presináptica, a través de la inhibición de proteínas G, estas activan los canales de K<sup>+</sup> e inhibiendo canales de Ca<sup>2+</sup>, provocando una reducción de los niveles de glutamato (Shen y Thayer, 1998).

El papel neuroprotector del SEC ha sido estudiado en muchos modelos de animales, enfermedades y células distintas, siendo CB1 el mayor receptor de interés y del que más se han encontrado propiedades neuroprotectoras, al menos a nivel SNC. Se ha descubierto que los agonistas de los receptores CB1 y CB2 inhiben los impulsos neuronales provocados por canales de Ca<sup>2+</sup>, modulando así la excitotoxicidad. El agonista de CB1, HU-211 pudo proteger las neuronas en un modelo de neurotoxicidad mediada por la activación de los receptores NMDA y protegió a las células de la excitotoxicidad (Shen y Thayer, 1998). En modelos de excitotoxicidad producida por kainato (KA) en cultivos de neuronas primarias de médula espinal de ratón, la activación del receptor CB1 con D<sup>9</sup>-THC o CP-55,940, otro agonista de CB1, también fue capaz de modular y disminuir la excitotoxicidad (Abood et al., 2001).

Uno de los agonistas de CB1 más estudiados es ACEA, el cual ha mostrado tener efectos antioxidantes y neuroprotectores en modelos de muerte celular por apoptosis y excitotoxicidad, un ejemplo de esto es el trabajo que hicieron Crunfli et al., en 2018, donde utilizaron un modelo de estreptozotocina (STZ); en este trabajo, ACEA incremento la actividad de las vías Akt y ERK que estaban siendo afectadas por STZ, e incrementó los niveles de las proteínas antiapoptóticas, Bcl-2, así como que pudo mejorar la supervivencia de las células N2A con las que se hicieron los experimentos *in vitro* y moduló la liberación de NO (Crunfli et al., 2018).

Esta protección dada por la activación del receptor CB1 se puede ver no sólo en cannabinoides sintéticos, sino también en fitocannabinoides. El extracto de *Cannabis sativa* L. (ECS), compuesto en su mayoría por CBD y  $\beta$ -cariofileno, pudo proteger a las células SH-SY5Y de manera significativa en un modelo de excitotoxicidad dada por glutamato, y pudo, también, contrarrestar los cambios en los niveles de BDNF, esto con la modulación de ERK. ECS también pudo revertir la reducción de los receptores CB1 inducida por glutamato (Borgonetti et al., 2022).

En un modelo de excitotoxicidad provocada por KA en ratones, se provocó una disminución de BDNF, esta disminución se vio incrementada al bloquear el receptor CB1, lo cual se comprobó tanto con la ablación del receptor como utilizando el antagonista específico de CB1, SR141716A, que provocó una susceptibilidad en células en la excitotoxicidad mediada por KA, derivando a muerte celular y a una disminución significativa de los niveles de

proteína de BDNF, sugiriendo que este último es un mediador importante en la protección contra la excitotoxicidad que provee CB1. Esta protección también mediada por la fosforilación de ERK (Khaspekov et al., 2004). En otro modelo de excitotoxicidad en epilepsia, usando KA para provocar excitotoxicidad y también, convulsiones excesivas *in vivo* en ratón en hipocampo, la activación de CB1, así como la potenciación genética de este receptor, pudieron disminuir la excitotoxicidad inducida por KA, sin embargo, a pesar de disminuir la excitotoxicidad provocada por este, aumentó la perceptibilidad de los ratones a sufrir convulsiones (Marsicano et al., 2003).

La activación del receptor CB1 en modelos de KA, también es capaz de bloquear el incremento de la concentración de TNF $\alpha$  que, aunque en concentraciones normales es importante para el desarrollo sináptico, en concentraciones altas puede provocar muerte celular por excitotoxicidad, el uso de un agonista de CB1 en experimentos con células de hipocampo, pudo bloquear este incremento tóxico de TNF $\alpha$ , y reguló la actividad de los receptores de glutamato AMPA, lo cual pudo verse también en cultivos neuronales de médula espinal (Zhao et al., 2010).

El ácido quinolínico (QUIN) es un agonista endógeno de glutamato que actúa sobre los receptores NMDA, el cual también es utilizado en modelos animales y celulares para inducir excitotoxicidad. Se ha demostrado que CB1 es capaz de modular la actividad del receptor NMDA a nivel postsináptico y reduce la actividad glutamatérgica. En un modelo de excitotoxicidad por QUIN, el uso de agonistas de los receptores CB pudo disminuir los marcadores tempranos de la toxicidad provocada por este, previnieron la muerte celular y aumentó los niveles de BDNF, sugiriendo una vez más el papel protector del SEC (Rangel-López et al., 2015).

Las pruebas que apuntan a que el SEC y la activación de sus receptores están involucrados en procesos antioxidantes y neuroprotectores no se limitan sólo a los agonistas de los receptores CB1 y CB2, sino que hay muchas más que involucran otros compuestos que actúan de forma directa o indirecta sobre este sistema, un ejemplo es la evidencia de que N-araquidonilfenolamina (AM404), un modulador de este sistema y un metabolito del paracetamol, tiene la capacidad de modular los procesos de inflamación y, además, tiene efectos neuroprotectores en modelos de Huntington, Parkinson e isquemia (Wilke-Saliba et al., 2019). Este metabolito bloquea el transportador membranar de anandamida y es un agonista tanto de CB1 como de TRPV1, es capaz de prevenir la muerte inducida por la actividad de NMDA de manera concentración dependiente, muy probablemente a través de la disminución de la liberación de glutamato y el calcio intracelular en hipocampo, es capaz también de disminuir la producción de IL-1b (Wilke-Saliba et al., 2019). Existe también evidencia de que el receptor vaniloide, TRPV1, podría estar involucrado en esta neuroprotección del SEC y específicamente, la neuroprotección mediada por AEA y arvanil, un análogo de AEA que es ligando tanto a TRPV1 y CB1, se ha demostrado que modular este receptor vaniloide con su agonista capsaicina, producía efectos neuroprotectores en modelo *in vivo* (Veldhuis et al., 2003).

Las pruebas que se han hecho también involucran inhibidores de las enzimas degradadoras de los endocannabinoides, MAGL y FAAH. En un modelo de excitotoxicidad inducida por ácido QUIN, en cortes de corteza de rata, el inhibidor de FAAH, enzima degradadora de AEA, URB597, pudo prevenir la pérdida de la función mitocondrial, la viabilidad celular y la peroxidación lipídica, al mismo tiempo que pudo reducir la necrosis y,

en menor rango, la apoptosis. Estos efectos fueron mediados por la activación del receptor CB1, evidencia de que AEA es un blanco terapéutico importante (Chavira-Ramos et al., 2020).

El papel de la oleamida (ODA), una amida ácido-grasa con perfil endocannabinoide abundante en el SNC, que está involucrada en muchos procesos neurológicos como la modulación de los receptores 5HT y GABA<sub>A</sub>, ha sido estudiado en procesos neuroprotectores. En modelo de excitotoxicidad por QUIN, ODA generó protección contra la pérdida mitocondrial y el daño celular; estos resultados parecen involucrar la activación de los receptores CB1 y, en cierta parte, CB2, aunque la vía exacta por la que esto ocurre sigue sin especificarse (Maya-López et al., 2019).

Aunque controversial, el bloqueo de CB1 también es causante de neuroprotección en modelos de excitotoxicidad, como NMDA, pues al usar un agonista de CB1 no se consiguió ningún efecto, pero al bloquear CB1, hubo una respuesta neuroprotectora significativa, reduciendo el número de pérdida de neuronas corticales; este efecto, donde la activación de CB1 resulta dañina y su bloqueo resulta neuroprotector, se ha visto en varios modelos tanto *in vivo* como modelos *in vitro*, aunque aún no se sabe exactamente el por qué hay esta discordancia con los resultados, se teoriza que puede ser debido a las concentraciones y modelos que se utilicen (Hansen et al., 2002).

En cuanto a CB2, también se ha encontrado que tienen un papel neuroprotector importante en procesos excitotóxicos, esto se demostró, por ejemplo, utilizando un modelo de rata de muerte celular remota inducida por cerebeloectomía, donde las lesiones axonales inducían síntesis de CB2 en la mitad de las neuronas lesionadas, además, el agonista de este receptor, JWH-015, a través de la señalización de PI3K/Akt, atenuó la apoptosis tardía que ocurre después del daño (Pacher y Mackie, 2012).

### ***Cannabinoides, excitotoxicidad y NOX***

Como se mencionó antes, recientemente se ha encontrado que el sistema endocannabinoide participa como parte de los mecanismos de neuroprotección en respuesta a diversos estímulos nocivos en modelos *in vivo* e *in vitro* (Casajeros et al, 2013; Khaksar and Bigdeli, 2016). Un aumento en los niveles de endocannabinoides tales como el 2-AG y la activación de los receptores CB1 y CB2 se asocian a una disminución de la muerte neuronal en modelos de isquemia, encefalitis aguda, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, traumatismo craneoencefálico y lesión modular. En todos los modelos neuropatológicos se presenta daño excitotóxico (Feliú et al, 2017; de Lago et al, 2009; Rodríguez-Cueto et al, 2017).

Se sabe que la activación de los receptores CB1 en las neuronas, provoca una disminución de la entrada de iones como Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, promovida por una lesión medular (Carrillo-Salinas et al, 2014), así como también la producción de ERO en el endotelio de arterias lesionadas (Matthews and Ross, 2015) y la liberación de glutamato durante la oclusión de la arteria cerebral media (Khaksar and Bigdeli, 2017). Con respecto al receptor CB2, que se encuentra expresado mayormente en la glía, su activación se correlaciona con una disminución en la producción de moléculas inflamatorias como el TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , así como la polarización de la microglía al fenotipo M2 y el aumento en la viabilidad de

oligodendrocitos durante la lesión de la médula espinal (Zooppi et al, 2014; Docagne et al, 2007).

Se ha reportado que una manera de neuroprotección ante procesos excitotóxicos del sistema endocannabinoide en lesiones neuronales agudas es a través de su coacción con FAAH, pues tiene un efecto dual donde este último inactiva la producción de endocannabinoides, lo cual podría modular respuestas de supervivencia celular o de reparo de tejido (Karanian et al., 2005).

A su vez, cuando existe excitotoxicidad inducida por glutamato, existe un aumento de la expresión del receptor CB1 y un aumento de AEA y 2-AG, que modulan el metabolismo de este sistema y provocan un efecto neuroprotector y regulador de la excitotoxicidad (Li et al., 2017).

Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición genética de NOX-2 resulta en el aumento de la supervivencia de neuronas sometidas a un evento excitotóxico (Coyoy et al., 2008; Páramo et al 2013; Hirano et al 2015; Ma et al, 2017). Se ha propuesto que existe una relación entre la activación del sistema endocannabinoide y la regulación de las ERO producidas por NOX en modelos de daño cardiaco e inflamación intestinal (Chandra et al, 2015). En relación con esto, se ha descubierto en macrófagos que la activación de CB2 promueve la disminución de ERO producidas por las NOX y la regulación negativa de vías proinflamatorias (Bermudez et al, 2016); sin embargo, no se conoce si existe relación directa entre la actividad de las NOX y el sistema endocannabinoide en el sistema nervioso central, parte de lo que también buscamos investigar con este proyecto.

Debido a que tanto la regulación negativa de la NOX-2 como la activación de los receptores CB1 en neuronas promueven efectos similares, es probable que estos sistemas jueguen papeles complementarios en la supervivencia de neuronas con daño excitotóxico. En la microglía se ha visto que la deficiencia de NOX-2 provoca la activación de CB2, asociada a la activación de fenotipos antiinflamatorios en modelos de daño medular (Mecha et al, 2018), no obstante, se desconoce el papel que juegan las NOX en este sistema.

Se ha encontrado que compuestos tales como el CBD tiene propiedades proapoptóticas, asimismo, que influye en la muerte, crecimiento y supervivencia celular. La exposición de CBD activa la vía apoptótica extrínseca e intrínseca acompañada con un incremento de producción de ERO y de la activación de la NOX-2, la NOX-4 y la p22phox (Wu et al., 2018).

### ***Cannabinoides y células granulares de cerebelo***

Los receptores CB además de encontrarse en las terminales sinápticas de las células de Purkinje, donde presentan su mayor densidad (Kawamura et al., 2006), también se encuentran en las células granulares de cerebelo (Pacheco et al., 1992; Skaper et al., 1999; Barnes et al., 2020), células utilizadas en este proyecto, específicamente en las fibras paralelas de estas células (Suárez et al., 2008), en donde se encargan de la inhibición de AMPc (Pacheco et al., 1992). Además de esto, se ha registrado que CB1 en estas células también está involucrado en la actividad de la enzima NOS, pues distintos cannabinoides sintéticos (WIN 55,212-2, CP55940 y HU210) inhiben la activación de esta encima inducida por KCl, y a su vez, por un decremento en el flujo de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a la despolarización de membrana (Hillard et al., 1999).

Numerosos estudios se han hecho sobre las implicaciones terapéuticas que estos receptores y todo el SEC podrían tener, sobre todo en casos de neuroexcitotoxicidad, uno de los cannabinoides reportados como protectores en casos de excitotoxicidad por glutamato en células granulares de cerebelo es la palmitoiletanolamida, WIN 55,212-2 y D<sup>8</sup>-THC, protegen a este tipo celular de manera concentración dependiente, pues funciona como un agonista endógeno de los receptores CB2 en las células granulares, sin embargo, AEA no pudo lograr el mismo efecto (Skaper et al., 1996).

A pesar de que se ha registrado que WIN 55,212-2 tiene efectos neuroprotectores en estas células, también se ha registrado que este cannabinoide sintético podría causar apoptosis en células granulares, pues se ha registrado que el tratamiento con este compuesto causa contracción del cuerpo celular y del núcleo, lo cual se suma a que también se ha registrado disminución en la viabilidad celular de manera concentración dependiente y aumento de la caspasa-1 (Pozzoli et al., 2006). Este tipo de contradicciones se han registrado con distintos tipos de cannabinoides en distintos tipos de células, aunque aún no se ha demostrado el porqué de esto, se ha sugerido que es debido a la concentración de fármaco que se utilice (Tomiyama y Funada, 2014).

La administración de cannabinoides, como THC, también afectan la actividad sincronizada de las redes neuronales de las células granulares en cerebelo, pero sólo la administración crónica, la cual produce daños en esta actividad neuronal y en su coordinación, estos fallos están relacionados con enfermedades tales como ataxia, lo cual se contrarrestó utilizando un antagonista de CB1, SR141716A (Ghozland et al., 2002).

Como vemos, aunque los estudios sobre cannabinoides en cerebelo se han enfocado más en el papel que tienen en las células de Purkinje, pues es donde muestran mayor densidad, el papel que tienen en las células granulares también es relevante para casos de excitotoxicidad, muerte celular, actividad neuronal y las enfermedades que estas alteraciones podrían causar en aspectos como la movilidad corporal.

En resumen, se ha visto que las ERO producidas por la mitocondria y por NOX, particularmente estas últimas, son críticas para la muerte neuronal. Por otra parte, los cannabinoides tienen un conocido efecto neuroprotector en distintos modelos clínicos y experimentales. Sin embargo, a la fecha se sabe poco sobre los mecanismos de acción de los cannabinoides. Un posible blanco de los cannabinoides podría ser la regulación de las ERO, aunque existe controversia sobre la acción de estos compuestos pues en algunos casos la activación de los receptores cannabinoides disminuye la producción de las ERO, mientras que en otros la aumenta. Por esta razón, en este proyecto se valorará si la neuroprotección de los cannabinoides está mediada, de alguna forma, por la regulación de las ERO y sus fuentes, particularmente alguna NOX. Para ello se utilizará un modelo in vitro de muerte excitotóxica en células granulares de cerebelo, donde se evaluará tanto la muerte producida por glutamato en estas células, así como su posible efecto neuroprotector y, si fuera el caso, explorar si las ERO y la NOX están involucradas en la acción protectora de los cannabinoides.

## Hipótesis

Si el SEC tiene un efecto neuroprotector y si la muerte excitotóxica involucra un incremento de ERO y si la NOX es la principal fuente de especies reactivas del oxígeno involucrada en la muerte, entonces parte del efecto protector del SEC se dará por una reducción de los niveles de ERO a través de inhibir la actividad de NOX.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Conocer los mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector del SEC en la muerte neuronal por excitotoxicidad.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la activación del receptor CB1 en la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad.
- Conocer el efecto del agonista y antagonista del receptor CB1 en los niveles de especies reactivas de oxígeno en condiciones de excitotoxicidad.
- Conocer el efecto del agonista y antagonista del receptor CB1 en la actividad de NOX en condiciones de excitotoxicidad.

## **Metodología**

### **Modelo experimental**

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de 7 días *in vitro* (DIV), obtenidos de ratas Wistar hembras y machos de 8 días de edad. Las NGC se trataron con glutamato monosódico (300  $\mu$ M) durante 24 horas para inducir daño excitotóxico. Los cultivos se trataron previamente con el agonista específico de CB1 (ACEA) o con el antagonista específico de CB1 (AM-251). Se evaluó la viabilidad celular por dos técnicas, la reducción de MTT y tinción con calceína y yoduro de propidio después de 24 horas del tratamiento de las células. También se evaluaron los niveles de ERO mediante la tinción con dihidroetidio, así como la actividad de NOX.

### **Animales**

Se emplearon 20 ratas Wistar hembras y machos de 8 días de edad. Todos los animales usados para la experimentación descrita en la presente investigación fueron tratados de acuerdo con los estándares aceptados de cuidado animal con los procedimientos aprobados por el Comité Interno del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, protocolo: "*Metodología del cultivo de células de cerebelo de rata*", con número **JMA174-21**. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales empleados en la presente investigación

### **Cultivos celulares**

Los cultivos de neuronas granulares de cerebelo (NGC) se hicieron a partir de los cerebelos de las ratas, una por cultivo. Las células fueron cultivadas en placas de plástico cubiertas con poli-L-lisina (5  $\mu$ g/mL) a una densidad de  $265 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en un medio Eagle basal suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, conteniendo glutamina 2 mM, KCl 25



mM, estreptomycin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y penicilina 50 U/mL. Después de 24 h se añadió citocina arabinosida (10  $\mu\text{M}$ ) para prevenir la proliferación de las células no neuronales. Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) y saturado con aire con vapor de agua (95%). Los cultivos contienen aproximadamente 95% de neuronas, determinado mediante el conteo celular. Las células se trataron con glutamato monosódico 300  $\mu\text{M}$  a los 7 DIV y las evaluaciones de viabilidad, ERO y actividad de NOX se midieron a los tiempos indicados.

### ***Curva de concentración de Glutamato***

Para determinar la concentración de glutamato monosódico (L-glutamato monosódico, diluido en agua MiliQ) requerida para obtener una muerte de 50-60%, aproximadamente para poder tener un margen de acción de neuroprotección de los cannabinoides. Para ello, se utilizaron cajas de 24 pozos con neuronas granulares de cerebelo obtenidas de ratas Wistar de 8 días de edad y cultivadas por 7 días. Las concentraciones de glutamato utilizadas fueron las siguientes: 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  y 900  $\mu\text{M}$ . El tratamiento se hizo durante 24 horas con las respectivas concentraciones de Glutamato, posteriormente, se realizó una prueba de MTT para determinar la viabilidad.

### ***Curvas de concentración de cannabinoides: ACEA y AM-251***

Para determinar la concentración de ACEA y AM-251, el agonista y antagonista, respectivamente, utilizados en este proyecto, se utilizaron cajas de 24 pozos de neuronas granulares de cerebelo obtenidas de ratas Wistar de 8 días de edad y cultivadas por 7 días y se utilizaron los siguientes grupos: Control, Glutamato a 300  $\mu\text{M}$ , Glutamato 300  $\mu\text{M}$ +ACEA a sus diferentes concentraciones. Las concentraciones utilizadas para ACEA fueron las siguientes: 0.2  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.7  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$ , con las cuales se hizo un pretratamiento a las células durante 30 minutos, para después tratarlas con glutamato durante 24 horas. En el caso de ACEA, se buscaba una concentración que fuera capaz de disminuir la muerte provocada por glutamato a 300  $\mu\text{M}$ .

En cuanto a AM-251, se tuvieron los siguientes grupos: Control, Glutamato a 300  $\mu\text{M}$ , Glutamato 300  $\mu\text{M}$ +AM-251. Las concentraciones de AM-251 que se utilizaron fueron las siguientes: 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . Se buscaba una concentración que no tuviera ningún efecto protector sobre la muerte provocada por glutamato ni generara cambios significativos.

Después del tratamiento con glutamato 24 horas, se realizó una prueba de viabilidad MTT para ambas curvas de concentración.

### ***Activación y bloqueo del receptor CB1 y muerte excitotóxica***

Para poder activar o bloquear la actividad del sistema endocannabinoide, en específico, del receptor CB1, se utilizaron dos fármacos: el agonista de CB1, araquidonil-2'-cloretilamida hidrato (ACEA) y el agonista inverso (con actividad) antagonista, AM-251. Primeramente, se realizó una curva de concentración para establecer las concentraciones a las que se

activaba o bloqueaba dicho receptor y conocer si tenían algún efecto *per se* en la viabilidad. A partir de estos ensayos se determinaron las siguientes concentraciones para los experimentos posteriores: para ACEA, 0.7  $\mu\text{M}$ , y para AM-251, 1  $\mu\text{M}$ . Las células fueron pretratadas con estos fármacos 30 min antes del tratamiento con glutamato 300  $\mu\text{M}$  que se hizo durante diferentes tiempos.

Se establecieron los siguientes grupos experimentales: Control; Glutamato; ACEA; AM-251; ACEA+AM-251 (A+A); ACEA+glutamato; AM-251+glutamato; A+A+glutamato. El control incluye un grupo al que solo se le añade el vehículo en el que se preparan las drogas.

### **Viabilidad Celular**

Se determinó la viabilidad celular de dos formas: por la técnica de reducción de MTT (bromidío 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio) y la acumulación de Calceína-AM y la exclusión de IP (Ca/IP). La primera técnica está basada en la habilidad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial de transformar MTT a azul de formazán. Dado a que sólo las células vivas pueden realizar esta reacción, en nuestra preparación ya hemos verificado que la cantidad de azul de formazán producida es directamente proporcional al número de células vivas presentes en el cultivo (Zaragoza-Campillo y Morán, 2017). Las células fueron incubadas con MTT (100  $\mu\text{M}$ ) durante 20 min a 37°C, posteriormente se extrajo el medio de cultivo y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimetil sulfóxido 100%) y se midió la cantidad de azul de formazán con espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Con la finalidad de confirmar los datos de viabilidad también utilizamos la técnica de Ca/IP mencionada anteriormente. Las células vivas contienen esterasas endógenas que convierten la Calceína-AM (no fluorescente) a Calceína, un producto verde fluorescente. Por lo que sólo las células vivas se tiñen de verde. Por su parte, el IP solo cruza las membranas plasmáticas de las células dañadas. Este compuesto se une al ADN y al ARN de doble cadena por intercalación y emite una señal roja fluorescente. Las células que muestran esta tinción se consideran células muertas o dañadas (Zaragoza-Campillo y Morán, 2017). Las células se incubaron con Calceína-AM (1  $\mu\text{M}$ ) e IP (40  $\mu\text{M}$ ) por 45 min a 37°C y después fueron observadas en un microscopio de fluorescencia a 517/494 nm y 535/617, respectivamente. Se tomaron fotos por pozo y las células teñidas en verde (Calceína) se consideraron vivas, mientras que las teñidas en rojo (IP) fueron consideradas como muertas. Del total de células contadas (verdes + rojas) se calculó el porcentaje de vivas/muertas con el empleo del programa ImageJ (versión no. v1.53k).

### **Determinación de las ERO**

Se utilizó la técnica de DHE para medir la cantidad de ERO producidas por las NGC. Esta técnica tiene como base la tinción de los núcleos celulares con DHE. Este compuesto entra libremente a las células y cuando es oxidado por las ERO presentes en el citosol se produce etidio y 2-hidroxi-etidio, los cuales entonces se unen al ADN y emiten una fluorescencia roja intensa. De esta forma, la intensidad de esta fluorescencia es un parámetro indirecto para medir los niveles de ERO. Las NGC se trataron como se indicó

arriba y de acuerdo con los tiempos indicados se les trató con DHE (1  $\mu$ l por pozo, 3.2  $\mu$ M) y se incubaron durante 20 min a 37°C (Zaragoza-Campillo y Morán, 2017). Pasado ese tiempo, se observó la fluorescencia de DHE en un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 488-515 nm. Las células se fotografiaron y se contaron de la misma forma que en el experimento anterior, donde los núcleos marcados con rojo se tomaron como los que estaban produciendo ERO, esto con el empleo de ImageJ, se hizo el porcentaje con respecto al grupo de glutamato.

### ***Medición de la actividad de NOX***

La actividad de la NOX se midió a través de luminiscencia, a través de un ensayo con lucigenina y NADPH. El método fue modificado de Bruce-Keller et al., 2011. Las muestras fueron tomadas del cultivo celular de neuronas granulares de cerebelo de rata de 8 días de edad, estas células tenían un tiempo de 7 DIV. Las NGC fueron sembradas en cajas de 35 mm, donde se tuvo los siguientes grupos: control, cannabinoides 1h, cannabinoides con glutamato 1h, glutamato 1h, cannabinoides 15h, cannabinoides con glutamato 15h, glutamato 15h y K5 (medio sin suero y bajo potasio (5 mM)) como control negativo, el cual tuvo un tiempo de tratamiento de 3h. Todos los tratamientos se hicieron por duplicado. Pasados los tiempos de tratamiento, se rasparon las células con PBS y se transfirieron a una placa oscura de 96 pozos, donde se les agregó 50  $\mu$ l de PBS con células, una solución de 50  $\mu$ l de NADPH y 50  $\mu$ l lucigenina, para completar un volumen final de 150  $\mu$ l. Para la determinación de la luminiscencia creada por la actividad de NOX, se realizó una lectura en el lector de placas Synergy HT durante 30 min, con una longitud de onda de 750nm, con intervalos de 1 min. La actividad de NOX se determina por la luminiscencia que es emitida por la lucigenina, ya que al estar en presencia del anión superóxido que produce NOX y NADPH, se reduce.

La actividad de NOX se calculó como el delta de la luminiscencia final con respecto a la inicial, esto se expresó como  $\Delta$ URL/hora/ $\mu$ g de proteína, para esto se hizo un ensayo Lowry, donde se midió la cantidad de proteína que había por cada grupo, se utilizó de igual forma una placa de 96 pozos, y se normalizó la cantidad de proteína con una curva de albumina, se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750nm.

### ***Análisis estadístico***

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 9. Se utilizó una n=4 para todos los experimentos. Los datos presentados como media  $\pm$  Error Estándar (a partir de aquí, EE) determinaron por ANOVA de una vía, seguido de la prueba Tukey. Valores menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

## **Resultados**

- **Curva de concentración de glutamato y excitotoxicidad**

Primeramente, determinamos la concentración de glutamato monosódico requerida para obtener una muerte de 50-60%, aproximadamente, para tener un margen de una posible acción neuroprotectora de los cannabinoides. De acuerdo con los resultados obtenidos, todas las concentraciones utilizadas inducen una muerte de las neuronas granulares de cerebelo de aproximadamente un 50% (Fig.1). Para los fines del proyecto, buscábamos una muerte de aproximadamente 50-60%, por lo que elegimos la

concentración de 300  $\mu\text{M}$ , con la que obtuvimos resultados más consistentes en todas las pruebas realizadas.

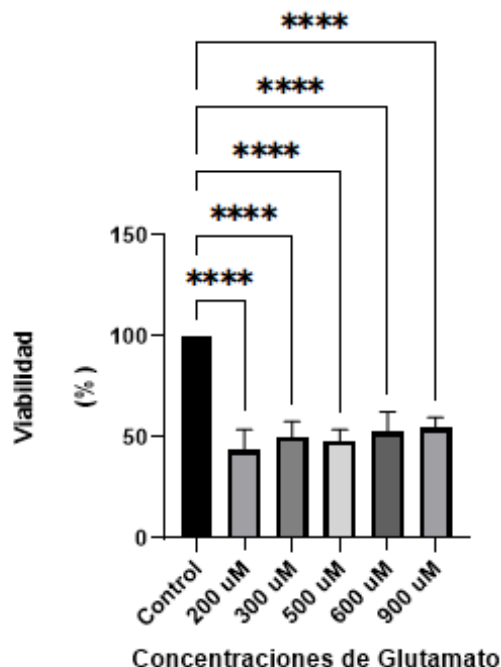


Fig. 1. Curva de concentración de glutamato en la viabilidad de NGC después de 24 h de tratamiento. La viabilidad se midió como la transformación de MTT medido espectrofotométricamente como se indica en Métodos. Se consideró al control como 100%. Las barras indican el promedio  $\pm$  EE de 4 experimentos independientes. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

- **Curva de concentración ACEA y AM-251 y excitotoxicidad**

Una vez que se estableció la concentración de glutamato a ser utilizada en los experimentos de viabilidad, se realizaron curvas de concentración para los fármacos usados en los ensayos de neuroprotección. Para determinar si el receptor CB1 pudiera estar involucrado en la neuroprotección de las neuronas granulares en la muerte por excitotoxicidad, utilizamos ACEA, un agonista del receptor CB1. También utilizamos AM-251, un agonista inverso de este mismo receptor, que para fines de sus efectos tiene una acción antagonista.

La Figura 2 muestra que todas las concentraciones de ACEA generaron una protección significativa al compararlas con el glutamato solo, mostrando una mejoría de hasta de 40% y siendo las concentraciones de 0.5 y 07  $\mu\text{M}$  las que mejores resultados mostraron. Con esto se comprobó que la estimulación del receptor CB1 tiene un efecto protector en estas neuronas ante una condición excitotóxica. Para fines de los siguientes

experimentos, se decidió usar la concentración de 0.7  $\mu\text{M}$ , pues fue la concentración que mayor protección brindó a las neuronas.

En cuanto a la curva de AM-251, ninguna concentración evaluada mostró algún efecto ante un daño excitotóxico, ya sea protegiendo o aumentando la muerte neuronal. Estos datos sugieren que en este modelo no participan endocannabinoides producidos en respuesta del daño excitotóxico, al menos en esta ventana de tiempo y/o en las dosis utilizadas (Fig. 3). Para fines de los siguientes experimentos, se determinó que la concentración a utilizar sería 1  $\mu\text{M}$ , por tratarse de una concentración intermedia de las evaluadas.

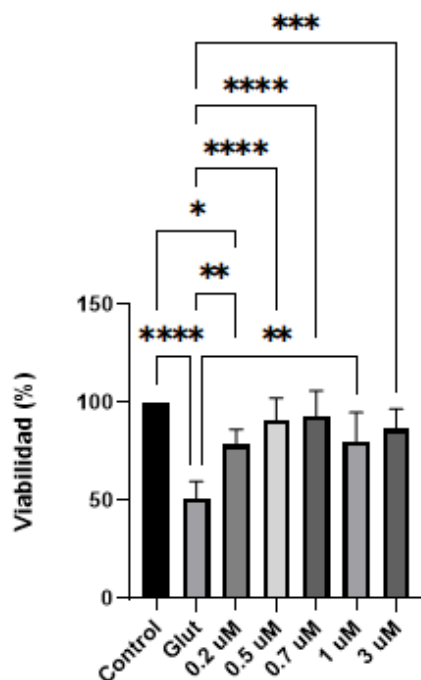


Fig. 2. Curva de concentración de ACEA y excitotoxicidad por glutamato. Las células se trataron con diferentes concentraciones de ACEA (0.2  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.7  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min y posteriormente, se les trató con glutamato 300  $\mu\text{M}$  durante 24 h. Se realizó una prueba de viabilidad por reducción de MTT como se indica en Métodos. El control sin tratamiento se consideró como 100%. Las barras indican el promedio  $\pm$  EE de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

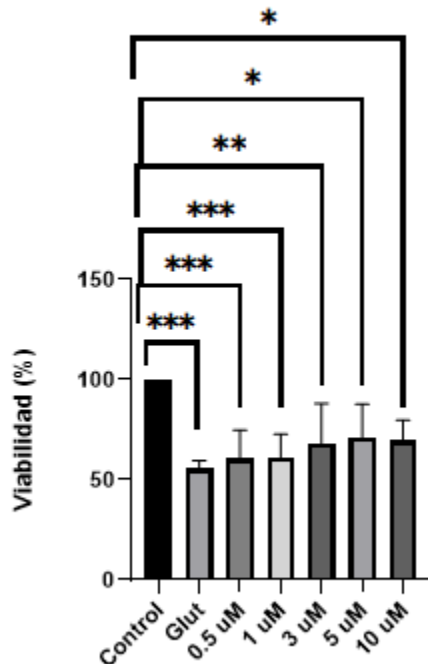


Fig. 3. Curva de concentración de AM-251 y excitotoxicidad por glutamato. Las células se trataron con diferentes concentraciones de AM-251 (0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) durante 30 min y posteriormente, se les trató con glutamato 300  $\mu$ M durante 24 h. Se realizó una prueba de viabilidad por reducción de MTT como se indica en Métodos. El control sin tratamiento se consideró como 100%. Las barras indican el promedio  $\pm$  EE de 4 experimentos independientes. \*\*\* p <0.001.

- **Efecto combinado de ACEA y AM-251 en la muerte por excitotoxicidad**

Determinadas las concentraciones de glutamato, ACEA y AM-251, se procedió a evaluar la viabilidad celular en células tratadas con glutamato y el tratamiento combinado de los agonistas del receptor CB1 en la muerte celular. Para esto, se hicieron 6 grupos:

- Control sin tratamiento
- ACEA 0.7  $\mu$ M solo
- AM-251 1  $\mu$ M solo
- ACEA + AM-251
- Glutamato 300  $\mu$ M
- Glutamato + ACEA
- Glutamato + AM-251
- Glutamato + ACEA+AM-251 (Referido en las figuras como Glut+A+A).

Las células se trataron con ACEA, AM-251 o ambos durante 30 min y posteriormente con glutamato durante 24 h y se realizaron las pruebas de viabilidad por las técnicas de reducción de MTT o por tinción con Ca/IP.

La Figura 4 muestra que ninguno de los fármacos agonista o antagonista, por sí solos o combinados, tuvo un efecto significativo en la viabilidad neuronal. Esto indica que en condiciones basales un incremento o bloqueo de la actividad de los receptores cannabinoides CB1 no tiene un efecto en la viabilidad de estas neuronas.

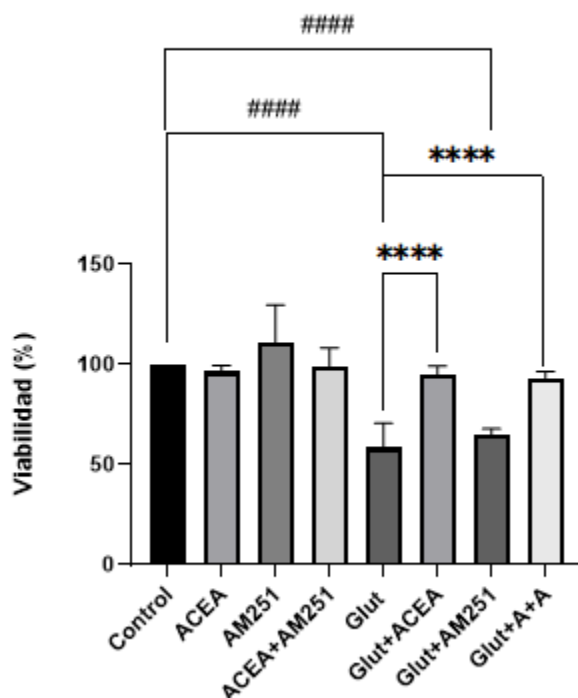


Fig. 4. Efecto del tratamiento solo y combinado de agonistas y antagonistas del receptor CB1 en el daño excitotóxico por glutamato en NGC. Las células se trataron con ACEA 0.7  $\mu\text{M}$  y/o AM-251 1  $\mu\text{M}$  durante 30 min. Posteriormente, un grupo se trató con glutamato 300  $\mu\text{M}$ , durante 24 h y se realizó una prueba de viabilidad por reducción de MTT como se indica en Métodos. Las barras indican el promedio  $\pm$  EE de 4 experimentos independientes. \*\*\*\* ANOVA de una vía, seguido de la prueba Tukey.  $p < 0.0001$ .

Por otra parte, como se mostró anteriormente (Fig. 2), ACEA proveyó a las células de una protección contra la muerte de NGC inducida por excitotoxicidad por glutamato, mostrando una diferencia significativa en comparación con el grupo tratado únicamente con glutamato (Fig. 4). También, como indicó arriba (Fig. 3), el AM-251 no tuvo ningún efecto sobre la acción neurotóxica del glutamato (Fig. 4).

Como se indicó arriba, la medición de la viabilidad por medio de la técnica de transformación de MTT se basa en la capacidad que tiene la mitocondria de transformar el MTT en azul de formación por acción de enzimas como la enzima succinato deshidrogenasa. De tal forma que podría considerarse que, bajo ciertas condiciones, esta

técnica mide principalmente el metabolismo celular y no necesariamente la viabilidad celular. Para confirmar los resultados de viabilidad obtenidos con la prueba de transformación de MTT decidimos utilizar otra técnica descrita en Métodos, la tinción con calceína y yoduro de propidio. Esta prueba se basa en que las células muertas o dañadas pierden la integridad membranal lo que permite el ingreso del IP (rojo), mientras que la calceína (Calceína-AM no fluorescente) penetra en todas las células, pero solo se hidroliza en las células vivas generando calceína verde. Por lo que uno puede detectar células vivas (verdes) y muertas (rojas) en la misma preparación. Dada su confiabilidad, decidimos probarla en este proyecto.

Como se indicó arriba, la medición de la viabilidad por medio de la técnica de transformación de MTT se basa en la capacidad que tiene la mitocondria de transformar el MTT en azul de formación por acción de enzimas como la enzima succinato deshidrogenasa. De tal forma que podría considerarse que, bajo ciertas condiciones, esta técnica mide principalmente el metabolismo celular y no necesariamente la viabilidad celular. Para confirmar los resultados de viabilidad obtenidos con la prueba de transformación de MTT decidimos utilizar otra técnica descrita en Métodos, la tinción con calceína y yoduro de propidio. Esta prueba se basa en que las células muertas o dañadas pierden la integridad membranal lo que permite el ingreso del IP (rojo), mientras que la calceína (Calceína-AM no fluorescente) penetra en todas las células, pero solo se hidroliza en las células vivas generando calceína verde. Por lo que uno puede detectar células vivas (verdes) y muertas (rojas) en la misma preparación. Dada su confiabilidad, decidimos probarla en este proyecto.

Con este propósito, en este estudio se trataron a las células como se describió anteriormente: seis grupos (control intacto, control fármacos: ACEA, AM-251 y ACEA+AM-251, glutamato, glutamato + ACEA, glutamato+AM-251 y Glutamato+ACEA+AM-251). Los fármacos se aplicaron 30 min, después de los 30 min antes del glutamato 300  $\mu$ M y después de 24 h se midió la viabilidad por C/IP. Pasadas las 24 h de incubación, se aplicó 1  $\mu$ l de IP y 0.5  $\mu$ l de calceína-AM en cada pozo y se dejó incubar durante 40 min. Después de esto, se observó y cuantificaron las células verdes y rojas en un microscopio de fluorescencia.

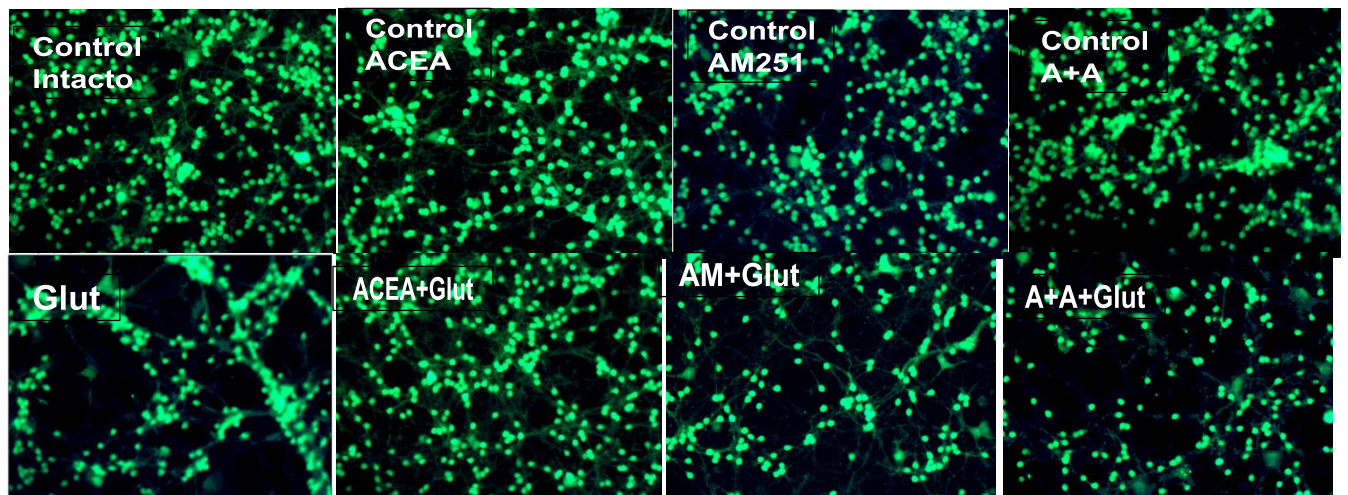


Fig. 5. Células marcadas con calceína. Arriba, de izquierda a derecha: Control; ACEA 0.7  $\mu$ M; AM-251 1  $\mu$ M; ACEA + AM-251. Abajo, de izquierda a derecha: glutamato, glutamato + ACEA; glutamato + AM-251; glutamato + ACEA + AM-251. Las células se trataron con los agonistas solos o combinados durante 30 min y posteriormente un grupo se trató con



glutamato 300  $\mu$ M, durante 24 h y se realizó una prueba de viabilidad por Ca/IP como se describe en Métodos.

La Figura 5 muestra, que ni el agonista ni el antagonista tiene algún efecto en la viabilidad basal de las células, lo cual concuerda con los resultados de MTT. Así mismo, observamos una marcada diferencia entre el grupo control y el tratado con glutamato, donde se observa la pérdida de células vivas en el grupo de glutamato en comparación con el grupo control. También se aprecia un efecto protector del ACEA en la muerte inducida por glutamato. Sin embargo, como se observó con la técnica de MTT, el antagonista parece no revertir el efecto neuroprotector de ACEA. La Figura 6 muestra la cuantificación de las células positivas a la fluorescencia emitida por la calceína. En este sentido, los resultados indicaron de nuevo que la activación del receptor CB1 induce una protección de las neuronas después del tratamiento con condiciones excitotóxicas. En este caso, la protección fue parcial, de aproximadamente un 50% en estas condiciones. De manera interesante, en este caso, el AM-251 mostró una reducción en el efecto protector inducido por el ACEA de aproximadamente un 50% (Fig.6), lo que podría sugerir una acción parcial mediada por el receptor CB1.

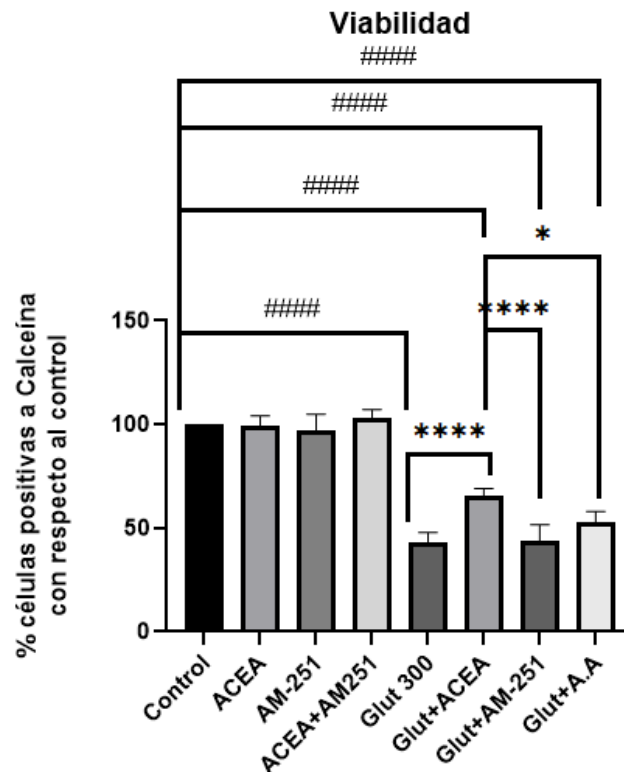


Fig. 6. Cuantificación de la viabilidad por calceína bajo las condiciones mostradas en la Fig. 5. La cuantificación se realizó mediante el conteo de células positivas a Calceína, obtenidas en fotos hechas en microscopio de fluorescencia,  $\pm$  EE, DE de 4 experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido de la prueba Tukey \*\*\*\*p <0.0001 y \* p<0.05.

Cuando se evaluó la tinción con IP (Fig. 7), se encontró una coincidencia con los datos calceína. De nuevo, fue notorio el aumento en el número de células positivas a IP de

los grupos tratados con glutamato en comparación con el grupo control. También fue notoria la reducción en el número de células muertas por glutamato cuando se tratan con ACEA; sin embargo, en este caso, como con MTT, el AM-251 parece no antagonizar el efecto protector de ACEA. También parece haber un pequeño incremento en el número de neuronas muertas cuando se tratan con ACEA o AM-251 solos.

La figura 8 muestra la cuantificación de las células positivas a IP en las condiciones experimentales descritas. En este caso, aunque hay tendencias en algunos grupos que coinciden con lo mencionado arriba, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales, salvo el incremento de neuronas positivas a IP en el grupo de glutamato. La activación del receptor CB1 por su fármaco agonista (ACEA) mostro una tendencia en la reducción de los niveles de fluorescencia de IP. Se puede notar que el grupo tratado con el agonista inverso de CB1, AM-251, tiene mayor cantidad de células positivas a IP en comparación con glutamato, aunque no resulte significativo. Será necesario ampliar el número de réplicas para confirmar los datos estadísticos.

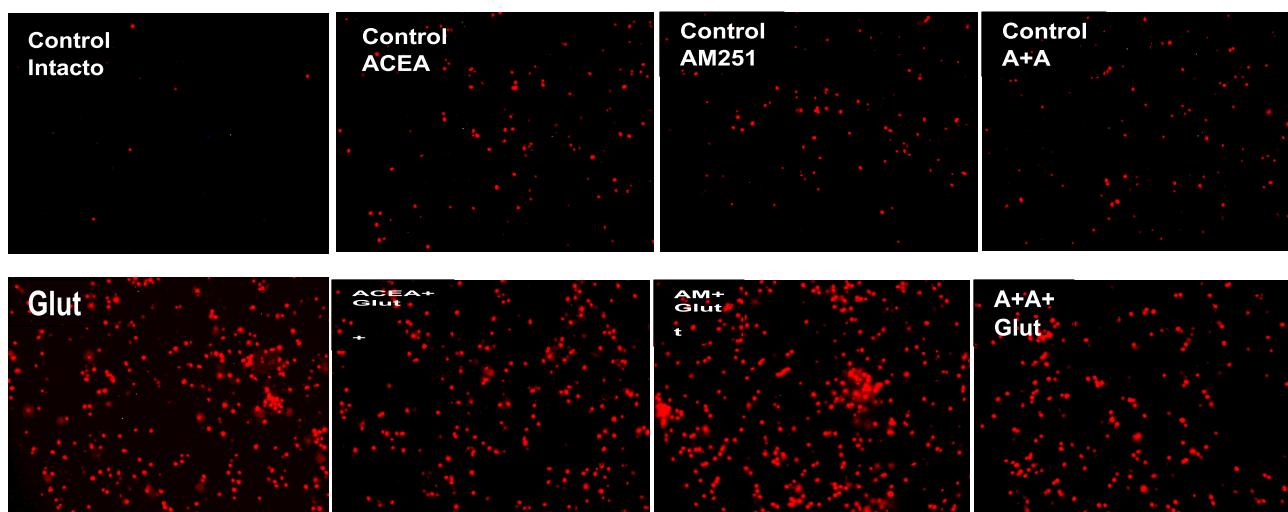


Fig. 7. Células marcadas con ioduro de propidio. Arriba, de izquierda a derecha: Control; ACEA 0.7  $\mu$ M; AM-251 1  $\mu$ M; ACEA + AM-251. Abajo, de izquierda a derecha: glutamato, glutamato + ACEA; glutamato + AM-251; glutamato + ACEA + AM-251. Las células se trataron con los agonistas solos o combinados durante 30 min y posteriormente un grupo se trató con glutamato 300  $\mu$ M, durante 24 h y se realizó una prueba de viabilidad por Ca/IP como se describe en Métodos.

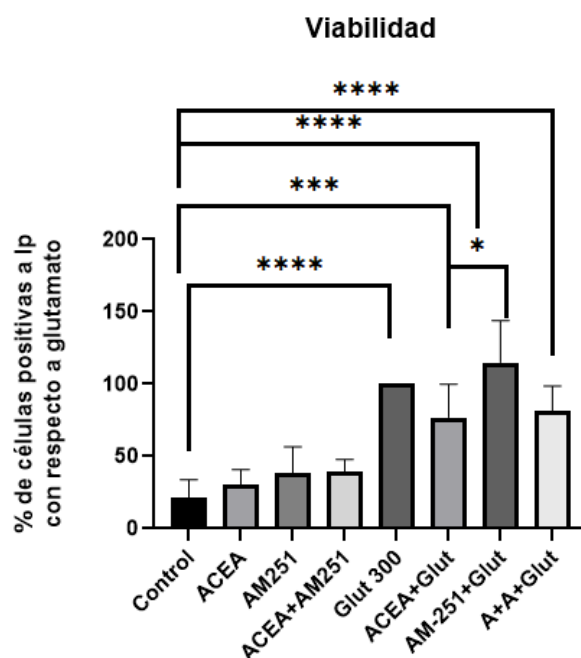


Fig. 8. Cuantificación de la viabilidad por ioduro de propidio bajo las condiciones mostradas en la Fig. 7. La cuantificación se realizó mediante el conteo de células positivas a Ioduro de propidio, obtenidas en fotos hechas en microscopio de fluorescencia. Los datos son el promedio  $\pm$  EE de 4 experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido de la prueba Tukey \*\*\*\* $p < 0.0001$  y \*\*\* $p < 0.005$  y \* $p < 0.05$ .

- **Efecto de un agonista y un antagonista del receptor CB1 en la producción de especies reactivas del oxígeno en condiciones de muerte por excitotoxicidad**

El siguiente paso en nuestro proyecto fue corroborar los cambios en los niveles de ERO inducidos por glutamato y averiguar una posible relación entre la producción de ERO y la protección por la activación del sistema endocannabinoide mediado por el receptor CB1 en la muerte inducida por excitotoxicidad por glutamato en estas células.

Para este punto, se sometieron a las células a los mismos tratamientos antes mencionados. Una vez realizados en los tiempos correspondientes, se hizo una prueba de medición de ERO por DHE, donde se identificó la producción de ERO citosólicas.

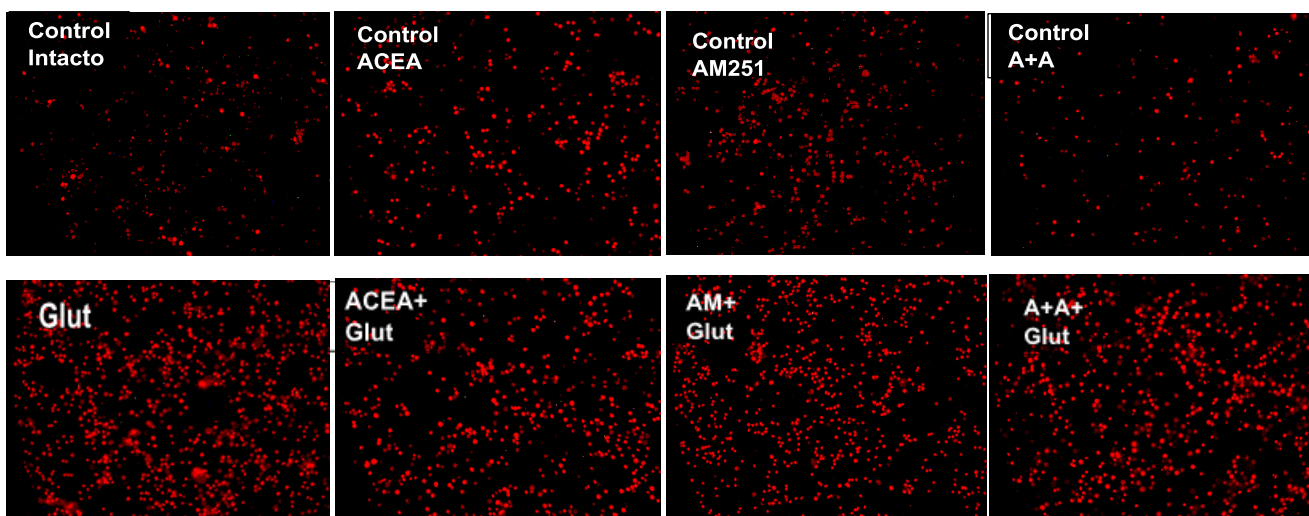


Fig. 9. Niveles de ERO medidos por dihidroetidio. Cada núcleo marcado en rojo indica una célula con niveles elevados de ERO. Arriba, de izquierda a derecha: Control; ACEA 0.7  $\mu$ M; AM-251 1  $\mu$ M; ACEA + AM-251. Abajo, de izquierda a derecha: glutamato, glutamato + ACEA; glutamato + AM-251; glutamato + ACEA + AM-251. Las células se trataron con los agonistas solos o combinados durante 30 min y posteriormente un grupo se trató con glutamato 300  $\mu$ M, durante 24 h y se trataron con DHE como se describe en metodología.

Bajo estas condiciones, encontramos que los niveles de fluorescencia, que indica producción de ERO, mostraron un incremento en los grupos tratados con glutamato; sin embargo, cuando las células se trataron con glutamato y el agonista ACEA, no se observó un cambio notorio en las células marcadas en rojo. Algo similar ocurrió en el tratamiento de glutamato con el antagonista AM-251. La combinación del agonista con el antagonista y glutamato mostró una aparente reducción en la fluorescencia. En ausencia de glutamato, el agonista y antagonista solos o combinados no indujeron un cambio aparente en el número de células teñidas (Fig. 9).

Cuando se cuantificó la cantidad de células positivas a DHE en las preparaciones mostradas en la Fig. 9 encontramos que la condición de glutamato en un 50% los niveles de ERO en comparación con los controles (Fig. 10); sin embargo, el resto de las condiciones no mostraron ningún cambio significativo en los niveles de ERO en comparación con glutamato. Aunque no fue estadísticamente significativa, ACEA más glutamato mostró una tendencia a reducir alrededor de un 30% los niveles de ERO en comparación con glutamato, sugiriendo que existe una interacción entre la producción de ERO y el SEC. Será necesario aumentar el número de ensayos para confirmar si existe una diferencia estadística.

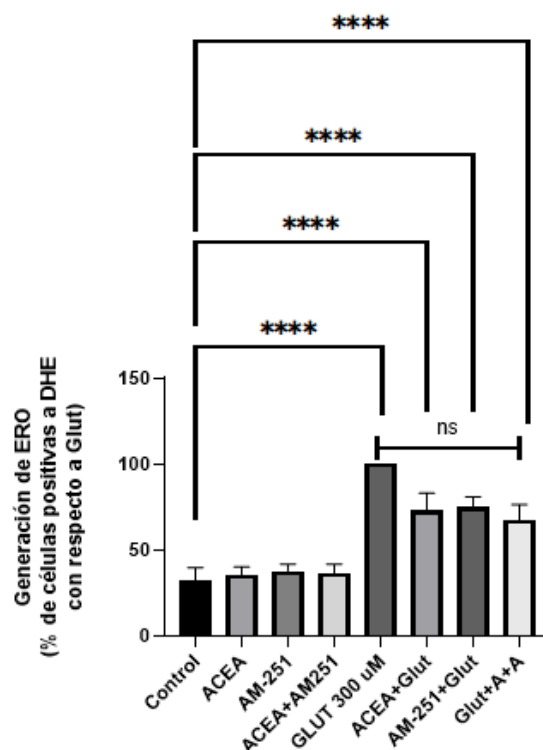
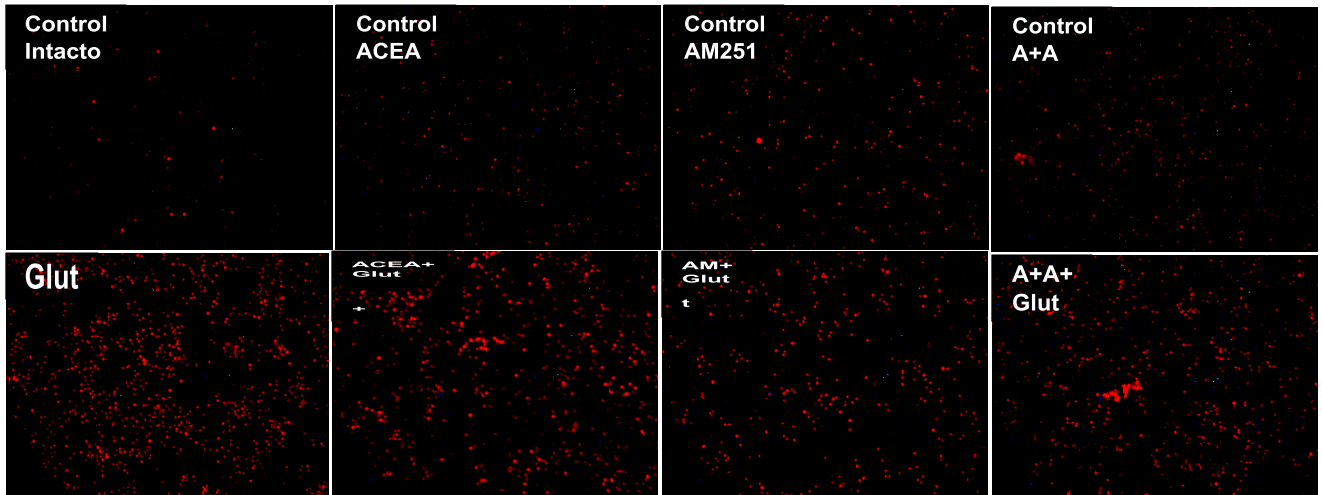


Fig. 10. Cuantificación de los niveles de ERO medida por la cantidad de células marcadas por DHE. Los niveles de ERO se determinaron a través del conteo de células positivas a DHE con respecto a fotos tomadas en microscopio de fluorescencia, el porcentaje se tomó con respecto al glutamato, con las condiciones mostradas en la Fig. 9. Los datos son el promedio  $\pm$  EE de 4 experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido de la prueba Tukey \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Para confirmar los niveles de ERO en los distintos grupos, en especial en los tratados con ACEA, y correlacionarlos directamente con la viabilidad, se hizo una prueba de calceína junto con la prueba de DHE. Como se observa en la Fig. 11, a pesar de los niveles altos de ERO producidos en los grupos tratados con cannabinoides, los niveles de células marcadas por calceína en el grupo con ACEA, se mantienen similares a los indicados arriba. Esto demuestra que, a pesar de la producción de las ERO en estos grupos, no se está teniendo un aumento en la muerte celular, lo que podría indicar que los cannabinoides podrían ejercer su acción río debajo de la producción de ERO.

A.



B.

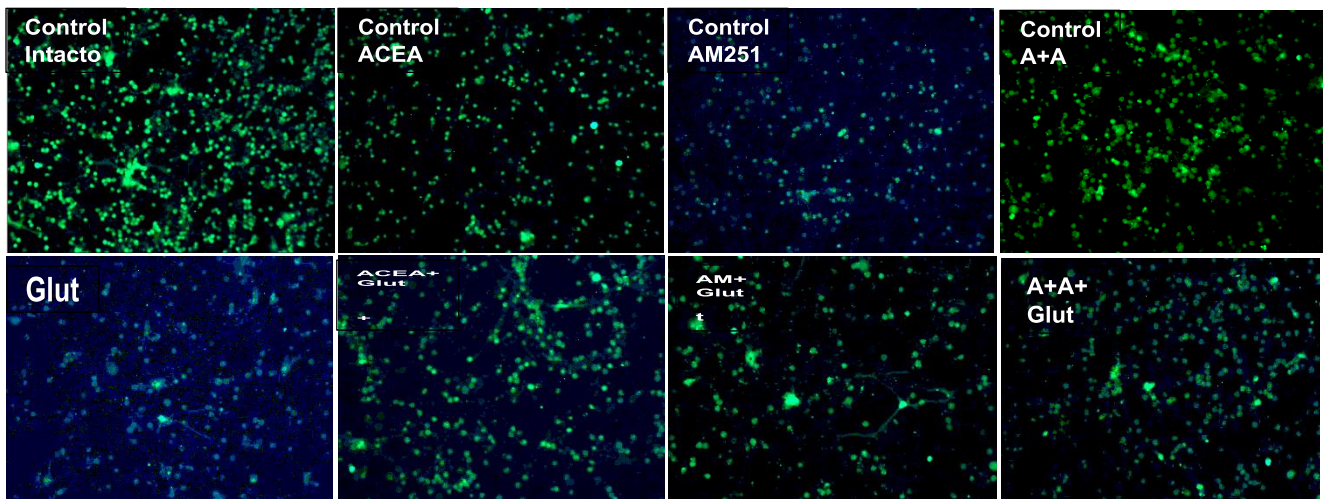


Fig. 11. Evaluación simultánea de células marcadas con DHE (A) y calceína (B) para determinar si existe una correlación entre estos dos parámetros reportados anteriormente Arriba, de izquierda a derecha: Las células se trataron con los agonistas solos o combinados durante 30 min y posteriormente un grupo se trató con glutamato 300  $\mu$ M, durante 24 h y las células se trataron con DHE y calceína como se describe en Métodos.

- **Efecto de la estimulación del receptor CB1 en la activación de la enzima NADPH-oxidasa por condiciones de muerte por excitotoxicidad**

Se midió la actividad de NOX para complementar los resultados anteriores y determinar si los cannabinoides utilizados en las condiciones establecidas pudiesen tener algún efecto en esta enzima, y si la actividad de esta pudiera estar relacionada con la protección celular brindada por estos. La actividad de la NOX se midió a través de luminiscencia, a través de

un ensayo con lucigenina y NADPH, para el cual se tuvieron los siguientes grupos: Control PBS (control al que no se le aplicó NADPH, pero sí lucigenina con PBS), Control 1 (control al que se no se le aplicó ni NADPH ni lucigenina), Control 2 (control al que se le aplicaron ambos reactivos), AM-251, ACEA, Glutamato, AM-251 + Glutamato y ACEA + Glutamato, los cuales se tuvieron a dos tiempos: 1 hora y 15 horas después del tratamiento.

Los resultados mostraron que, aunque en los grupos experimentales existe un aumento en general de la actividad de NOX, todos entre un 50-90%. Este aumento en la actividad sólo fue significativo entre el grupo Control 1 y los grupos AM-251 1H, AM + GLUT 1 H y GLUT 1H, donde estos mostraron un aumento de aproximadamente un 90% en comparación con los controles; también podemos también notar que, aunque no fue estadísticamente significativo, ambos grupos de ACEA con glutamato (1 h y 18 h) fueron capaces de disminuir la actividad de esta enzima (Fig 10). Esto resulta congruente con los resultados de los experimentos anteriores sobre los niveles de ERO, en los que se mostró que, aunque no de manera significativa, el grupo de ACEA también disminuyó los niveles de ERO (Fig. 12).

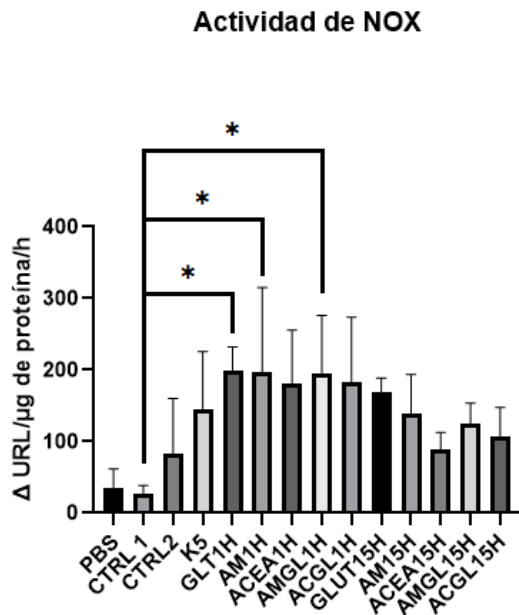


Fig. 12. Cuantificación de la actividad de NOX, medida por luminiscencia. La actividad fue medida por la  $\Delta$  de las Unidades Relativas de Luminiscencia (URL), referida por la proteína de cada muestra y normalizada por hora. La actividad fue medida como se menciona en la Metodología. Los datos son el  $\Delta$  de URL,  $\pm$  EE de 4 experimentos independientes, donde \* $p < 0.05$ . Describir todas las abreviaturas

## Discusión

El SEC, así como los diversos cannabinoides que existen, han sido objeto de estudio para entender el cómo funcionan en los diversos procesos biológicos, siendo unos de los más relevantes sus efectos neuroprotectores (Howlett et al., 2006; Zou y Kumar, 2018, Tadijan et al., 2022). A pesar de que hay evidencia de que los cannabinoides proveen neuroprotección en casos de excitotoxicidad (Khaspekov et al., 2004), se desconocen los mecanismos de acción. Por otra parte, también hay reportes que muestran un efecto opuesto al descrito aumentando la muerte neuronal (Hansen et al., 2002) sin que se haya encontrado la explicación de esta aparente contradicción, pero se teoriza que puede ocurrir por la concentración de cannabinoides utilizada, por el tipo de células y/o por el contexto celular (Tomiya y Funada, 2014; Lipina y Hundal, 2016). El objetivo de este trabajo fue comprender la relación entre el SEC, las ERO y una de sus principales fuentes, la enzima NOX, y de cómo el SEC ejerce neuroprotección en las NGC bajo condiciones de muerte excitotóxica provocada por el tratamiento de glutamato.

Los datos obtenidos en este estudio nos indican algunos aspectos importantes, el primero es que el agonista inverso AM-251 no tuvo ningún efecto per se ni afectó la muerte inducida por glutamato en comparación con el grupo de glutamato por sí solo, y en todo caso, aumentó la muerte celular, aunque no de manera significativa. Encontramos, también, que el agonista del receptor CB1, ACEA, tuvo un efecto neuroprotector ante el daño excitotóxico en las NGC. Sin embargo, el tratamiento con AM-251 no inhibió la acción neuroprotectora de ACEA. Esto sugiere primeramente que la acción del agonista podría no estar mediada por el receptor CB1, aunque existen otras posibilidades, pues vemos que AM-251, en los experimentos de MTT, no disminuyó de manera significativa esta protección provista por ACEA, mientras que en los experimentos de Ca/Ip, vemos que sí existe una disminución de la viabilidad en este grupo, lo cual podría significar que: 1. Al ser el MTT una prueba que mide la actividad metabólica celular y no ser una prueba de viabilidad tan viable, como lo es Ca/Ip, algún otro factor ajeno al SEC y los cannabinoides utilizados, podrían estar afectando esta actividad, por lo que los resultados no mostraron un cambio significativo; y 2. Que la concentración utilizada de AM-251 (1 $\mu$ M) no fue suficiente para bloquear del todo a CB1 e impedir la actividad de ACEA del todo, y que a concentraciones más altas, este efecto se vería más en las pruebas de MTT, no obstante, la concentración fue la suficiente para mostrar un cambio en las pruebas de Ca/Ip. Finalmente, otra posibilidad es que no se haya hecho el tratamiento en el tiempo adecuado. En nuestro estudio se hizo el tratamiento con ambos compuestos de forma simultánea. En algunos otros estudios el protocolo utilizado contempla un pretratamiento con el agonista inverso (Yang et al., 2020; Palomba et al., 2015; Vrechi et al., 2018; Ma et al., 2015). Esta diferencia podría haber sido otra razón por la que el receptor no se bloqueó de la forma correcta, o que el efecto de ACEA sea más potente que el del agonista, sin embargo, no podemos asegurarlo del todo.

Otra posibilidad, es que el efecto de ACEA no sea exclusivo del receptor CB1, como se ha reportado en otras preparaciones en donde la acción de los agonistas CB1 está mediada otros receptores, como los de serotonina o de vaniloides (TRPV1) (Veldhuis et al., 2003; Poleszak et al., 2018). Es necesario descartar las posibilidades mencionadas arriba antes de concluir definitivamente que la acción del agonista no es exclusiva de la activación del receptor CB1, o que pudiese ser la concentración la responsable de estos efectos y resultados.

Otro de los resultados que resultó interesante fue que, a pesar de la neuroprotección ejercida por el agonista ACEA ante la excitotoxicidad, el incremento en los niveles de ERO



inducido por la excitotoxicidad no se modifica. Se ha considerado desde hace mucho tiempo que las ERO son tóxicas para las células y que éstas desencadenan la muerte celular apoptótica (Valencia y Morán, 2001; Howlett et al., 2006). Ahora se sabe que las ERO podrían ejercer su acción a través de la regulación redox de muchas proteínas, incluyendo proteínas de vías de señalización, incluyendo la vía Akt/PI3K (Liu et al., 2012), la cual es una de las vías por las que el SEC produce parte de sus efectos protectores (Zou y Kumar, 2018), sin mencionar que las ERO también son considerados mensajeros de señalización necesarios para la función fisiológica normal de las células, y están involucradas en procesos de desarrollo y supervivencia como la diferenciación y proliferación, dependiendo de los niveles de estas, así como que ayudan a la determinación y destino de la muerte celular al funcionar como segundos mensajeros (Milkovic et al., 2019). Estos papeles de las ERO, como el de la vía Akt/PI3K, podrían indicar que están funcionando como reguladores de la supervivencia celular, dependiendo de los niveles en los que se encuentren, y no sólo en procesos de muerte celular, y que, al haber niveles altos de ellas, y provocando una sobreactivación y oxidación de esta vía, podría generar fallas en las vías de supervivencia, generando así la muerte. Esto también podría explicar por qué al haber concentraciones altas de cannabinoides, se produce muerte celular y no supervivencia, y el por qué a pesar de no haber cambiado los niveles de ERO en comparación con el grupo de glutamato, ACEA aun así proveyó de protección a las células, habría que hacer experimentos y estudios con esta vía y las involucradas con ERO y el SEC para poder explicar esto de mejor manera.

Por otra parte, existen evidencias de que los cannabinoides pueden reducir los niveles de ERO en condiciones neurotóxicas (Howlett et al., 2006). Hay que mencionar, sin embargo, que existe la posibilidad de que haya algún efecto en la acción del agonista sobre los niveles de ERO dado que, aunque los datos no son estadísticamente significativos, observamos una tendencia en la reducción de los niveles de ERO en el grupo de ACEA. Así, para poder concluir definitivamente los efectos de la activación del receptor CB1 en los niveles de ERO será necesario incrementar el número de ensayos y revisar la estadística. En caso de confirmarse la falta de efecto de ACEA en el incremento de ERO podrías sugerir un mecanismo de protección río debajo de la generación de ERO. Una posibilidad sería a través de la regulación de la vía Akt/PI3K, como se mencionó arriba. También, los niveles altos de ERO podrían no estar siendo necesariamente producidos por NOX, sino más bien por la mitocondria, y esto podría estarse regulando a nivel mitocondrial. Así mismo, tampoco podemos descartar la participación del receptor CB2 y su activación por otros tipos celulares, como la glía (microglía o astrocitos).

Finalmente, en cuanto nuestros resultados de la actividad de NOX, encontramos que, al igual que lo encontrado con ERO, el antagonista ACEA ejerció una tendencia en la reducción de los niveles de la actividad de la enzima; sin embargo, éstos no fueron estadísticamente significativos, de igual forma, resulta interesante ver que, ACEA por sí solo, a 1 h, provocó un aumento, aunque no significativo, de la actividad de NOX, indicando que probablemente que la activación de CB1 podría afectar la actividad de NOX por sí misma. Por su parte, el agonista inverso AM-251, aumentó la actividad de NOX de manera significativa en comparación con el grupo control, tanto por sí solo como en cotratamiento de glutamato, estos resultados sí tuvieron significancia estadística, y podrían significar que así mismo, el bloqueo de CB1 podría estar involucrado en la regulación de la actividad de NOX. El fármaco por sí solo ejerció un efecto, lo cual podría indicar que bloquear el receptor CB1 podría propiciar un aumento en la actividad de esta enzima en condiciones basales; sin embargo, esto no es congruente con el efecto del fármaco en los niveles de ERO, por lo que será necesario tomar con cautela estos resultados, a la fecha, sigue sin estar

determinado el mecanismo y la correlación de la actividad de NOX y el SEC, a pesar de esto, con estos resultados, podemos ver que sí tienen una coacción y uno afecta el otro.

## **Conclusiones y perspectivas**

La muerte neuronal está estrechamente relacionada con la producción de ERO. El conocer los mecanismos responsables de la muerte neuronal podría ayudar a encontrar los blancos terapéuticos para el tratamiento de estas enfermedades que involucran muerte neuronal. Una de estas posibilidades involucra a los cannabinoides. Entender cómo funcionan el SEC, y los distintos tipos de cannabinoides para ejercer su acción neuroprotectora en los eventos de excitotoxicidad nos permitiría crear terapias farmacológicas basadas en estas moléculas para tratar estas enfermedades. Uno de los posibles blancos terapéuticos podría ser la interacción de los cannabinoides y las ERO.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el papel que tienen las ERO en la neuroprotección mediada por endocannabinoides en un modelo de muerte excitotóxica. En particular, conocer los mecanismos de los cannabinoides que involucran a las distintas fuentes de ERO en un modelo de muerte neuronal. En este proyecto, encontramos que el SEC y sus componentes tienen un efecto neuroprotector ante el daño excitotóxico de neuronas granulares. Sin embargo, aunque observamos una marcada tendencia en la reducción de la actividad de NOX y ERO por la activación del receptor CB1, los resultados no fueron estadísticamente significativos y por ello no podemos concluir definitivamente que el mecanismo de neuroprotección involucre la regulación la NOX y en consecuencia de las ERO producidas. Será necesario realizar más estudios y modificar las concentraciones y tiempo de tratamiento de los fármacos empleados. Para tener un panorama general del proceso sería necesario además considerar también el papel de SEC en los ERO producidas por la mitocondria, así como evaluar el papel del receptor CB2 en este modelo.

## Referencias

1. Abood, M. E., Rizvi, G., Sallapudi, N., & McAllister, S. D. (2001). Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neuroscience Letters*, 309(3), 197–201. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)02065-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)02065-1)
2. Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2018). Role of mitochondrial Ros in the brain: From physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*, 592(5), 692–702. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964>
3. Aymerich, M. S., Aso, E., Abellanas, M. A., Tolon, R. M., Ramos, J. A., Ferrer, I., Romero, J., & Fernández-Ruiz, J. (2018). Cannabinoid pharmacology/therapeutics in chronic degenerative disorders affecting the central nervous system. *Biochemical Pharmacology*, 157, 67–84. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.016>
4. Baggelaar, M. P., Maccarrone, M., & van der Stelt, M. (2018). 2-arachidonoylglycerol: A signaling lipid with manifold actions in the brain. *Progress in Lipid Research*, 71, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.05.002>
5. Barnes, J. L., Mohr, C., Ritchey, C. R., Erikson, C. M., Shiina, H., & Rossi, D. J. (2020). Developmentally transient cb1rs on cerebellar afferents suppress afferent input, downstream synaptic excitation, and signaling to migrating neurons. *The Journal of Neuroscience*, 40(32), 6133–6144. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1931-19.2020>
6. Barua, S., Kim, J., Yenari, M., & Lee, J. (2019). The role of NOX inhibitors in neurodegenerative diseases. *IBRO Reports*, 7, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.07.1721>
7. Baul, H. S., Manikandan, C., & Sen, D. (2019). Cannabinoid receptor as a potential therapeutic target for parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*, 146, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.016>
8. Bermudez S, Khayrullina G, Zhao Y, Byrnes KR. *Mol Cell Neurosci*. 2016 Dec; 77:53-64. doi: 10.1016/j.mcn.2016.10.001.
9. Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of Cell Death. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
10. Borgonetti, V., Biagi, M., Galeotti, N., Manetti, F., & Governa, P. (2022). Investigation on the neuroprotective effect of a cannabidiol-enriched non-psychotropic cannabis sativa L. Extract in an in vitro model of excitotoxicity. *Fitoterapia*, 163, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105315>
11. Brandes, R., Weissmann, N., & Schröder, K. (2020). *Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
12. Bruce-Keller, A. J., Gupta, S., Knight, A. G., Beckett, T. L., McMullen, J. M., Davis, P. R., Murphy, M. P., Van Eldik, L. J., St Clair, D., & Keller, J. N. (2011). Cognitive impairment in humanized app $\times$ PS1 mice is linked to AB1–42 and Nox Activation. *Neurobiology of Disease*, 44(3), 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.07.012>
13. Buceta, I., Elezgarai, I., Rico - Barrio, I., Gerrikagoitia, I., Puente, N., & Grandes, P. (2019). Deletion of the cannabinoid CB 1 receptor impacts on the ultrastructure of the

- cerebellar parallel fiber-purkinje cell synapses. *Journal of Comparative Neurology*, 528(6), 1041–1052. <https://doi.org/10.1002/cne.24808>
14. Campos, A., Fogaça, M., Sonogo, A., & Guimarães, F. (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research*, 112, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.033>
  15. Campos, A., Fogaça, M., Sonogo, A., & Guimarães, F. (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research*, 112, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.033>
  16. Carrillo-Salinas FJ, Navarrete C, Mecha M, Feliú A, Collado JA, et al. *PLoS One*. 2014 Apr 11;9(4): e94733. doi: 10.1371/journal.pone.0094733.
  17. Casarejos MJ, Perucho J, Gomez A, Muñoz MP, Fernandez-Estevez M, et al. *Alzheimers Dis*. 2013;35(3):525-39. doi: 10.3233/JAD-130050.
  18. Casarejos, M., Perucho, J., Gomez, A., Muñoz, M., Fernandez-Estevez, M., & Sagredo, O. et al. (2013). Natural Cannabinoids Improve Dopamine Neurotransmission and Tau and Amyloid Pathology in a Mouse Model of Tauopathy. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 35(3), 525-530. <https://doi.org/10.3233/jad-130050>
  19. Chandra LC, Kumar V, Torben W, Vande Stouwe C, Winsauer P, et al. *J Virol*. 2015 Jan 15;89(2):1168-81. doi: 10.1128/JVI.01754-14.
  20. Chavira-Ramos, K., Orozco-Morales, M., Karasu, Ç., Tinkov, A. A., Aschner, M., Santamaría, A., & Colín-González, A. L. (2020). Urb597 prevents the short-term excitotoxic cell damage in rat cortical slices: Role of cannabinoid 1 receptors. *Neurotoxicity Research*, 39(2), 146–155. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00301-1>
  21. Costa, L., Amaral, C., Teixeira, N., Correia-da-Silva, G., & Fonseca, B. (2016). Cannabinoid-induced autophagy: Protective or death role? *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 122, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.12.006>
  22. Costa, M., Fonseca, B., Teixeira, N., & Correia-da-Silva, G. (2015). The endocannabinoid anandamide induces apoptosis in cytotrophoblast cells: Involvement of both mitochondrial and death receptor pathways. *Placenta*, 36(1), 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.10.011>
  23. Coyoy A, Valencia A, Guemez-Gamboa A, Morán J. *Free Radic Biol Med*. 2008; Oct 15;45(8):1056-64. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.027
  24. Crunfli, F., Vrechi, T. A., Costa, A. P., & Torrão, A. S. (2019). Cannabinoid receptor type 1 agonist ACEA improves cognitive deficit on STZ-induced neurotoxicity through apoptosis pathway and no modulation. *Neurotoxicity Research*, 35(3), 516–529. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9991-2>
  25. D'Arcy, M. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-589. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
  26. Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, 6, 472–485. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.005>
  27. de Lago E, Gómez-Ruiz M, Moreno-Martet M, Fernández-Ruiz J. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2009 Nov; 2(6):645-60. doi: 10.1586/ecp.09.42.
  28. Dickson, D. W. (2004). Apoptotic mechanisms in alzheimer neurofibrillary degeneration: Cause or effect? *Journal of Clinical Investigation*, 114(1), 23–27. <https://doi.org/10.1172/jci22317>

29. Docagne F, Muñetón V, Clemente D, Ali C, Loría F, et al. Mol Cell Neurosci. 2007 Apr;34(4):551-61
30. Du, T., Gao, J., Li, P., Wang, Y., Qi, Q., Liu, X., Li, J., Wang, C., & Du, L. (2021). Pyroptosis, metabolism, and tumor immune microenvironment. *Clinical and Translational Medicine*, 11(8). <https://doi.org/10.1002/ctm2.492>
31. Feliú A, Bonilla Del Río I, Carrillo-Salinas FJ, Hernández-Torres G, Mestre L et al. 2017. J. Neurosci. 37(35): 8385-8398.[doi:10.1523/JNEUROSCI.2900-16.2017](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2900-16.2017)
32. Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2014). Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death & Differentiation*, 22(3), 377–388. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
33. Fišar, Z., Singh, N., & Hroudová, J. (2014). Cannabinoid-induced changes in respiration of brain mitochondria. *Toxicology Letters*, 231(1), 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.09.002>
34. Fišar, Z., Singh, N., & Hroudová, J. (2014). Cannabinoid-induced changes in respiration of brain mitochondria. *Toxicology Letters*, 231(1), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.09.002>
35. Fleming, A., Bourdenx, M., Fujimaki, M., Karabiyik, C., Krause, G. J., Lopez, A., Martín-Segura, A., Puri, C., Scrivo, A., Skidmore, J., Son, S. M., Stamatakou, E., Wrobel, L., Zhu, Y., Cuervo, A. M., & Rubinsztein, D. C. (2022). The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration. *Neuron*, 110(6), 935–966. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.01.017>
36. Fowler, C., Rojo, M., & Rodriguez-Gaztelumendi, A. (2010). Modulation of the endocannabinoid system: Neuroprotection or neurotoxicity?. *Experimental Neurology*, 224(1), 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.021>
37. Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., & Brown, G. C. (2018). Neuronal Cell Death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813–880. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>
38. Fricker, M., Tolkovsky, A., Borutaite, V., Coleman, M., & Brown, G. (2018). Neuronal Cell Death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813-820. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>
39. Gao, W., Wang, X., Zhou, Y., Wang, X., & Yu, Y. (2022). Autophagy, ferroptosis, pyroptosis, and necroptosis in Tumor immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01046-3>
40. Garcia-Arencibia, M., Molina-Holgado, E., & Molina-Holgado, F. (2018). Effect of endocannabinoid signalling on cell fate: life, death, differentiation, and proliferation of brain cells. *British Journal Of Pharmacology*, 176(10), 1361-1369. <https://doi.org/10.1111/bph.14369>
41. Ghozland, S., Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J. F., Soriano, E., & Maldonado, R. (2002). Spontaneous network activity of cerebellar granule neurons: Impairment by in vivo chronic cannabinoid administration. *European Journal of Neuroscience*, 16(4), 641–651. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02112.x>
42. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
43. Gómez-Ruiz, M., Rodríguez-Cueto, C., Luna-Piñel, E., Hernández-Gálvez, M., & Fernández-Ruiz, J. (2019). Endocannabinoid system in spinocerebellar ataxia type-3

- and other autosomal-dominant cerebellar ataxias: Potential role in pathogenesis and expected relevance as neuroprotective targets. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00094>
44. Hansen, H. H., Azcoitia, I., Pons, S., Romero, J., García-Segura, L. M., Ramos, J. A., Hansen, H. S., & Fernández-Ruiz, J. (2002). Blockade of cannabinoid CB1 receptor function protects against in vivo disseminating brain damage following NMDA-induced excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 82(1), 154–158. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00961.x>
  45. Harkany, T., & Horvath, T. (2017). (S)Pot on Mitochondria: Cannabinoids Disrupt Cellular Respiration to Limit Neuronal Activity. *Cell Metabolism*, 25(1), 8-10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.020>
  46. Hillard, C. J., Muthian, S., & Kearn, C. S. (1999). Effects of CB1 cannabinoid receptor activation on cerebellar granule cell nitric oxide synthase activity. *FEBS Letters*, 459(2), 277–281. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01253-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01253-3)
  47. Hirano K, Chen WS, Chueng AL, Dunne AA, Seredenina T, et al. Antioxid Redox Signal. 2015; Aug 10;23(5):358-74. doi:10.1089/ars.2014.6202.
  48. Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death. *New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570–1583. <https://doi.org/10.1056/nejmra0901217>
  49. Howlett, A. C., Mukhopadhyay, S., & Norford, D. C. (2006). Endocannabinoids and reactive nitrogen and oxygen species in neuropathologies. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(3), 305–316. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9022-6>
  50. Hungund, B. L., Vinod, K. Y., Kassir, S. A., Basavarajappa, B. S., Yalamanchili, R., Cooper, T. B., Mann, J. J., & Arango, V. (2004). Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35s] GTPγS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Molecular Psychiatry*, 9(2), 184–190. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001376>
  51. Hynd, M. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 45(5), 583-595. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.03.007>
  52. Jewett BE, Thapa B. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018-, 2018 Aug 21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519495>
  53. Kaczanowski, S. (2016). Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physical Biology*, 13(3), 031001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/3/031001>
  54. Kahles T, Brandes RP. Cell Mol Life Sci. 2012; Jul;69(14):2345-63. doi: 10.1007/s00018-012-1011-8.
  55. Karanian, D. (2005). Dual Modulation of Endocannabinoid Transport and Fatty Acid Amide Hydrolase Protects against Excitotoxicity. *Journal Of Neuroscience*, 25(34), 7813-7820. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2347-05.2005>
  56. Karanian, D. A., Brown, Q. B., Makriyannis, A., Kosten, T. A., & Bahr, B. A. (2005). Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 25(34), 7813–7820. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2347-05.2005>
  57. Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T., & Kano, M. (2006). The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and

- cerebellum. *The Journal of Neuroscience*, 26(11), 2991–3001. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4872-05.2006>
58. Ketelut-Carneiro, N., & Fitzgerald, K. A. (2022). Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis—oh my! the many ways a cell can die. *Journal of Molecular Biology*, 434(4), 167378. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167378>
59. Khaksar S, Bigdeli MR. *Eur J Pharmacol*. 2017 Jan 5; 794:270-279. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.11.011
60. Khaspekov, L. G., Brenz Verca, M. S., Frumkina, L. E., Hermann, H., Marsicano, G., & Lutz, B. (2004). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *European Journal of Neuroscience*, 19(7), 1691–1698. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03285.x>
61. Kim, J., Park, J., Lee, J., & Yenari, M. (2017). NOX Inhibitors - A Promising Avenue for Ischemic Stroke. *Experimental Neurobiology*, 26(4), 195-198. <https://doi.org/10.5607/en.2017.26.4.195>
62. Kim, K. H., & Lee, M.-S. (2014). Autophagy—a key player in cellular and body metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(6), 322–337. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.35>
63. Knowles, M. D., de la Tremblaye, P. B., Azogu, I., & Plamondon, H. (2016). Endocannabinoid CB1 receptor activation upon global ischemia adversely impact recovery of reward and stress signaling molecules, neuronal survival and behavioral impulsivity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 66, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.10.010>
64. Knowles, M., de la Tremblaye, P., Azogu, I., & Plamondon, H. (2016). Endocannabinoid CB1 receptor activation upon global ischemia adversely impact recovery of reward and stress signaling molecules, neuronal survival and behavioral impulsivity. *Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry*, 66, 8-21. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.10.010>
65. Kotlar, I., Rangel-López, E., Colonnello, A., Aguilera-Portillo, G., Serratos, I. N., Galván-Arzate, S., Pedraza-Chaverri, J., Túnez, I., Wajner, M., & Santamaría, A. (2019). Anandamide reduces the toxic synergism exerted by quinolinic acid and glutaric acid in rat brain neuronal cells. *Neuroscience*, 401, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.014>
66. Lai TW, Zhang S, Wang YT. *Prog Neurobiol*. 2014; Apr; 115:157-88. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.006.
67. Li, X., Xu, H., Lei, T., Yang, Y., Jing, D., & Dai, S. et al. (2017). A Pulsed Electromagnetic Field Protects against Glutamate-Induced Excitotoxicity by Modulating the Endocannabinoid System in HT22 Cells. *Frontiers In Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00042>
68. Li, X., Xu, H., Lei, T., Yang, Y., Jing, D., Dai, S., Luo, P., & Xu, Q. (2017). A pulsed electromagnetic field protects against glutamate-induced excitotoxicity by modulating the endocannabinoid system in HT22 cells. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00042>
69. Lipina, C., & Hundal, H. (2016). Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. *Open Biology*, 6(4), 150276. <https://doi.org/10.1098/rsob.150276>
70. Lipina, C., Irving, A., & Hundal, H. (2014). Mitochondria: a possible nexus for the regulation of energy homeostasis by the endocannabinoid system? *American Journal*

71. Liu, Y., Shi, Q.-F., Ye, Y.-C., Tashiro, S., Onodera, S., & Ikejima, T. (2012). Activated n<sup>2</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated cell survival in SU11274-treated non-small-cell lung cancer A549 cells via c-met–pi3k–akt and c-met–grb2/sos–ras–p38 pathways. *Journal of Pharmacological Sciences*, 119(2), 150–159. <https://doi.org/10.1254/jphs.12048fp>
72. Lutz, B. (2020). Neurobiology of cannabinoid receptor signaling. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 207–222. <https://doi.org/10.31887/dcns.2020.22.3/blutz>
73. Ma MW, Wang J, Dhandapani KM, Brann DW. NADPH Oxidase 2 Oxid Med Cell Longev. 2017; 2017:6057609. doi: 10.1155/2017/6057609.
74. Ma, L., Jia, J., Niu, W., Jiang, T., Zhai, Q., Yang, L., Bai, F., Wang, Q., & Xiong, L. (2015). Mitochondrial CB1 receptor is involved in acea-induced protective effects on neurons and mitochondrial functions. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep12440>
75. Ma, L., Jia, J., Niu, W., Jiang, T., Zhai, Q., Yang, L., Bai, F., Wang, Q., & Xiong, L. (2015). Mitochondrial CB1 receptor is involved in acea-induced protective effects on neurons and mitochondrial functions. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep12440>
76. Maccarrone, M., & Finazzi-Agró, A. (2003). The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 10(9), 946-955. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401284>
77. MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. Nature 1986; 1986; 321:519–22. doi:10.1038/321519a0
78. Manjo, G., & I Joris. (1995). *Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death*. [https://doi.org/ PMID: 7856735; PMCID: PMC1870771](https://doi.org/PMID:7856735;PMCID:PMC1870771).
79. Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S. C., Cascio, M. G., Gutiérrez Silvia Ortega, van der Stelt, M., López-Rodríguez Maria Luz, Casanova, E., Schütz Günther, Zieglgänsberger Walter, Di Marzo, V., Behl, C., & Lutz, B. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 302(5642), 84–88. <https://doi.org/10.1126/science.108820>
80. Matthews, A., & Ross, M. (2015). Oxyradical Stress, Endocannabinoids, and Atherosclerosis. *Toxics*, 3(4), 481-498. <https://doi.org/10.3390/toxics3040481>
81. Maya-López, M., Rubio-López, L. C., Rodríguez-Alvarez, I. V., Orduño-Piceno, J., Flores-Valdivia, Y., Colonnello, A., Rangel-López, E., Túnez, I., Prospéro-García, O., & 97. Santamaría, A. (2019). A cannabinoid receptor-mediated mechanism participates in the neuroprotective effects of oleamide against excitotoxic damage in rat brain synaptosomes and cortical slices. *Neurotoxicity Research*, 37(1), 126–135. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00083-1>
82. Maycotte P, Guemez-Gamboa A, Moran J. J Neurosci Res. 2010; Jan;88(1):73-85. doi: 10.1002/jnr.22168.
83. Mecha M, Feliú A, Machín I, Cordero C, Carrillo-Salinas F, et al. Glia. 2018 Jul;66(7):1447-1463. doi: 10.1002/glia.23317.
84. Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annual Review of Psychology*, 64(1), 21–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143739>



85. Melis, M., & Pistis, M. (2007). Endocannabinoid Signaling in Midbrain Dopamine Neurons: More than Physiology?. *Current Neuropharmacology*, 5(4), 268-277. <https://doi.org/10.2174/157015907782793612>
86. Mironova, Y., Zhukova, I., Zhukova, N., Alifirova, V., Izhboldina, O., & Latypova, A. (2018). Parkinson's disease and glutamate excitotoxicity. *Zhurnal Nevrologii I Psikhiatrii Im. S.S. Korsakova*, 118(6), 50. <https://doi.org/10.17116/jnevro201811806250>
87. More, S. V., & Choi, D.-K. (2015). Promising cannabinoid-based therapies for parkinson's disease: Motor symptoms to neuroprotection. *Molecular Neurodegeneration*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0012-0>
88. Nicholls DG, Johnson-Cadwell L, Vesce S, Jekabsons M, Yadava N. *J Neurosci Res*. 2007; Nov 15;85(15):3206-12. doi: 10.1002/jnr.21290
89. Nicholls, D. G., & Budd, S. L. (1998). Neuronal excitotoxicity: The role of mitochondria. *BioFactors*, 8(3-4), 287-299. <https://doi.org/10.1002/biof.5520080317>
90. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448-3459. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
91. Norberg, E., Karlsson, M., Korenovska, O., Szydlowski, S., Silberberg, G., & Uhlén, P. et al. (2010). Critical role for hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 in the AIF-mediated apoptosis. *The EMBO Journal*, 29(22), 3869-3878. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.253>
92. Nunn, A., Guy, G., & Bell, J. (2012). Endocannabinoids in neuroendopsychology: multiphasic control of mitochondrial function. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1607), 3342-3352. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0393>
93. Olloquequi, J., Cornejo-Córdova, E., Verdaguer, E., Soriano, F., Binvignat, O., Auladell, C., & Camins, A. (2018). Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. *Journal Of Psychopharmacology*, 32(3), 265-270. <https://doi.org/10.1177/0269881118754680>
94. Pacheco, M. A., Ward, S. J., & Childers, S. R. (1993). Identification of cannabinoid receptors in cultures of rat cerebellar granule cells. *Brain Research*, 603(1), 102-110. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91304-b](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91304-b)
95. Pacher, P., & Mackie, K. (2012). Interplay of Cannabinoid 2 (CB2) receptors with nitric oxide synthases, oxidative and nitrative stress, and cell death during remote neurodegeneration. *Journal of Molecular Medicine*, 90(4), 347-351. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0884-1>
96. Palazuelos, J., Aguado, T., Pazos, M. R., Julien, B., Carrasco, C., Resel, E., Sagredo, O., Benito, C., Romero, J., Azcoitia, I., Fernández-Ruiz, J., Guzmán, M., & Galve-Roperh, I. (2009). Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain*, 132(11), 3152-3164. <https://doi.org/10.1093/brain/awp239>
97. Palomba, L., Silvestri, C., Imperatore, R., Morello, G., Piscitelli, F., & Martella, A. et al. (2015). Negative Regulation of Leptin-induced Reactive Oxygen Species (ROS) Formation by Cannabinoid CB1 Receptor Activation in Hypothalamic Neurons. *Journal Of Biological Chemistry*, 290(22), 13669-13677. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.646885>

98. Palomba, L., Silvestri, C., Imperatore, R., Morello, G., Piscitelli, F., Martella, A., Cristino, L., & Di Marzo, V. (2015). Negative regulation of leptin-induced reactive oxygen species (ROS) formation by cannabinoid CB1 receptor activation in hypothalamic neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 290(22), 13669–13677. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.646885>
99. Pan, W., Cui, L.-N., Chu, C.-P., Jin, W.-Z., & Qiu, D.-L. (2019). Etomidate modulates the tactile stimulation-evoked field potential responses in cerebellar granule cell layer in vivo in mice. *Pharmacology*, 104(5–6), 287–295. <https://doi.org/10.1159/000502133>
100. Páramo B, Montiel T, Rivera-Martínez M, Morán J, Massieu L. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013; Nov;45(11):2596-604. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.013.
101. Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
102. Patricio, F., Morales-Andrade, A. A., Patricio-Martínez, A., & Limón, I. D. (2020). Cannabidiol as a therapeutic target: Evidence of its neuroprotective and neuromodulatory function in parkinson's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595635>
103. Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). *cannabis sativa* L. and nonpsychoactive cannabinoids: Their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. *BioMed Research International*, 2018, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>
104. Pellegrini-Giampietro, D., Mannaioni, G., & Bagetta, G. (2008). Post-ischemic brain damage: the endocannabinoid system in the mechanisms of neuronal death. *FEBS Journal*, 276(1), 2-12. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06765.x>
105. Plotegher, N., Filadi, R., Pizzo, P., & Duchen, M. R. (2021). Excitotoxicity revisited: Mitochondria on the verge of a nervous breakdown. *Trends in Neurosciences*, 44(5), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.01.001>
106. Poleszak, E., Wośko, S., Sławińska, K., Szopa, A., Wróbel, A., & Serefko, A. (2018). Cannabinoids in depressive disorders. *Life Sciences*, 213, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.058>
107. Pozzoli, G., Tringali, G., Vairano, M., D'Amico, M., Navarra, P., & Martire, M. (2006). Cannabinoid agonist WIN55,212-2 induces apoptosis in cerebellar granule cells via activation of the CB1 receptor and downregulation of Bcl-XL gene expression. *Journal of Neuroscience Research*, 83(6), 1058–1065. <https://doi.org/10.1002/jnr.20794>
108. Rangel-López, E., Colín-González, A. L., Paz-Loyola, A. L., Pinzón, E., Torres, I., Serratos, I. N., Castellanos, P., Wajner, M., Souza, D. O., & Santamaría, A. (2015). Cannabinoid receptor agonists reduce the short-term mitochondrial dysfunction and oxidative stress linked to excitotoxicity in The rat brain. *Neuroscience*, 285, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.016>
109. Rapino, C., Tortolani, D., Scipioni, L., & Maccarrone, M. (2018). Neuroprotection by (endo)Cannabinoids in Glaucoma and Retinal Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, 16(7), 959-970. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170724104305>
110. Rodríguez-Cueto C, Hernández-Gálvez M, Hillard CJ, Maciel P, Valdeolivas S, et al. *PLoS One*. 2017. 27;12(4): e0176521. doi: 10.1371/journal.pone.0176521.
111. Rodríguez-Cueto, C., Benito, C., Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Hernández-Gálvez, M., & Gómez-Ruiz, M. (2014). Changes in CB1 and CB2 receptors in the post-mortem

- cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias. *British Journal of Pharmacology*, 171(6), 1472–1489. <https://doi.org/10.1111/bph.12283>
112. Rossi, S., Bernardi, G., & Centonze, D. (2010). The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 224(1), 92-102. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.030>
  113. Rueda, C. B., Llorente-Folch, I., Traba, J., Amigo, I., Gonzalez-Sanchez, P., Contreras, L., Juaristi, I., Martinez-Valero, P., Pardo, B., del Arco, A., & Satrustegui, J. (2016). Glutamate excitotoxicity and  $Ca^{2+}$ -regulation of respiration: Role of the  $Ca^{2+}$ -activated mitochondrial transporters (camcs). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(8), 1158–1166. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.04.003>
  114. Ruver-Martins, A. C., Bicca, M. A., de Araujo, F. S., de Noronha Sales Maia, B. H., Pamplona, F. A., da Silva, E. G., & Nascimento, F. P. (2022a). Cannabinoid extract in microdoses ameliorates mnemonic and nonmnemonic alzheimer's disease symptoms: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13256-022-03457-w>
  115. Ryan, D., Drysdale, A., Lafourcade, C., Pertwee, R., & Platt, B. (2009). Cannabidiol Targets Mitochondria to Regulate Intracellular  $Ca^{2+}$  Levels. *Journal Of Neuroscience*, 29(7), 2053-2063. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4212-08.2009>
  116. Saliba, S. W., Bonifacino, T., Serchov, T., Bonanno, G., de Oliveira, A. C., & Fiebich, B. L. (2019). Neuroprotective effect of AM404 against NMDA-induced hippocampal excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00566>
  117. Shen, M., & Thayer, S. A. (1998). Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Molecular Pharmacology*, 54(3), 459–462. <https://doi.org/10.1124/mol.54.3.459>
  118. Singh, N., Hroudová, J., & Fišar, Z. (2015). Cannabinoid-Induced Changes in the Activity of Electron Transport Chain Complexes of Brain Mitochondria. *Journal Of Molecular Neuroscience*, 56(4), 926-931. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0545-2>
  119. Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., & Sil, P. C. (2013). Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1157–1180. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4>
  120. Skaper, S. D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L., & Leon, A. (1996). The aliamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), 3984–3989. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.3984>
  121. Suárez, J., Bermúdez-Silva, F. J., Mackie, K., Ledent, C., Zimmer, A., Cravatt, B. F., & de Fonseca, F. R. (2008). Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *The Journal of Comparative Neurology*, 509(4), 400–421. <https://doi.org/10.1002/cne.21774>
  122. Tadijan, A., Vlašić, I., Vlainić, J., Đikić, D., Oršolić, N., & Jazvinščak Jembrek, M. (2022). Intracellular molecular targets and signaling pathways involved in antioxidative and neuroprotective effects of cannabinoids in neurodegenerative conditions. *Antioxidants*, 11(10), 2049. <https://doi.org/10.3390/antiox11102049>
  123. Tehse, J., & Taghibiglou, C. (2018). The Overlooked Aspect of Excitotoxicity: Glutamate-Independent Excitotoxicity in Traumatic Brain Injuries. *European Journal Of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.14307>

124. Tomiyama, K., & Funada, M. (2014). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 274(1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.10.028>
125. Tomiyama, K.-ichi, & Funada, M. (2014). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: The involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.10.028>
126. Tomiyama, Kichi, & Funada, M. (2014). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: The involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.10.028>
127. Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A., & Norberg, E. (2020). *The role of mitochondria in metabolism and cell death*. ELSEIVER. Retrieved 27 July 2020, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>
128. Veeraraghavan, P., Dekanic, A., & Nistri, A. (2016). A study of cannabinoid-1 receptors during the early phase of excitotoxic damage to rat spinal locomotor networks in vitro. *Neuroscience*, 333, 214-228. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.021>
129. Veldhuis, W. B., van der Stelt, M., Wadman, M. W., van Zadelhoff, G., Maccarrone, M., Fezza, F., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F., Bär, P. R., Nicolay, K., & Di Marzo, V. (2003). Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and Arvanil against *in vivo* excitotoxicity in the rat: Role of vanilloid receptors and Lipoxygenases. *The Journal of Neuroscience*, 23(10), 4127-4133. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-10-04127.2003>
130. Verma, M., Lizama, B. N., & Chu, C. T. (2022). Excitotoxicity, calcium and mitochondria: A triad in synaptic neurodegeneration. *Translational Neurodegeneration*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00278-7>
131. Viscomi, M., Oddi, S., Latini, L., Bisicchia, E., Maccarrone, M., & Molinari, M. (2010). The endocannabinoid system: A new entry in remote cell death mechanisms. *Experimental Neurology*, 224(1), 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.023>
132. Vrechi, T. A., Crunfli, F., Costa, A. P., & Torrão, A. S. (2017). Cannabinoid receptor type 1 agonist ACEA protects neurons from death and attenuates endoplasmic reticulum stress-related apoptotic pathway signaling. *Neurotoxicity Research*, 33(4), 846-855. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9839-1>
133. Weerasinghe, P., & Buja, L. M. (2012). Oncosis: An important non-apoptotic mode of Cell Death. *Experimental and Molecular Pathology*, 93(3), 302-308. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.09.018>
134. Wu, H., Huang, C., Lin, Y., Wang, C., & Jan, T. (2018). Cannabidiol induced apoptosis in human monocytes through mitochondrial permeability transition pore-mediated ROS production. *Free Radical Biology And Medicine*, 124, 311-315. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.023>
135. Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.-C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1). <https://doi.org/10.1042/bsr20180992>

136. Yang, S., Hu, B., Wang, Z., Zhang, C., Jiao, H., Mao, Z., Wei, L., Jia, J., & Zhao, J. (2020). Cannabinoid CB1 receptor agonist acea alleviates brain ischemia/reperfusion injury via CB1–drp1 pathway. *Cell Death Discovery*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00338-3>
137. Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Tang, L., Peng, C., & Chen, X. (2021). Pyroptosis: Mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>
138. Zaragoza-Campillo, M. A., & Morán, J. (2017). Reactive oxygen species evoked by potassium deprivation and staurosporine inactivate Akt and induce the expression of TXNIP in cerebellar granule neurons. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/8930406>
139. Zhao, P., Leonoudakis, D., Abood, M. E., & Beattie, E. C. (2010). Cannabinoid receptor activation reduces TNFA-induced surface localization of AMPAR-type glutamate receptors and excitotoxicity. *Neuropharmacology*, 58(2), 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.035>
140. Zoppi S., Madrigal JL, Caso JR, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, et al. *Br J Pharmacol.* 2014 Jun;171(11):2814-26. doi: 10.1111/bph.12607.
141. Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>