

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

“Estudio de los efectos del URB597 en un modelo preclínico de la enfermedad de Huntington en ratas”

TESIS

Que para obtener el grado académico de
Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A

M. en C. Gabriela Aguilera Portillo

COMITÉ TUTORAL

Co-Directores

Dra. Mina Königsberg Fainstein
Universidad Autónoma Metropolitana –
Iztapalapa

Dr. Abel Santamaría Del Angel
Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía – Manuel Velasco Suárez

Asesora Externa

Dra. Anahí Chavarría Krauser
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

Comité Tutorial

Co-Directora

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Investigador Titular “C” de Tiempo Completo

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Departamento de Ciencias de la Salud

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular

E-mail: mkf@xanum.uam.mx

Co-Director

Dr. Abel Santamaría Del Ángel

Investigador en Ciencias Médicas “F” de Tiempo Completo

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS

Unidad de Investigación del Sistema Nervioso

Laboratorio de Aminoácidos Excitadores

E-mail: absada@yahoo.com

Asesora Externa

Dra. Anahí Chavarría Krauser

Profesor Titular “A” de Tiempo Completo

Unidad de Investigación en Medicina Experimental

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

E-mail: anahi.chavarria@gmail.com

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020”

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT a Gabriela Aguilera Portillo para estudios doctorales: 486539.

Casa Abierta al Tiempo

Distinguido por risas despreocupadas y ruidosos choques de asientos, un salón de clases es origen de incontables momentos extraordinarios. Un primer salón de clases es diario de la inagotable energía de un estudiante ligero y despreocupado, siempre a la espera del descubrimiento. Curiosos e imprudentes, entablamos amistad inmediata con la sorpresa, y la simplicidad infantil nos convierte en recipientes idóneos de tantas ideas y mensajes como puedan imaginarse. Más tarde, direcciones y obligaciones nos llevan a un segundo salón de clases. Aunque disponemos aún de levedad, acudimos también con un bullicio interior que emana rebeldía y un tanto de duda. Así, a la exigencia de esta aula se le suma una larga estancia, con lo que pacientemente atestigua una metamorfosis que ha de distinguirnos más allá de lo individual; la espera nos otorga personalidad y carácter, y conocemos -y sobrevivimos- a las más grandes emociones humanas. Aunque poco, la energía ha menguado cuando llegamos a un último salón de clases. La ligereza se ha convertido lentamente en un amasijo de interrogantes y planes cargados de dirección. Para entonces, el deseo y el deber le otorgan una agrí dulce sensación a nuestros días en una convivencia cómica pero emblemática de la adultez: la armonía de estos opuestos demanda nuestra entereza en relación inversa a nuestras pretensiones.

El recuerdo que tengo de mis días en estas aulas está vivo y muy presente en mi rutina; recurro a mis primeros días de escuela casi exclusivamente para despertar la felicidad gratuita de esos años; viajo en el tiempo para recuperar mis memorias de adolescente y recordar cómo mi caminar acortó el paso para llegar a un trote que se convirtió en la carrera que todavía no termina, pues ahí nacieron las pautas que regirían mi destino como estudiante de Química; y finalmente, evoco las anécdotas que siguen alimentando el fuerte eco que cultiva mi insaciabilidad. El quehacer de mis últimos años se ha convertido paulatinamente en un porvenir; en este tiempo he sido honrada con las enseñanzas de muchos Maestros, segundos padres para mí, y he cantado el lema de muchas Escuelas. En el furor que nace al término de este propósito, quiero ofrecer estas líneas a la Casa Abierta al Tiempo, principio y fin de esta etapa. Su patrimonio, que no las palabras, me ha quedado claro apenas antes de escribir esta dedicatoria: finitudes e infinitudes contenidas en un bien tan común como una casa, ostentando un valiente desembarazo a consecuencia de su apertura tan gloriosa como dolorosa, a expensas del inflexible paso del tiempo. Han pasado años desde mis primeros arañazos a esta gran visión, y aunque mantengo todavía una gran distancia con todas sus dimensiones, reconozco que su riqueza es ahora mía también. Con esto, el objeto de mis futuras aspiraciones, científicas y no científicas, estarán por siempre inspiradas en este lema hecho a la medida de sus grandísimos exponentes. En este día, mi último día como su estudiante, asumo con honor el compromiso de compartir los motores que mantienen las aulas que portan el emblema bicolor, adopto estos símbolos que serán ejes para mi vida, y las raíces formadas que me llevarán siempre de regreso a Mi Casa Abierta al Tiempo.

A mi Familia

Aunque parezca mentira, hoy el arte de mi oficio ha dejado de ser eterno. En espacio de 15 años me he descubierto como científica ante el mundo, y me presento a responder a un acuerdo al que llegué con esta Casa de estudios. Sin embargo, contraí una deuda el día preciso en el que nací, y diariamente recibo recordatorios de esta alianza: recibí un nombre, cuyo propósito secundario es diferenciarme de los demás. Según el tono empleado, puedo distinguir una reprimenda, una orden, un consejo, o una cortesía; mientras que el uso de tres sílabas me señala a los que me llaman desde la distancia, el descarte de tan solo una de ellas denota los diálogos cotidianos. Y a estas alturas, hablar de los muchos diminutivos a los que respondo en mis círculos cercanos resulta innecesario. Pero valga, pues, esta reflexión, porque solo en contadas ocasiones el uso de un nombre propio acompañado de un par de apellidos es motivo de inigualable contento. Es en ese escenario cuando el nombre que nos fue asignado alcanza su propósito esencial, pues le concede un merecido lugar a nuestros padres y hermanos, y de ser actores invisibles los lleva al terreno protagónico.

Querida Familia, es evidente que no solo compartimos el nombre; en el universo de variables que forman parte de la vida de cinco individuos hemos compartido también espacios, tradiciones y memorias, y en estos tránsitos es que verdaderamente radica nuestra distinción. La esencia que ha dominado mis proezas no nació ni siquiera al inicio de las batallas; ese espíritu se gestó en el abrazo de una familia que se ha esmerado en cultivar la educación y el trabajo duro labrando un amor de fibra, y enalteciendo los principios de honor y lealtad que tanto han esculpido nuestra historia. Con este cierre humildemente retomo mi deuda todavía con saldo pendiente, pues este proyecto no pretende ni remotamente satisfacer ese compromiso con ustedes; por el contrario, me limito a refrendar la gratitud que siento de tenerlos en mi vida. Sepan que cuando las más altas autoridades académicas digan hoy mi nombre, yo estaré escuchando vibrar el suyo, y el de los que nos acompañan ya en un plano inmortal. Con esto, el Título que recibo legítimamente los reconoce al llevar el nombre que he recibido de ustedes, que nos une en este tiempo y este espacio, y que de manera cíclica los recordará cuando de nosotros solo quede un legado escrito. Todas las palabras están debidas a ustedes; desde la primera que fui capaz de leer, hasta la última que he escrito en estas páginas.

Con todo mi cariño.

Este trabajo fue realizado en:

- El Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- El Laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS.
- El Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS.

La investigación presentada contó con financiamiento de CONACYT-TUBITAK con el número de proyecto 265991 del Dr. Abel Santamaría Del Ángel.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Estudio de los efectos del URB597 en un modelo preclínico de la enfermedad de Huntington en ratas”, que presentó

Gabriela Aguilera Portillo

El día 20 de septiembre de 2019

Sinodales

Dra. María del Socorro Imelda Retana

Presidenta

Dra Anahí Chavarría Krauser

Secretaria

Dra. Verónica Guarner Lans

Vocal

Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal

Vocal

1.	RESUMEN.....	10
2.	ABSTRACT	11
3.	LISTA DE ABREVIATURAS	12
4.	LISTA DE FIGURAS	14
5.	LISTA DE TABLAS.....	15
6.	INTRODUCCIÓN	16
6.1	Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide	16
6.2	La enfermedad de Huntington.....	23
6.3	Implicaciones del sistema endocannabinoide en la neurodegeneración.....	27
6.3.1	Antecedentes de terapias de origen cannabinoide en modelos de enfermedades neurodegenerativas.....	31
6.4	EL URB597.....	34
6.4.1	Nomenclatura y propiedades químicas.....	34
6.4.2	Parámetros farmacocinéticos.....	35
6.4.3	Inhibición de la FAAH.....	35
6.4.4	Selectividad del URB597	36
6.4.5	Mecanismo de acción	38
6.4.6	Efectos asociados al URB597	39
6.4.7	Perfil de seguridad.....	40
6.5	Mecanismos de acción de los endocannabinoides	41
6.6	Excitotoxicidad y el modelo de ácido quinolínico	50
7.	JUSTIFICACIÓN.....	55
8.	HIPÓTESIS.....	56
9.	OBJETIVOS	56
9.1	Objetivo General	56
9.2	Objetivos específicos.....	56
10.	MATERIALES Y MÉTODOS	57
10.1	Reactivos.....	57
10.2	Animales	57
10.3	Diseño experimental e infusión de reactivos.....	58
10.4	Cirugía estereotáxica.....	59
10.5	Prueba de conducta de rotación.....	60
10.6	Evaluación histológica	60
10.7	Ensayo de inmunofluorescencia para la MAP-2, GAD, y localización de CB1 y NR1 en el estriado.....	61

10.8	Ensayo de peroxidación lipídica.....	62
10.9	Ensayo de carbonilación de proteínas	62
10.10	Análisis estadístico.....	63
11.	RESULTADOS.....	63
11.1	El URB597 previene la disminución en el peso corporal inducido por QUIN	63
11.2	El URB597 atenuó la asimetría motora inducida por QUIN.....	64
11.3	El URB597 disminuyó el daño celular estriatal inducido por QUIN.....	65
11.4	El URB597 atenuó la pérdida neuronal (inducida por QUIN) de la GAD y MAP-2 en el estriado.....	66
11.5	El URB597 previene el daño oxidativo (inducido por QUIN) en lípidos y proteínas.....	68
11.6	El QUIN y el URB597 modifican la expresión estriatal y localización del CB1 y NR1 ..	69
12.	DISCUSIÓN	71
13.	CONCLUSIONES	79
14.	PERSPECTIVAS	80
15.	REFERENCIAS.....	80
16.	PUBLICACIONES	98

1. RESUMEN

El sistema endocannabinoide (SEC) participa activamente en una gran cantidad de procesos fisiológicos en el Sistema Nervioso Central. A la fecha se ha establecido su participación en la regulación del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAr) glutamatérgico a través del control modulador en los receptores cannabinoideos (CB_r). De esta forma, el agonista endógeno de estos receptores, el ácido quinolínico (QUIN), puede actuar como excitotoxina a través de la sobreactivación selectiva de los NMDAr, participando por tanto en el inicio y desarrollo de desórdenes neurológicos. Con este antecedente, en este trabajo evaluamos si la inhibición farmacológica de hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH) inducida por el URB597, y el consecuente incremento en los niveles endógenos de anandamida, puede prevenir el daño excitotóxico inducido por QUIN. El URB597 (0.3 mg/kg/día por 7 días, administrado antes, durante y después de una lesión estriatal) ejerció efectos protectores en las alteraciones motoras (conducta asimétrica) y bioquímicas (peroxidación lipídica y carbonilación de proteínas) inducidas por el QUIN en el modelo de rata. Asimismo, el URB597 preservó la integridad estructural en el estriado, y previno la pérdida neuronal (evaluada por localización de proteína asociada a microtúbulos 2, y glutamato descarboxilasa) inducida por QUIN (1 µL intraestriatal, 240 nmol/µL), y modificó los patrones tempranos de localización de CB_{1r} y la subunidad NR1 del NMDAr. En conjunto, estos hallazgos fundamentan que la manipulación del SEC desempeña un papel neuroprotector frente a los insultos excitotóxicos en el Sistema Nervioso Central.

2. ABSTRACT

The endocannabinoid system (ECS) actively participates in several physiological processes within the Central Nervous System. It has been involved in the regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) through a modulatory input at the cannabinoid receptors (CB_r). The endogenous ligand of such receptors, the quinolinic acid (QUIN), can act as an excitotoxin through the selective overactivation of NMDAr, leading to the onset and development of neurological disorders. In this work we evaluated whether the pharmacological inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) by URB597, and the consequent increase in the endogenous levels of anandamide, prevent the excitotoxic damage induced by QUIN. URB597 (0.3 mg/kg/day for 7 days, administered before, during and after the striatal lesion) exerted protective effects on the QUIN-induced motor (asymmetric behavior) and biochemical (lipid peroxidation and protein carbonylation) alterations in rats. URB597 also preserved the structural integrity of the striatum and prevented the neuronal loss (assessed as microtubule-associated protein-2 and glutamate decarboxylase localization) induced by QUIN (1 μ L intrastriatal, 240 nmol/ μ L), while modified the early localization patterns of CB₁ (CB₁) and NMDAr subunit 1 (NR1). Altogether, these findings support the concept that the pharmacological manipulation of the endocannabinoid system plays a neuroprotective role against excitotoxic insults in the Central Nervous System.

3. LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG- 2-araquidonoilglicerol
2-AG-éter- 2-araquidonoilglicerol éter
3-HK- 3-hidroxikinurenina
3-NP- 3-nitropropiónico
6-OHDA- 6-hiroxidopamina
AEA- anandamida
AINE- antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA- Análisis de varianza
ATP- adenosín trifosfato
BHE- barrera hematoencefálica
cAMP- adenosín monofosfato cíclico
CB1r- receptor a cannabinoides 1
CB2r- receptor a cannabinoides 2
CBD- Cannabidiol
CBG- cannabigerol
CBr- receptores a cannabinoides
CuZn-SOD- superóxido dismutasa Cu/Zn
Cx43- conexina 43
DA- dopamina
DAG- diacilglicerol
DLP- depresión a largo plazo
DMSO- dimetilsulfóxido
DNPH- dinitrofenilhidrazina
EA- enfermedad de Alzheimer
EH- enfermedad de Huntington
EP- enfermedad de Parkinson
ELA- Esclerosis Lateral Amiotrófica
FAAH- amida hidrolasa de ácidos grasos
GABA- ácido γ -aminobutírico
GAD- glutamato descarboxilasa
GSH:GSSG- glutatión reducido/oxidado
HINT1 – proteína de histidina de unión a nucleótidos
HTT- huntingtina
KYNA- ácido kinurénico
MAGL- monoacilglicerol lipasa
MAP-2- proteína asociada a microtúbulos 2
mtCB1r- receptor a cannabinoides mitocondrial
NAD+- nicotin adenin dinucleótido oxidado
NAPE- N-acilfosfatidil etanolamina
NAPE-PLD- N-acilfosfatidil etanolamina fosfolipasa selectiva
NAT- N-aciltransferasa
NEM- neuronas espinosas medianas

NMDA- N-metil-D-aspartato
NMDAr- receptores para N-metil-D-aspartato
NPY- neuropéptido Y
nNOS- sintasa de óxido nítrico neuronal
ODA- oleamida
OEA- oleiletanolamina
PEA- palmitoiletanolamina
PLC- proteína cinasa A
polyQ- poliglutamina
PPAR- receptor activado por proliferación peroxisomal
RXR- receptor X retinoide
SEC- sistema endocannabinoide
SED-supresión de la excitación inducida por despolarización
SEM- error estándar de la media
SNC- Sistema Nervioso Central
SSTr2- receptor para somatostatina 2
SSTr5- receptor para somatostatina 5
TBARS- sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA- ácido tricloroacético
TGH- triacilglicerol hidrolasa
TH- tirosina hidroxilasa
THC- Δ^9 -tetrahidrocannabinol
TMPO- tetrametoxipropano
TRPV1- receptor de potencial transitorio V1
Trp- triptófano
VK- Vía de la kinurenina
 Δ^9 -THCV-tetrahidrocannabivarina

4. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los dos endocannabinoides más importantes, la AEA y el 2-AG.	19
Figura 2. Ciclos de biosíntesis e inactivación de los dos eCBs más importantes a la fecha	21
Figura 3. Estructura química del URB597	34
Figura 4. Mecanismos de acción de los eCBs.....	49
Figura 5. Representación esquemática de los mecanismos de toxicidad clásicos ejercidos por el ácido quinolínico (QUIN) en el Sistema Nervioso Central.....	52
Figura 6. Diseño experimental e infusión de reactivos	59
Figura 7. Efectos del ácido quinolínico (QUIN) y/o URRB597 (URB) en los cambios en el peso corporal y alteraciones motoras en ratas.	64
Figura 8. Efecto del ácido quinolínico (QUIN) y/o URB597 (URB) en la morfología estructural en ratas.	65
Figura 9. Efectos del ácido quinolínico (QUIN y/o URB597 (URB) en la inmunofluorescencia estriatal de células (GABAérgicas) neuronales.....	67
Figura 10. Niveles estriatales de peroxidación lipídica (porcentaje de daño oxidativo a lípidos; panel izquierdo) y carbonilación proteica	69
Figura 11. Efectos del URB597 (URB) y/o ácido quinolínico (QUIN) en la expresión y localización por inmunofluorescencia de CB1 y NR1 en tejido estriatal de rata.....	71
Figura 12. Resumen gráfico de la estrategia experimental propuesta en este trabajo	72

5. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de estrategias de modulación del SEC disponibles a la fecha.	32
Tabla 2. Efectos del URB597 en la unión a receptores, canales iónicos, transportadores, y enzimas en ensayos <i>in vitro</i>	37

6. INTRODUCCIÓN

6.1 Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide

Los componentes activos del cannabis, los cannabinoides, han estado presentes en las civilizaciones humanas por siglos. Sus primeras descripciones se encuentran documentadas alrededor del año 70 a. C. en “De Materia Medica”, escrita por el botánico, farmacólogo y médico griego Pedacio Dioscórides (Staub et al., 2016). La célebre farmacopea antigua refería propiedades interesantes a las variedades del *cannabis*, entre las cuales se destacaba el uso de la raíz de *Cannabis indica* para “disminuir la inflamación y el edema”, mientras que las semillas de *Cannabis sativa* resultaban “útiles para reprimir la concepción” (Dioscorides, 1996). Después de la Edad Media, el primer reporte publicado que refería los efectos del cannabis ocurre en 1843; en esta publicación, el médico inglés William Brooke O’Shaughnessy refirió diferentes preparaciones de una planta con “poderes inequívocos, y probablemente un remedio de marcada eficacia en enfermedades hasta ahora inmanejables” (Shaughnessy, 1840). Con esto quedó asentada su introducción en Reino Unido dado su perfil antiinflamatorio, antiemético y anticonvulsivante; casi de manera inmediata fue incorporado a la medicina occidental y fue en este momento que alcanzó su apogeo. Finalmente, las últimas décadas del siglo XIX refrendaron el desuso de la planta con fines medicinales, principalmente debido a la amplia disponibilidad de otras drogas sintéticas de mucha mayor potencia (Robson, 2014).

Actualmente se reconocen tres clases de cannabinoides: los fitocannabinoides, los cannabinoides sintéticos, y los cannabinoides de naturaleza endógena. El grupo de los fitocannabinoides comprende todos aquellos cannabinoides derivados de las plantas, y este grupo incluye los más de 80 compuestos liposolubles encontrados en la resina producida por la planta de cannabis (Galve-Roperh et al., 2013). Existen cerca de 500 compuestos químicos en la planta, de los cuales, alrededor de 80 son considerados cannabinoides (Brenneisen, 2007). Principalmente hay dos

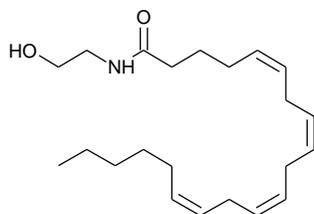
compuestos en los fitocannabinoides que son los que poseen los mayores efectos, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y que constituye el ingrediente psicoactivo principal y más conocido, y el cannabidiol (CBD) (Galve-Roperh et al., 2013). Actualmente se han descrito diversas posibles aplicaciones a nivel terapéutico, lo que ha propiciado el estudio de la farmacología de otros fitocannabinoides y de sus efectos a nivel molecular; algunos ejemplos son la Δ^9 -tetrahidrocannabivarina, el cannabinol, la cannabidivarina, el cannabigerol y el cannabicromeno (Turner et al., 2017).

El segundo grupo lo forman los cannabinoides sintéticos. Cerca de 140 compuestos han sido reportados hasta el 2014; el carácter psicoactivo de algunos de ellos aunado a una difusión de venta en línea les ha otorgado gran popularidad. Desde hace aproximadamente 20 años han sido detectadas diferentes preparaciones herbales en forma de cigarrillo bajo los nombres “*Spice*”, “*Spice Gold*”, “*K*”, “*Yucatan Fire*”, y probablemente muchos más, que contienen una mezcla de las hojas de la planta rociadas con cannabinoides sintéticos y que producen efectos que mimetizan aquellos de la planta. Así, su popularidad y facilidad de acceso ignoran una alta incidencia de efectos adversos serios o incluso fatales tras su uso, de manera que para muchos autores constituyen un auténtico fenómeno con gran impacto en términos de salud pública (Karila et al., 2016). Aunque en menor medida, otro subgrupo de cannabinoides sintéticos incluye también compuestos producidos a nivel de laboratorio que, por lo general, son sintetizados con objetivos de investigación concretos. Algunos ejemplos son: WIN-55,212-2, CP-55,940, JWH-184, AM-2233 (Martinotti et al., 2017).

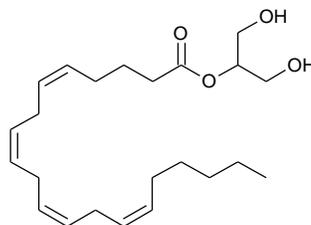
El último grupo es el de los cannabinoides endógenos, y su descripción es significativamente más extensa; el reconocimiento de estas moléculas sentó las bases para la definición de lo que hoy en día se conoce como Sistema Endocannabionide (SEC). El SEC es un complejo lipoproteico, constituido por dos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), los receptores cannabinoides tipo 1 (CB1r) y los receptores cannabinoides tipo 2 (CB2r); además, contiene una serie de agonistas de

dichos receptores, típicamente sintetizados “por demanda” tras estímulos fisiológicos y/o patológicos y reciben el nombre de endocannabinoides (eCBs). Dentro de estos mediadores lipídicos se encuentran el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) y la anandamida (AEA), que constituyen hoy en día los dos eCBs mejor caracterizados. Por último, una variedad de enzimas encargadas de la biosíntesis, transporte, y degradación de estas moléculas se reconocen también como parte del SEC (Piomelli, 2003; Di Marzo, 2008). El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) fue aislado, identificado y sintetizado alrededor de 1970 (Gaoni y Mechoulam, 1971), lo que representa el antecedente clave en la historia del SEC; sin embargo, no fue sino hasta 1990 que los receptores cannabinoides fueron descritos y subsecuentemente clonados en el cerebro (Matsuda et al., 1990), con lo que no solo se dio a conocer el mecanismo de acción de los extractos de cannabis, sino que se condujo a la identificación y aislamiento de muchos otros compuestos del SEC. En conjunto, la presencia del SEC en el cerebro y estructuras periféricas, y la regulación que ejercen en la función sináptica excitatoria e inhibitoria permite que los eCBs participen en muchos fenómenos fisiopatológicos que comprenden, sin limitarse a los siguientes eventos: la regulación de funciones básicas como la cognición, el control del movimiento, y las emociones (Kendall y Yudowski, 2016; Araque et al., 2017), la proliferación celular, la modulación de la plasticidad sináptica (Araque et al., 2017), la antinocicepción (Blazquez et al., 2011; Ulgol, 2014), el desarrollo neural (Keimpema et al., 2011), la modulación de los estados del ánimo (Kendall y Yudowski, 2016), y con certeza muchas funciones más.

La AEA y el 2-AG son los ligandos endógenos mejor caracterizados a la fecha, y sus estructuras químicas se presentan en la Figura 1. Sus ciclos de biosíntesis y degradación se conocen con precisión y se muestran en la Figura 2.



Anandamida (AEA)



2-araquidonoilglicerol (2-AG)

Figura 1. Estructura química de los dos endocannabinoides más importantes, la AEA y el 2-AG. ACD/ChemSketch 2018.

El 2-AG se origina a partir del metabolismo de triacilgliceroles por la actividad de la enzima diacilglicerol (DAG) lipasa, en respuesta a la activación de receptores metabotrópicos acoplados a la fosfolipasa C (PLC) tipo β (grupo I de los receptores metabotrópicos a glutamato mGluR1/5, o bien, los receptores muscarínicos de acetilcolina mACh tipos M1/M3). Con este paso, el DAG se convierte en 2-AG. La presencia de transportadores de eCBs en la membrana facilita la entrada y salida de cannabinoides y por lo tanto la activación de los CB1r. La inactivación del 2-AG se alcanza a nivel presináptico, donde la monoacilglicerol lipasa (MAGL) convierte el 2-AG en glicerol y ácido araquidónico. Por otro lado, la biosíntesis de la AEA comprende la conversión de fosfolípidos en N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) a través de la N-aciltransferasa (NAT), que requiere elevaciones de Ca^{2+} intracelular tras la despolarización y/o activación de receptores ionotrópicos. El NAPE es transformado en AEA por una NAPE-fosfolipasa selectiva (NAPE-PLD). En la fase de inactivación interviene la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH) que transforma a la AEA en etanolamina y ácido araquidónico (Blazquez et al., 2011; Alswat, 2013; Al Kury et al., 2014; Chiarlone et al., 2014; Ulgol, 2014; Valdeolivas et al., 2014; Araque et al., 2017; Basavarajappa et al., 2017). La probabilidad de liberación de neurotransmisor se reduce significativamente tras la activación de los CBr. De acuerdo con la literatura, lo anterior puede ocurrir a través de la inhibición presináptica del flujo de entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+}

dependientes de voltaje, la activación de canales de K^+ presinápticos, y la señalización mediada por adenosín monofosfato cíclico (cAMP)/ proteína cinasa A (PKA) (Castillo et al., 2012; Araque et al., 2017). Dada su naturaleza lipofílica, se acepta que pueden dividirse y difundirse de manera efectiva en las membranas celulares sin almacenarse en vesículas (Basavarajappa et al., 2017). Por otro lado, existe poca evidencia que refiere que los eCBs actúan de modo no retrógrado, donde el 2-AG activa CB1r postsinápticos o CB2r, mientras que la AEA activaría a los receptores de potencial transitorio V1 (TRPV1) (Castillo et al., 2012). Sin embargo, se acepta que una vez liberados de la estructura postsináptica, ambos eCBs actuarán fundamentalmente como mensajeros retrógrados al activar CB1r presinápticos, lo que propicia un mecanismo de retroalimentación o *feedback* inhibitorio para regular la liberación de neurotransmisores en el cerebro (Basavarajappa et al., 2017). Adicional a lo anterior, hoy en día se reconocen muchos otros compuestos como parte de la vasta familia de eCBs, incluyendo al 2-araquidonoilglicerol éter (noladin éter, o 2-AG-éter), el o-araquidonoiletanolamina (virodamina, o AEA invertida), y el N-palmitoiletanolamina (PEA), el N-oleiletanolamina (OEA) (Lam et al., 2010; Brown et al., 2012).

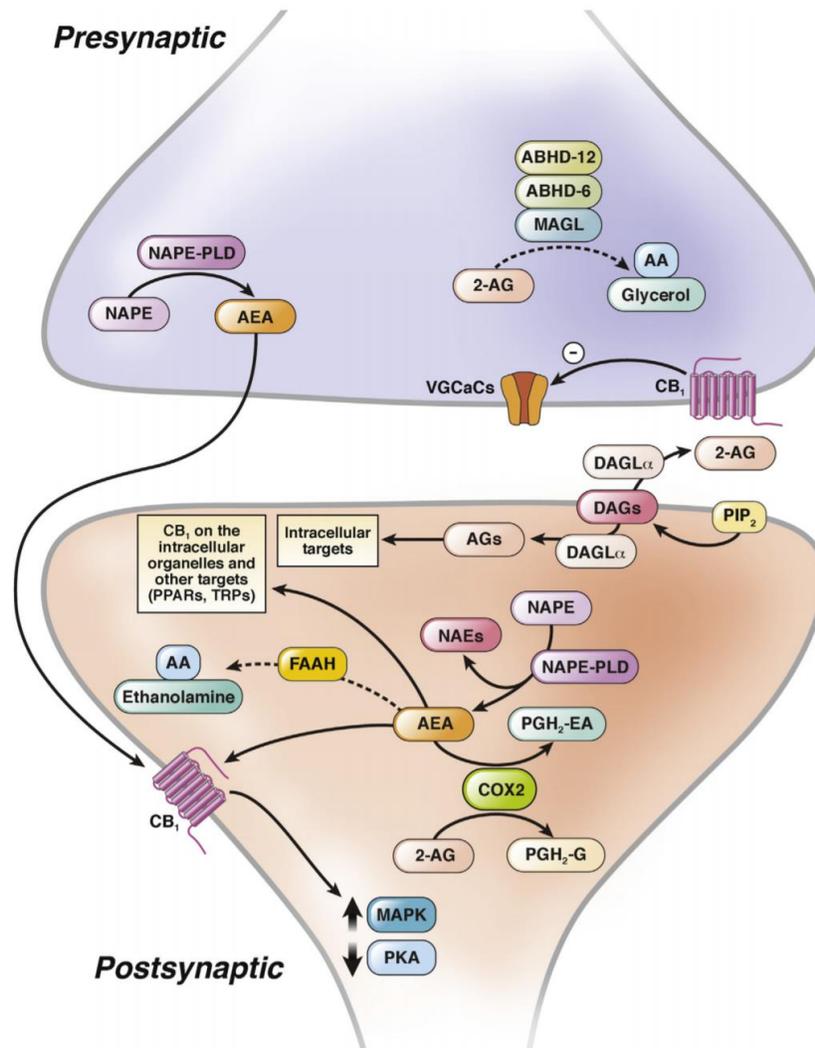


Figura 2. Ciclos de biosíntesis e inactivación de los dos eCBs más importantes a la fecha, la anandamida (AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Se muestra la distribución de las enzimas encargadas de la biosíntesis y degradación de AEA y 2-AG. Con base en este arreglo, se evidencia el rol de la AEA como transmisor intracelular anterógrado, y el papel del 2-AG como transmisor sináptico de tipo retrógrado. Las líneas punteadas denotan inactivación. Tomado de *Gastroenterology* 2016; 151:252-266 (Sharkey y Wiley, 2016).

Los CB $_1$ r se expresan abundantemente en el Sistema Nervioso Central (SNC) en neuronas corticales, interneuronas, astrocitos, y oligodendrocitos (Galve-Roperh et al., 2013), así como en

estructuras como la corteza motora, tálamo, hipotálamo, e hipocampo, con lo cual es evidente su influencia en el procesamiento de emociones, activación motora y demás funciones cognitivas (Mackie, 2005). Inicialmente se pensaba que los CB2r se encontraban únicamente en las células inmunes como macrófagos o linfocitos T y B; sin embargo, su presencia es reconocida en neuronas y astrocitos del tronco cerebral, en órganos inmunes como el bazo, timo, nódulos linfáticos, y microglía (Atwood y Mackie, 2010; Chiurchiú et al., 2015; Manera et al., 2016; Busquets-Garcia et al., 2018). Si bien la distribución es importante, la densidad de estos receptores resulta de especial relevancia; se ha establecido que de la familia de los receptores GPCRs, el CB1r es el más abundante, presente hasta 50 veces más que aquellos receptores clásicos (Sánchez-Blázquez et al., 2014). Los eCBs ejercen sus efectos a través de la activación de los CB1r y CB2r, y actúan en diferentes sitios moleculares como neuronas, astrocitos y microglía (tanto activada como inactiva), hasta estructuras complejas como la barrera hematoencefálica (BHE) (Fernández-Ruiz et al., 2015). Más aún, los eCBs liberados por las neuronas son capaces de efectuar un control modulador a nivel pre y postsináptico a través de la activación de los CB1r expresados en astrocitos (Navarrete et al., 2014; Metna-Laurent y Marsicano, 2015). Por otro lado, una publicación reciente determinó la presencia de la maquinaria cannabinoide en la microglía; con esto, la expresión de los receptores cannabinoideos, en particular el CB2r, se relacionaría con el perfil de activación de dichas células, y resultaría en implicaciones terapéuticas de gran interés (Mecha et al., 2016).

La regulación en la transmisión sináptica ejercida por la activación de los CB1r y CB2r ocurre en lapsos cortos de tiempo. Si la transmisión ocurre en decenas de segundos, se propiciará una supresión en la excitación o inhibición debida a una despolarización, mismas que dependerán del blanco de los eCBs (terminales glutamatérgicas o GABAérgicas). Por otro lado, la transmisión puede ocurrir en el orden de minutos o 1 hora; en este escenario, los cambios sinápticos en dicho plazo derivados de la activación de CB1r y CB2r ocurrirán en respuesta a los tipos de actividad a nivel pre o postsináptico (Kano et al., 2009; Castillo et al., 2012; Araque et al., 2017).

6.2 La enfermedad de Huntington

El estudio de los cannabinoides podría ser una alternativa terapéutica en enfermedades cuyos tratamientos actuales no hacen frente a las necesidades de los pacientes. Entre estos ejemplos destaca el caso de la enfermedad de Huntington (EH), un desorden neurodegenerativo que sigue un patrón de herencia autosómico dominante en el que se manifiestan síntomas motores, psiquiátricos y cognitivos importantes. La enfermedad es causada por una mutación en el gen codificante de la huntingtina (HTT), y que consiste propiamente en un exceso de repeticiones del triplete CAG (por arriba de 36) en el exón 1 del gen HTT. Así, la porción expandida del triplete es traducida en los residuos repetidos de glutamina, o poliglutamina (polyQ), en el extremo N-terminal de la proteína HTT en el cromosoma 4 (Rikani et al., 2014). De acuerdo con la literatura, la traducción del fragmento repetido es necesaria para que se ejerzan sus efectos tóxicos. Por lo anterior, la presencia del fragmento de repeticiones de CAG se convirtió en el criterio molecular confirmatorio de EH en aquellos pacientes con signos sugerentes de la enfermedad (Kremer et al., 1994; Goldberg et al., 1996; Kay et al., 2017). Como es sabido, en el curso de la enfermedad típicamente se presentan anormalidades motoras (coreas), así como deterioro cognitivo y psiquiátrico (McGarry y Biglan, 2017). Estos síntomas se explican por la degeneración y muerte neuronal en estructuras como el globo pálido, el estriado y la corteza cerebral en menor proporción; dada la naturaleza progresiva de la EH, estos síntomas se acentuarán gradualmente con el avance de la condición.

Tras su descripción original a finales del siglo XIX (Huntington, 1872) y la documentación del patrón de herencia autosómico dominante a principios del siglo XX (Punnett, 1908), la EH ha ido ganando reconocimiento a nivel clínico, lo que ha permitido documentar la presencia de la enfermedad. De acuerdo con algunos autores (Harper, 1992), el estudio epidemiológico de un desorden que es por definición mendeliano, como el abordado en este trabajo, requiere invariablemente de estrategias de análisis basadas en estatutos procedentes de la genética clásica.

Con esto, una gran cantidad de información ha sido colectada alrededor del mundo, y ha contribuido significativamente con la definición de los orígenes y distribución de la EH. Sin embargo, las conclusiones derivadas de esta valoración tradicional han sido superadas por la naturaleza compleja de la enfermedad, y son necesarios más enfoques; entre estos destaca el uso de estudios a nivel molecular para determinar las tasas de mutación en el locus específico, el origen (probablemente de gran antigüedad), o las mutaciones más frecuentes en poblaciones únicas (Harper, 1992).

La repetición de 36 o más triplete de CAG es criterio para presentar la enfermedad; a mayor número de repeticiones, mayor penetración y menor edad de inicio de los signos y síntomas. Por esta razón, algunos autores consideran que la epidemiología de la EH recae importantemente en la determinación de los individuos con la mutación de mayor repetición del triplete, así como un seguimiento clínico apropiado para la detección y diagnóstico oportunos. Lo anterior resulta de particular relevancia a la luz de algunos trabajos que exponen que la mayoría de los individuos que padecen la enfermedad tienen la repetición extendida del triplete y presentan manifestaciones clínicas en la edad adulta. Así, aquellos con la repetición corta manifiestan un menor perfil patogénico, lo que indica que la frecuencia en la repetición extendida en la población general es probablemente mayor de lo que se ha considerado (Kay et al., 2017). Además, deben considerarse las diferencias genéticas y demográficas que podrían incidir en la variación geográfica y étnica en su presencia y distribución; lo anterior se confirma al considerar que han existido diferencias importantes en la prevalencia de la EH desde sus primeros registros, y algunos estudios apuntan a diferencias en las nuevas tasas de mutación como responsables de las discrepancias observadas en poblaciones específicas a lo largo del tiempo. Determinar la prevalencia de la EH es una labor complicada, y requiere del empleo simultáneo de muchas fuentes de información para alcanzar un grado aceptable de confiabilidad. Sin embargo, cabe mencionar que los criterios clínicos para considerar el inicio de la enfermedad no han seguido siempre el mismo rigor, y han tenido que

adaptarse al desarrollo progresivo de los síntomas y la incapacidad para determinar la condición en individuos asintomáticos con cualquiera de las extensiones del triplete. Por lo anterior, el registro sistemático de los casos se centró casi exclusivamente en un abordaje patológico tradicional, sin incorporación de pruebas a nivel molecular y sin considerar la aparición de nuevas mutaciones, pues se limitaban a caracterizarlas como eventos atípicos.

La definición de la epidemiología de la EH depende, en una primera etapa, de la evaluación del médico especialista, usualmente en el marco de los antecedentes heredo-familiares, y subsecuentes pruebas confirmatorias *post mortem*; a este respecto, factores como la falta de familiaridad o confusión con condiciones neurológicas de manifestación semejante y la ausencia de historiales clínicos certeros, han impactado seriamente en los índices reportados de la EH (Kay et al., 2017). En el Reino Unido, en donde se ha realizado la labor más extensiva para la determinación de la EH, la prevalencia reportada está entre 1.6 y 12.3 casos por cada 100 000 habitantes, con un notable aumento en la región este, y el norte de Escocia (Kay et al., 2017). De acuerdo con la última revisión, la estimación para Columbia Británica (Canadá) es de 13.7 por cada 100 000, y constituye además la cifra más alta reportada para la región norte de América (Fisher y Hayden, 2014). El panorama en América Latina es el siguiente: Venezuela presenta el foco de mayor concentración de casos de EH en el mundo. Hace aproximadamente 20 años se logró la identificación de más de 80 variantes independientes de la EH, mismas que se agruparon en un inicio alrededor del Lago de Maracaibo, y que con el tiempo se dispersaron a regiones contiguas (Wexler et al., 2004). Lo anterior generó valiosa información referente al origen de las variantes encontradas, lo que permitió el mapeo del gen y el fragmento expandido de CAG; sin embargo, a pesar de estas condiciones, no existen estudios formales que arrojen cifras certeras. De acuerdo con una publicación de 2009, fueron caracterizados 691 pacientes con la enfermedad en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en la Ciudad de México; de acuerdo con las apreciaciones de Kay y colaboradores, la prevalencia ajustada corresponde a 4 casos por cada 100 000 habitantes (Alonso et al., 2009).

Finalmente, es importante recalcar que la prevalencia de la EH, aún en nuestros días, está subestudiada, en especial en países en desarrollo, lo que implica una falta de reconocimiento de la enfermedad a nivel local y global.

El cuadro evocado por esta patología se atribuye en parte a la toxicidad de la proteína HTT mutante (condición que incluye el plegamiento incorrecto, proteólisis anormal, agregación y deposición proteica, etc.). No obstante, a pesar del progreso en la definición del mecanismo patogénico que caracteriza a esta enfermedad, la manifestación clínica y evolución son variables con cada paciente, y no se explican únicamente con la mutación de la proteína, ya que en los procesos de progresión de la misma y la muerte neuronal, convergen también otros procesos que inician con la alteración en la agregación proteica y la función mitocondrial, y que resultan en excitotoxicidad, eventos oxidativos, activación glial, y eventos inflamatorios locales y citotóxicos (Tai et al., 2007; Pazos et al., 2008; Quintanilla y Johnson, 2009; Arrasate y Finkbeiner, 2012).

Por otro lado, la tarea de estimación del nivel de deterioro en la calidad de vida de estos pacientes se vuelve más compleja y difícil. A nivel individual, el impacto en la calidad de vida por la EH es significativo. Los antecedentes familiares aunados al diagnóstico de la enfermedad representan un reto mayor en la vida de los pacientes y familiares. El progreso de la enfermedad se refleja en el proceso psicológico que acompaña al paciente (mismo que involucra el desconocimiento, negación, y en últimas etapas, aceptación del diagnóstico y sus consecuencias). Además, desafortunadamente la terapéutica actual carece de una opción viable para detener la progresión de la enfermedad (Basavarajappa et al., 2017) y a la fecha ofrece únicamente opciones a través de antidepresivos, antipsicóticos y sedantes, mismos que se acompañan por rehabilitación apoyo psiquiátrico, nutricional y social (Lastres-Becker et al., 2005; Pintor et al., 2006; Ramaswamy et al., 2007; Palazuelos et al., 2009; Galve-Roperh et al., 2013; Bates et al., 2015).

6.3 Implicaciones del sistema endocannabinoide en la neurodegeneración

Durante la última década, ha aumentado el interés en esclarecer los mecanismos fisiopatológicos de la EH y muchas otras enfermedades de carácter neurodegenerativo. En su mayoría, las enfermedades de esta naturaleza se caracterizan por el deterioro cognitivo y otros rasgos neurológicos. Por lo general, las causas de dichas enfermedades, y los mecanismos subyacentes son mayormente desconocidos. Pueden desarrollarse de manera paralela o simultánea con otros eventos patológicos, y diferirán dependiendo del tipo celular y la región cerebral afectada. Como se ha establecido anteriormente, el SEC se encuentra abundantemente distribuido en las estructuras que forman a los ganglios basales, lo que sugiere que este sistema está involucrado fuertemente a la respuesta motora (Herkenham et al., 1991; Bisogno et al., 1999), y por tanto pudiera ser relevante en el escenario patológico de estas condiciones. Varios reportes señalan que existe una afectación en la señalización cannabinoide como parte del cuadro patológico de la EH. Una serie de estudios post mortem demostraron una pérdida masiva de CB1r en estructuras de los ganglios basales en pacientes con EH; de acuerdo con estos hallazgos, mientras que hace más de 3 décadas se reportó la pérdida de CB1r en sustancia nigra (*pars reticulata*) en el cerebro humano de pacientes con EH (Glass et al., 1993), otros grupos reportaron pérdida aguda de CB1r en ganglios basales, con especial selectividad en el globo pálido (Richfield y Henkenham, 1994). En contraste, etapas avanzadas de la EH se asocian a la expresión aumentada de CB2r en células gliales, en paralelo a la degeneración estriatal.

Por otro lado, los CB2r entrañan características interesantes; han sido identificados principalmente en astrocitos y microglía, y en menor proporción en subpoblaciones neuronales; esta distribución los limitó inicialmente a un rol periférico y asociado al sistema inmune. Sin embargo, se ha demostrado que existe una inducción/sobrerregulación de los CB2r en diferentes patologías, tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la EH, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), etc. Modelos experimentales han demostrado que la activación de dichos receptores se asocia al retraso

en la progresión de eventos neurodegenerativos (Fernández-Ruiz et al., 2008), lo que encierra un potencial incalculable a nivel terapéutico que requiere más atención.

El cuerpo estriado desempeña un papel fundamental en el movimiento de tipo involuntario y el aprendizaje; paradójicamente, es una de las estructuras de mayor disfunción y compromiso en una gran variedad de enfermedades psicomotoras. Asimismo, el cuerpo estriado, en particular su región dorsal, integra las señales de entrada de estructuras como la corteza y el tálamo, mismas que convergen en neuronas espinosas medianas (NEM) de las vías directa e indirecta, y que jugarán distintos roles para llevar a cabo el control motor de salida (Bateup et al., 2010; Kravitz et al., 2012; Cui et al., 2013; Tecuapetla et al., 2016; Vicente et al., 2016). La señalización estriatal de eCBs involucra en primera instancia a las NEM, que sintetizan y liberan al espacio extracelular una variedad de eCBs después de la activación sinérgica de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs) tipo 1 y receptores dopaminérgicos D₂, y por la entrada de Ca²⁺ vía canales de calcio dependientes de voltaje y vía NMDAr (Yin et al., 2006; Uchigashima et al., 2007; Lovinger y Mathur, 2012; Araque et al., 2017). Así, los diferentes elementos que componen el SEC tienen una presencia significativa en esta estructura, y de acuerdo con diversos estudios, los CB1r se expresan ampliamente en las terminales corticoestriatales, donde la señalización cannabinoide es fundamentalmente de tipo retrógrada. Consecuentemente, los eCBs son capaces de modular la función sináptica a través de sus efectos sobre los receptores presinápticos en terminales glutamatérgicas y GABAérgicas. Adicionalmente, los eCBs están asociados mayormente al control de la excitabilidad neuronal y la regulación de distintas formas de plasticidad sináptica a largo plazo; por ejemplo, en inducción de proliferación y neurogénesis posterior al daño excitotóxico, vía CB1r (Aguado et al., 2007). Asimismo, se ha establecido anteriormente que la señalización cannabinoide en el estriado constituye un eficaz sistema neuromodulador que actúa deprimiendo las vías de entrada corticoestriatales en dos ventanas de tiempo: la corta, vía la inhibición de la liberación de glutamato y la supresión de la excitación inducida por despolarización (SED), y la

larga, vía de procesos de depresión a largo plazo (DLP) inducidos por eCBs, donde estos compuestos serán responsables del efecto inhibitorio producido por la liberación transitoria de GABA en terminales inhibitorias ricas de CB1r (Gerdeman y Lovinger, 2001, 2003; Gerdeman et al., 2002).

El desarrollo de modelos animales de la EH ha permitido confirmar estos patrones de alteración y reducción de receptores del SEC como parte de la fisiopatología de esta condición. Un estudio realizado con el modelo de EH basado en el uso del ratón transgénico R6/1 (que expresa el fragmento extendido de CAG [≥ 115 repeticiones]) reveló una reducción en el mRNA del CB1r, así como menor unión a ligandos de CB1r en tejido estriatal (Dowie et al., 2009). Asimismo, ratones expresando esta mutación también mostraron una reducción de mRNA de CB1r en el cuerpo estriado (en su región dorsal), hipocampo y en menor medida en tejido cortical en una etapa temprana de la patología (Denovan-Wright y Robertson, 2000). Las observaciones no solo se centran en alteraciones en los receptores, sino que también abarcan niveles diferenciales de algunos de los ligandos de mayor relevancia. En 2009, un grupo de investigación realizó un trabajo con ratones R6/1 presintomáticos para determinar los niveles de algunos eCBs por cromatografía de líquidos -espectrometría de masas en corteza, hipocampo y estriado. Observaron una disminución significativa en los niveles de AEA en hipocampo en el modelo de estudio y en contraste, los niveles de 2-AG aumentaron importantemente en la corteza cerebral (Dowie et al., 2009). Un trabajo en 2013 evaluó los cambios en los niveles de actividad de las enzimas fosfolipasa selectiva de N-acilfosfatidil etanolamina (NAPE-PLD) y diacilglicerol lipasa (DAGL), que en cerebro completo de ratones R6/1 revelaron una actividad a la baja; los niveles bajos de actividad enzimática se repitieron para muestras de estriado aislado. Adicionalmente, los niveles de AEA en cerebro completo no mostraron cambios respecto a los controles (Bari et al., 2013). La reducción en los niveles de la enzima FAAH, encargada de la hidrólisis de AEA, están además correlacionados con el incremento constitutivo de AEA, que a su vez se asocia con el efecto inhibitorio de los

nociceptores (Malek et al., 2014). Por su parte, la hidrólisis del 2-AG es significativa puesto que conlleva a la producción de ácido araquidónico libre, mismo que regula procesos neuroinflamatorios (Cabral et al., 2015). Lo anterior genera un antecedente en el cual, aquellos compuestos capaces de aumentar y mejorar la señalización mediada por los CB1r pueden ser utilizados como un acercamiento terapéutico; además, el área de oportunidad en el contexto de esta enfermedad es evidente. Así, aunque inicialmente la pérdida de receptores CB1 se atribuyó a un efecto secundario de la destrucción progresiva de las neuronas GABAérgicas en las que residen estos receptores, la evidencia indica que dicha pérdida está presente también en condiciones de ausencia de daño estriatal, o bien con un grado de daño menor. Además, al igual que el deterioro en la EH es dependiente del grado de progresión y mantiene congruencia con los síntomas clínicos, las alteraciones en el SEC son específicas de cada región cerebral y se asocian con el daño tisular y funcional de cada estructura. Estas observaciones confirman como la disminución y pérdida de los CB1r es en realidad un evento relacionado directamente con la patogénesis de la enfermedad, y no una consecuencia; por lo tanto, estas alteraciones contribuirían activamente con su inicio y progresión.

La evidencia recolectada de pacientes y modelos experimentales demuestra la reducción en la densidad y/o la hipofunción de los CB1r -y algunos otros elementos del SEC-, en las estructuras típicamente afectadas por la enfermedad. Sin embargo, se ha establecido también que la degeneración intensa que exhiben las neuronas estriatales es una manifestación del fenómeno de “vulnerabilidad neuronal selectiva” a través del cual se explica la sobreactivación de receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópico tras la acción de neurotransmisores excitatorios, lo que resulta en excitotoxicidad y daño neuronal (Ina et al., 2011). Además de explicar parcialmente las bases del daño degenerativo, lo anterior expone la vulnerabilidad del grupo neuronal afectado.

6.3.1 Antecedentes de terapias de origen cannabinoide en modelos de enfermedades neurodegenerativas

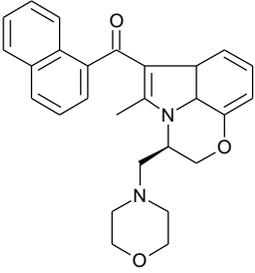
En consideración a la cantidad de reportes que demuestran la participación del SEC en escenarios fisiológicos y patológicos, la modulación de su actividad constituye una alternativa terapéutica potencial debido a que los agentes cannabinoideos son capaces de ejercer una función neuroprotectora y pro-homeostática en enfermedades crónicas y agudas en un rango muy amplio. Entre las posibles enfermedades blanco para este tipo de tratamiento se incluyen los desórdenes de los estados de ánimo y la ansiedad (Badgy et al., 2012; Hermanson et al., 2013), los desórdenes motores como la enfermedad de Parkinson (EP) o la EH (Fernández-Ruiz, 2009; Esposito et al., 2012; Alswat, 2013; Pacher y Kunos, 2013), el dolor neuropático, y la esclerosis múltiple (Ulgol, 2014), extendiéndose además a otro tipo de enfermedades como el cáncer, aterosclerosis, accidentes cerebrovasculares, hipertensión, obesidad, y el síndrome metabólico (Kogan y Mechoulam, 2007).

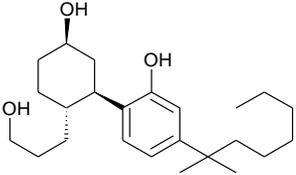
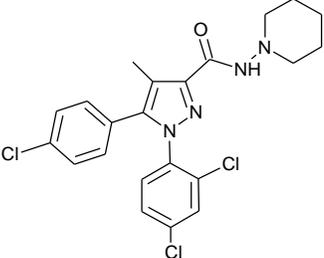
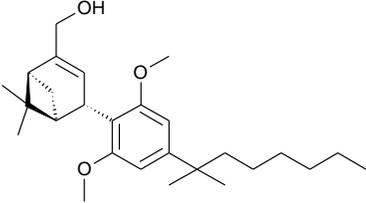
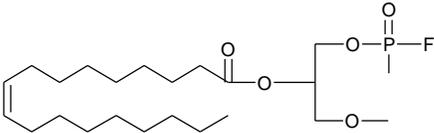
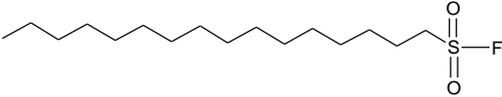
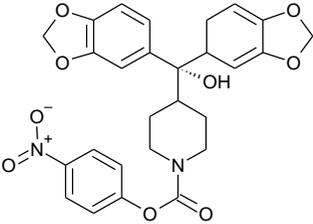
Con estos criterios, se han explorado experimentalmente varias estrategias con eCBs sobre los efectos tóxicos de distintos agentes. Por ejemplo, para la EP, se ha demostrado su capacidad reductora de estrés oxidativo en modelos de administración de la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). En este escenario, el Δ^9 -THC y el cannabidiol atenuaron de forma contundente la depleción dopaminérgica, así como los déficits de tirosina hidroxilasa (TH), enzima responsable de catalizar la conversión de L-tirosina en dihidroxifenilalanina (Lastres-Becker et al., 2005). Reforzando lo anterior, se reportó que la administración de cannabinoideos como la tetrahidrocannabivarina (Δ^9 -THCV) retrasa la progresión de la enfermedad y reduce la inhibición motora a través de cambios en la transmisión glutamatérgica, tanto en modelos de EP con administración de 6-OHDA, como de lipopolisacárido (LPS), el cual actúa como agente proinflamatorio (García et al., 2011). Por otro lado, también se ha explorado el alcance de las terapias con derivados cannabinoideos en modelos preclínicos de la EH. A través de un mecanismo dependiente de receptores cannabinoideos, la administración de cannabigerol (CBG) atenuó la

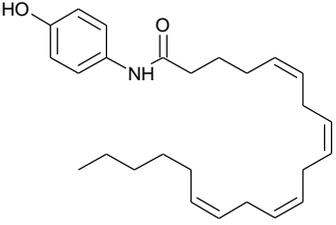
microgliosis reactiva y contrarrestó la sobreexpresión de marcadores inflamatorios en modelos de administración de toxinas, con lo que se demostró una capacidad neuroprotectora importante (Valdeolivas et al., 2014). Ratones transgénicos R6/1 exhibieron expresiones de toxicidad inferiores cuando se encontraron bajo esquemas de administración con cannabinoides sintéticos como el WIN 55,212-2 o el HU210, puesto que ambos atenúan la toxicidad asociada a la agregación proteica de la HTT a través de un mecanismo de acoplamiento de los CB1r a las proteínas Gi/o (Scotter et al., 2010).

Mientras que una gran mayoría de diseños experimentales se basan en la administración de un sinnúmero de agonistas de ambos receptores, en fechas recientes se han planteado algunas estrategias alternativas para llevar a cabo la modulación del SEC, mismas que se resumen en la Tabla 1. Estas alternativas permiten potenciar los niveles de eCBs y mantener las respuestas benéficas derivadas de la activación directa de los CB1r, limitando a la vez los efectos indeseados asociados a la mayoría de los agonistas de estos receptores (Gado et al., 2018).

Tabla 1. Ejemplos de estrategias de modulación del SEC disponibles a la fecha.

Estructura y nombre	Actividad	Efectos principales
 <p data-bbox="391 1829 560 1860">WIN55,212-2</p>	<p data-bbox="797 1549 1011 1581">Agonista de CB1r</p>	<p data-bbox="1081 1514 1396 1745">Exhibe propiedades neuroprotectoras contra la toxicidad inducida por ácido 3-nitropropiónico (3-NP) en cerebro de rata (Maya-López et al., 2017a).</p>

 <p>CP 55-940</p>	<p>Potente agonista de CB1r y CB2r</p>	<p>Ejerce alteraciones - dependientes de la edad y estructura- en el perfil lipídico cerebral (Leishman et al., 2018).</p>
 <p>SR141716A (rimonabant)</p>	<p>Antagonista de CB1r</p>	<p>Ejerce efectos neuroprotectores al reducir el volumen de infarto en ~40% a nivel experimental (Sommer et al., 2006).</p>
 <p>HU-308</p>	<p>Agonista selectivo de CB2r</p>	<p>Reduce la presión arterial; ejerce actividad periférica analgésica y anti-inflamatoria (Hanus et al., 1999).</p>
 <p>O-3841</p>	<p>Inhibidor de la biosíntesis del 2-AG</p>	<p>Mostró efectos neuroprotectores en ratas lesionadas con malonato (Valdeolivas et al., 2013).</p>
 <p>AM374</p>	<p>Inhibidor de la FAAH</p>	<p>Potencia el efecto de la AEA (Gifford et al., 1999; Arizzi et al., 2004).</p>
 <p>JZL184</p>	<p>Inhibidor irreversible de la MAGL</p>	<p>Eleva selectivamente los niveles de 2-AG en el cerebro de rata (Tabrizi et al., 2018).</p>

 <p>AM404</p>	<p>Inhibidor de la recaptación de AEA</p>	<p>Metabolito del paracetamol que podría aportar evidencia del mecanismo de acción del analgésico (Sharma et al., 2017). Hiperfagia (Reyes-Cabello et al., 2012).</p>
--	---	---

6.4 EL URB597

6.4.1 Nomenclatura y propiedades químicas

El KDS-4103 (éster 3'-carbamoilbifenil-3-il del ácido ciclohexilcarbámico) posteriormente denominado URB597, es un potente y selectivo inhibidor de la FAAH que se encuentra en forma de polvo sólido cristalino. Tiene un peso molecular de 338.407 g/mol, y su fórmula química es $C_{20}H_{22}N_2O_3$. Su estructura se presenta en la Figura 3. Su solubilidad en buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4) es de 523 ng/ml, y un $\log D$ de 3.93 (*n*-octanol/PBS, pH 7.4). Tiene una densidad de 1.23 g/cm³, y un punto de ebullición de 276.3°C. Es estable bajo condiciones de calor, acidez, luz, y simulaciones de fluido gástrico (Piomelli et al., 2006; TOCRIS, 2016).

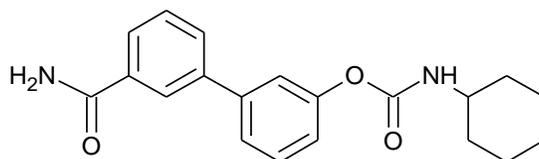


Figura 3. Estructura química del URB597. ACD/ChemSketch, 2018.

6.4.2 Parámetros farmacocinéticos

EL URB597 es absorbido a una tasa moderada, con un pico de concentración en plasma ($C_{m\acute{a}x}$) alcanzado 1.2 horas después de la administración. La vida media de eliminación oral ($t_{1/2}$) es de ~2 horas. Después de una dosis oral de 10 mg/kg, los niveles máximos en el cerebro se alcanzan aproximadamente 1 hora después de la administración; y congruentemente, la inhibición de la FAAH se alcanza rápidamente (≤ 1 hora), y se mantiene en $>90\%$ por 12 horas, y $>60\%$ por 24 horas (Piomelli et al., 2006).

6.4.3 Inhibición de la FAAH

Se ha caracterizado la inhibición de la FAAH por el URB597 en estudios *in vitro* e *in vivo*. Los valores de concentración inhibitoria máxima (IC_{50}) del URB597 son de 3 nM en hígado humano y 5 nM en cerebro de rata. De acuerdo con estudios publicados en el año 2003, el URB597 previene la hidrólisis de la AEA (catalizada por la FAAH) en cultivos primarios de neuronas corticales de rata, con una IC_{50} de 0.5 nM (Kathuria et al., 2003). Por otro lado, existe evidencia disponible que demuestra que el URB597 inhibe la actividad de la enzima y la consecuente prevención en la degradación de AEA, sin generar efectos inhibitorios sobre el transporte de esta última. De esta forma, el URB597 promueve la acumulación de AEA a nivel intracelular, la salida de AEA del soma y el aumento en sus niveles extracelulares (Piomelli et al., 2006). La inhibición de la enzima FAAH se ha evaluado también en modelos experimentales *in vivo*, en los que ha quedado de manifiesto una relación dosis-dependiente, con una media-máxima de 0.15 mg/kg (Kathuria et al., 2003). De esta manera, la administración de URB597 (0.3 mg/kg, i.p.) en ratas demostró que la inhibición de la FAAH ocurre después de los 15 minutos de la administración y con un tiempo de persistencia que rebasa las 12 horas. Lo anterior coincide con un aumento en los niveles cerebrales de AEA y, como se discutió anteriormente, con el aumento de otras etanolaminas de ácidos grasos sustratos de la enzima (Fegley et al., 2005; Piomelli et al., 2006). Fegley y colaboradores

demonstraron en 2005 el aumento en los niveles cerebrales de AEA en ratones FAAH^{-/-} (Fegley et al., 2005). Por otro lado, los efectos de la AEA están mediados por el CB1r, dado que previas publicaciones lo demostraron tras el bloqueo de estos mismos receptores con el agonista rimonabant.

6.4.4 Selectividad del URB597

La Tabla 2 muestra la farmacología *in vitro* del URB597 (Piomelli et al., 2006). Con base en la información disponible, el URB597 no altera la actividad de enzimas de un rango amplio que incluye a la MAGL, lo que resulta especialmente relevante al considerar la participación de esta enzima en la inactivación de otro eCB de gran importancia, el 2-AG (Dinh et al., 2002; Makara et al., 2005). Por otro lado, se encontró que el URB597 no interactúa con otros receptores, transportadores, canales iónicos, enzimas, e isoformas del citocromo P450 (a concentración 10 µM). Tampoco tiene efectos sobre las enzimas triacilglicerol (TGH) hidrolasa y lipasa (TGL), mientras que en esquemas experimentales *in vivo* inhibe significativamente la enzima FAAH, sin propiciar alteraciones en los niveles de triglicéridos en hígado de rata y tejido adiposo (Piomelli et al., 2006).

Tabla 2. Efectos del URB597 en la unión a receptores, canales iónicos, transportadores, y enzimas en ensayos *in vitro* (Piomelli et al., 2006).

Ensayo	Resultado
Receptores	
Adrenérgico: α_1 (no selectivo), α_2 (no selectivo), β_1 (h), β_2 (h)	NS
Benzodiazepinas: BZD (central), BZD (periférico)	NS
Cannabinoides: CB1 (h), CB2 (h)	NS
Dopaminérgicos: D ₁ (h), D _{2S} (h), D ₃ (h), D ₄ (h), D ₅ (h)	NS
GABAérgico (no selectivo)	NS
Factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas: CXCR ₂ (h), IL-8, TNF- α , CCR ₁ (h)	NS
Histamina: H ₁ (h), H ₂ (h)	NS
Melatonina; MT ₁	NS
Opiáceos δ (h) (DOP), κ (KOP), μ (h) (MOP) (sitio de agonista)	NS
Fenciclidina: PCP	NS
Serotonina: 5-HT _{1A} (h), 5-HT _{1B} , 5-HT _{2A} (h), 5-HT _{2C} (h), 5-HT ₃ (h), 5-HT _{5A} (h), 5-HT ₆ (h), 5-HT ₇ (h).	NS
Canales iónicos	
Canal de Ca ²⁺	NS
Canal de K ⁺ _v (dependiente de voltaje)	NS
Canal de Na ⁺ (sitio 2)	NS
Canal de Cl ⁻	NS
Transportadores	
Transportador de dopamina (h)	NS
Transportador de norepinefrina (h)	NS
Transportador de serotonina (h)	NS
Transportador de anandamida (células de astrocitoma humano)	NS
Enzimas	
COX-1 (h), COX-2 (h)	NS
Acetilcolinesterasa (h)	NS
MAGL (cerebro de rata)	NS
Actividad en enzimas del citocromo P450 humano	
Inhibición de CYP1A2	NS
Inhibición de CYP2C9	NS
Inhibición de CYP2C19	NS
Inhibición de CYP2D6	NS
Inhibición de CYP3A4	NS

6.4.5 Mecanismo de acción

El URB597 constituye un neuromodulador lipídico al promover la acumulación de este neurotransmisor en el SNC (Al Kury et al., 2014). La enzima FAAH, que fue identificada y reportada en 1985 (Schmid et al., 1985) y clonada en 1995 (Désarnaud et al., 1995; Hillard et al., 1995), es la principal responsable de la hidrólisis de la AEA en el interior de la célula. Recibió su denominación ya que un gran número de amidas de ácidos grasos actúan de manera efectiva como sus sustratos; de esta forma, la FAAH puede actuar como hidrolasa para etanolaminas de ácidos grasos como la AEA, amidas primarias (oleamida, ODA), o ésteres (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). El amplio perfil de los sustratos se debe a un inusual mecanismo de reciente descripción que muestra que los residuos de aminoácidos Lisina 142 y Serina 217 cooperan para activar al residuo Serina 241, que actúa como nucleófilo; la metodología basada en hibridación logró identificar las interacciones catalíticas en el sitio de acción, de las cuales derivará el diseño y desarrollo de inhibidores potentes en el futuro (Lodola et al., 2005).

La enzima FAAH se expresa en abundancia en el SNC en las estructuras que forman a los ganglios basales, el hipocampo y la corteza cerebral; se encuentra presente también, aunque en menor medida, en amígdala, en las regiones ventral y posterior del tálamo, en el núcleo cerebelar, y en las neuronas motoras de la médula espinal (Sugiura et al., 1995). En congruencia con el rol principal de la enzima que implica la degradación de AEA, muchas de las neuronas positivas a la FAAH se encuentran en la proximidad de las terminales nerviosas con receptores cannabinoides, en especial del CB1r; sin embargo, debe reconocerse la participación de la enzima en el catabolismo de muchos otros ácidos grasos no-cannabinoides, lo cual explicaría la presencia de la enzima en regiones con baja o nula presencia de receptores cannabinoides. La inhibición farmacológica de la actividad de la enzima FAAH, o la disrupción genética del gen *faah*, propicia un incremento significativo en los niveles de AEA, al igual que de otras etanolaminas de ácidos grasos, como la PEA y la oleiletanolamina (OEA) (Cravatt et al., 2001). Como se ha revisado, la inhibición de la enzima para

propiciar un aumento endógeno de los niveles de AEA tiene un potencial importante a nivel terapéutico, y se encuentra actualmente en su momento más próspero. Se han descrito algunos otros inhibidores de la FAAH, entre los que destacan compuestos tipo haloenol lactonas como el BTNP (Patente EUA 5,925,672 del 07/20/1999) (Hazen et al., 1991; Balsinde et al., 1995), sulfonilfluoruros como el palmitoilsulfonilfluoruro -denominado AM374- (Patente EUA 5,688,825 del 11/18/1997) (Alapafuja et al., 2012) y trifluorometilcetonas de ácidos grasos, fluorofosfatos, y algunos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES). Sin embargo, estas alternativas carecen de la selectividad o actividad biológica deseables en un compuesto de este tipo (Piomelli et al., 2006), mientras que las propiedades del URB597 sugieren una inhibición selectiva y de gran alcance terapéutico.

6.4.6 Efectos asociados al URB597

Una serie de estudios realizados en décadas pasadas sugieren que el URB597 emula efectos ansiolíticos, antidepresivos, y analgésicos. A la fecha contamos con un alto número de reportes que han asociado el uso de compuestos de naturaleza cannabinoide al favorecimiento de respuestas emocionales (Iversen, 2000); esto forma parte de un conglomerado de observaciones empíricas asociadas al consumo de *Cannabis*. Como se ha mencionado anteriormente, los CB1r están expresados abundantemente en estructuras como el núcleo basolateral de la amígdala el cual tiene un papel en la respuesta emocional, el control del ánimo y la ansiedad (Freund et al., 2003). A este respecto, los modelos experimentales *in vivo* involucrando diseños con animales y humanos sugieren que el bloqueo farmacológico o genético del CB1r evoca conductas similares a la ansiedad (Haller et al., 2004). Poniendo a prueba esta observación, un estudio demostró que el uso del URB597 en dosis de 0.1 mg/kg, i.p., generó efectos equiparables a los de un ansiolítico, mismos que fueron antagonizados por el rimonabant (Kathuria et al., 2003). Por otro lado, estos hallazgos sirvieron para considerar la posibilidad de que el bloqueo de la FAAH pudiera también favorecer la aparición de efectos similares a los detonados por antidepresivos. Para la medición de dicho efecto,

se utilizaron pruebas *in vivo* de rutina para la evaluación de agentes antidepresivos como la paroxetina; así, la administración de dosis desde 0.03 a 0.3 mg/kg, i.p., permitió concluir que el URB597 propició signos conductuales que resultan comparables con aquellos detonados por agentes antidepresivos clásicos; además, estos efectos fueron bloqueados por el antagonista de CB1r rimonabant. Por otro lado, una segunda observación de este trabajo relacionó un aumento dosis-dependiente de actividad de disparo de neuronas del núcleo dorsal de rafé con la administración de URB597 en esquemas agudos y subcrónicos, efecto que se inhibió con el uso de rimonabant. Adicionalmente, el URB597 ha demostrado ejercer efectos antinociceptivos moderados en estudios *in vivo* en la prueba de hot-plate; al igual que en las pruebas arriba mencionadas, los efectos ejercidos por el URB597 fueron prevenidos por el rimonabant (Kathuria et al., 2003). Más aún, se ha asociado la administración del URB597 a una potenciación en la analgesia en un modelo de shock, proceso mediado por la liberación de AEA (Hohmann et al., 2005). En conjunto, estas nociones dejan entrever el destacado perfil de acciones evocadas por el URB597, y que pudieran aprovecharse al aplicarse en diferentes escenarios experimentales. Además de presentar esta triada de acciones potencialmente benéficas, la administración sistémica de URB597 parece no detonar las respuestas farmacológicas producidas por cannabinoides exógenos como catalepsia, hipotermia, o hiperfagia. Más importante aún es la ausencia de efectos inducidos por este compuesto en modelos *in vivo* de abuso (Piomelli et al., 2006), con lo que el URB597 se postula como una clase novedosa de agentes que inhiben la desactivación de la AEA, al utilizar como blanco la actividad enzimática intracelular de la FAAH, propiciando los efectos arriba mencionados.

6.4.7 Perfil de seguridad

EL URB597 es un compuesto que en fechas recientes ha adquirido creciente importancia; subsecuentemente, ha comenzado a emerger información sobre estudios preclínicos que refieren evaluaciones de seguridad tras su uso. De acuerdo con una de estas publicaciones, estudios

comparativos -todavía en desarrollo- en monos *Cynomolgus* y ratas, basados en esquemas de hasta 28 días de dosis repetida, no han reportado toxicidad sistémica tras administraciones de dosis de hasta 1500 mg/kg en los monos, y 2000 mg/kg en las ratas. Asimismo, se llevaron a cabo una serie de evaluaciones terminales 7 días después en monos, y 28 días en ratas, incluyendo panel de química sanguínea y hematología, y necropsia, no encontrándose signos de toxicidad, a pesar de que las dosis utilizadas se encuentran muy por arriba de la necesaria para ejercer la inhibición de la FAAH. Con certeza, los próximos años serán clave para la generación de nuevos estudios para evaluar estos y otros marcadores de seguridad del URB597, que se sumarán al prometedor perfil mostrado por el compuesto.

6.5 Mecanismos de acción de los endocannabinoides

Hasta el momento, una serie de trabajos han descrito la variedad de mecanismos a través de los cuales actúan los cannabinoides. El concepto general de la participación del SEC revela un papel crítico de la señalización endocannabinoide en la regulación de la transmisión sináptica excitatoria, misma que tendría impacto en muchas funciones a nivel fisiológico, así como en la fisiopatología de muchas enfermedades del SNC. Sin embargo, la evidencia recolectada sugiere la intervención de algunos otros mecanismos todavía no descritos, o incluso, elementos del SEC no reconocidos a la fecha (como pudieran ser receptores adicionales a los descritos hasta ahora).

En el SNC, los NMDAr permiten la entrada de Ca^{2+} a la estructura postsináptica, con lo cual están asociados a diversas funciones: plasticidad sináptica, consolidación de la memoria, aprendizaje, y cognición. La disfunción del NMDAr, principalmente en áreas corticales, podría causar alteraciones en los procesos mencionados previamente, con una manifestación clínica similar a aquella presente en la esquizofrenia (Sánchez-Blázquez et al., 2014). De esta forma, se establece que el SEC, principalmente a través del CB1r, mantiene un rol inverso a la función glutamatérgica vía NMDAr

mediante la reducción de la liberación de glutamato hacia el espacio sináptico, o la inhibición de los receptores cannabinoides a nivel postsináptico cuya vía de señalización pudiera interferir con dichos NMDAr; adicionalmente, algunos trabajos plantean también la prevención en el incremento de Ca^{2+} endógeno a través de la inhibición directa del canal de los NMDAr (Zhuang et al., 2005; Li et al., 2010). Por lo tanto, a la actividad que los CB1r tienen sobre la función de los NMDAr subyacen efectos tanto neuroprotectores como neurotóxicos; en consideración al reclutamiento de CB1r bajo demanda de la señal de NMDAr, la regulación adecuada de esta señalización dependerá entonces del equilibrio de ambas actividades y la desregulación conllevaría una hipofunción persistente de los NMDAr y sus funciones derivadas.

Se ha demostrado que el SEC lleva a cabo un control cardinal de la actividad de los NMDAr; así, el CB1r se constituye como un regulador fisiológico negativo al prevenir la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos y proteger a las neuronas y células gliales contra el daño excitotóxico. La sobreactivación de los NMDAr genera un exceso en el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la neurona y una subsecuente liberación de Ca^{2+} de organelos celulares internos (retículo endoplásmico o mitocondria); paralelamente, se incrementa la actividad de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) y el óxido nítrico (ON) reacciona en consecuencia con superóxidos para formar una serie de agentes oxidantes como el peroxinitrito (ONOO^-), y especies reactivas de oxígeno (ERO). Lo anterior constituye una señal oxidante y nitrosativa que favorece la liberación de zinc, que a su vez contribuye al microambiente tóxico al facilitar el desencadenamiento de cascadas apoptóticas. A este respecto, algunos trabajos han explorado el rol del catión Zn^{2+} en la señalización a nivel intra y extracelular. De acuerdo a la literatura, la homeostasis del Zn^{2+} sería especialmente sensible al daño oxidativo, con lo que esta condición se adicionaría a condiciones ya pro-oxidantes, actuando entonces como potenciador del daño y generando más neurotoxicidad. Adicional a su papel en este escenario, el entendimiento de la importancia neurofisiológica del catión Zn^{2+} es clara, y seguirán estudiándose las rutas asociadas a su función en enfermedades

neurológicas con un componente de neurotoxicidad (Knott y Bossy-Wetzel, 2009; Sensi et al., 2009).

Se ha establecido (Sánchez-Blázquez et al., 2014) que el SEC es un mediador de la actividad de los NMDAr que reduce el flujo de entrada de Ca^{2+} , y la liberación subsecuente de Ca^{2+} y Zn^{2+} de almacenes intracelulares. En lugar de estimular la depuración de calcio o su redireccionamiento al espacio extracelular, los cannabinoides controlan la actividad de los NMDAr activados actuando a través del canal de calcio, lo que ocurre a través de la unión postsináptica del CB1r y el NMDAr; este mecanismo es, sin embargo, altamente sensible, y se regularía dependiendo del escenario. La asociación de ambos receptores requiere la interacción directa del CB1r sobre el NMDAr para reducir su actividad; para restringir adecuadamente la permeabilidad al Ca^{2+} , el reclutamiento del SEC tendría que alcanzarse en un tiempo corto, o de lo contrario, la respuesta moduladora no se lograría. Lo anterior resulta de particular relevancia al considerar que la función de los NMDAr requiere de la actividad de PKA vía Ca^{2+} -CaM/adenil ciclasa/cAMP, lo que genera una acción inhibitoria de los CB1r sobre la función NMDAr (Sánchez-Blázquez et al., 2013, 2014).

Los cannabinoides que modulan la función de los NMDAr promueven la internalización y eventual reciclaje del CB1r para reducir la estabilidad del receptor glutamatérgico a través de la co-internalización de subunidades NR1 del NMDAr, lo que propicia un desensamblaje de dicho receptor y su consecuente disfunción (Garzón et al., 2009; Sánchez-Blázquez et al., 2013). La asociación CB1r-NR1 en la membrana celular es dependiente de la proteína de histidina de unión a nucleótidos 1 (HINT1), de tal manera que el receptor CB1 activado es co-internalizado con HINT1 y la subunidad NR1. La proteína HINT1 se localiza principalmente a nivel nuclear; está asociada a la hidrólisis de nucleótidos, a la estabilización de complejos actuando como proteína de andamiaje y la modulación de la degradación proteosomal de diferentes proteínas. A nivel intracelular, se mantiene únicamente el vínculo entre CB1-HINT1, mismo que se recicla y regresa a la membrana celular para asociarse nuevamente con otras subunidades NR1; así, la subunidad NR1 es degradada

vía proteosomal. La proteína HINT1 es crítica para esta regulación, y en su ausencia, el CB1r no puede establecer una relación funcional con la subunidad NR1 del NMDAr, por lo que el estímulo cannabinoide no es suficiente para reducir la sobreactivación glutamatérgica. La unión del CB1r a HINT1 se hace mediante la proteína RGSZ2, un regulador de la señalización a proteínas G, que a su vez se une a la NOS neuronal, y controla la producción de ON vía activación de CB1r (Marsicano et al., 2002). El estímulo por agonistas cannabinoide activa una gran cantidad de receptores, que generan la respuesta antes mencionada y causan inestabilidad y disrupción de muchos NMDAr (Sánchez-Blázquez et al., 2014). Sin embargo, reforzando el concepto inicial, la adecuada regulación de los NMDAr tiene un límite fisiológico, de manera que el estímulo que propicie una disminución persistente de los NMDAr en la superficie celular resultará en la hipofunción glutamatérgica. Como es evidente, la regulación que el SEC ejerce sobre los NMDAr es de gran importancia, ya que su activación constante produce alteraciones moleculares y celulares que convergen en el desarrollo de un rango significativo de enfermedades, entre las que destacan las neurodegenerativas.

La cadena de eventos descritos anteriormente constituye uno de los mecanismos más sofisticados del SEC sobre la actividad glutamatérgica. Sin embargo, muchos otros blancos y mecanismos de acción de cannabinoide están siendo estudiados. El receptor activado por proliferación peroxisomal (peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs) es una subfamilia de receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción activados por ligandos. Actualmente se reconocen tres isotipos: PPAR α , PPAR β , y PPAR γ , mismos que se heterodimerizan con el receptor X retinoide (RXR) y se unen a secuencias específicas de ADN denominadas “elementos de respuesta PPAR”, que a su vez conducen a la transcripción de genes tras su activación. La unión de ligandos a los PPAR genera el reclutamiento de proteínas reguladoras, que a su vez se unen a un tercer sitio en los receptores, y que en última instancia modularán la transactivación. Todos se encuentran codificados en distintos genes, y se asocian a funciones relacionadas esencialmente a la homeostasis energética,

al catabolismo de ácidos grasos, a procesos inflamatorios, y a diferenciación celular (Bishop-Bailey, 2000; Ferre, 2004; Glass, 2006; Dionisi et al., 2012). De acuerdo con la literatura, las tres isoformas de los receptores se expresan en el cerebro, y pudieran estar involucradas en diferentes funciones dependiendo de su distribución en los distintos tejidos cerebrales (Cimini et al., 2005; Lenman y Fowler, 2007). Algunos de los ligandos endógenos de estos receptores son ácidos grasos y sus metabolitos. Dada esta condición, se ha establecido que una gran variedad de cannabinoides es capaz de unirse y activar estos receptores nucleares; de hecho, algunos eCBs prominentes como la AEA y la virodamina actuarían como activadores naturales de los PPAR α ; asimismo, la AEA y el 2-AG activarían a los PPAR γ , y aparentemente esta unión sería en parte responsable de sus propiedades anti-inflamatorias (O'Sullivan, 2007). Evidencia creciente demuestra una relación estrecha entre los cannabinoides y los diferentes isotipos de PPAR; en todos ellos se establecen mecanismos de acción independientes que hoy están solo parcialmente descritos.

Por otro lado, el concepto de señalización plasmática de los CBr cambió drásticamente en fechas recientes. A inicios de esta década, se demostró la presencia del CB1r en la membrana mitocondrial de neuronas de ratón (mtCB1r), donde ejerce funciones críticas, tales como el control en la respiración celular y la regulación en la producción de energía; más aún, la activación de los receptores mitocondriales incidiría repetidamente sobre la actividad de los eCBs, lo que sugiere que la actividad de los mtCB1r en la fisiología cerebral es regida por nuevos mecanismos moleculares (Bénard et al., 2012). Según la literatura, la activación de los mtCB1r es requerida para la disminución en la transmisión sináptica glutamatérgica dependiente de cannabinoides, lo cual transforma radicalmente el alcance del SEC y su participación a nivel fisiológico. La activación de mtCB1r modifica los niveles de Ca²⁺, ERO e incluso del adenosín trifosfato (ATP). La información disponible hasta este momento permite ver que la activación de los mtCB1r está involucrada en muchos procesos, mismos que convergen en funciones mitocondriales clave para la función energética cerebral (Bénard et al., 2012; Fišar et al., 2014; Djeungoue-Petga y Hebert-Chatelain,

2017). Mayor entendimiento de la fisiología de los mtCB1r será indispensable para dimensionar su impacto en condiciones fisiológicas, y comorbilidades entre patologías cerebrales y cardiometabólicas.

El escenario de los procesos en los que participan los CBr, y por tanto los mecanismos de acción subyacentes, está en constante actualización. Así, al estar constituido primordialmente por moléculas de señalización lipídica, el SEC estará modulando un sinnúmero de procesos en varios niveles, y con moléculas distintas, para evocar diversas respuestas celulares. A este respecto, las cadenas largas de amidas de ácidos grasos han emergido en fechas recientes como moléculas de señalización de interés; en una primera etapa, la AEA fue el blanco más relevante de estudio; sin embargo, muchos otros como la oleamida (ODA) ha empezado a ganar reconocimiento. La ODA es otro ligando endógeno de los CB1r y CB2r asociado a importantes roles en procesos de sueño, memoria, termorregulación, y locomoción (Basile et al., 1999; Huitron-Resendiz et al., 2001; Murillo-Rodríguez et al., 2001). A pesar de que no se ha identificado un receptor específico para la ODA, se ha reportado recientemente para este cannabinoide un mecanismo de acción celular. De acuerdo con este trabajo, la ODA inhibe la comunicación de las uniones gap, mejor conocidas como gap junctions, que son canales proteicos que se forman entre células adyacentes y permiten el acoplamiento eléctrico y el intercambio de moléculas pequeñas (Bernstein y Morley, 2006). De acuerdo con algunos reportes, el aumento en la producción de ODA está acompañado del cierre de estas uniones gap. La ODA tiene además un efecto sobre la mitocondria al aumentar la liberación de citocromo *c* y otros factores apoptóticos vía conexina 43 (Cx43), una proteína de unión gap, con lo que se acelera la muerte celular (Mueller y Driscoll, 2009). Lo anterior se ha establecido en diferentes modelos celulares: en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (SiuYu Leung et al., 2001), en neuronas motoras (Coleman y Sengelaub, 2002), en preparaciones organotípicas de células del giro dentado (Boitano y Evans, 2000), y en células endoteliales (Nagasawa et al., 2006). Sin embargo, se desconoce aún si este efecto es regulado por receptores específicos de la ODA, o a

través de interacciones alostéricas con estas proteínas de unión. Las uniones gap promueven la sobrevivencia celular a través de la creación de un sincitio químico y eléctrico, mismo que participa en la liberación de diversos nutrientes y factores de crecimiento, la remoción de metabolitos en exceso, y el amortiguamiento de moléculas potencialmente tóxicas. Asimismo, se ha propuesto que la ODA puede actuar como un mensajero intracelular capaz de vincular el papel metabólico mitocondrial con la comunicación entre las uniones gap, de manera que el esclarecimiento de los mecanismos detrás de los efectos ejercidos por la ODA sobre las uniones gap resulta de gran importancia para este y muchos otros eCBs a nivel fisiológico.

Más recientemente, un estudio próximo a ser publicado expone un interesante mecanismo que involucra a los receptores para somatostatina 2 y 5 (SSTr2 y SSTr5). El factor inhibitor de la liberación de somatotropina, o SST, es un péptido inhibitor de la hormona de crecimiento que suprime el crecimiento celular; el SST actúa como neurotransmisor y neuromodulador. Está involucrado en funciones neuronales de gran importancia que se traslapan con aquellas de los CB1r: procesos cognitivos, sensoriales, o locomotores (Kumar y Grant, 2010). La evidencia que vincula este sistema a la neurodegeneración es clara: en el pasado se encontró que una subclase de interneuronas no-espinosas medianas que expresan SST, neuropéptido Y (NPY), y nNOS, son selectivamente preservadas en el proceso inicial de neurodegeneración en la EH, y el nivel de expresión de SST aumenta en los ganglios basales (Aronin et al., 1983; Ferrante et al., 1985). Adicional a lo anterior, en años pasados se demostró la co-localización de los CB1r y SST en hipocampo e hipotálamo de rata; posteriormente, el mismo equipo expuso la interacción funcional del CB1r y el SSTr5 para constituirse como heterodímeros capaces de disociarse tras la activación los receptores. Sin embargo, este mecanismo de susceptibilidad neuronal selectiva es todavía desconocido. A este respecto, se ha propuesto una disrupción en la expresión de SST como una alteración que converge con las muchas otras abordadas en este trabajo, y que en consecuencia está asociada a la patogénesis de la EH. De acuerdo con las observaciones de los autores, la activación

independiente de los receptores protege a las células contra daño excitotóxico inducido por ácido quinolínico (QUIN). Por su parte, la co-activación de los SST2r, SST5r, y el CB1r inhibe estos efectos protectores, resulta en la fosforilación tardía de ERK1/2, y en una composición alterada del complejo de receptores. Lo anterior representa la primera evidencia del papel protector del SSTR, y por tanto, el posible lenguaje entrecruzado entre estos dos receptores en la modulación de la excitotoxicidad en enfermedades neurodegenerativas (Zou y Kumar, n.d.).

La Figura 4 muestra un resumen gráfico que engloba los mecanismos de acción descritos anteriormente. De esta forma, la química cannabinoide en el cerebro ofrece todavía un gran terreno de estudio sobre la participación de los PPAR, los mtCB1r, los SSTR, y las uniones gap en la fisiología mediada por estos receptores, y muchas preguntas se mantienen sin respuesta a la fecha; por lo tanto, aunque el enfoque de este trabajo se centró inicialmente en el estudio del mecanismo postsináptico, no se descarta la participación de los PPAR y los CB1r, así como otros posibles ejecutores, en los resultados presentados.

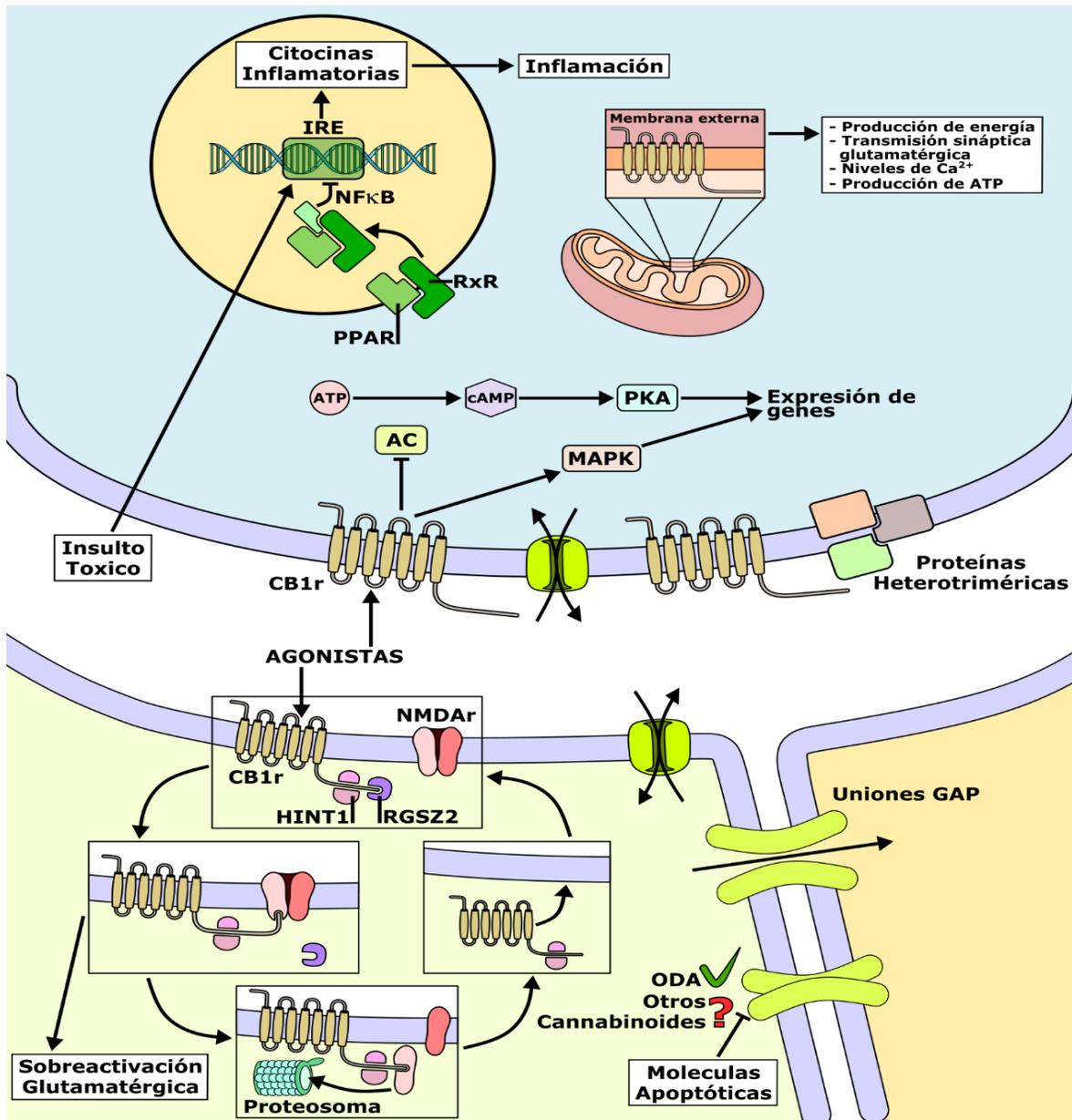


Figura 4. Mecanismos de acción de los eCBs. Se representan a los receptores cannabinoides 1 (CB1r) y su posible mecanismo de acción (1) a nivel nuclear con los receptores PPAR, (2) en la membrana externa mitocondrial para posiblemente intervenir en la regulación de diferentes funciones energéticas, (3) en su asociación con los receptores NMDA (NMDAr) para la modulación de la sobreactivación glutamatérgica, y (4) su posible influencia sobre el cierre de uniones gap. Inkscape, 2017.

6.6 Excitotoxicidad y el modelo de ácido quinolínico

Como ya se sugirió, una evaluación apropiada del papel que desempeñan los elementos del SEC en el inicio y desarrollo de una enfermedad tan compleja como la EH requiere del uso de modelos experimentales de estudio que permitan cuantificar los efectos producidos por una determinada terapia experimental a la escala pertinente (molecular, celular, tisular, etc.). Por lo tanto, la selección del paradigma correcto resulta primordial para estimar adecuadamente el potencial de las estrategias empleadas y la elaboración de diseños experimentales a futuro. Para el caso específico de la EH, existen disponibles una gran variedad de modelos genéticos: roedores con insertos transgénicos de la mutación humana, expansiones del gen codificante de la HTT, o vectores virales generados para la expresión de la proteína mutada (Lelos y Dunnet, 2018). Los anteriores son ejemplos de modelos que, si bien han probado arrojar información valiosa relacionada con los procesos moleculares y celulares asociados a la mutación, no logran replicar la intensa degeneración en los ganglios basales, misma que constituye una característica distintiva de la enfermedad.

El ácido 2,3-piridin-dicarboxílico, denominado comúnmente como QUIN, es una molécula endógena sintetizada en la Vía de la Kinurenina (VK), una ruta vinculada a la catálisis del triptófano (Trp) en nicotina adenina dinucleótido (NAD^+) en mamíferos. Además de la degradación de este aminoácido esencial, esta vía favorece la formación de dos metabolitos neuroactivos: el ácido kinurénico (KYNA), que actúa como antagonista endógeno de los NMDAr y el QUIN, un agonista endógeno de los NMDAr. En condiciones normales, el QUIN es producido transitoriamente como metabolito del aminoácido esencial y es detectable en concentraciones nanomolares en tejido cerebral humano y de rata (Chen et al., 2009) y, en concentraciones micromolares en líquido cefalorraquídeo (Schwarcz y Pellicari, 2002). El aporte de Trp en mamíferos se obtiene principalmente de la dieta, y es catabolizado por la VK. Adicionalmente, la VK está asociada a la formación de otros metabolitos con actividad redox, entre los que destacan la 3-hidroxicinurenina (3-HK), un compuesto de carácter pro-oxidante, que inversamente ha exhibido

actividad tipo scavenger (Backaus et al., 2008). El desarrollo de la vía puede verse alterado por distintas condiciones patológicas que resultarán en su estimulación, y en consecuencia, en el aumento en la producción de QUIN y 3-HK. Como evidencia de lo anterior, se han observado niveles alterados de la VK en una serie de desórdenes inflamatorios del SNC, que cuentan con el componente de sobreactivación de los NMDAr (Schwarcz et al., 2010; Pérez-De La Cruz et al., 2012). Las concentraciones más bajas que se han asociado a la inducción de muerte neuronal por mecanismos excitotóxicos se encuentran en el orden submicromolar (Schwarcz et al., 2010). De esta manera, condiciones patológicas (como el aumento de la inflamación) que favorezcan el aumento en la concentración de este metabolito serán la antesala de un patrón neurotóxico derivado de las propiedades excitotóxicas y pro-oxidantes del QUIN, así como estímulos inflamatorios; esto último incrementa aún más sus niveles, y justifica alteraciones en la respuesta inflamatoria en distintos desórdenes del SNC (Chiarugi et al., 2000).

El QUIN detona una serie de eventos neurotóxicos de gran complejidad, y con la participación de muchos mecanismos distintos; lo anterior se expresa en la Figura 5. Inicialmente, el QUIN ejerce una excitación excesiva sobre los NMDAr y recluta Ca^{2+} citoplásmico en concentraciones por arriba del límite funcional; entonces, se generan importantes eventos dañinos, tales como la disfunción mitocondrial iniciada por la activación de enzimas proteo- y lipolíticas, la consecuente disminución en los niveles de ATP y la liberación de citocromo *c*. Además, este escenario se relaciona con la pérdida eventual de neuronas GABAérgicas y colinérgicas (Pérez-De La Cruz et al., 2007). El QUIN promueve la formación de ERO y ERN y las implicaciones de este último evento se enfatizan tras considerar la susceptibilidad de este tejido al ataque por especies reactivas derivadas de un sistema de defensa disfuncional, mismo que contrasta con la alta dependencia del metabolismo redox del SNC (Pérez-De La Cruz et al., 2012). Lo anterior se suma a la alta demanda de oxígeno requerida para el funcionamiento del cerebro y al elevado contenido de cadenas de ácidos grasos poli-insaturados en las membranas celulares cerebrales. En su conjunto, estos

procesos conducen finalmente a la muerte celular por apoptosis y/o necrosis. La exposición a QUIN, en particular en la corteza cerebral o el estriado de roedores, conduce a la muerte neuronal por mecanismos excitotóxicos (McLin et al., 2006).

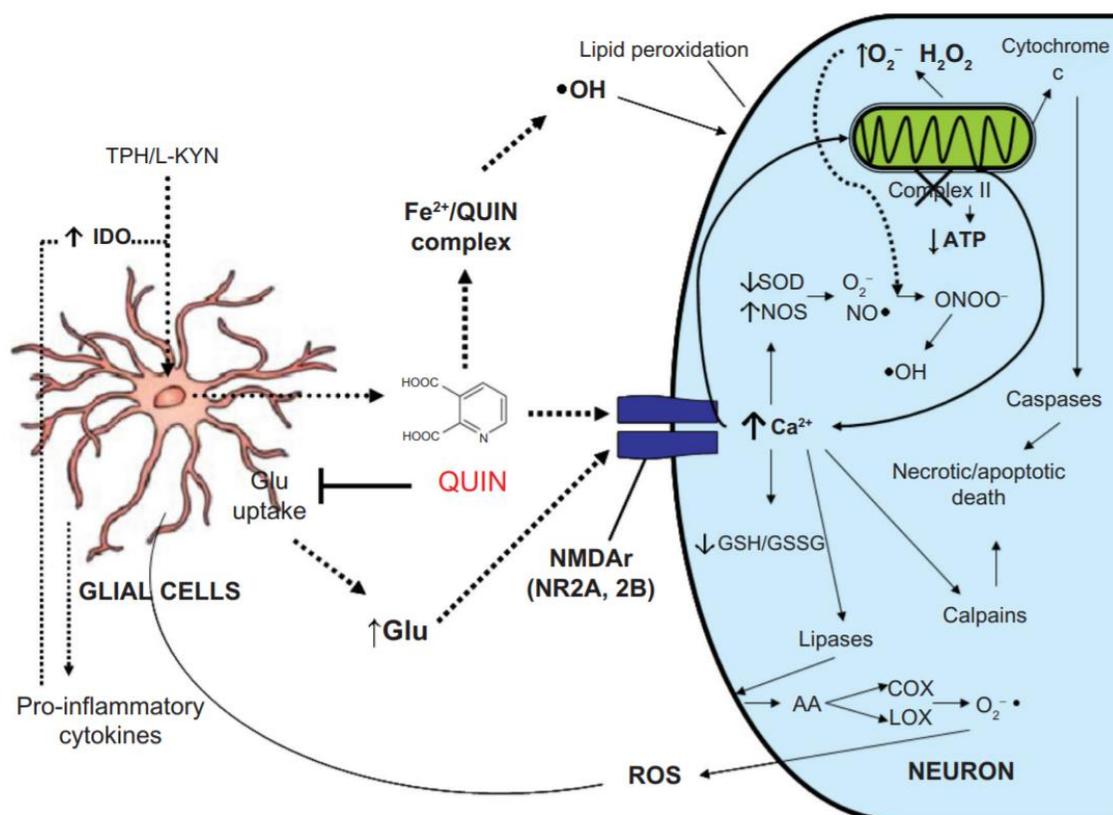


Figura 5. Representación esquemática de los mecanismos de toxicidad clásicos ejercidos por el ácido quinolínico (QUIN) en el Sistema Nervioso Central. Los altos niveles de QUIN a nivel extracelular se alcanzan tras la activación glial inducida por estímulos inflamatorios. El QUIN estimulará al NMDAr, y junto con el glutamato, inducirán eventos excitotóxicos que dirigen al aumento en la señalización intracelular de Ca^{2+} , y al reclutamiento del mismo de depósitos en organelos. El QUIN puede actuar también directamente con iones Fe^{2+} libres para formar complejos que exacerbaban la formación de ERO y ERN a través de la reacción de Fenton, estrés oxidativo y excitotoxicidad. Estas señales alcanzarán a su vez a células adyacentes (neuronales, y gliales), lo que perpetúa el daño celular. Tomado de International Journal of Tryptophan Research 2012:5 1-8 (Pérez-De La Cruz et al., 2012).

Las respuestas tóxicas inducidas por el QUIN no están limitadas a las neuronas, ya que afectan también a los astrocitos y otras células gliales, lo cual ratifica la importancia de definir aquellos desórdenes que se desarrollan bajo estas mismas condiciones (Guillemin et al., 2005; Pérez-De La Cruz et al., 2012; Lugo-Huitrón et al., 2013). Estudios previos han demostrado que, además, el QUIN forma complejos con el Fe (II) para formar ERO, especialmente radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), principal responsable del rompimiento de cadenas de ADN y el daño oxidante a lípidos (Platenik et al., 2001). El exceso de radicales libres se asocia, desde hace varias décadas, al aumento en la liberación de glutamato (Pellegrini-Giampietro et al., 1988); por lo tanto, estos mecanismos se suman al patrón de daño ejercido por el QUIN de manera independiente a la sobre-estimulación de los NMDAr, y de presentarse simultáneamente, participarán en la potenciación del daño excitotóxico. Con fundamento en el concepto de excitotoxicidad como un evento dañino asociado al aumento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} generadas en respuesta a la exposición persistente a aminoácidos excitatorios o agonistas para estos mismos receptores, se ha descrito la aplicación del QUIN, mismo que se ha consolidado como agente excitotóxico y modelo neurodegenerativo. De hecho, condiciones experimentales basadas en el uso de QUIN exhiben patrones de degeneración neuronal similar a la observada en la EH (Schwarcz et al., 1983). El uso recurrente del QUIN como herramienta de daño excitotóxico ha arrojado valiosas observaciones con relación a sus efectos en modelos experimentales. Modelos *in vivo* han demostrado que la exposición a QUIN propicia la depleción en la actividad de la enzima superóxido dismutasa cobre/zinc (CuZn-SOD)-dependiente, una desregulación en el balance redox al alterar la tasa glutatión reducido:glutatión oxidado (GSH:GSSG) (Rodríguez-Martínez et al., 2000a), y la formación de ONOO^- , el producto de la reacción biológica del superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) con el ON, y que actúa como un potente oxidante (Pérez-De La Cruz et al., 2005).

La evidencia revisada sobre este tema es abundante y define el aporte del QUIN como herramienta excitotóxica en modelos experimentales, especialmente al inducir un cuadro de daño estriatal severo

que permite replicar algunas de las características de la EH. De esta forma, la relevancia adquirida por el QUIN como herramienta toxicológica es retomada en este trabajo, pues representa el paradigma ideal para el estudio sobre el papel del SEC en el contexto de la EH.

Por lo tanto, en este proyecto se explora el efecto de la inhibición de la FAAH inducida por el URB597, que propiciará un aumento en los niveles endógenos de anandamida, sobre el daño excitotóxico generado en un modelo experimental de EH en ratas.

7. JUSTIFICACIÓN

La modulación de algunos elementos del SEC constituye una diana terapéutica de interés y potencial aplicación como tratamiento en la EH; esto se enfatiza por la falta, hasta la fecha, de una terapia eficiente que sea capaz de paliar los síntomas motores y cognitivos, a la vez que atienda la raíz de esta patología. Una terapia experimental de este tipo considera los cambios que tienen lugar en la señalización del SEC durante la progresión de la enfermedad, y la respuesta farmacológica generada como resultado de la activación de sus receptores. A través de una terapia eficaz de este tipo, sería posible aliviar síntomas específicos y retrasar el inicio de la degeneración neuronal en el cuerpo estriado; o bien, reducir los efectos degenerativos sobre los cuerpos neuronales gracias a las propiedades neuroprotectoras de los agentes a emplear. Por lo tanto, este proyecto evalúa las propiedades neuroprotectoras del compuesto URB597 como propuesta de tratamiento para las alteraciones observadas en el modelo de la EH. Debido a su naturaleza y alcances, un trabajo preclínico como éste proporcionará información mecanística esencial del papel del SEC en procesos neurodegenerativos, y sustentará la viabilidad de la modulación endocannabinoide como estrategia terapéutica. El presente trabajo sienta los fundamentos para continuar elucidando las bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares que explican los sucesos que tienen lugar en el desarrollo de la EH y por lo tanto, brindará conocimiento básico para desarrollar estrategias que combinen elementos preventivos y esquemas de tratamiento que contemplen amplios espectros de protección vinculados al SEC.

8. HIPÓTESIS

La modulación del sistema endocannabinoide (SEC), a través del efecto inhibitor de la FAAH desplegado por el URB597, promoverá neuroprotección contra la toxicidad inducida por el ácido quinolínico (QUIN), en un modelo animal de la enfermedad de Huntington (EH).

9. OBJETIVOS

9.1 Objetivo General

Evaluar el impacto del URB597 como agente promotor de neuroprotección en un modelo excitotóxico de la EH en ratas generado por la toxicidad del QUIN.

9.2 Objetivos específicos

En animales lesionados estriatalmente con QUIN y/o expuestos previamente a los compuestos cannabinoide:

- 1.- Determinar los efectos de la terapia cannabinoide propuesta en la función motora.
- 2.- Evaluar los posibles efectos preventivos y protectores del URB597 sobre las alteraciones morfológicas.
- 3.- Evaluar los posibles efectos protectores delURB597 ante el daño oxidativo a lípidos y proteínas.
- 4.- Confirmar las posibles asociaciones NR1-CB1 como mecanismo de neuroprotección de la terapia cannabinoide.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron elegidos con grado analítico. El URB597 fue adquirido de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, EUA). La apomorfina, el QUIN, y el ácido tiobarbitúrico (TBA) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Los anticuerpos anti-GAD65 (monoclonal) y anti-proteína asociada a microtúbulos 2 (anti-MAP-2) (policlonal) fueron también comprados a Sigma Chemical Co. Los anticuerpos policlonales anti-NMDAR1 (NR1) y anti-CB1 fueron comprados a Abcam (Cambridge, UK). Todas las soluciones requeridas para el desarrollo de los experimentos fueron preparadas utilizando agua desionizada de un sistema Milli-RQ (Millipore, MA). El resto de los reactivos fue adquirido de otras fuentes comerciales conocidas.

10.2 Animales

A lo largo del estudio se utilizaron ratas macho de la especie Wistar (*Ratus norvegicus*) adultas en un rango de peso entre 280 y 320 gramos de peso (N=72). Todos los animales fueron obtenidos del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), México. Las ratas fueron distribuidas en grupos de seis por cada caja, y fueron alimentados con una dieta estándar comercial (Rodent Chow, St. Louis, MO) y agua *ad libitum*. Adicionalmente, los animales fueron sincronizados con ciclos 12:12 de luz-oscuridad, bajo condiciones estándar de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), y 50% de humedad relativa. Todos los procedimientos que requirieron el uso de animales fueron estrictamente desarrollados para cumplir con los lineamientos locales para el uso y cuidado de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-2001), y las “Guías para el Uso de Animales en la Investigación en Neurociencias” de la Sociedad de Neurociencias. Todos los experimentos realizados fueron aprobados oportunamente por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se hicieron todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento animal durante los experimentos.

10.3 Diseño experimental e infusión de reactivos

Este estudio comprendió cuatro grupos experimentales (n=4-6 por grupo, lotes independientes por cada prueba). Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a uno de estos grupos: a) Grupo Sham (administración de vehículo intraperitoneal compuesto por 5% de Tween 80 + 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) 50 mM + 85% de solución salina, administrado en los días 1 a 7, más administración unilateral intraestriatal de solución salina (1 μ L) en el día 4, 1 hora después de la administración de vehículo); b) Grupo QUIN (administración de vehículo intraperitoneal en los días 1 a 6, y administración unilateral intraestriatal de QUIN (1 μ L, 240 nmol/ μ L) en el día 4, 1 hora después de la administración de vehículo); c) Grupo URB597 (administración intraperitoneal de solución de 0.3 mg/kg de URB597 + 0.5 ml de vehículo en los días 1 a 7, y administración unilateral intraestriatal de solución salina (1 μ L) en el día 4, 1 hora después de la administración de vehículo). Las dosis y esquemas de administración de QUIN y URB597 fueron elegidos con base en reportes previos (Colín-González et al., 2013; Escamilla-Ramírez et al., 2017; Maya-López et al., 2017b). El URB597 fue administrado antes, durante y después de la infusión de QUIN (y el resto de los grupos experimentales) para crear un escenario protector alrededor de la lesión estriatal. Los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados en tres tiempos distintos, dependiendo de la naturaleza de la prueba a la que fueron asignados: 8 días post-cirugía para los ensayos histológicos y de inmunofluorescencia (para determinar la degeneración estriatal), 24 horas post-cirugía para los ensayos bioquímicos (para conferir el rol causal del estrés oxidativo en la consecuente degeneración celular), y 1.5 horas post-cirugía para ensayos de inmunofluorescencia adicionales (para evaluar la regulación de distintas proteínas y su localización como componente elementos del mecanismo tóxico o preventivo). Por lo tanto, los experimentos fueron llevados a cabo en tiempos cortos o largos para determinar en primera instancia la degeneración tisular y/o preservación (8 días postcirugía), y luego la naturaleza causal de dichos eventos (24 y 1.5 horas postcirugía).

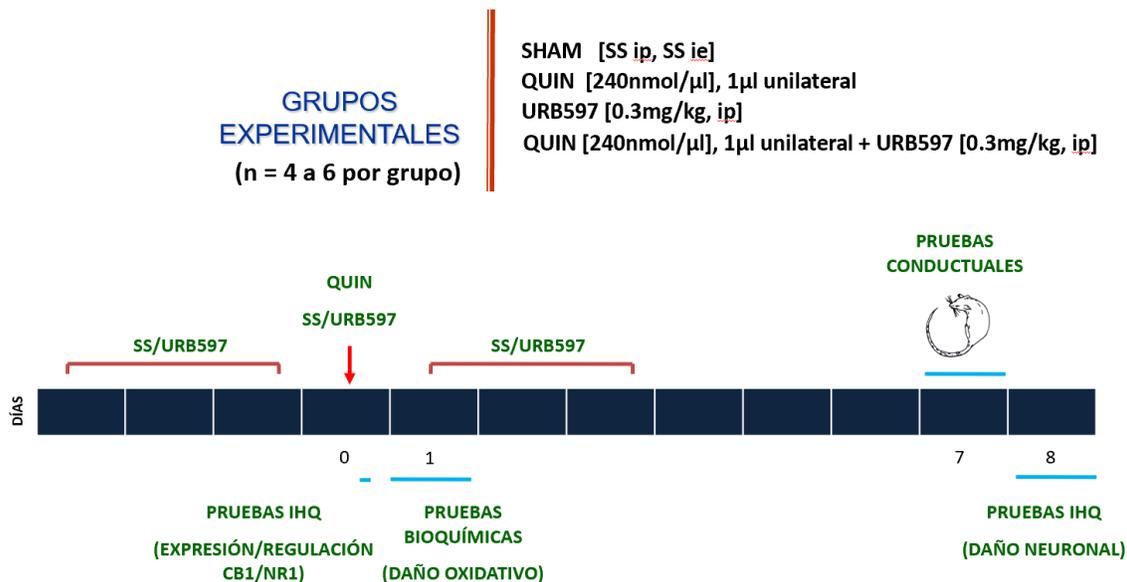


Figura 6. Diseño experimental e infusión de reactivos. (García, et al, 2011; Valdeolivas, et al, 2014; Scotter, et al, 2010; Al Kury, 2014; Slusar, et al, 2013; Hakimizadeh, 2012; Khasabova, 2013; Chiarlone, et al, 2014).

10.4 Cirugía estereotáxica

Previo a los procedimientos quirúrgicos, las ratas fueron anestesiadas (0.2 U por 250 g de pentobarbital sódico, i.p.) y colocadas en el aparato estereotáxico (Stoelting Co., IL). Utilizando un atlas de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1998), el vehículo o la toxina fueron inyectados en el estriado derecho a una tasa de 0.5 μ L/1 min, utilizando una microjeringa Hamilton de 10 μ L, a las siguientes coordenadas: AP: +0.5 mm, L: -2.6 mm, DV: -4.5 mm. Posterior a la infusión, la aguja se mantuvo en el lugar de administración por 2 minutos antes de retirarla. Después de la cirugía, los animales se colocaron individualmente en cajas limpias hasta su recuperación completa.

10.5 Prueba de conducta de rotación

Las ratas lesionadas fueron evaluadas con la prueba de conducta de giro después de 5 minutos de recibir hidrocloreuro de apomorfina (1 mg/kg), por 60 minutos, en el día 7 después de la cirugía. Esta prueba permite evaluar el grado de alteraciones motoras derivadas de la degeneración del tejido estriatal. Como es sabido, posterior a la inyección unilateral intraestriatal de QUIN, los animales exhiben una conducta de rotación en respuesta a la apomorfina dada su naturaleza como agonista dopaminérgico. Este método se basa en que la degeneración estriatal compromete la transmisión de DA, que ejerce una influencia tónica en las neuronas estriatales; por lo tanto, los compuestos químicos que alteren la transmisión dopaminérgica también modularán la actividad locomotora (Borlongan et al., 1995). El número de rotaciones ipsilaterales al hemisferio lesionado fueron contados y comparados entre grupos. No se observaron rotaciones contralaterales al hemisferio lesionado en los animales en este estudio.

10.6 Evaluación histológica

Se realizó el procedimiento de perfusión intracardiaca en el día 8 post-cirugía con paraformaldehído al 4%. Los cerebros completos de los animales fueron colectados y embebidos en parafina para la obtención de secciones coronales (5 µm de espesor) con un microtomo Leica RM2255 (Leica Geosystems AD, St Gallen, Suiza). Las secciones fueron fijadas, desparafinadas, y rehidratadas. Posteriormente, se utilizó la tinción de Hematoxilina-Eosina para el análisis histológico del estriado. Se obtuvieron imágenes digitales (40x) con un microscopio Nikon ECLIPSE E200 (DiaMedical USA, West Bloomfield, MI) utilizando el software Q-capture Pro 7. Además, la tasa de daño celular fue calculada a través del conteo del número de núcleos celulares dañados vs. el número total de células por campo, por triplicado.

10.7 Ensayo de inmunofluorescencia para la MAP-2, GAD, y localización de CB1 y NR1 en el estriado

Se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en secciones coronales de tejido cerebral a nivel estriatal (área dorsal) con los bloques de parafina obtenidos de ratas de todos los grupos experimentales. Todas las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios para la identificación y localización de CB1 (Abcam ab3558), NR1 (Abcam ab17345), MAP-2 (Sigma M3696) y GAD (Sigma SAB4200232). Para CB1 y NR1, los cerebros fueron procesados 1.5 horas post-cirugía para identificar cambios tempranos en la expresión de estas proteínas; en contraste, la tinción con MAP-2 y GAD se llevó a cabo en secciones obtenidas de cerebro de rata 8 días post-cirugía para evidenciar la pérdida neuronal. Las secciones cerebrales fueron desparafinadas y rehidratadas con soluciones de concentración decreciente de alcohol. Los antígenos fueron desenmascarados con buffer de citratos (0.1 M ácido cítrico monohidratado/ 0.1 M citrato trisódico deshidratado). Las secciones fueron bloqueadas con solución de bloqueo universal (Biogenes, Fremont, CA). Posteriormente, las secciones fueron incubadas durante toda la noche con los anticuerpos correspondientes (anti-CB1, anti-NR1, anti-GAD, o anti-MAP-2, todos a dilución 1:200) para posteriormente lavar por triplicado con PBS-TWEEN (0.2%, pH 7.2) por 10 minutos cada uno. Las secciones fueron incubadas con glicina 0.6 M por 20 minutos para remover autofluorescencia de aldehídos, y lavadas por triplicado con PBA 0.5% (PBS-albúmina). Los anticuerpos secundarios anti-conejo acoplados con Alexa-488 (Thermo Fisher, Waltham, MA) y anti-ratón acoplados con rodamina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) fueron diluidos (1:400) e incubados por 60 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron lavadas por triplicado con PBS-TWEEN (0.2%, pH 7.2). Los núcleos fueron teñidos en azul con DAPI (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), y fueron montadas con solución fluorescente (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Las imágenes (20x) fueron obtenidas con un Microscopio Confocal (LSM-780 NLO (Carl Zeiss, Alemania), utilizando un diodo laser a 405 nm para DAPI, y uno Ar/ML 458/488/514 nm para los fluoróforos Alexa 488 y rodamina. Para el análisis de las

imágenes se utilizó el software ZEN 2010 6.0 (Carl Zeiss, Alemania). Asimismo, el método de Otsu (algoritmo de segmentación) se utilizó para contrastar células positivas a las proteínas CB1, NR1, GAD o MAP-2 de acuerdo con reportes previos (González y Woods, 2008). El área se representó como unidades de intensidad relativa diferentes del fondo en una imagen binaria. La intensidad de la fluorescencia fue calculada utilizando el software Matlab (versión 7.10.0, MATLAB, Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, EUA, 2010).

10.8 Ensayo de peroxidación lipídica

En tejido homogenizado de estriado dorsal obtenido 24 horas post-cirugía, se estimó la peroxidación lipídica como la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS), siguiendo un protocolo estandarizado (Rangel-López et al., 2015). Alícuotas de los homogenados (50 μ L) fueron adicionadas a 100 μ L de reactivo de TBA (0.75 g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético (TCA) + 2.54 ml de HCL 1N) y luego incubadas a 96°C por 20 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. La densidad óptica de los sobrenadantes fue estimada a 532 nm en un Cytation 3 Image Reader (Biotek). Los resultados fueron calculados como nmoles de TBARS por mg de proteína por la previa interpolación de absorbancia en una curva estándar construida con tetrametoxipropano (TMPO) y expresados como porcentaje de peroxidación *versus* el grupo Sham.

10.9 Ensayo de carbonilación de proteínas

En tejido homogenizado de estriado dorsal obtenido 24 horas después de la administración intraestriatal de toxina (o vehículo), se estimó la carbonilación de proteínas como el índice de daño oxidante a proteínas, siguiendo un protocolo estandarizado (Colín-González et al., 2013). Un total de μ L de sulfato de estreptomycin (10 mg de sulfato de estreptomycin/100 mL de agua destilada) fueron agregados a los homogenados (250 μ L) la noche previa al experimento. Posteriormente, cada muestra fue agitada vigorosamente con un vórtex y centrifugada a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos.

Los pellets fueron descartados, y se agregó un total de 300 μ L de dinitrofenilhidrazina (DNPH) (0.05 g de DNPH/25 mL de HCL 2.5N); las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente y protegidas de la luz por una hora. Un total de 300 μ L de TCA al 20% fue agregado subsecuentemente y se agitó vigorosamente con vórtex; las muestras fueron colocadas en el congelador por 10 minutos; los pellets fueron resuspendidos, y las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos; este último paso se llevó a cabo por triplicado, y las muestras fueron recolectadas claras y sin trazas amarillas del DNPH. La densidad óptica de los sobrenadantes fue estimada a 280 y 370 nm en un Cytation 3 Image Reader (Biotek). Los resultados fueron calculados y expresados como nmoles de DNPH por mg de proteína por la previa interpolación de la absorbancia en una curva estándar construida con DNPH.

10.10 Análisis estadístico

Se expresaron los resultados como las medias de los valores \pm error estándar (SEM). Los datos fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados de significancia estadística. El análisis estadístico fue realizado utilizando el software científico de estadística GraphPad Prism 5 (GraphPad Scientific, San Diego, CA, USA).

11. RESULTADOS

11.1 El URB597 previene la disminución en el peso corporal inducido por QUIN

Como práctica estándar, el peso de todos los animales fue registrado diariamente previo a la administración de reactivos. Como se observa en la Figura 7 (panel izquierdo), los animales lesionados unilateralmente con QUIN exhibieron una disminución significativa en el peso corporal a lo largo de los 12 días de experimentación en comparación con el grupo Sham (20% por debajo

del grupo Sham; $P < 0.05$). En contraste, los animales lesionados con QUIN que recibieron también URB597 exhibieron una ganancia de peso similar a la del grupo Sham (3% arriba del grupo Sham, y 82% por encima del grupo QUIN; $P < 0.05$). El URB597 *per se* no afectó la ganancia de peso corporal comparada con el grupo Sham.

11.2 El URB597 atenuó la asimetría motora inducida por QUIN

Se evaluó si la administración de URB597 (como pretratamiento por 3 días, antes de la administración de la toxina, y como tratamiento de seguimiento por 3 días) podría prevenir o reducir la asimetría motora en animales lesionados unilateralmente con QUIN. Los resultados de esta prueba conductual de (60 minutos de duración) están representados en el panel derecho de la Figura 7. El grupo de animales con la lesión estriatal inducida por QUIN exhibió una asimetría motora significativa comparada con la del grupo Sham (230% sobre Sham; $P < 0.05$), y este efecto fue prevenido por el URB597 (89% por debajo del grupo QUIN; $P < 0.05$), casi alcanzando los niveles control. El URB597 *per se* no afectó la conducta de rotación comparada con el grupo Sham.

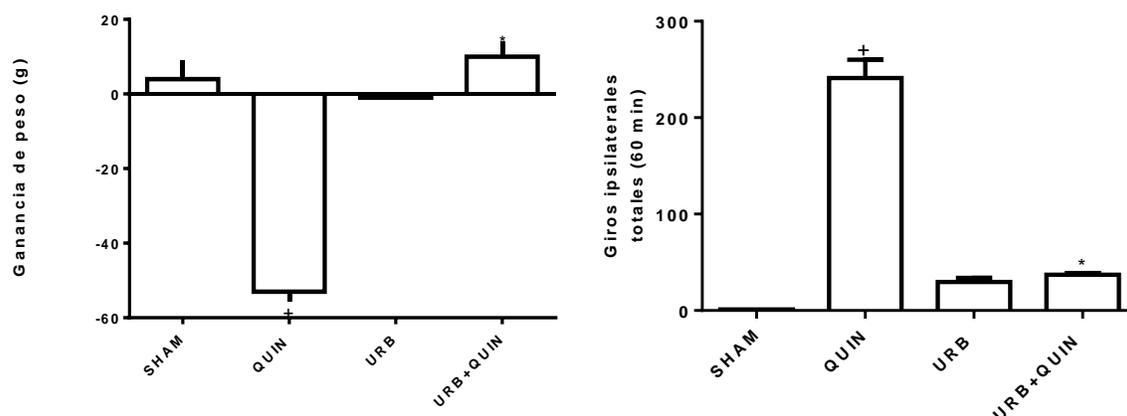


Figura 7. Efectos del ácido quinolínico (QUIN) y/o URRB597 (URB) en los cambios en el peso corporal y alteraciones motoras en ratas. El panel izquierdo muestra la ganancia de peso general de los animales (peso inicial de 280-320 gramos) expuestos a QUIN y/o URB en 12 días. El panel derecho muestra el número total de giros ipsilaterales inducidos por la administración de apomorfina (1 mg/kg, s.c.) durante 60 minutos en animales expuestos a QUIN y/o URB. Se representan los valores promedio \pm SEM de $n = 4-6$ ratas por grupo. + $P < 0.05$, diferente del grupo Sham; * $P < 0.05$, diferente del grupo QUIN; ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey.

11.3 El URB597 disminuyó el daño celular estriatal inducido por QUIN

Las secciones de estriado dorsal teñidas con Hematoxilina & Eosina evidenciaron que el QUIN produjo un daño severo en el neurópilo y picnosis, e indujo un gran número de núcleos celulares dañados (Figura 8, panel izquierdo, inciso B) comparado con el grupo Sham (panel izquierdo, inciso A). En contraste, el URB597 ejerció una protección efectiva en el tejido estriatal de ratas lesionadas con QUIN (panel izquierdo, inciso D), como se evidencia con la preservación de un número de núcleos celulares, neurópilo, y estriosomas. El URB597 *per se* (panel izquierdo, inciso C) no afectó la integridad estructural estriatal, como se observa al compararlo con el grupo Sham. La evaluación de la tasa general de daño celular (número de células dañadas/número total de células por campo) se muestra en la Figura 8 (panel derecho). El QUIN incrementó significativamente la tasa de daño celular comparando con el grupo Sham (117% sobre el Sham; $P < 0.05$), y este efecto fue parcialmente prevenido por el URB597 en ratas lesionadas con QUIN (27% por debajo del grupo QUIN). EL URB597 *per se* no afectó la tasa de daño celular comparada con el grupo Sham.

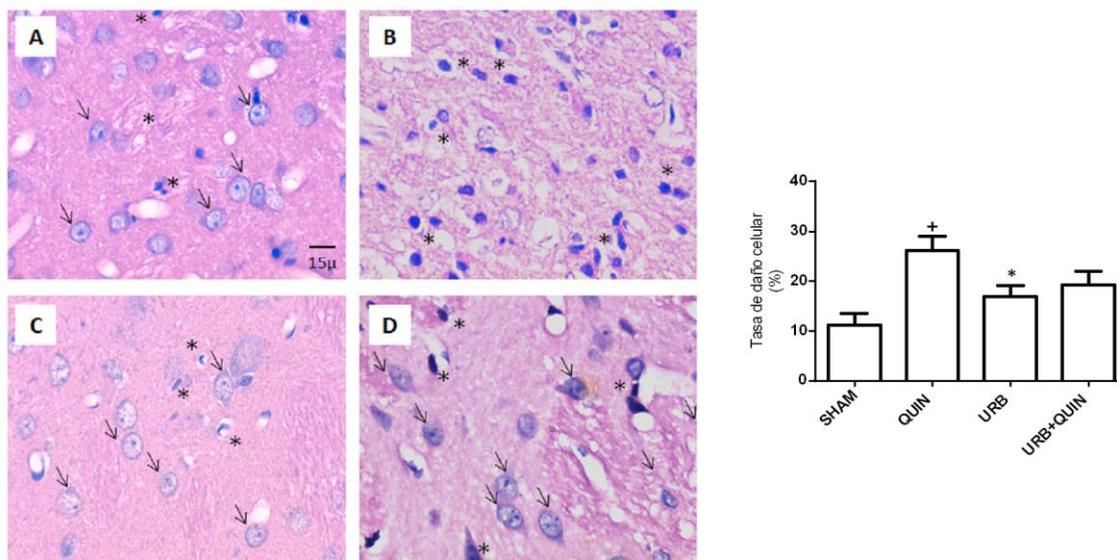


Figura 8. Efecto del ácido quinolínico (QUIN) y/o URB597 (URB) en la morfología estructural en ratas. El panel izquierdo muestra fotomicrografías de tejido estriatal dorsal de animales expuestos a

QUIN y/o URB. (A) Sham; (B) QUIN; (C) URB597; (D) URB597+QUIN. Las flechas denotan células vivas (núcleo preservado), y los asteriscos denotan núcleo celular dañado. El panel derecho exhibe la tasa de daño celular (células dañadas/ total de células por campo) de tejido estriatal de animales expuestos a QUIN y/o URB. Se representan los valores promedio \pm SEM de n= 4-6 ratas por grupo. +P<0.05, diferente del grupo Sham; *P<0.05, diferente del grupo QUIN; ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey (40x).

11.4 El URB597 atenuó la pérdida neuronal (inducida por QUIN) de la GAD y MAP-2 en el estriado

La expresión y localización de MAP-2 y GAD evaluada por inmunofluorescencia fue evaluada en secciones de tejido estriatal obtenidas en el día 8 post-lesión como índices de los niveles de pérdida celular (GABAérgica) y/o preservación; se puede observar en la Figura 9. (A) Sham; (B) QUIN; (C) URB597; (D) URB597+QUIN. Mientras que el panel superior izquierdo muestra imágenes representativas de núcleos celulares (teñidos con DAPI en azul) superpuestos con GAD (en verde), los paneles inferiores izquierdos muestran imágenes de núcleos (también en azul) superpuestos con MAP-2 (en rojo). Para ambas proteínas, los grupos Sham y URB597 muestran intensa fluorescencia mayormente localizada a nivel de estriosomas, y ocasionalmente rodeando núcleos (paneles superiores e inferiores). En contraste, el tejido lesionado con QUIN exhibe fluorescencia difusa y de menor intensidad para ambas proteínas (verde y rojo), mientras que las intensidades de fluorescencia fueron parcialmente recuperadas en el tratamiento de URB597 + QUIN. Los paneles al centro muestran las imágenes contrastadas con el procedimiento de segmentación. Un contraste intenso se exhibe en los grupos Sham y URB597, mientras que un contraste reducir se muestra en el grupo QUIN. Este contraste fue parcialmente recuperado para ambas proteínas en el grupo URB597 + QUIN. Los paneles derechos muestran el análisis densitométrico (normalizado) para las imágenes, calculado después del procedimiento de segmentación. Los niveles de expresión de las proteínas GAD y MAP-2 disminuyeron en un 48 y 60 por ciento comparados con el grupo Sham,

respectivamente). El URB597 *per se* no modificó los patrones de expresión de GAD y MAP-2 (17 y 24% por debajo del grupo Sham, respectivamente).

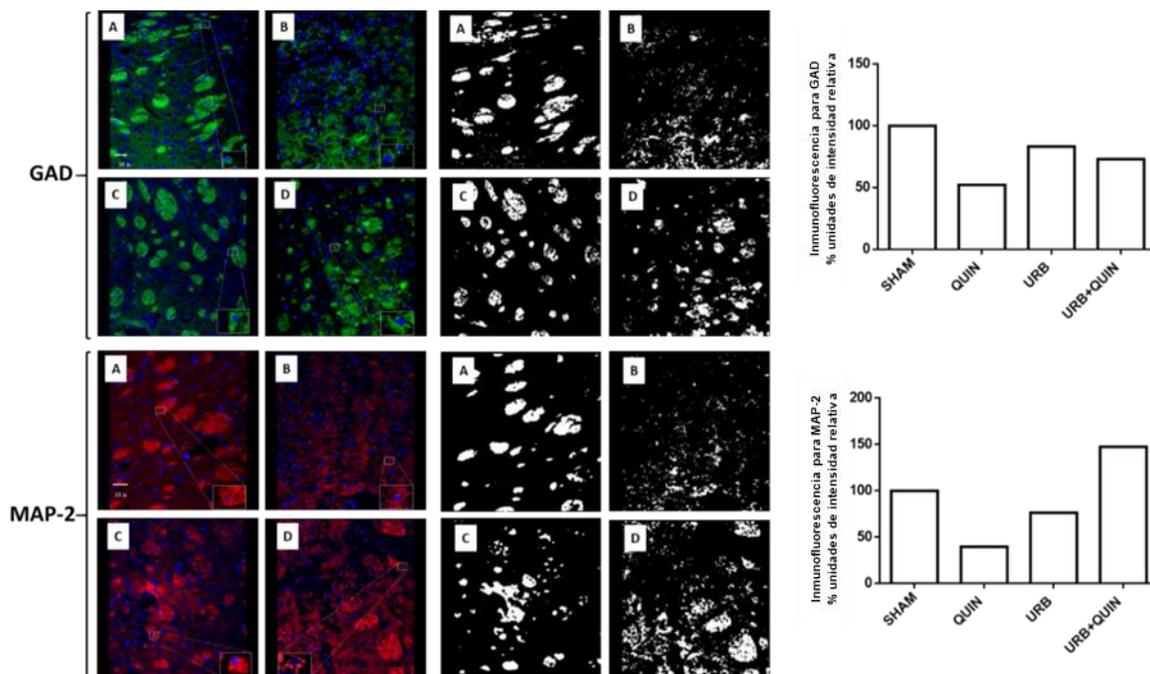


Figura 9. Efectos del ácido quinolínico (QUIN y/o URB597 (URB)) en la inmunofluorescencia estriatal de células (GABAérgicas) neuronales. Los paneles a la izquierda muestran inmunofluorescencia en fotomicrografías de rebanadas coronales del estriado dorsal de animales expuestos a QUIN y/o URB597. La inmunofluorescencia fue dirigida a la proteína GAD GABAérgica (en verde) y la proteína neuronal MAP-2 (en rojo). (A) Sham; (B) QUIN; (C) URB597; (D) URB597+QUIN. Se muestran las imágenes representativas colectadas de cuatro ratas (3 secciones de estriado dorsal por rata). Cuadros pequeños muestran detalles magnificados de células inmunopositivas. En blanco y negro se muestran imágenes de las mismas micrografías muestran el proceso de segmentación. Los paneles a la derecha corresponden al análisis densitométrico obtenido después del análisis de segmentación. Las barras en las gráficas representan unidades de intensidad de fluorescencia relativa. No se representan dispersiones dado que las barras exhiben valores normalizados (20x).

11.5 El URB597 previene el daño oxidante (inducido por QUIN) en lípidos y proteínas

La medición del grado de daño oxidativo a lípidos se realizó en muestras de tejido estriatal de animales expuestos a QUIN y/o URB597. El nivel de peroxidación lipídica inducida por QUIN se incrementó comparando con el grupo Sham (974% sobre el Sham, $P<0.05$) como respuesta al patrón tóxico temprano ejercido por el QUIN (muestras obtenidas 24 horas post-lesión; se muestran en la Figura 10, en el panel a la izquierda). En contraste, el URB597 previno significativamente el efecto tóxico del QUIN (72% por debajo del grupo QUIN; $P<0.05$). El URB597 no afectó los niveles estriatales de peroxidación lipídica comparando con el grupo Sham.

Los efectos del QUIN y/o URB597 fueron también evaluados en los niveles de carbonilación proteica en muestras de tejido estriatal. La Figura 10 (panel derecho) muestra que los niveles promedio de la carbonilación de proteínas inducida por QUIN después de 24 horas de exposición aumentó significativamente en comparación con el grupo Sham (94% sobre Sham; $P<0.05$). En contraste, el URB597 redujo significativamente el daño oxidativo a proteínas inducido por QUIN comparando con la toxina (37% por debajo de QUIN; $P<0.05$). El URB597 *per se* no afectó los niveles estriatales de carbonilación proteica comparados con el grupo Sham.

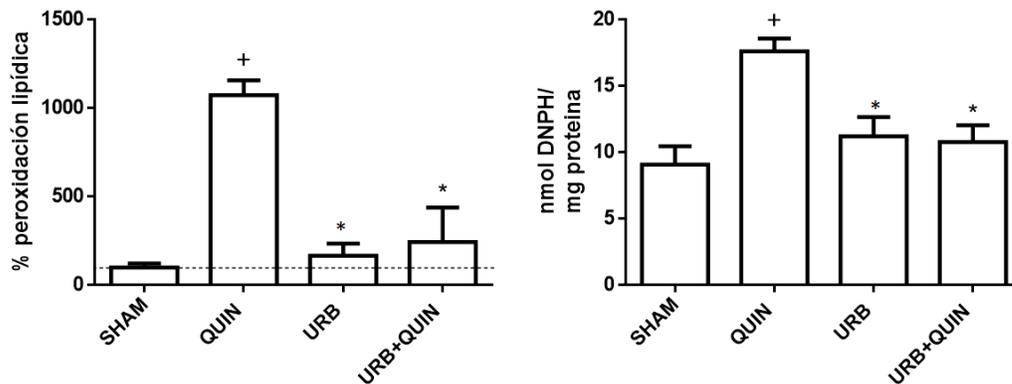


Figura 10. Niveles estriatales de peroxidación lipídica (porcentaje de daño oxidativo a lípidos; panel izquierdo) y carbonilación proteica (nmol de dinitrofenilhidrazina (DNPH)/ mg proteína; panel derecho) de animales expuestos a ácido quinolínico (QUIN, por 24 horas) y/o URB597 (URB). Se representan los valores promedio \pm SEM de $n = 4-6$ ratas por grupo. $+P < 0.05$, diferente del grupo Sham; $*P < 0.05$, diferente del grupo QUIN; ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey.

11.6 El QUIN y el URB597 modifican la expresión estriatal y localización del CB1 y NR1

La inmunofluorescencia contra las proteínas CB1 y NR1 fue evaluada en secciones coronales de tejido cerebral de rata obtenidas 1.5 horas post-lesión. Los ensayos de inmunofluorescencia fueron realizados para estudiar la distribución de las proteínas dentro de esa ventana de tiempo debido a que los eventos intracelulares de naturaleza tóxica pueden ocurrir de manera temprana, en los primeros minutos/horas del insulto tóxico; eventos compensatorios y regulatorios detonados por el URB597 pueden ocurrir de igual forma en los primeros minutos/horas después del insulto tóxico.

La Figura 11 muestra imágenes de los núcleos teñidos con DAPI (en azul) superpuestos con la tinción de CB1 y NR1 (ambos en rojo). En las dos líneas superiores de las micrografías (cuatro paneles izquierdos), la localización de CB1 en el grupo Sham (A) se observa punteado, difuso y mayormente distribuido de forma homogénea; en contraste, la lesión con QUIN (B) produjo una

localización de menor densidad y mayor agregación de CB1 en las secciones estriatales, mientras que el tratamiento de URB597 + QUIN (D) indujo una disminución de la señal para CB1 comparada con la del grupo Sham (similar al grupo QUIN), remitida a algunos puntos agregados. Estas imágenes fueron contrastadas de igual forma con el método de segmentación de imágenes, confirmando las tendencias de localización y distribución descritas arriba (los cuatro paneles a la derecha). En las dos líneas inferiores de micrografías (cuatro paneles a la izquierda), la localización de NR1 en el grupo Sham (A) parece homogéneamente distribuida y localizada en los estriosomas. El tratamiento con QUIN (B) presenta también una localización organizada de NR1, aparentemente remitida a algunos estriosomas, pero con una tinción de menor densidad (B) que aquella del grupo Sham. El URB597 *per se* (C) indujo una menor densidad, y una mayor distribución y localización difusa de NR1 en las secciones estriatales, mientras que el tratamiento de URB597 + QUIN (D) indujo una marca de menor intensidad para NR1 comparada con la del grupo Sham (pero de mayor densidad que la del grupo QUIN), preservando la localización de la proteína mayormente en estriosomas. Estas imágenes fueron también contrastadas con el método de segmentación de imágenes, confirmando las tendencias de localización y distribución descritas anteriormente (cuatro paneles derechos). Para cada tratamiento, la densidad promedio de NR1 para varios campos fue contrastada con aquella de CB1 para obtener la relación de NR1/CB1 (gráfica derecha). Notablemente, en contraste con las densidades crudas arriba descritas, el QUIN incrementó la relación NR1/CB1 por 98% sobre el grupo Sham (normalizado a 1), mientras que los tratamientos URB y URB597 + QUIN disminuyeron esta relación por 50% y 46% por debajo del grupo Sham, respectivamente.

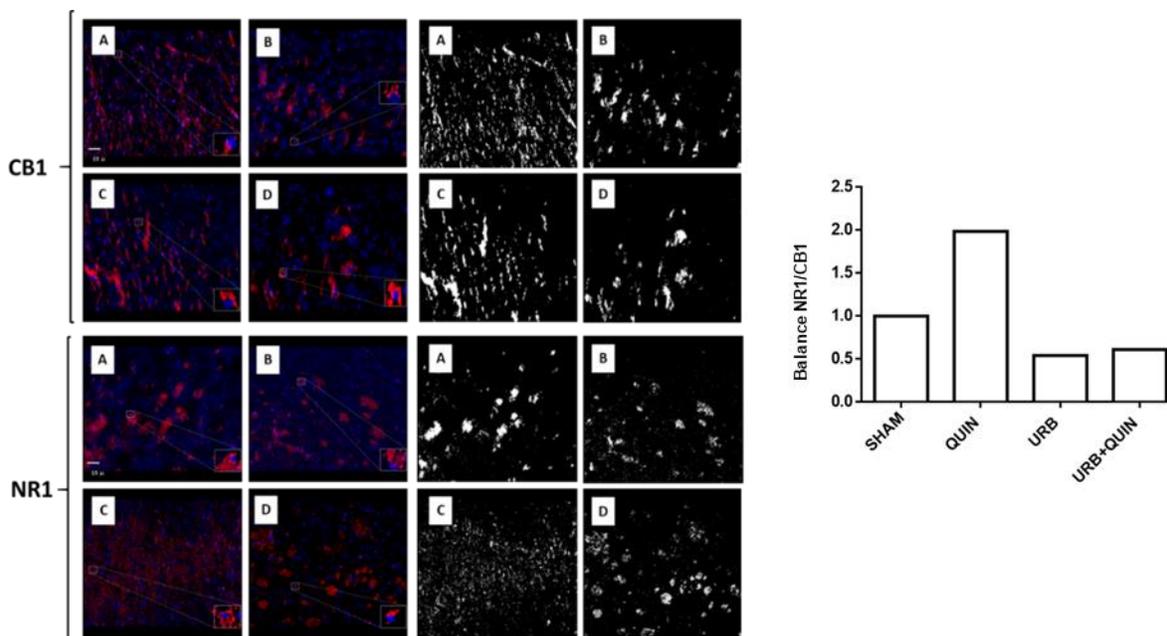


Figura 11. Efectos del URB597 (URB) y/o ácido quinolínico (QUIN) en la expresión y localización por inmunofluorescencia de CB1 y NR1 en tejido estriatal de rata. La tinción de núcleos con DAPI se observa en azul; la tinción de proteínas se observa en rojo para ambos casos (CB1 y NR1). Se muestran las imágenes representativas recolectadas de tres ratas (3 secciones del estriado dorsal por rata). En la composición superior (primeras dos líneas) se muestra la inmunofluorescencia para CB1; en la composición inferior (líneas tercera y cuarta) se muestra la inmunofluorescencia para NR1. En los ocho paneles de la izquierda ((A) Sham; (B) QUIN; (C) URB597; (D) URB597+QUIN) las señales típicas de inmunofluorescencia se muestran en secciones coronales; en los ocho paneles de la derecha se muestran las imágenes obtenidas por la técnica de segmentación contrastando las señales de fluorescencia real. La intensidad de la señal de fluorescencia fue calculada usando el software ImageJ (versión 1.47, NIH, Bethesda, Maryland, EUA). Los tratamientos se muestran en los paneles de acuerdo con la siguiente relación: A) Sham; B) QUIN (por 1.5 horas); C) URB; y D) URB+QUIN. En la gráfica se muestra la relación NR1/CB1 en el estriado dorsal de ratas de los diferentes tratamientos. No se representa dispersión dado que las barras muestran valores normalizados (20x).

12. DISCUSIÓN

Después del reconocimiento del SEC como un complejo molecular de señalización lipídica con funciones fisiológicas –tales como la coordinación motora, la respuesta inmune, o la cognición–,

este sistema modulador emerge como un objetivo significativo de aproximaciones terapéuticas bajo diversos escenarios patológicos. Entre las posibles estrategias detrás de dichos efectos, la modulación del sistema, a través de los CB1r y CB2r con sus respectivos agonistas, constituye una alternativa recurrente que también puede incluir moléculas capaces de alterar el proceso de degradación de cannabinoides endógenos. Considerando este antecedente, en este trabajo hemos evaluado por primera vez el papel protector del URB597, un inhibidor selectivo de la FAAH, en los eventos excitotóxicos ejercidos por el QUIN en el estriado, lo cual se representa en la figura 12. Para este propósito, se exploraron marcadores de toxicidad conductual, morfológica, y bioquímica.

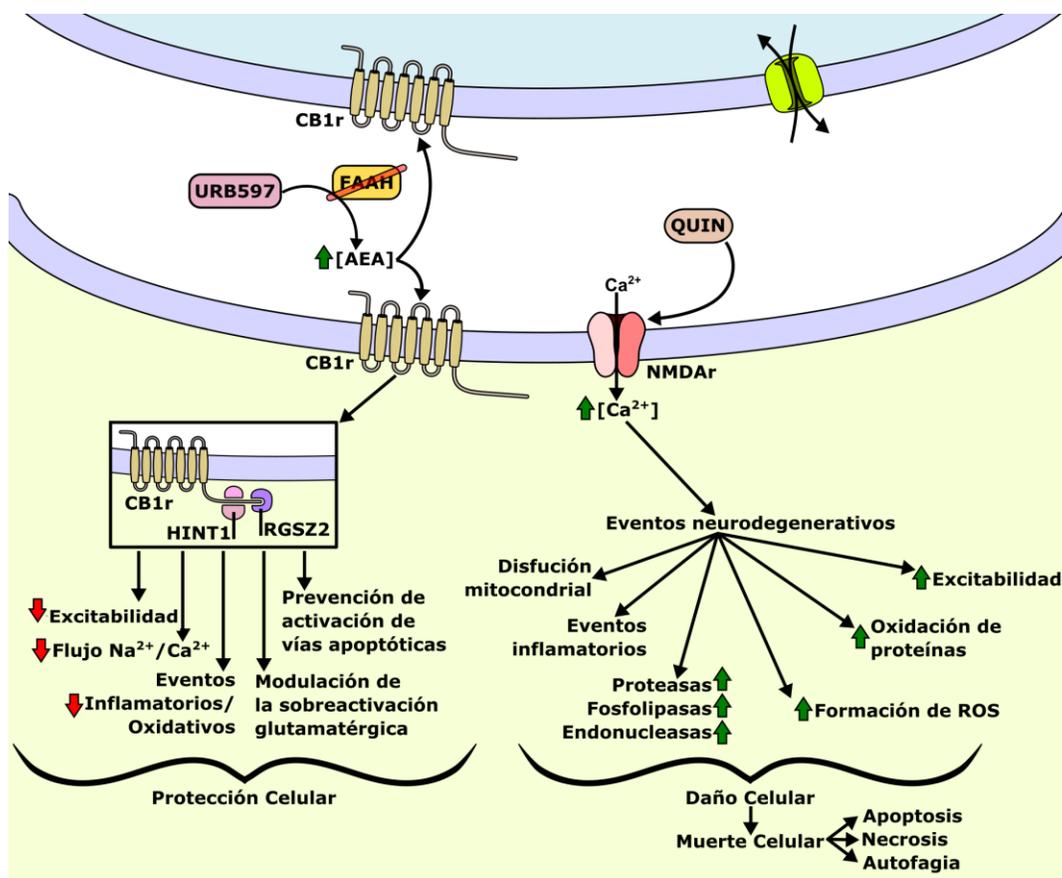


Figura 12. Resumen gráfico de la estrategia experimental propuesta en este trabajo, así como las posibles implicaciones en el mecanismo postsináptico de protección.

El patrón tóxico inducido por el QUIN incluye una disminución significativa en la ganancia de peso, acompañada de un aumento en la conducta de rotación de ratas inducida después del reto con apomorfina. Se ha demostrado que la lesión estriatal unilateral inducida bajo el paradigma excitotóxico producido por el QUIN en ratas es responsable de la estimulación de una conducta asimétrica debida al severo daño unilateral al tejido estriatal (Dunbar et al., 1992). Por lo tanto, esta prueba claramente representa el grado de daño alcanzado después del insulto tóxico en el modelo animal, que es producido por el desbalance de los sistemas neurotransmisores entre los hemisferios lesionado y no lesionado (Trigo-Damas et al., 2018). El URB597 fue capaz de prevenir la pérdida de peso corporal y la asimetría motora inducida por QUIN, sugiriendo por tanto que la preservación estructural del tejido estriatal debida a las acciones protectoras de este agente fue suficiente para ejercer un funcionamiento adecuado de los procesos fisiológicos regulados en el estriado, preservando en última instancia, la integridad motora. Las propiedades protectoras del URB597 observadas en este estudio están bien fundamentadas en evidencia que demuestra que el agente produce efectos positivos que previenen la pérdida del peso corporal en ratas en otros modelos neurotóxicos, incluyendo el modelo producido por la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3-NP) (Maya-López et al., 2017b). Asimismo, se ha reportado recientemente evidencia demostrando la capacidad del URB597 de mejorar el efecto motor en ratas sujetas a insultos tóxicos. Esta evidencia incluye las acciones positivas de este agente en las alteraciones motoras (campo abierto) inducidas por el 3-NP y la neurotoxina parkinsoniana 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas (Maya-López et al., 2017b), así como en los déficits motores (campo abierto) producidos por la neurotoxina también parkinsoniana 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en ratones (Escamilla-Ramírez et al., 2017).

Con relación a los cambios morfológicos mayores inducidos por el QUIN en el estriado, la toxina produjo picnosis, vacuolización, y neuropilo degradado. Efectos similares se han reportado en estudios previos que demuestran la agresividad del insulto excitotóxico inducido por QUIN

(Santamaría et al., 2003). Se asume que una preservación en la función motora mantendría una estrecha relación con la defensa de la integridad estructural en el estriado. De esta forma, el URB597 fue capaz de proteger al estriado contra la actividad tóxica del QUIN, como se evidencia por la conservación en la apariencia del tejido y la proporción de células preservadas. Este efecto fue confirmado por el cálculo de la tasa de daño celular, que muestra que el severo daño producido por el QUIN fue prevenido por el URB597. Evidencia de soporte de esta capacidad neuroprotectora del URB597 se ha reportado recientemente para el modelo tóxico inducido por el 3-NP y las alteraciones morfológicas generadas por la 6-OHDA en tejido estriatal y nigral de rata (Maya-López et al., 2017b).

Para fundamentar una correlación entre la preservación conductual (funcional) y morfológica (estructural) ejercida por el URB597 en el paradigma tóxico inducido por QUIN, es pertinente considerar que, además de otras células contribuyentes, como las de la glía, la estructura celular que requiere protección de forma preferente es la neurona. Se ha mostrado anteriormente que el estriado está enriquecido con neuronas GABAérgicas medianas con innervaciones corticales de tipo glutamatérgico (Holley et al., 2015); por lo tanto, a través de la evaluación de la expresión y localización de la proteína neuronal MAP-2 y el marcador GABAérgico específico GAD, brindamos un acercamiento preciso para evidenciar protección específicamente neuronal. Encontramos que la intensidad y localización de la fluorescencia para estas dos proteínas disminuyó en el estriado de ratas expuestas a QUIN. Reportes previos concuerdan con estos hallazgos, dado que se ha demostrado que el QUIN puede reducir la fluorescencia a MAP-2 en cultivos neuronales humanos (Kerr et al., 1998) y la marca de inmunofluorescencia a GAD65 y GAD67 en estriado de rata (Qin et al., 1992), lo que valida estas estrategias considerando el daño neuronal GABAérgico en el paradigma tóxico. En contraste al efecto del QUIN, el URB597 preservó parcialmente la marca y localización de ambas proteínas, sugiriendo que la estrategia protectora desplegada por este compuesto involucra la preservación neuronal. Este concepto se sustenta también por la

conservación funcional (motora) en el estriado de animales tratados con URB597+QUIN descrita anteriormente, así como las acciones neuroprotectoras ya descritas para este agente en otros modelos neurotóxicos (Escamilla-Ramírez et al., 2017; Maya-López et al., 2017b).

Los índices de peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas fueron estimados 24 horas post-lesión en tejido estriatal de ratas sujetas a tratamientos distintos. Estos tiempos de evaluación fueron seleccionados para determinar si el daño oxidativo puede ser un evento causal en el compromiso morfológico y conductual tardío inducido por QUIN. La toxina aumentó los niveles de daño oxidativo en lípidos y proteínas, sugiriendo que las alteraciones oxidativas tempranas podrían ser una parte integral del patrón excitotóxico evocado por este metabolito tóxico. Reportes previos han demostrado que estos dos marcadores son estimados por el QUIN en tiempos cortos después de la infusión intraestriatal (Colín-González et al., 2013; Santana-Martínez et al., 2014). A este respecto, la producción del radical hidroxilo, y la consecuente peroxidación de lípidos inducida por la toxina, puede tomar algunos minutos después de la inyección intraestriatal (Rios y Santamaría, 1991; Santamaría et al., 2001), sustentado el concepto de que el estrés oxidativo ya sea asociado a excitotoxicidad o independiente de la sobreactivación de los NMDAr, contribuye significativamente a los eventos neurodegenerativos ya en desarrollo. Más aún, el QUIN es capaz de inducir cambios significativos en diferentes sistemas antioxidantes de importancia crítica (enzimáticos y no enzimáticos) que son dependientes del metabolismo celular, contribuyendo al daño celular vía estrés oxidativo (Rodríguez-Martínez et al., 2000b; Maya-López et al., 2017b). Así, el URB597 previno contra el daño oxidativo a lípidos y proteínas ejercido por QUIN. Este hallazgo permite sugerir tres posibles escenarios, no excluyentes entre sí, para explicar el efecto protector del URB597: esta molécula podría reducir el daño oxidativo vía la inhibición de la FAAH y posterior acumulación de AEA y activación de CB1r (Howlett y Abood, 2017), misma que podría indirectamente regular procesos metabólicos para reducir el daño oxidativo; el URB597 podría también ejercer un efecto indirecto a través de rutas independientes a la estimulación del CB1r

(pendientes a ser demostradas); adicionalmente, el URB597 podría evocar un efecto antioxidante directo como posible atrapador de radicales, dado que se ha mostrado su capacidad para reducir la formación de radical superóxido en el modelo tóxico de consumo de etanol (Pelicao et al., 2016), mientras que disminuye la peroxidación lipídica en otros modelos tóxicos (Escamilla-Ramírez et al., 2017; Maya-López et al., 2017b). El último escenario descrito es una propiedad del URB597 que amerita ser investigada con mayor detenimiento; mientras tanto, esta cualidad no puede ser descartada como propiedad clave en el patrón protector ejercido por esta molécula.

Con el objetivo de caracterizar e identificar el posible mecanismo de protección inducido por el URB597 en la neurotoxicidad ejercida por el QUIN, la señal de inmunofluorescencia para las proteínas CB1 y NR1 fue evaluada y cuantificada en el estriado dorsal de animales bajo todos los esquemas de tratamiento. El QUIN alteró los patrones de expresión y localización de CB1 y NR1 comparados con el grupo Sham. Sin considerar la disminución en la señal de inmunofluorescencia para NR1 inducida por QUIN, la relación NR1/CB1 -un marcador más funcional del balance entre estos dos receptores denotó un incremento general en la expresión de NR1 sobre CB1 en el estriado de animales lesionados con la toxina, sugiriendo condiciones propicias para la detonación de eventos excitotóxicos. A este respecto, es necesario considerar que los patrones crudos de localización de la proteína NR1 no necesariamente reflejan el estado funcional de la excitabilidad inducida por QUIN; en cambio, podrían reflejar una compensación temprana de la estimulación excitatoria persistente ya en desarrollo, y/o una reorganización temprana de estos receptores en preparación para los eventos excitatorios futuros. Notablemente, el URB597 administrado a ratas lesionadas con QUIN disminuyó la tasa NR1/CB1, llevando el balance de estas dos proteínas a un esquema similar al de la condición Sham, sustentando así el concepto de que estos animales fueron menos propensos a desarrollar episodios excitotóxicos. Como era esperado, El URB597 *per se* disminuyó el patrón de expresión de CB1. Por lo tanto, aunque la tasa de NR1/CB1 obtenida de todos los grupos experimentales sustenta la excitotoxicidad temprana aumentada asociada a la

desregulación de CB1 y su prevención por URB597, con los datos preliminares presentados en este trabajo no es posible confirmar categóricamente este mecanismo; serán entonces necesarios más estudios detallados que caractericen la regulación de CB1 y NR1 ejercidos por el URB597. En un reporte previo, se mostró una alteración en el mapeo de CB1 en el caudado-putamen de ratas recibiendo QUIN, como fue sugerido por la baja regulación del receptor *in vivo* evaluada a través del marcador de recaptura [18F]MK-9470 por PET (Casteels et al., 2010). Esta evidencia respalda las alteraciones inducidas por QUIN en los patrones de expresión y localización de CB1 observadas en este estudio. Además, se ha mostrado que la manipulación del SEC a través de agonistas sintéticos y endógenos de CBr puede reducir los eventos nocivos producidos en respuesta a la excitotoxicidad inducida por QUIN. Nuestro grupo observó recientemente que la incubación de cultivos primarios de neuronas estriatales de rata y fracciones sinaptosomales con AEA endógena, y los agonistas WIN 55,212-2 y CP 55,940, todos en presencia de QUIN, resultan en la prevención de diferentes marcadores tóxicos en ambas preparaciones biológicas, incluyendo la pérdida de viabilidad celular, reducción en la señal de inmunofluorescencia para el marcador neuronal Neu-N y CB1, disminución de la función mitocondrial y daño oxidativo (Rangel-López et al., 2015). Notablemente, el QUIN nuevamente, demostró su capacidad para disminuir CB1r, sugiriendo que este efecto podría ser considerado como una característica temprana de la toxicidad del QUIN con implicaciones potencialmente causales. En efecto, la baja regulación de CB1r en el cerebro humano está bien caracterizada como un rasgo de pacientes con la EH (Dowie et al., 2010), y ha servido para postular este evento como parte de los procesos degenerativos que toman lugar en la progresión de la enfermedad. Como tal, terapias basadas en cannabinoides se encuentran actualmente bajo investigación para la mejoría de diferentes síntomas de los pacientes con la enfermedad (Sagredo et al., 2012).

Otros grupos han mostrado que la estimulación del SEC resulta en respuestas eficientes en el modelo de excitotoxicidad inducida por QUIN. El WIN55,212-2 ha demostrado reducir el

incremento inducido por QUIN de los niveles de glutamato extracelulares, y ha atenuado el daño estriatal a través de mecanismos que pueden atribuirse al CB1r (Pintor et al., 2006). Experimentos validando el rol protector de una población limitada de CB1r localizada en terminales glutamatérgicas contra insultos excitotóxicos fue reportada posteriormente (Chiarlone et al., 2014). Evidencia sustentando el rol positivo de los agentes con perfil cannabinoide contra la toxicidad del QUIN ha sido provista más recientemente con el uso del derivado de CBG VCE-003.2, un compuesto que actúa sobre el receptor PPAR- γ (Díaz-Alonso et al., 2016). El VCE-003.2 atenuó la muerte neuronal inducida por QUIN y redujo los agregados de HTT mutada en células estriatales. En conjunto, la evidencia descrita valida la exploración del compuesto con un perfil cannabinoide distinto para la reducción de los insultos excitotóxicos asociados a efectos dañinos del QUIN.

Hasta este punto, el principal mecanismo a través del cual agentes con perfil cannabinoide pudieran ejercer acciones neuroprotectoras es atribuible a sus propiedades para la disminución en la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico y/o la reducción de estímulos excitatorios a nivel postsináptico. Se ha demostrado que la activación de CBr lleva al acoplamiento de estos receptores con el NMDAr en un proceso dirigido a la neuroprotección en condiciones excitotóxicas vía la regulación en la proteína HINT1. (Sánchez-Blázquez et al., 2013). Esta interacción entre receptores ha sido descrita a detalle como un *switch* de ENCENDIDO - APAGADO compuesto por el complejo σ 1R-HINT1, que controla la regulación cruzada entre proteínas G-NMDAr; entre estas proteínas se encuentran los receptores cannabinoideos, y eventualmente, podría ser responsable de la reducción de la actividad de los NMDAr (Rodríguez-Muñoz et al., 2015). Asimismo, la inhibición de la FAAH tendrá efectos en la acumulación de otras moléculas como la ODA; a recientes fechas se encontró que la ODA es responsable de algunos efectos neuroprotectores en un modelo murino de EA (Ano et al., 2015), y en un modelo de excitotoxicidad inducida por ácido kaínico (Nam et al., 2017); de esta forma, el efecto de otras moléculas acumuladas por efecto de la inhibición de la FAAH puede sumarse al efecto neuroprotector exhibido por la AEA. La relevancia de este

sofisticado sistema que establece el control ejercido por los CBr sobre los NMDAr, ha sido discutida recientemente y es válida como mecanismo terapéutico potencial a nivel experimental (Rodríguez-Muños et al., 2016). Por lo tanto, nuestro grupo sugiere que el URB597 podría ejercer los efectos protectores observados en este estudio vía la acumulación de AEA después de la inhibición en la actividad de la FAAH (Panlilio et al., 2010), con la regulación subsecuente de estos receptores. Sin embargo, a la luz de otras propiedades ya reportadas del URB597, como su perfil antioxidante (Pelicao et al., 2016; Escamilla-Ramírez et al., 2017; Maya-López et al., 2017b), no es posible descartar un posible escenario en el que reclute otros muchos mecanismos para evocar las respuestas protectoras contra los insultos excitotóxicos. Mientras que este escenario es investigado con detalle, nuestro equipo sugiere que los fármacos y estrategias basadas en cannabinoides diseñadas para inducir una acumulación fisiológica de agonistas endógenos de CBr serán herramientas farmacológicas muy promisorias para mejorar la expectativa clínica de los pacientes cursando con episodios excitotóxicos.

13. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demuestran el efecto neuroprotector del URB597 en diferentes eventos neurotóxicos evocados por el QUIN en el cuerpo estriado de rata. Estos eventos comprendieron marcadores conductuales, morfológicos y bioquímicos de toxicidad, mismos que fueron prevenidos por el URB597 con aparente contribución de una reducción potencial de la excitabilidad glutamatérgica excesiva. Se asume que el URB597 podría ejercer sus acciones parcialmente vía la inhibición de la FAAH y la subsecuente acumulación de AEA endógena, posiblemente induciendo la regulación de receptores cannabinoides y glutamatérgicos a través de mecanismos ya descritos. Sin embargo, dado que el URB597 posee además una actividad antioxidante *per se*, no es posible descartar una posible participación de esta propiedad en su patrón neuroprotector. El URB597 es una herramienta farmacológica útil para explorar mecanismos

bioquímicos y moleculares en modelos de enfermedades neurodegenerativas, lo que permitirá el diseño de terapias alternativas contra las enfermedades neurodegenerativas basadas en la manipulación del SEC.

14. PERSPECTIVAS

- 1.- Determinar el posible perfil atrapador de radicales libres del URB597.
- 2.- Evaluar los efectos del URB597 sobre los perfiles neuroquímicos en tejido cerebral (neurotransmisores glutamato y GABA).
- 3.- Caracterizar los mecanismos de señalización involucrados en el patrón de neuroprotección del URB597.
- 4.- Estudiar los mecanismos de acción del URB597 a largo plazo en un sistema de cultivo organotípico de rebanadas corticales.

15. REFERENCIAS

- Adachi Y, Nakashima K (1999) Population genetic study of Huntington's disease- prevalence and founder's effect in the San-in area, western Japan. *Nihon Rinsho* 57:900–904.
- Aguado T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G, Lutz B, Guzman M, Galve-Roperh I (2007) The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J Biol Chem* 282:23892–23898.
- Al-Jader L, Harper P, Krawczak M (2001) The frequency of inherited disorders database: prevalence of Huntington disease. *Community Genet* 1:148–157.
- Al Kury L, Susan Yang K, Thayyullathil F, Rajesh M, Ali R, Shuba Y, Howarth F, Galadari S, Oz M (2014) Effects of endogenous cannabinoid anandamide on cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Cell Calcium*:231–237.
- Alapafuja S, Nikas S, Bharathan I, VG S, Nasr M, Bowman A, Zvonok N, Li J, Shi X, Engen J,

- Makriyannis A (2012) Sulfonyl fluoride inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *J Med Chem* 55:10074–10089.
- Alexander J, Cravatt B (2006) The putative endocannabinoid transport blocker LY2183240 is a potent inhibitor of FAAH and several other brain serine hydrolases. *J Am Chem Soc* 128:9699–9704.
- Alonso M, Ochoa A, Boll M, Sosa A, Yescas P, López M, Macias R, Familiar I, Rasmussen A (2009) Clinical and genetic characteristics of Mexican Huntington's disease patients. *Mov Disord* 24:2012–2015.
- Alswat K (2013) The role of endocannabinoids system in fatty liver disease and therapeutic potentials. *Saudi J Gastroenterol* 19:144–151.
- Ano Y, Ozawa M, Kutzukake T, Sugiyama S, Uchida K, Yoshida A, Nakayama H (2015) Preventive effects of a fermented dairy product against Alzheimer's disease and identification of a novel oleamide with enhanced microglial phagocytosis and anti-inflammatory activity. *PLoS One* 10:e0118512.
- Araque A, Castillo P, Manzoni O, Ronini R (2017) Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology*:13–24.
- Arizzi M, Cervone K, Aberman J, Betz S, Liu Q, Makriyannis A, Salamone J (2004) Behavioral effects of inhibition of cannabinoid metabolism: The amidase inhibitor AM374 enhances the suppression of lever pressing produced by exogenously administered anandamide. *Life Sci* 4:1001–1011.
- Aronin N, Cooper P, Lorenz L, Bird E, Sagar S, Leeman S, Martin J (1983) Somatostatin is increased in the basal ganglia in Huntington disease. *Ann Neurol* 13:519–526.
- Arrasate M, Finkbeiner S (2012) Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp Neurol* 238:1–11.
- Atwood B, Mackie K (2010) CB2: A cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol* 160:467–479.
- Backaus C, Rahman H, Scheffler S, Laatsch H, Hardeland R (2008) NO scavenging by 3-hydroxyanthranilic acid and 3-hydroxykynurenine: N-nitrosation leads via oxidiazoles to o-quinone diazides. *Nitric Oxide* 19:237–244.
- Badgy G, Juhasz G, Gonda X (2012) A New Clinical Evidence-Based Gene-Environment

- Interaction Model of Depression. *Neuropsychopharmacol Hungarica* 14:213–220.
- Balsinde J, Bianco I, Ackermann E, Conde-Frieboes K, Dennis E (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8527–8531.
- Bari M, Battista N, Valenza M, Mastrangelo N, Malaponti M, Catanzaro G, Cetonze D, Finazzo A, Cattaneo E, Maccarrone M (2013) In vitro and in vivo models of Huntington's disease show alterations in the endocannabinoid system. *FEBS J* 280:3376–3388.
- Basavarajappa B, Shivakumar M, Joshi V, Subbanna S (2017) Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 142:624–648.
- Basile A, Hanus L, Mendelson W (1999) Characterization of the hypnotic properties of oleamide. *Neuroreport* 10:947–951.
- Bates G, Dorsey R, Gusella J, Hayden M, Kay C, Leavitt B, Nance M, Ross C, Scahill R, Wetzel R, Wild E, Tabrizi S (2015) Huntington's disease. *Nat Rev Dis Prim* 1.
- Bateup H, Santini E, Shen W, Birnbaum S, Valjent E, Surmeier D, Fisone G, Nestler E, Greengard P (2010) Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci* 107:14845–14850.
- Beltramo M, di Tomaso E, Piomelli D (1997) Inhibition of anandamide hydrolysis in rat brain tissue by (E)-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran-2-one. *FEBS Lett* 403:263–267.
- Bénard G et al. (2012) Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci* 4:558–564.
- Bernstein S, Morley G (2006) Gap junctions and propagation of the cardiac action potential. *Adv Cardiol* 42:71–85.
- Bishop-Bailey D (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 129:823–834.
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos J, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 256:377–380.
- Blazquez C et al. (2011) Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in

- Huntington's disease. *Brain* 134 (Pt 1):119–136.
- Boitano S, Evans W (2000) Connexin mimetic peptides reversibly inhibit Ca (2+) signaling through gap junctions in airway cells. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 279:L623–L630.
- Borlongan C, Randall T, Cahill D, Sanberg P (1995) Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. *Brain Res* 676:231–234.
- Brenneisen R (2007) Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents (ElSohly MA, ed). Totowa, NJ: Humana Press.
- Brown I, Cascio M, Rotondo D, Pertwee R, Heys S, Wahle K (2012) Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators. *Prog Lipid Res* 52:50–109.
- Busquets-Garcia A, Bains J, Marsicano G (2018) CB1 receptor signaling in the brain: extracting specificity from ubiquity. *Neuropharmacology* 43:4–20.
- Cabral GA, Ferreira GA, Jamerson MJ (2015) Endocannabinoids and the Immune System in Health and Disease.
- Casteels C, Martinez E, Bormans G, Camon L, de Vera N, Baekelandt V, Planas A, Laere K (2010) Type 1 cannabinoid receptor mapping with [18F]MK-9470 PET in the rat brain after quinolinic acid lesion: a comparison to dopamine receptors and glucose metabolism. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37:2354–2363.
- Castillo P, Younts T, Chavez A, Hashimoto Y (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 76.
- Chen Y, Meiningner V, Guillemin G (2009) Recent advances in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Emphasis on kynurenine pathway inhibitors. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 9:32–39.
- Chiarlone A, Bellocchio L, Blázquez C, Resel E, Soria-Gómez E, Cannich A, Ferrero J, Sagredo O, Benito C, Romero J, Sánchez-Prieto J, Lutz B, Fernández-Ruiz J, Galve-Roperh I, Guzmán M (2014) A restricted population of CB1 cannabinoid receptors with neuroprotective activity. *Proc Natl Acad Sci* 111:8257–8262.
- Chiarugi A, Sbarba D, Paccagnini A, Donnini S, Filippi S, Moroni F (2000) Combined inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and nitric oxide synthase modulates neurotoxin release by

- interferon-gamma-activated macrophages. *J Leukoc Biol* 68:260–266.
- Chiurchiú V, Battistini L, Maccarrone M (2015) Endocannabinoid signaling in innate and adaptive immunity. *Immunology* 144:352–364.
- Cimini A, Benedetti E, Cristiano L, Sebastiani P, D’Amico M, D’Angelo B, Di Loreto S (2005) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. *Neuroscience* 130:325–337.
- Coleman A, Sengelaub D (2002) Patterns of dye coupling in lumbar motor nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 454:34–41.
- Colín-González A, Orozco-Ibarra M, Chánez-Cárdenas M, Rangel-López E, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J, Barrera-Oviedo D, Maldonado P (2013) Heme oxygenase-1 (HO-1) upregulation delays morphological and oxidative damage induced in an excitotoxic/pro-oxidant model in the rat striatum. *Neuroscience* 12:91–101.
- Cravatt B, Demarest K, Patricelli M, Bracey M, Giang D, Martin B, Lichtman A (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9371–9376.
- Cui G, Jun S, Jin X, Pham M, Vogel S, Lovinger D, Costa R (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action inaction. *Nature* 494:238–242.
- Denovan-Wright E, Robertson H (2000) Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in a subset of neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington’s disease mice. *Neuroscience* 98:705–713.
- Désarnaud F, Cadas H, Piomelli D (1995) Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *J Biol Chem* 270:6030–6035.
- Di Marzo V (2008) Targeting the endocannabinoid system: To enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7:438–455.
- Diaz-Alonso J, Paraíso-Luna J, Navarrete C, del Río C, Cantarero I, Palomares B, Aguarales J, Fernández-Ruiz J, Bellido M, Pollastro F, Appendino G, Calzado M, Galve-Roperh I, Muñoz E (2016) VCE-003.2, a novel cannabigerol derivative, enhances neuronal progenitor cell survival and alleviates symptomatology in murine models of Huntington’s disease. *Sci Rep* 6:29789.

- Dinh T, Freund T, Piomelli D (2002) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem and Physics Lipids* 121:149–158.
- Dionisi M, Alexander S, Bennett A (2012) Oleamide activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in vitro. *Lipids Health Dis* 11:54.
- Dioscorides (1996) *The Greek Herbal of Dioscorides* (Gunther RT, ed). Johannesburg, South Africa: Classics of Medicine Library.
- Djeungoue-Petga M, Hebert-Chatelain E (2017) Linking mitochondria and synaptic transmission: the CB1 receptor. *Bioessays* 39.
- Dowie M, Bradshaw H, Howard M, Nicholson L, Faull R, Hannan A, Glass M (2009) Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* 163:456–465.
- Dowie M, Howard M, Nicholson L, Faull R, Hannan A, Glass M (2010) Behavioural and molecular consequences of chronic cannabinoid treatment in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience* 170:324–336.
- Dunbar J, Hitchcock K, Latimer M, Rugg E, Ward N, Winn P (1992) Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus of the rat. II. Examination of eating and drinking, rotation, and reaching and grasping following unilateral ibotenate or quinolinate lesions. *Brain Res* 589:194–206.
- Escamilla-Ramírez A, García E, Palencia-Hernández G, Colín-González A, Galván-Arzate S, Túnez I, Sotelo J, Santamaría A (2017) URB597 and the cannabinoid WIN55,212-2 reduce behavioral and neurochemical deficits induced by MPTP in mice: Possible role of redox modulation and NMDA receptors. *Neurotox Res* 34:532–544.
- Esposito E, Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Cuzzocrea S (2012) Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PLoS One* 7.
- Fegley D, Gaetani S, Duranti A (2005) Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597). Effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 313:352–358.
- Fernández-Ruiz J (2009) The endocannabinoid system as a target of the treatment of motor dysfunction. *Br J Pharmacol* 156:1029–1040.

- Fernández-Ruiz J, Pazos M, García-Arencibia M, Sagredo O, Ramos J (2008) Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol Cell Endocrinol* 286:S91-96.
- Fernández-Ruiz J, Romero J, Ramos J (2015) Endocannabinoids and neurodegenerative disorders: Parkinson's disease, Huntington's chorea, Alzheimer's disease and others. *Handb Exp Pharmacol* 231:233–259.
- Ferrante R, Kowall N, Beal M, Richardson E, Bird E, Martin J (1985) Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* (80-) 230:561–563.
- Ferre P (2004) The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53:S43-50.
- Fišar Z, Singh N, Hroudová J (2014) Cannabinoid-induced changes in respiration of brain mitochondria. *Toxicol Lett* 231:62–71.
- Fisher E, Hayden M (2014) Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: prevalence and population at risk. *Mov Disord* 29:105–114.
- Freund T, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017–1066.
- Gado F, Digiacomio M, Macchia M, Bertini S, Manera C (2018) Traditional uses of cannabinoids and new perspectives in the treatment of Multiple Sclerosis. *Med* 5:91.
- Galve-Roperh I, Chiurchiú V, Díaz-Alonso J, Bari M, Guzmán M, Maccarrone M (2013) Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Prog Lipid Res* 52:633–650.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1971) The isolation and structure of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc* 93:217–224.
- García C, Palomo-Garo C, García-Arencibia M, Ramos J, Pertwee R, Fernández-Ruiz J (2011) Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease. *Brain J Pharmacol* 163:1495–1506.
- Garzón J, Torre-Madrid E, Rodríguez-Muñoz M, Vicente-Sánchez A, Sánchez-Blázquez P (2009) Gz mediates the long-lasting desensitization of brain CB1 receptors and is essential for cross-tolerance with morphine. *Mol Pain* 10:5–11.
- Gerdeman G, Lovinger D (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in

- rat dorsolateral striatum. *Journal Neurophysiol* 85:468–471.
- Gerdeman G, Lovinger D (2003) Emerging roles for endocannabinoids in long-term synaptic plasticity. *Br J Pharmacol* 140:781–789.
- Gerdeman G, Ronesi J, Lovinger D (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5:446–451.
- Gifford A, Bruneus M, Lin S, Goutopoulos A, Makriyannis A, Volkow N, Gatley S (1999) Potentiation of the action of anandamide on hippocampal slices by the fatty acid amide hydrolase inhibitor, palmitylsulphonyl fluoride (AM 374). *Eur J Pharmacol* 383:9–14.
- Glass C (2006) Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 116:556–560.
- Glass M, Faull R, Dragunow M (1993) Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neuroscience* 53:523–527.
- Goldberg Y, Kalchman M, Metzler M, Nasir J, Zeisler J, Graham R, Kolde H, O'Kusky J, Sharp A, Ross C, Jirik F, Hayden M (1996) Absence of disease phenotype and intergenerational stability of the CAG repeat in transgenic mice expressing the human Huntingtin disease transcript. *Hum Mol Genet* 5:177–185.
- González R, Woods R (2008) *Digital Image Processing*, 3rd ed, Pearson Prentice Hall, USA.
- Guillemin G, Wang L, Brew B (2005) Quinolinic acid selectively induces apoptosis of human astrocytes: potential role in AIDS dementia complex. *J Neuroinflammation*:2–16.
- Haller J, Varga B, Ledent C, Barna I, Freund T (2004) Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 19:1906–1912.
- Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah A, Goldenberg D, Horowitz M, Pertwee R, Ross R, Mechoulam R, Fride E (1999) HU-308: A specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci United States Am* 96:14228–14233.
- Harper P (1992) The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* 89:365–376.
- Harrison P, Weinberger D (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10:60–68.
- Hazen S, Zupan L, Weiss R, Getman D, Gross R (1991) Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A2. Mechanism-based discrimination between

- calcium-dependent and -independent phospholipases A2. *J Biol Chem* 266:7227–7232.
- Herkenham M, Lynn A, de Costa B, Richfield E (1991) Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 547:267–274.
- Hermanson DJ, Hartley ND, Gamble-George J, Briwn N, Shonesy BC, Kingsley PJ, Colbran RJ, Reese J, Marnett LJ, Patel S (2013) Substrate-selective COX-2 Inhibition Decreases Anxiety Via Endocannabinoid Activation. *Nat Neurosci* 16:1291–1298.
- Hillard C, Wilkison D, Edgemond W, Campbell W (1995) Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1257:249–256.
- Hohmann A, Suplita R, Bolton N, Neely M, Fegley D, Mangieri R, Krey J, Walker J, Holmes P, Crystal J, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435:1108–1112.
- Holley S, Joshi P, Parievsky A, Galvan L, Chen J, Fisher Y, Huynh M, Cepeda C, Levine M (2015) Enhanced GABAergic inputs contribute to functional alterations of cholinergic interneurons in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *eNeuro* 2:e0008.
- Howlett A, Abood M (2017) CB1 and CB2 receptor pharmacology. *Adv Pharmacol* 80:169–206.
- Huitron-Resendiz S, Gombart L, Cravatt B, Henriksen S (2001) Effect of oleamide on sleep and its relationship to blood pressure, body temperature, and locomotor activity in rats. *Exp Neurol* 172:235–243.
- Huntington G (1872) On chorea. *Med Surg Report* 26:320–321.
- Ina H, YiMei Y, Jeffrey H, Brady S, Morfini G (2011) Differential vulnerability of specific cell populations in HD and its relationship to morphological and biochemical characteristics. *J Neurochem* 113:1073–1091.
- Iversen L (2000) *The science of marijuana*. Oxford Univ Press.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89:309–380.
- Karila L, Benyamina A, Blecha L, Cottencin O, Billieux J (2016) The synthetic cannabinoids phenomenon. *Curr Pharm Des* 22:6420–6425.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G,

- Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9:76–81.
- Kay C, Hayden R, Leavitt B (2017) Epidemiology of Huntington disease. *Handb Clin Neurol* 144:31–46.
- Keimpema E, Mackie K, Harkany T (2011) Molecular model of cannabis sensitivity in developing neuronal circuits. *Trends Pharmacol Sci* 32:551–561.
- Kendall D, Yudowski G (2016) Cannabinoid receptors in the Central Nervous System: their signaling and roles in disease. *Front Cell Neurosci* 10:294.
- Kerr S, Armati P, Guillemin G, Brew B (1998) Chronic exposure of human neurons to quinolinic acid results in neuronal changes consistent with AIDS dementia complex. *AIDS* 5:355–363.
- Knott A, Bossy-Wetzel E (2009) Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal* 11:541–554.
- Kogan NM, Mechoulam R (2007) Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci* 9:413–430.
- Kravitz A, Tye L, Kreitzer A (2012) Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 15:816–818.
- Kremer B, Goldberg P, Andrew S, Thellmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Lin B, Bassett A, Almqvist E (1994) A worldwide study of the Huntington's disease mutation: the sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* 330:1401–1406.
- Kumar U, Grant M (2010) Somatostatin and somatostatin receptors. *Results Probl Cell Differ* 50:137–184.
- Lam P, Marczyklo T, Konje J (2010) Simultaneous measurement of three N-acyl ethanolamides in human bio-matrices using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 398:2089–2097.
- Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos J, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 19:96–107.
- Leishman E, Murphy M, Murphy M, Mackie K, Bradshaw H (2018) Broad and region-specific impacts of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in adolescent and adult female mouse brain.

Front Mol Neurosci 11:436.

- Lelos M, Dunnet S (2018) Generating excitotoxic lesion models of Huntington's disease. In: *Methods in molecular biology*, pp 209–220.
- Lenman A, Fowler C (2007) Interaction of ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma with the endocannabinoid system. *Br J Pharmacol* 151:1343–1351.
- Li Q, Yan H, Wilson W, Swartzwelder H (2010) Modulation of NMDA and AMPA-mediated synaptic transmission by CB1 receptors in frontal cortical pyramidal cells. *Brain Res* 25:127–137.
- Lodola A, Mor M, Hermann J, Tarzia G, Piomelli D, Mulholland A (2005) QM/MM modelling of oleamide hydrolysis in fatty acid amide hydrolase (FAAH) reveals a new mechanism of nucleophile activation. *Chem Commun (Camb)* 21:4399–4401.
- Lovinger D, Mathur B (2012) Endocannabinoids in striatal plasticity. *Park Relat Disord* 18:S132–134.
- Lugo-Huitrón R, Ugalde-Muñiz P, Pineda B, Pedraza-Chaverrí J, Ríos C, Pérez-De La Cruz V (2013) Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev* 104024.
- Maat-Kievit A, Helderma-van den Enden P, Losekoot M (2001) Using a roster and haplotyping is useful in risk assessment for persons with intermediate and reduced penetrance alleles in Huntington disease. *Am J Med Genet* 105:737–744.
- Mackie K (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In: *Cannabinoids Handbook of experimental pharmacology* (RG P, ed), pp 299–323. Berlin: Springer.
- Makara J, Mor M, Fegley D, Szabó S, Kathuria S, Astarita G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Rivara S, Freund T, Piomelli D (2005) Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nat Neurosci* 8:1139–1141.
- Malek N, Kucharczyk M, Starowicz K (2014) Alterations in the anandamide metabolism in the development of neuropathic pain. *Biomed Res Int*.
- Manera C, Arena C, Chicca A (2016) Synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists: implication in CNS disorders. *Recent Pat CNS Drug Discov* 10:142–156.

- Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C (2002) Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem* 80:448–456.
- Martinotti G, Santacrose R, Papanti D, Elgharably Y, Prilutskaya M, Corazza O (2017) Synthetic cannabinoids: Pharmacology, clinical aspects, psychotic onset. *CNS Neurological Disord Drug Targets* 16:567–575.
- Matsuda L, Lolait S, Brownstein M, Young A, Bonner T (1990) Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561–564.
- Maya-López M, Colín-González A, Aguilera G, de Lima M, Colpo-Ceolin A, Rangel-López E, Villeda-Hernández J, Rembao-Bojórquez D, Túnez I, Luna-López A, Lazzarini-Lechiga R, González-Puertos V, Posadas-Rodríguez P, Silva-Palacios A, Königsberg M, Santamaría A (2017a) Neuroprotective effect of WIN55,212-2 against 3-nitropropionic acid-induced toxicity in the rat brain: involvement of CB1 and NMDA receptors. *Am J Translational Res* 9:261–274.
- Maya-López M, Ruiz-Contreras H, de Jesús Negrete-Ruiz M, Martínez-Sánchez J, Benítez-Valenzuela J, Colín-González A, Villeda-Hernández J, Sánchez-Chapul L, Parra-Cid C, Rangel-López E, Santamaría A (2017b) URB597 reduces biochemical, behavioral and morphological alterations in two neurotoxic models in rats. *Biomed Pharmacother* 88:745–753.
- McGarry A, Biglan K (2017) Preclinical motor manifestations of Huntington disease. *Handb Clin Neurol* 144:93–98.
- McLin J, Thompson L, Steward O (2006) Differential susceptibility to striatal neurodegeneration induced by quinolinic acid and kainate in inbred, outbred and hybrid mouse strains. *Eur J Neurosci* 24:3134–3140.
- Mecha M, Carrillo-Salinas F, Feliú A, Mestre L, Guaza C (2016) Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 166:40–55.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminsky N, Schatz A, Gopher A, Almog S, Martin B, Compton D (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83–90.
- Metna-Laurent M, Marsicano G (2015) Rising stars: modulation of brain functions by astroglial type-1 cannabinoid receptors. *Glia* 2 63:353–364.

- Mueller GP, Driscoll WJ (2009) Biosynthesis of Oleamide, 1st ed. Elsevier Inc.
- Murillo-Rodríguez E, Giordano M, Cabeza R, Henriksen S, Mendez Díaz M, Navarro L, Prospero-García O (2001) Oleamide modulates memory in rats. *Neurosci Lett* 313:61–64.
- Nagasawa K, Chiba H, Fujita H, Kojima T, Saito T, Endo T, Sawada N (2006) Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *J Cell Physiol* 208:123–132.
- Nam H, Na E, Lee E, Kwon Y, Kim H (2017) Antiepileptic and neuroprotective effects of oleamide in rat striatum on kainate-induced behavioral seizure and excitotoxic damage via calpain inhibition. *Front Pharmacol* 8:817.
- Navarrete M, Diez A, Araque A (2014) Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 369:20130599.
- O’Sullivan S (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 152:576–582.
- Pacher P, Kunos G (2013) Modulating the endocannabinoid system in human health and disease--successes and failures. *FEBS J* 280:1918–1943.
- Palazuelos J, Aguado T, Pazos M, 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* 132:3152–3164.
- Panlilio L V, Justinova Z, Goldberg SR (2010) Animal models of cannabinoid reward. *Br J Pharmacol* 160:499–510.
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. Academic Press.
- Pazos MR, Sagredo O, Fernández-Ruiz J (2008) The Endocannabinoid System in Huntington’s Disease. *Curr Pharm Des* 14:2317–2325.
- Pelicaio R, Santos M, Freitas-Lima L, Meyrelles S, Vasquez E, Nakamura-Palacios E, Rodrigues L (2016) URB597 inhibits oxidative stress induced by alcohol binging in the prefrontal cortex of adolescent rats. *Neurosci Lett* 15:17–22.
- Pellegrini-Giampietro D, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F (1988) Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free radical formation. *J Neurochem* 51:1960–1963.

- Pérez-De La Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A (2012) Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int J Tryptophan Res* 5:1–8.
- Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos O, Pérez-Severiano F, Ali S, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A (2005) Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III). *Neuroscience* 135:463–474.
- Pérez-De La Cruz V, Konigsberg M, Santamaría A (2007) Kynurenine Pathway and Disease: An Overview. *CNS Neurol Dis Drug Targets* 6:398–410.
- Petit H, Salomez J (1985) Huntington's disease. Contribution of clinical and epidemiological data to genetic counseling. *J Genet Hum* 33:91–102.
- Pintor A, Tebano M, Martire A, Grieco R, Galluzzo M, Scattoni M, Pezzola A, Coccorello R, Felici F, Cuomo V, Piomelli D, Calamandrei G, Popoli P (2006) The cannabinoid receptor agonist WIN 55.212-2 attenuates the effects induced by quinolinic acid in the rat striatum. *Neuropharmacology* 51:1004–1012.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873–884.
- Piomelli D, Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Mor M, Compton T, Dasse O, Monaghan E, Parrot J, Putman D (2006) Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev* 12:21–38.
- Platenik J, Stopka P, Vejrazka M (2001) Quinolinic acid-iron (II) complexes: slow autooxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the Fenton reaction. *Free Radic Res* 34:445–459.
- Punnett R (1908) Mendelism in relation to disease. *Proc R Soc Med* 1:135–168.
- Qin Y, Soghomonian J, Chesselet M (1992) Effects of quinolinic acid on messenger RNAs encoding somatostatin and glutamic acid decarboxylases in the striatum of adult rats. *Exp Neurol* 115:200–211.
- Quintanilla R, Johnson G (2009) Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. *Brain Res Bull* 80:242–247.

- Ramaswamy S, McBride J, Kordower J (2007) Animal models of Huntington's disease. *ILAR J* 48:356–373.
- Rangel-López E, Colín-González A, Paz-Loyola A, Pinzón E, Torres I, Serratos I, Castellanos P, Wajner M, Souza D, 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.
- Reyes-Cabello C, Alen F, Gómez R, Serrano A, Rivera P, Orio L, Rodríguez de Fonseca F, Pavón F (2012) Effects of the anandamide uptake blocker AM404 on food intake depend on feeding status and route of administration. *Pharmacol Biochem Behav* 101:1–7.
- Richfield E, Henkenham M (1994) Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann Neurol* 36:577–584.
- Rikani A, Choudhry Z, Choudhry A, Rizvi N, Ikram H, Mobassarrah N, Tulli S (2014) The mechanism of degeneration of striatal neuronal subtypes in Huntington disease. *Ann Neurosci* 21:112–114.
- Rios C, Santamaría A (1991) Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res* 16:1139–1143.
- Robson P (2014) Therapeutic potential of cannabinoid medicines. *Drug Test Anal* 6:24–30.
- Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado P, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría A (2000a) Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 858:436–439.
- Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado P, Pedraza-CHaverrí J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría S (2000b) Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 858:436–439.
- Rodríguez-Muños M, Sánchez-Blázquez P, Merlos M, Garzón-Niño J (2016) Endocannabinoid control of glutamate NMDA receptors: the therapeutic potential and consequences of dysfunction. *Oncotarget* 34:55840–55862.
- Rodríguez-Muñoz M, Cortés-Montero E, Pozo-Rodríguez A, Sánchez-Blázquez P, Garzón-Niño J (2015) The ON:OFF switch, σ 1R-HINT1 protein, controls GPCR-NMDA receptor cross-regulation: Implications in neurological disorders. *Oncotarget* 6:35458–35477.

- Sagredo O, Pazos M, Valdeolivas S, Fernandez-Ruiz J (2012) Cannabinoids: novel medicines for the treatment of Huntington's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov* 7:41–48.
- Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Garzón J (2014) The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction: implications in psychosis and schizophrenia. *Front Pharmacol* 4:169.
- Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Vicente-Sánchez A, Garzón J (2013) Cannabinoid receptors couple to NMDA receptors to reduce the production of NO and the mobilization of Zinc induced by glutamate. *Antioxid Redox Signal* 15:1766–1782.
- Santamaría A, Jiménez-Capdeville M, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S (2001) In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12:2693–2696.
- Santamaría A, Salvatierra-Sánchez R, Vázquez-Román B, Santiago-López D, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Jiménez-Capdeville M, Syed F (2003) Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem* 86:479–488.
- Santana-Martínez R, Galván-Arzate S, Hernández-Pando R, Chánez-Cárdenaz M, Avila-Chávez E, López-Acosta G, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A, Maldonado P (2014) Sulphoraphane reduces the alterations induced by quinolinic acid: modulation of glutathione levels. *Neuroscience* 272:188–198.
- Schmid P, Zuzarte-Agustin M, Schmid H (1985) Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. *J Biol Chem* 260:14145–14149.
- Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar K, Muchowski P (2010) Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 90:230–245.
- Schwarcz R, Pellicari R (2002) Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *Ther J Pharmacol Exp* 303:1–10.
- Schwarcz R, Whetsell WJ, Mangano R (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* (80-):316–318.
- Scotter EL, Goodfellow CE, Graham ES, Dragunow M, Glass M (2010) Neuroprotective potential of CB1 receptor agonists in an vivo model of Huntington's disease. *Brain J Pharmacol* 160:747–761.

- Sensi S, Paoletti O, Bush A, Sekler I (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci* 10:780–791.
- Sharkey K, Wiley J (2016) Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology. *Gastroenterology* 151:252–266.
- Sharma C, Long J, Shah S, Rahman J, Perrett D, Ayoub S, Menta V (2017) First evidence of the conversion of paracetamol to AM404 in human cerebrospinal fluid. *J Pain Res* 10:2703–2709.
- Shaughnessy W (1840) On the cannabis indica or Indian hemp. *Br Foreign Med Rev* 10:225–228.
- Sipilä J, Hietala M, Siitonen A, Päivärinta M, Majamaa K (2014) Epidemiology of Huntington's disease in Finland. *Park Relat Disord* 21:46–49.
- SiuYu Leung D, Unsicker K, Reuss B (2001) Gap junctions modulate survival-promoting effects of fibroblast growth factor-2 in cultured midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 18:44–55.
- Sommer C, Schomacher M, Berger C, Kuhnert K, Müller H, Schwab S, Schäbitz W (2006) Neuroprotective cannabinoid receptor antagonist SR141716A prevents downregulation of excitotoxic NMDA receptors in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathol* 112:277–286.
- Staub P, Casu L, Leonti M (2016) Back to the roots: A quantitative survey of herbal drugs in Dioscorides' *De Materia Medica* (ex Mattioli, 1568). *Phytomedicine* 23:1043–1052.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89–97.
- Sveinsson O, Halldorsson S, Olafsson E (2012) An unusually low prevalence of Huntington's disease in Iceland. *Eur Neurol* 68:48–51.
- Tabrizi M, Baraldi P, Baraldi S, Ruggiero E, De Stefano L, Rizzolio F, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Chicca A, Lapillo M, Gertsch J, Manera C, Macchia M, Martinelli A, Granchi C, Minutolo F, Tuccinardi T (2018) Discovery of 1,5-diphenylpyrazole-3-carboxamide derivatives as potent, reversible, and selective monoacylglycerol lipase (MAGL) inhibitors. *J Med Chem* 61:1340–1354.
- Tai Y, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi S, Barker R, Brooks D, Piccini P (2007) Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain* 130:1759–1766.

- Tecuapetla F, Jin X, Lima S, Costa R (2016) Complementary contributions of striatal projection pathways to action inaction and execution. *Cell* 166:703–715.
- TOCRIS (2016) URB597 Certificate of Analysis. Catalog No. 4612. Batch No.: 1.
- Trigo-Damas I, Del Rey N, Blesa J (2018) Novel models for Parkinson's disease and their impact on future drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 13:229–239.
- Turner S, Williams C, Iversen L, Whalley B (2017) Molecular pharmacology of phytocannabinoids. *Prog Chem Org Nat Prod* 103:61–101.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukuya M, Katona I, Kano M, Watanabe M (2007) Subcellular arrangement of molecules of 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci* 27:3663–3676.
- Ulgol A (2014) The endocannabinoid system as a potential therapeutic target for pain modulation. *Balk Med J* 31:115–120.
- Valdeolivas S, Navarrete C, Cantarero I, Bellido M, Muñoz E, Sagredo O (2014) Neuroprotective properties of cannabigerol in Huntington's disease: Studies in R6/2 mice and 3-Nitropropionate-lesioned mice. *Neurotherapeutics* 12:185–199.
- Valdeolivas S, Pazos M, Bisogno T, Piscitelli F, Iannotti F, Allará M, Sagredo O, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J (2013) The inhibition of 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) biosynthesis, rather than enhancing striatal damage, protects striatal neurons from malonate-induced death: a potential role of cyclooxygenase-2-dependent metabolism of 2-AG. *Cell Death Dis* 4:e862.
- Vicente A, Galvao-Ferrerira P, Tecuapetla F, Costa R (2016) Direct and indirect dorsolateral striatum pathways reinforce different action strategies. *Curr Biol* 26:R267-269.
- Wendt C, Drohm D (1972) Die huntingtonsche Chorea. Eine populations-genetische Studie. Thieme, Stuttgart.
- Wexler N et al. (2004) Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3498–3503.
- Yin H, Mulcare S, Hilario M, Clouse E, Holloway T, Davis M, Hansson A, Lovinger D, Costa R (2006) Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci* 12:333–341.
- Zhuang S, Bridges D, Grigorenko E, McCloud S, Boon A, Hampson R (2005) Cannabinoids

produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. *Neuropharmacology* 48:1086–1096.

Zou S, Kumar U (n.d.) Somatostatin and cannabinoid receptors crosstalk in protection of huntingtin knock-in striatal neuronal cells in response to quinolinic acid. Ahead of print.

16. PUBLICACIONES



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00114

Matrícula: 2153805828

Estudio de los efectos del URB597 en un modelo preclínico de la enfermedad de Huntington en ratas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 20 del mes de septiembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MARQUEZ
DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL
DRA. VERONICA GUARNER LANS
DRA. ANAHI CHAVARRIA KRAUSER



GABRIELA AGUILERA PORTILLO
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: GABRIELA AGUILERA PORTILLO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. MARIA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MARQUEZ

VOCAL

DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL

VOCAL

DRA. VERONICA GUARNER LANS

SECRETARIA

DRA. ANAHI CHAVARRIA KRAUSER