



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

**UNIDAD XOCHIMILCO**

**Nombre y matrícula del alumno:** Karin Jhonatan Antonio Moran, 2142034224.

**Lugar y periodo de realización:** Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, del 28 de enero de 2019 al 27 de julio de 2019.

**Unidad, División y Licenciatura:** Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica.

**Nombre del plan, programa o proyecto en el que se participó:** Efecto antioxidante y antiapoptótico en el tratamiento con WIN en un modelo traumático de médula espinal en rata.

**Nombre de los asesores:** Asesor interno, Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda y asesor externo, Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Lesión medular

La lesión de la médula espinal (LME) es una causa importante de discapacidad en todo el mundo. Su resultado clínico depende principalmente de la extensión del daño inicial. La LME son el resultado de algún tipo de contusión, compresión, estiramiento o laceración de la columna, siendo las lesiones contusivas/compresivas más frecuentes para ocasionar una columna vertebral fracturada o dislocada. Sin embargo, el daño al cordón no solo es el resultado del trauma inicial, sino también una consecuencia de la cascada de eventos celulares y moleculares que ocurren durante los primeros minutos o días después de la lesión (Hall & Springer, 2004). Esta compleja lesión secundaria es un determinante importante de la extensión final de la lesión y puede ser el primer objetivo para una intervención terapéutica después de la LME. De hecho, muchos estudios preclínicos y la mayoría de los ensayos clínicos para LME tienen como objetivo limitar la lesión secundaria para prevenir la pérdida de la función neurológica y proporcionar el sustrato anatómico para una reparación adicional (Cadotte & Fehlings, 2011). Por ejemplo, varias estrategias terapéuticas experimentales están dirigidas a interferir con todos los eventos relacionados con hipoxia/isquemia y el posterior agotamiento de ATP, el mal funcionamiento de las bombas de iones, acumulación de calcio intracelular y, finalmente, excitotoxicidad. Pero no todos los eventos desencadenados después de LME están involucrados en el aumento de la lesión. Por el contrario, algunas respuestas endógenas podrían contrarrestar los eventos perjudiciales y fomentarlos podría ser útil para reducir la lesión secundaria (Arevalo-Martin *et al.*, 2012).

La LME es un trastorno grave que provoca una serie de disfunciones neurológicas. La lesión traumática de medula se ha clasificado en lesión primaria y lesión secundaria. La lesión primaria es causada por el impacto mecánico directo en la zona lesionada de la médula espinal, mientras que la lesión secundaria es el resultado de una serie de alteraciones fisiopatológicas complejas (Beattie, 2004; Oyinbo, 2011). Como se mencionó, después de la

lesión mecánica primaria, se produce un período tardío y prolongado de daño secundario, que involucra una serie de eventos fisiopatológicos y bioquímicos destructivos. Entre ellos, la falla energética (Torres *et al.*, 2010), la excitotoxicidad (Park, E., Velumian & Fehlings, 2004), el estrés oxidativo (Diaz-Ruiz *et al.*, 1999), la respuesta inflamatoria (Hausmann, 2003) y la muerte celular programada o apoptosis son los mecanismos principales (Beattie *et al.*, 2002). Numerosos estudios han proporcionado pruebas convincentes de que la apoptosis está presente en las neuronas, oligodendroglia y microglia después de LME, lo que lleva a un deterioro neurológico (Yip & Malaspina, 2012).

En base a esta información, se ha propuesto que la prevención de la apoptosis después de una lesión de la médula espinal podría ser un objetivo clave para prevenir el daño del tejido de la médula espinal y promover una función motora mejorada después de la LME (Ríos *et al.*, 2015).

## **1.2. Farmacología Cannabinoide**

### ***1.2.1. Agentes cannabimiméticos derivados de plantas y sintéticos***

La ingestión de preparaciones de *Cannabis sativa* como la marihuana (hojas y cimas florecientes) o ganja (resina) produce una intoxicación caracterizada por la sedación, disfunción cognitiva, incapacidad para consolidar la memoria a corto plazo, alteración en la noción del tiempo, cambios en la percepción, así como la falta de coordinación motora (Abood & Martin, 1992; Dewey, 1986; Pertwee, 1988).

La farmacología del receptor de cannabinoides como la conocemos hoy en día comenzó hace más de 40 años cuando  $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Fig. 1) fue aislado y sintetizado por el laboratorio de Mechoulam, y demostró ser el principal componente psicoactivo de la marihuana (Mechoulam *et al.*, 1967; Mechoulam & Gaoni, 1967).

Otros compuestos cannabinoides, incluidos el cannabinal y el cannabidiol, no logran los mismos efectos psicoactivos que el  $\Delta^9$ -THC, pero pueden exhibir actividad anticonvulsiva e inducir enzimas metabólicas hepáticas (Aguirell *et al.*, 1986; Hollister, 1986; Bornheim *et al.*, 1993). Se han sintetizado y probado una serie abundante de análogos de cannabinoides en

modelos animales para detectar comportamientos que incluyen disfunción motora e hipoactividad, inmovilidad, hipotermia, antinocicepción y déficits en la memoria y la cognición (Martin, 1986; Compton *et al.*, 1993; Pertwee, 1999; Howlett *et al.*, 1995). Algunos de estos cannabinoides sintéticos, como el CP55940 (Fig. 1) han proporcionado valiosas herramientas de investigación para el estudio de los mecanismos de la actividad del receptor de cannabinoides. Sterling Research Institute descubrió una nueva clase de analgésicos aminoalquilindol que actuaban como agonistas en el receptor de cannabinoides en el cerebro, siendo WIN 55212-2 el prototipo (Compton *et al.*, 1992; Pacheco *et al.*, 1991). Estos efectos se han atribuido a la activación del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, un receptor acoplado a la proteína G que se encuentra abundantemente en el cerebro. Los efectos de la función inmune del Δ<sup>9</sup>-THC se han atribuido al receptor cannabinoide CB<sub>2</sub>, también acoplado a proteínas G, que se encuentran predominantemente en las células inmunes (Howlett *et al.*, 2002).

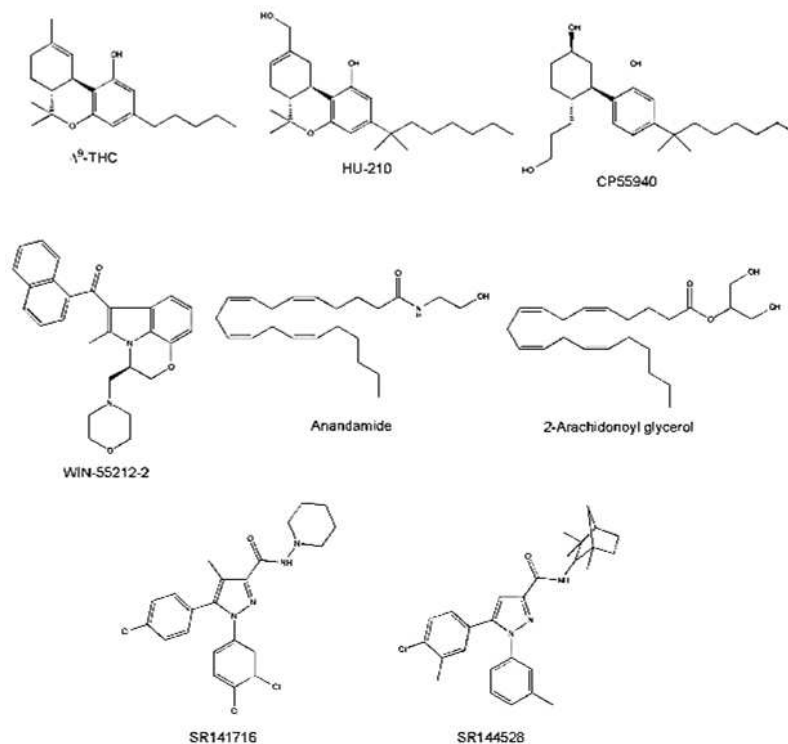


Fig. 1. Estructuras de los agonistas, antagonistas y agonistas endógenos del receptor cannabinoide.

## 1.2.2 Localización de los receptores cannabinoides

### 1.2.2.1. Distribución de los receptores CB<sub>1</sub>

Los receptores CB<sub>1</sub> se encuentran entre los receptores acoplados a proteínas G más abundantes en el cerebro, sus densidades son similares a los niveles de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y los canales iónicos activados por glutamato. Miles Herkenham describió por primera vez la distribución de los receptores de cannabinoides en el sistema nervioso central en un estudio histórico que utiliza autorradiografía cuantitativa de receptores in vitro con el radioligando [<sup>3</sup>H] CP55940 (Herkenham *et al.*, 1991).

La distribución de los receptores CB<sub>1</sub> es altamente heterogénea con las densidades más altas de receptores presentes en los núcleos de salida de los ganglios basales, la sustancia negra de los pares reticulados y los segmentos internos y externos del globo pálido. Además, están presentes niveles muy altos de unión en el hipocampo, particularmente dentro del giro dentado, así como en la capa molecular del cerebelo. Por el contrario, hay pocos receptores CB<sub>1</sub> en el tronco encefálico que pueden explicar la falta de toxicidad asociada con dosis muy altas de  $\Delta^9$ -THC u otros ligandos cannabinoides.

Sin embargo, la distribución por sí sola no puede establecer la importancia funcional de los receptores CB<sub>1</sub>, ni cómo las acciones de varios ligandos cannabinoides, tanto exógenos como endógenos, en estos receptores se traducen en comportamiento. Un enfoque para esta pregunta ha sido el uso de métodos de neuroimagen para medir la actividad funcional en el sistema nervioso central (SNC). Dada la distribución generalizada de los receptores CB<sub>1</sub>, y la variedad de efectos farmacológicos, fisiológicos y conductuales atribuidos a los medicamentos cannabinoides, los métodos de neuroimagen de todo el cerebro son particularmente adecuados para identificar el papel funcional de estos receptores. En algunos de los primeros y más simples estudios, se estableció que la administración de  $\Delta^9$ -THC y otros ligandos cannabinoides produjeron alteraciones generalizadas dependientes de la dosis en la función cerebral en los ganglios basales, el hipocampo (Fig. 2), cerebelo, amígdala y cuerpo estriado (Margulies & Hammer Jr., 1991; Bloom *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998; Freedland *et al.*, 2002).

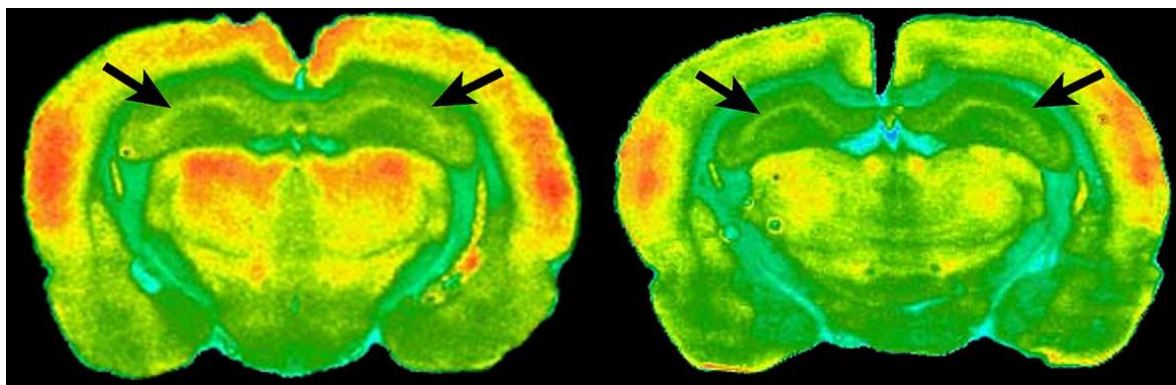


Fig. 2. Se muestran transformaciones codificadas por colores de autorradiogramas de secciones coronales de cerebro de rata a nivel del hipocampo. Cada color representa un rango de tasas de utilización local de glucosa cerebral ( $\mu\text{mol} / 100 \text{ g} / \text{min}$ ).

#### **1.2.2.2. Distribución de los receptores $\text{CB}_2$**

El ARNm del receptor  $\text{CB}_2$  se ha encontrado en el bazo, las amígdalas y el timo, que son los principales tejidos de la producción y regulación de las células inmunes (Howlett *et al.*, 2002; Cabral & Dove Pettit, 1998). El ARNm de  $\text{CB}_2$  se ha localizado en linfocitos B y T, células NK, monocitos, macrófagos y células microgliales, mastocitos, así como modelos de células cultivadas de estas células inmunes. Los agonistas  $\text{CB}_2$  generalmente suprimen la función de estas células, pero tanto los receptores  $\text{CB}_1$  como  $\text{CB}_2$  podrían contribuir a estos efectos (Cabral & Dove Pettit, 1998).

#### **1.2.3. Mecanismos de transducción de señales de los receptores cannabinoides**

Los receptores cannabinoides  $\text{CB}_1$  y  $\text{CB}_2$  son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, por lo que las propiedades de transducción de señales de estos receptores están mediadas por el proceso de activación de proteínas G. El uso de ensayos de transducción de señal específicos fue un punto de inflexión crítico en la identificación de receptores cannabinoides específicos. Después de muchos años de especulación, la existencia de receptores de cannabinoides se confirmó cuando Howlett y sus colegas mostraron que los cannabinoides disminuyeron el cAMP en cultivos de células de

neuroblastoma de una manera sensible a la toxina pertussis (PT), lo que sugiere la mediación por un receptor acoplado a  $G_{i/o}$ .

#### **1.2.3.1. Efectores acoplados al receptor cannabinoides**

La activación del receptor cannabinoide de las proteínas G influye en múltiples sistemas efectores. La inhibición cannabinoide de la adenilil ciclasa se ha demostrado en varios tipos de células y en membranas cerebrales (Bayewitch *et al.*, 1995; Felder *et al.*, 1995; Slipetz *et al.*, 1995; Bidaut-Russell *et al.*, 1990; Childers *et al.*, 1993).

En términos generales, la farmacología de la adenilil ciclasa inhibida por cannabinoides coincide con la de la unión al receptor de cannabinoides (Pacheco *et al.*, 1991), incluido el antagonismo competitivo por Rimonabant (Felder *et al.*, 1995).

Al igual que con otros receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$ , la activación de los receptores  $CB_1$  disminuye la conductancia de  $Ca^{2+}$  y aumenta la conductancia de  $K^+$  (Caulfield & Brown, 1992; Mackie *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1996; Mackie *et al.*, 1995). Estos efectos sobre los canales de  $Ca^{2+}$  y los canales de  $K^+$  rectificadores hacia adentro acoplados a proteínas G (GIRK), se deben al acoplamiento directo por las proteínas G e independientes de cAMP (Henry & Chavkin, 1995).

Además de los canales iónicos, otros efectores acoplados a la proteína G se han asociado con los receptores de cannabinoides; la más conocida es la liberación de ácido araquidónico inducida por cannabinoides, observada en varios sistemas de cultivo celular y mediada tanto por la actividad de la fosfolipasa como por las proteínas G (Burstein *et al.*, 1991).

Los medicamentos cannabinoides que actúan a través de los receptores  $CB_1$  y  $CB_2$  activan la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP) e inducen la expresión de Krox-24, presumiblemente mediante la activación de las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína G (Bouaboula *et al.*, 1996). Estos hallazgos ilustran el concepto básico de que los receptores acoplados a la proteína G pueden operar a través de varios efectores diferentes, y cada sistema efector puede estar diseñado para propósitos específicos.

#### **1.2.4. Acción relacionada con la activación del receptor CB<sub>1</sub>**

La estructura y expresión funcional del receptor CB<sub>1</sub> fue descrita por primera vez por Matsuda *et al.*, 1990. Desde el descubrimiento del receptor CB<sub>1</sub>, se ha descrito su localización en el SNC (mediante autorradiografía con radioligando, hibridación *in situ* e inmunocitoquímica), en la corteza, el cuerpo estriado, el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo, el cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal. tanto roedores como humanos (Herkenham *et al.*, 1991; Tsou *et al.*, 1998; Egertova & Elphick, 2000; Moldrich & Wenger, 2000). La activación de los receptores CB<sub>1</sub> representa el mecanismo de señalización predominante para los cannabinoides endógenos y exógenos en el cerebro y la médula espinal.

La activación de CB<sub>1</sub> influye no solo en la homeostasis intracelular, sino también en la comunicación intercelular, y la modulación de la liberación de neurotransmisores es una consecuencia importante. Varios estudios indican que la activación de CB<sub>1</sub> disminuye la liberación de glutamato, un neurotransmisor prominente en la neurodegeneración.

También se ha demostrado que los cannabinoides inhiben la transmisión GABAérgica en varias áreas del cerebro (Szabo *et al.*, 1998; Katona *et al.*, 1999; Hoffman & Lupica, 2000; Takahashi & Linden, 2000). La liberación de óxido nítrico (NO), que desempeña un papel clave en los procesos neurodegenerativos, se ve nuevamente afectada por el sistema cannabinoide, con los cannabinoides que inhiben la producción de NO en la microglía, los astrocitos, las neuronas y macrófagos (Waksman *et al.*, 1999; Coffey *et al.*, 1996).

#### **1.2.5. Acción relacionada con la activación del receptor CB<sub>2</sub>**

Teniendo en cuenta que la inflamación juega un papel importante en la patología de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, sería ventajosa la capacidad de controlar el grado de reacción inflamatoria. La posible participación del receptor CB<sub>2</sub> en este proceso puede representar un mecanismo por el cual se podría lograr una intervención terapéutica (Grundy *et al.*, 2001). En comparación con las vías de señalización del receptor CB<sub>1</sub>, las del receptor CB<sub>2</sub> se han investigado menos a fondo (Fig. 3), mientras que se ha



prestado mucha atención al control que ejerce sobre la interacción de las células inmunes y la producción de citocinas.

Hay poca evidencia de la presencia del receptor CB<sub>2</sub> en el SNC. Skaper *et al.*, 1996, informaron que el receptor CB<sub>2</sub> se expresa en las células granulares y las células de Purkinje del cerebelo. Más recientemente, utilizando la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), se ha observado inmunoreactividad CB<sub>2</sub> en neuronas aisladas de los ganglios de la raíz dorsal y la línea celular F-11, un hibridoma de ganglio de la raíz dorsal x neuroblastoma (Ross *et al.*, 2001). El ARNm del receptor CB<sub>2</sub> también se ha detectado en cultivos de células microgliales de rata, donde se ha demostrado que está acoplado negativamente a la actividad adenilil ciclasa (Kearn & Hillard, 1997). Este resultado es intrigante ya que sugiere la posibilidad de que los cannabinoides puedan afectar la función microglial en el SNC.

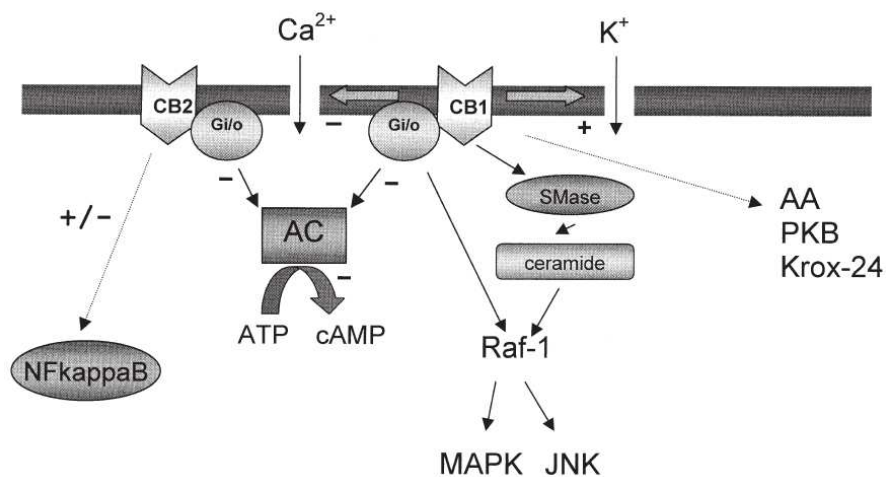


Fig. 3. Mecanismos de señalización del receptor cannabinoide. Los cannabinoides endógenos y exógenos activan los receptores cannabinoide ubicados en la membrana plasmática.

### 1.2.6. WIN 55212-2

En los años 90, la empresa Sterling Winthrop desarrolló el WIN 55212-2, un aminoalquilindol con una potente afinidad tanto por el receptor CB<sub>1</sub> como por el receptor CB<sub>2</sub>. La familia de los aminoalquilindoles incluye moléculas cuya estructura química deriva

del analgésico pravadolina, es decir, no están relacionados estructuralmente con los cannabinoides clásicos, pero muestran un perfil farmacológico cannabimimético.

WIN 55212-2, un agonista para los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, se ha demostrado con la capacidad de inhibir la infiltración de neutrófilos y la producción de citocinas proinflamatorias en trastornos neurológicos como la esclerosis múltiple (Arévalo-Martín *et al.*, 2008; Di Marzo, 2008). Además, se observa que WIN 55212-2 puede atenuar el dolor neuropático después de la LME inducida por compresión (Hama & Sagen, 2007). Sin embargo, aún se desconoce si el tratamiento de WIN 55212-2 mejoraría la recuperación funcional al reducir directamente la apoptosis y la inflamación después de una LME traumática.

### **1.3. Apoptosis**

La apoptosis es un tipo de muerte celular regulada por una serie de cascadas de señal en ciertas situaciones. Desempeña un papel esencial en la regulación del crecimiento, el desarrollo y la respuesta inmune, y en la eliminación de células redundantes o anormales en los organismos. También es una forma importante por la cual los organismos pueden mantener una cantidad constante de células para vivir con éxito. La inducción y ejecución de la apoptosis requiere la cooperación de una serie de moléculas que incluyen moléculas de señal, receptores, enzimas y proteínas reguladoras de genes. Entre ellos, el sistema de señalización de caspasa-cascada, regulado por diversas moléculas como el inhibidor de la proteína de apoptosis (IAP), las proteínas de la familia Bcl-2 y la calpaína, es vital en el proceso de apoptosis (Launay *et al.*, 2005).

La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento y como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones celulares en los tejidos. La apoptosis también ocurre como un mecanismo de defensa como en las reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos (Norbury & Hickson, 2001). Aunque existe una amplia variedad de estímulos y afecciones, tanto fisiológicas como patológicas, que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células morirán necesariamente en respuesta al mismo estímulo.

Algunas células expresan receptores Fas o TNF que pueden conducir a la apoptosis a través de la unión de ligandos y la reticulación de proteínas. Otras células tienen una vía de muerte predeterminada que debe ser bloqueada por un factor de supervivencia como una hormona o un factor de crecimiento. También está la cuestión de distinguir la apoptosis de la necrosis, dos procesos que pueden ocurrir de forma independiente, secuencial y simultánea (Hirsch *et al.*, 1997; Zeiss, 2003). En algunos casos, es el tipo de estímulo y/o el grado de estímulo que determina si las células mueren por apoptosis o necrosis. A dosis bajas, una variedad de estímulos nocivos como el calor, la radiación, la hipoxia y los fármacos anticancerígenos citotóxicos pueden inducir apoptosis, pero estos mismos estímulos pueden provocar necrosis a dosis más altas. Finalmente, la apoptosis es un proceso coordinado y a menudo dependiente de la energía que involucra la activación de un grupo de cisteína proteasas llamadas caspasas y una compleja cascada de eventos que vinculan los estímulos iniciadores con la desaparición final de la célula (Elmore, 2007).

### **1.3.2. Propiedades moleculares de las caspasas**

Las caspasas, son proteasas perteneciente a la familia de enzimas convertidora de interleucina-1 $\beta$ , son altamente homólogas al gen de muerte celular *CED-3* de *Caenorhabditis elegans* (Sadowski-Debbing *et al.*, 2002). Hasta ahora se han identificado catorce caspasas, las cuales todas comparten algunas propiedades comunes: todas son cisteína proteasas específicas de aspartato; todas tienen un sitio activo de pentapéptido conservador "QACXG" (X puede ser R, Q o D); todos sus precursores son zimógenos conocidos como procaspasas. El terminal N del prodominio en procaspasas contiene una estructura muy diversa requerida para la activación de caspasa; y todas son capaces de autoactivarse y activar otras caspasas, para producir un heterodímero con una subunidad grande y una pequeña, y dos heterodímeros forman un heterotetramero enzimático activo (Launay *et al.*, 2005). Según su homología en las secuencias de aminoácidos, las caspasas se dividen en tres subfamilias (Fig. 4).

Subfamily	Role	Members
I	Apoptosis activator	Caspase-2 Caspase-8 Caspase-9 Caspase-10
II	Apoptosis executioner	Caspase-3 Caspase-6 Caspase-7
III	Inflammatory mediator	Caspase-1 Caspase-4 Caspase-5 Caspase-11 Caspase-12 Caspase-13 Caspase-14

Fig. 4. Subfamilias, miembros de la familia caspasa.

### 1.3.3. Mecanismos de la apoptosis

Los mecanismos de la apoptosis son altamente complejos y sofisticados, e involucran una cascada de eventos moleculares dependientes de la energía. Hasta la fecha, la investigación indica que hay dos vías apoptóticas principales: la vía extrínseca o del receptor de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Sin embargo, ahora hay evidencia de que las dos vías están unidas y que las moléculas en una vía pueden influir en la otra (Igney & Krammer, 2002). Hay una vía adicional que implica la citotoxicidad mediada por células T y la muerte de células dependientes de perforina-granzima. La vía de perforina/granzima puede inducir apoptosis a través de la granzima B o la granzima A. Las vías extrínseca, intrínseca y granzima B convergen en el mismo terminal o vía de ejecución. Esta vía se inicia mediante la escisión de la caspasa-3 y da como resultado la fragmentación del ADN, la degradación de las proteínas citoesqueléticas y nucleares, la reticulación de proteínas, la formación de cuerpos apoptóticos, la expresión de ligandos para los receptores de células fagocíticas y, finalmente, la absorción por las células fagocíticas. La vía de la granzima A activa una vía de muerte celular paralela, independiente de la caspasa, a través del daño de ADN monocatenario (Martinvalet *et al.*, 2005).

### **1.3.4. Vía de activación de procaspasa mediada por receptor de muerte**

#### **1.3.4.1. Vía de activación de procaspasa dependiente del receptor de muerte (caspasa-8 y caspasa-10)**

Las señales de muerte celular, como el ligando Fas (FasL) y el factor de necrosis tumoral (TNF)-2, pueden reconocerse específicamente por sus receptores de muerte correspondientes, como el receptor Fas o TNF (TNFR)-1, en la membrana plasmática. Su unión a su vez activará los receptores de muerte. Fas puede unirse al dominio de muerte asociado a Fas (FADD) (o dominio de muerte asociado a TNFR, TRADD) y causar la agregación de FADD y la aparición de DED. Estas DED expuestas interactúan con las DED en el prodominio de la procaspasa-8, lo que inducirá la oligomerización de la procaspasa-8 localizada en el lado citosólico de la membrana plasmática. Luego se forma un complejo de molécula masiva conocido como complejo de señal inductora de muerte (DISC). En DISC, dos subunidades lineales de la procaspasa-8 se compactan entre sí, seguidas de la autoactivación de la procaspasa-8 a caspasa-8. La activación de las vías aguas abajo de la caspasa-8 varía con los diferentes tipos de células (Fig. 5). En las células Tipo I (células de algunas líneas celulares linfoides), la caspasa-8 se activa vigorosamente y puede activar directamente las procaspasas aguas abajo (por ejemplo, procaspasa-3). En las células Tipo II (que no sean las células Tipo I), la caspasa-8 solo se activa levemente y no puede activar la procaspasa-3 directamente. Sin embargo, puede activar la vía mediada por mitocondrias truncando Bid (un miembro de la familia Bcl-2 pro-apoptótico), un tipo de proteína proapoptótica en el citosol, en su forma activa, tBid. tBid desencadenará la activación de la vía de la mitocondria: el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF) y otras moléculas se liberan de las mitocondrias, y se inducirá la apoptosis (Wang *et al.*, 2005; Arnoult *et al.*, 2003; Lü *et al.*, 2003; Fu & Fan, 2002). La vía de activación mediada por la procaspasa-10, con un prodominio que contiene DED, es similar a la mediada por la procaspasa-8. La caspasa-10 funciona principalmente en la apoptosis de las células linfoides (Wang *et al.*, 2001). Puede funcionar independientemente de la caspasa-8 al iniciar la apoptosis relacionada con Fas y TNF. Además, la reticulación de Fas en células T humanas primarias

conduce al reclutamiento y activación de la procaspasa-10. Aunque la caspasa-8 y la caspasa-10 interactúan con la DED de FADD en la señalización del receptor de muerte, pueden tener diferentes sustratos de apoptosis y, por lo tanto, pueden funcionar claramente en la señalización del receptor de muerte u otros procesos celulares (Wang et al., 2001; Cowling & Downward, 2002).

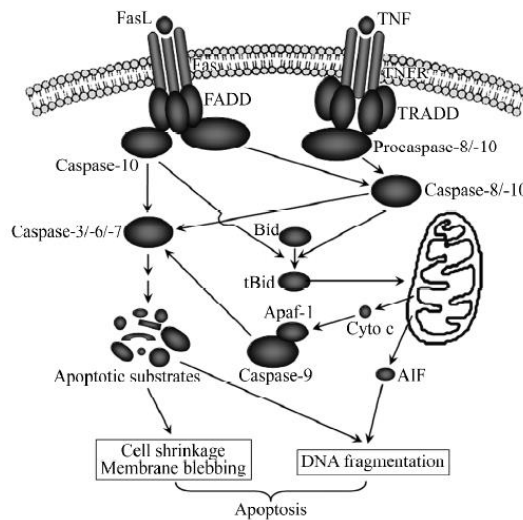


Fig. 5. Vía de activación de procaspasa dependiente de la caspasa-8 / caspasa-10.

### 1.3.5. Vía de activación de procaspasa mediada por mitocondrias

#### 1.3.5.1. Vía de activación de procaspasa mediada por mitocondrias de caspasa-8

Además de ser reclutado para formar un complejo DISC después de la autoactivación, la procaspasa-8 también podría activarse a través de una vía dependiente del citocromo c. Después de que el citocromo c se libera de las mitocondrias al citosol, la caspasa-6 es la única caspasa citosólica con la capacidad de activar la procaspasa-8, que depende únicamente de la activación de la procaspasa-6 mediante la división del prodominio. Significa que, en la vía dependiente del citocromo c, la activación de la procaspasa-8 no requiere la interacción con FADD ni la formación de un complejo DISC (Cowling & Downward, 2002).

### 1.3.5.2. Vía de activación de procaspasa mediada por mitocondrias de caspasa-9

Cuando se produce estrés celular (por ejemplo, daño en el ADN), se activarán las proteínas proapoptóticas en el citosol, lo que a su vez inducirá la apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTPs). Como resultado, el citocromo c localizado en las mitocondrias se liberará al citosol. Con la presencia de dATP citosólico (trifosfato de desoxiadenosina) o ATP, el factor de activación de la proteasa apoptótica-1 (Apaf-1) se oligomeriza. Junto con la procaspasa-9 citosólica, dATP y el citocromo c, el Apaf-1 oligomerizado puede dar lugar a la formación de un complejo masivo conocido como apoptosoma. El terminal N de Apaf-1 y el prodominio de la procaspasa-9 tienen CARDs, con formas complementarias y cargas opuestas. Interactúan entre sí mediante CARDs y forman un complejo en la proporción de 1:1 (Arnoult *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2001). La caspasa-9 activada a su vez puede activar la procaspasa-3 y la procaspasa-7. La caspasa-3 activada activará la procaspasa-9 y formará una vía de activación de retroalimentación positiva (Fig. 6). Según resultados recientes, se han presentado ideas alternativas sobre cómo se activa la procaspasa-9 y qué moléculas se requieren durante la activación. Una opinión generalmente sostenida es que, aunque el prodominio de la procaspasa-9 se escinde, la formación del dímero de la caspasa-9 (o procaspasa-9), en lugar de la escisión, es esencial para la activación de la caspasa-9. Sin embargo, en algunas circunstancias, la activación de la procaspasa-9 puede ser independiente de factores mitocondriales, como el citocromo c (Fan *et al.*, 2005).

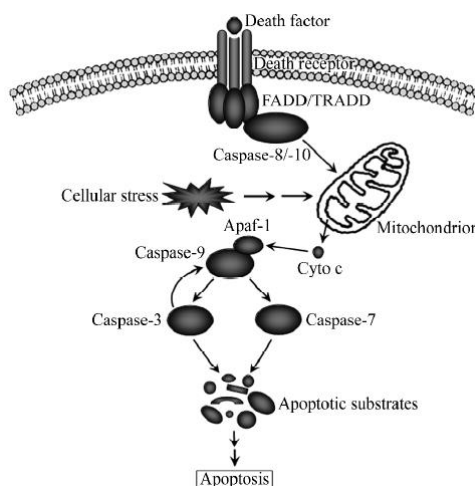


Fig. 6. Vía típica mediada por mitocondrias y dependiente de caspasas.

### **1.3.6. Sustratos aguas abajo**

Una vez activadas, las caspasas activadoras de apoptosis como las caspasas-2, -8 y/o -10 activarán posteriormente otras caspasas ejecutoras de la apoptosis, incluidas las caspasas-3, -6 y -7.

#### **1.3.6.1. Caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7**

La caspasa-3, juega un papel clave en la ejecución de la apoptosis, es la forma activa de la procaspasa-3. Este último puede ser activado por la caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10, proteasa activadora de CPP32, granzima B (Gran B) y otros. Los sustratos aguas debajo de la caspasa-3 incluyen la procaspasa-3, la procaspasa-6, la procaspasa-9, ADN-PK, PKC $\gamma$ , PARP, D4-GDI (inhibidor de disociación D4 GDP), proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides, U<sub>1</sub>-70kD, inhibidor de la desoxirribonucleasa activada por caspasa (ICAD) y así sucesivamente. Excepto por la  $\alpha$ -fodrina y la topoisomerasa I, todos los sustratos se pueden escindir durante la apoptosis en las células caspasa-3<sup>-/-</sup>, de las cuales podemos ver que la caspasa-3 no es la única caspasa ejecutora de la apoptosis (Yuan & Ding, 2002). Debido a que todos los sustratos de la caspasa-3 contienen secuencias DEVD en común, los tetrapéptidos sintetizados artificialmente Ac-DEVE-AMC y Ac-DEVE-CHO generalmente se usan como sustrato específico e inhibidor de la caspasa-3, respectivamente.

Las caspasa-6 y la caspasa-7 son altamente homólogas a la caspasa-3. La procaspasa-6 puede activarse mediante la caspasa-3 pero no Gran B. La caspasa-6 también puede activar la procaspasa-3 mediante una vía de retroalimentación positiva. Los sustratos de la caspasa-6 incluyen PARP, lamina y procaspasa-3. La procaspasa-7, cuyos sustratos incluyen PARP, procaspasa-6 y la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides, puede ser activada por Gran B (Cowling & Downward, 2002; Sattar *et al.*, 2003).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.2. General:**

**2.2.2.**Determinar mediante pruebas bioquímicas si el WIN 55,212-2 presenta algún efecto neuroprotector en un modelo de lesión traumática de médula espinal por contusión moderada en rata.

### **2.3. Específicos:**

**2.3.2.**Establecer si el WIN 55,212-2 presenta algún efecto neuroprotector administrado a una dosis mínima eficaz en un modelo de lesión traumática de médula espinal por contusión moderada en rata.

**2.3.3.**Cuantificar los niveles de apoptosis de las muestras de médula espinal mediante un Kit de ensayo de actividad colorimétrica de caspasa 8 y 3.

**2.3.4.**Mediante un análisis estadístico, determinar si el WIN 55,212-2 presenta algún efecto antiapoptótico en un modelo de lesión traumática de médula espinal por contusión moderada en rata.

## **3. METODOLOGÍA**

### **3.2. Diseño del estudio**

Para la realización del presente estudio, se siguieron los lineamientos establecidos a nivel internacional y nacional por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Además, el cuidado de los animales y los protocolos para su uso fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México. Se utilizaron ratas hembras de la cepa *Wistar* adultas (200–250 g) asignadas aleatoriamente a uno de cuatro grupos; dos grupos fueron sometidos a un procedimiento de lesión simulada (laminectomía) mientras que dos grupos más se

sometieron a una lesión traumática de médula espinal (LTME). El alojamiento de las ratas fue de cinco por jaula con un ciclo de 12 horas luz/ oscuridad, con libre acceso al agua y alimento.

### **3.3. Cirugía y cuidados posoperatorios**

La lesión simulada y la contusión de la médula espinal se realizaron con animales previamente anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/ Kg i.p.). Se realizó una incisión en la piel, así como en el tejido conectivo y muscular que se extendió desde las regiones torácicas medias a bajas, seguida de una laminectomía de T9 para exponer la médula espinal. El dispositivo de caída de peso NYU se utilizó para producir la LTME por contusión. Por lo tanto, las pinzas espinales se unieron a los procesos espinosos T8 y T10, se colocó un transductor sobre el proceso transversal de T9 y el cilindro de impacto se centró por encima. El cilindro metálico se bajó lentamente hasta que entró en contacto con la duramadre, que se determinó al completar un circuito que activó un tono en el equipo. Luego, la LTME se produjo dejando caer el cilindro metálico de 10 g desde una distancia de 25 mm. Posteriormente, el sitio quirúrgico fue suturado en capas. Se permitió que las ratas se recuperaran de los procedimientos anestésicos y quirúrgicos en una unidad de cuidados intensivos para animales pequeños (Schoer Manufacturing Co., Kansas City, MO), y luego se alojaron en jaulas acrílicas con aserrín estéril. Las ratas tuvieron libre acceso al agua y alimento.

### **3.4. Tratamientos farmacológicos**

Las ratas se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos experimentales de la siguiente manera: grupo 1, laminectomía más vehículo (10% de DMSO, 5% de Tween 80 y 85% de solución salina, i.p.); grupo 2, laminectomía más WIN 55,212-2 a una dosis de 3 mg/ Kg, i.p.; grupo 3, LTME más vehículo; y grupo 4, LTME más WIN 55,212-2 (3 mg/ Kg, i.p.). Debido a que el estudio fue a 24 horas, se realizó una administración única 3 horas después de la laminectomía o LTME, respectivamente.

### **3.5. Determinación de proteínas por el método de Lowry**

Para determinar la concentración de proteína requerida para el ensayo de caspasas (250 µg de proteína), las muestras fueron analizadas de acuerdo con el método de Lowry, para determinar su contenido de proteínas, solamente se modificaron los volúmenes del método para realizar la lectura en placa. De acuerdo con los informes de Ling *et al.*, se diseccionó aproximadamente 0.5 cm de la médula espinal del sitio de la lesión o laminectomía de cada rata. Las muestras extraídas se homogenizaron en 200 µl de buffer de lisis celular. Se diluyó cada muestra en una proporción 1:50 (4 µl del homogenado + 196 µl de agua desionizada), para los 200 µl de la muestra diluida, se adicionó 1 ml de la siguiente solución: 50 ml de (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%, NaOH al 0.4% y Tartrato de Sodio al 0.2%) más 1 ml de CuSO<sub>4</sub> al 2%, dejando incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 100 µl del reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu (1:1, reactivo de Folin-Ciocalteu + agua desionizada). Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se colocaron 200 µl de muestra en cada pozo de la placa. La absorbancia de cada muestra se leyó en un espectrofotómetro de microplaca BioTek Eon a una longitud de onda de 550 nm.

### **3.6. Determinación de la actividad de la Caspasa-8 y Caspasa-3: ensayo colorimétrico**

La actividad de la Caspasa-8 y Caspasa-3 se midió utilizando el Kit de Ensayo Colorimétrico (Millipore) que evalúa la actividad de las caspasas que reconocen la secuencia DEVD. El ensayo se basa en la detección espectrofotométrica del cromóforo *p*-nitroanilina (*p*NA) después de la escisión del sustrato marcado DEVD-*p*NA. El *p*NA libre se puede cuantificar utilizando un espectrofotómetro o un lector de placas de microtitulación a 405 nm. La comparación de la absorbancia de *p*NA de una muestra apoptótica con un control no inducido permite la determinación del aumento en la actividad de la caspasa. Para poder utilizar el Kit Millipore para caspasas, se le tuvo que hacer una modificación, debido a que el kit no es para muestras de tejido. Para cada muestra a analizar, se colocaron 20 µl de buffer de ensayo 5X en cada pozo de la placa. El volumen necesario para tomar 250 µg de proteínas para cada una de las muestras fue diferente, así como la cantidad de agua

desionizada precisa para completar un volumen entre ambos de 70  $\mu$ l ( $\mu$ l muestra homogenizada +  $\mu$ l H<sub>2</sub>O DI = 70  $\mu$ l). Por último, se adicionó a cada muestra 10  $\mu$ l de sustrato de Caspasa-8 o Caspasa-3 (Ac-DEVD-pNA, 3 mg/ ml). Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora y posteriormente se leyeron en un espectrofotómetro de microplaca BioTek Eon a una longitud de onda de 405 nm.

### **3.7. Análisis estadístico**

Para determinar si los valores presentaban una homogeneidad de varianza, se aplicó la prueba de Levene. Una vez determinado esto, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas como la de Kruskal-Wallis seguida de múltiples comparaciones utilizando la prueba *U* de Mann-Whitney para el análisis de la actividad de la Caspasa-8 y la Caspasa-3. Las diferencias significativas para las actividades de la Caspasa-8 y Caspasa-3 después de la LTME se determinaron utilizando ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett. Para evaluar el efecto del WIN 55,212-2 y Cannabidiol sobre la actividad de las caspasas, los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey. Todos los análisis se realizaron utilizando el software SPSS 19.0. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **4. ACTIVIDADES REALIZADAS**

1. Adiestramiento de la cirugía y lesión medular.
2. Cirugía y lesión medular de cada uno de los grupos experimentales.
3. Administración del cannabinoide sintético (WIN 55212-2) y natural (Cannabidiol).
4. Extracción de la médula espinal 24 horas después de la lesión.
5. Análisis de las muestras obtenidas.

## 5. **Objetivos y metas alcanzadas**

El objetivo principal de la investigación fue determinar si el cannabinoide sintético WIN 55212-2 presenta algún efecto neuroprotector en un modelo de lesión traumática de medula espinal por contusión. Tanto los procedimientos quirúrgicos como el análisis de las muestras mediante pruebas bioquímicas se llevaron a cabo sin mayor complicación, así como el tratamiento de los datos obtenidos por dichas pruebas. Sin embargo, el objetivo principal de la investigación no fue el esperado, ya que se esperaban resultados más favorables para la molécula. Aunque no se logró determinar si la molécula presenta como tal un efecto neuroprotector, al menos se abordaron unas vías y con los resultados del estudio es posible descartarlas y abordar nuevas directrices.

## 6. **Resultados y conclusiones**

**El WIN 55212-2 y Cannabidiol (CBD) no disminuyen la actividad de la caspasa-8 después de la lesión de la medula espinal.**

La activación de la vía extrínseca de la apoptosis se evaluó a través de la actividad de la caspasa-8. Los resultados obtenidos de la actividad de la caspasa-8 se muestran en la Fig. 7. Los valores se expresan en unidades de absorbancia arbitrarias por  $\mu\text{g}$  de proteína por hora y representan la media  $\pm$  SEM de 4-6 animales por grupo. Como se puede apreciar, hay un aumento significativo en la actividad de caspasa-8 después de la lesión ( $294.74 \pm 9.99$ ,  $p = 0.05$ ), que corresponde a un aumento del 29.26% comparado con el grupo sham ( $228.01 \pm 5.72$ ).

El estudio se llevó a cabo a las 24 horas, por lo que se evaluó el efecto del WIN 55212-2 a esa hora para poder apreciar el efecto que tiene sobre la actividad de la caspasa-8. Como se mencionó, la LTME produjo un aumento significativo en la actividad de la caspasa-8 (29.26% frente al grupo sham,  $p < 0.05$ ). El tratamiento con WIN 55212-2 no disminuyó tal efecto, el grupo que recibió WIN 55212-2 3 horas después de la lesión (SCI/WIN) muestra

una disminución de la actividad de la caspasa-8 frente al grupo solo con la LTME (SCI/Veh), pero al compararlo con el grupo sham, la disminución no resulta ser significativa. Del mismo modo, se evaluó otro grupo, esta vez tratado con Cannabidiol (CBD), para evaluar el efecto que tiene sobre la actividad de la caspasa-8. Sin embargo, los resultados fueron muy similares a los obtenidos con WIN 55212-2. No observamos diferencias significativas entre el grupo sham y los grupos SCI tratados con WIN y CBD.

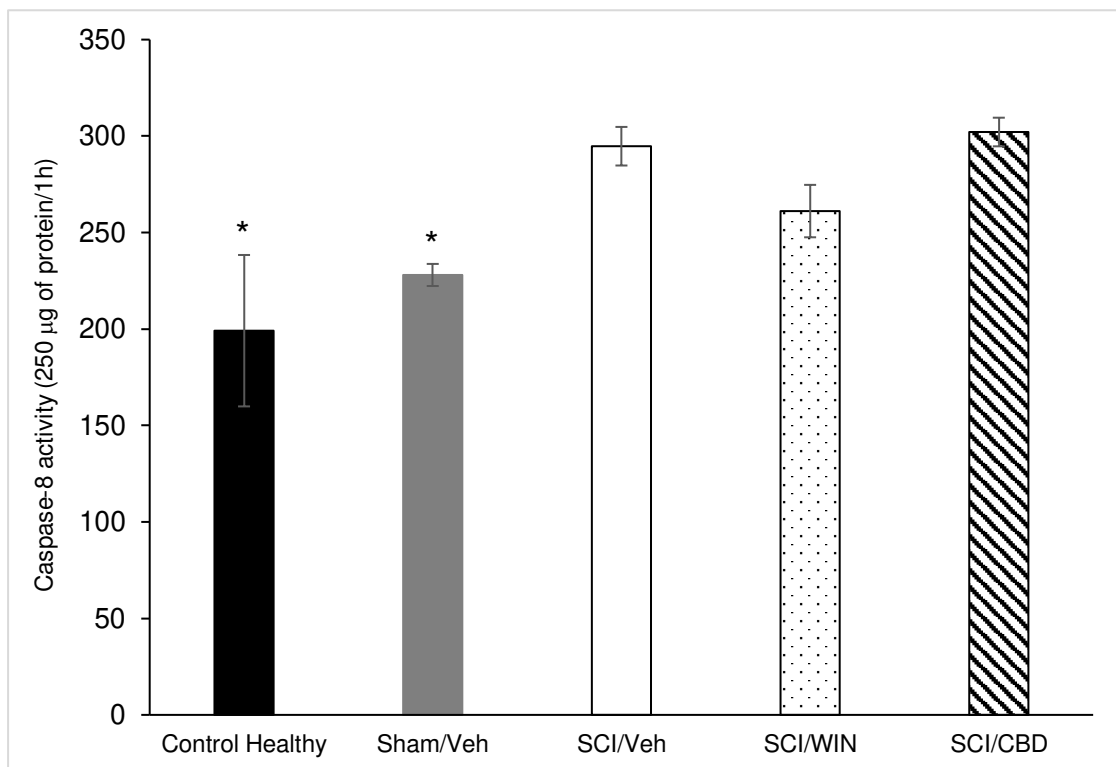


Fig. 7. Se muestra la actividad de la caspasa-8 de la médula espinal, evaluada 24 h después de la lesión. Sham/Veh: animales solo con el procedimiento quirúrgico, SCI/Veh: animales con lesión de la médula espinal, SCI/WIN: animales con lesión de medula espinal tratados con WIN 55212-2 (3 mg/Kg 3 h después de la lesión), SCI/CBD: animales con lesión de medula espinal tratados con CBD (5 mg/Kg 3 h después de la lesión). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM de 4–6 animales por grupo en unidades de absorbancia arbitrarias / mg de proteína / 1 h de incubación. \* Diferente del grupo SCI/Veh ( $p < 0.05$ ). ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey, la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Mann-Whitney.

### El CBD disminuye la actividad de la caspasa-3 después de la lesión de la médula espinal.

Los resultados obtenidos de las actividades de la caspasa-3 se muestran en la Fig. 8. La LTME indujo un aumento de la actividad de la caspasa-3, alcanzando la significancia ( $395.93 \pm 21.02$ ) por efecto del daño, en comparación con el grupo sham ( $282.83 \pm 8.29$ ), lo que representa un incremento del 39.98%. De igual forma, los resultados del efecto del WIN 55212-2 y CBD administrados 3 h después de LTME sobre la actividad de la caspasa-3 se muestran en la Fig. 8. Los resultados mostraron un aumento de la actividad de caspasa-3 del 39.98% como efecto de LTME (SCI/Veh), en comparación con el grupo sham, y este efecto disminuyó con el tratamiento con CBD (SCI/CBD 3 h). Esa reducción fue del 20.46% en comparación con la LTME sin tratamiento ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, la actividad de la caspasa-3 en el grupo tratado con WIN 55212-2 (SCI/WIN) no fue posible apreciar una disminución frente al grupo con la LTME sin tratamiento (SCI/Veh).

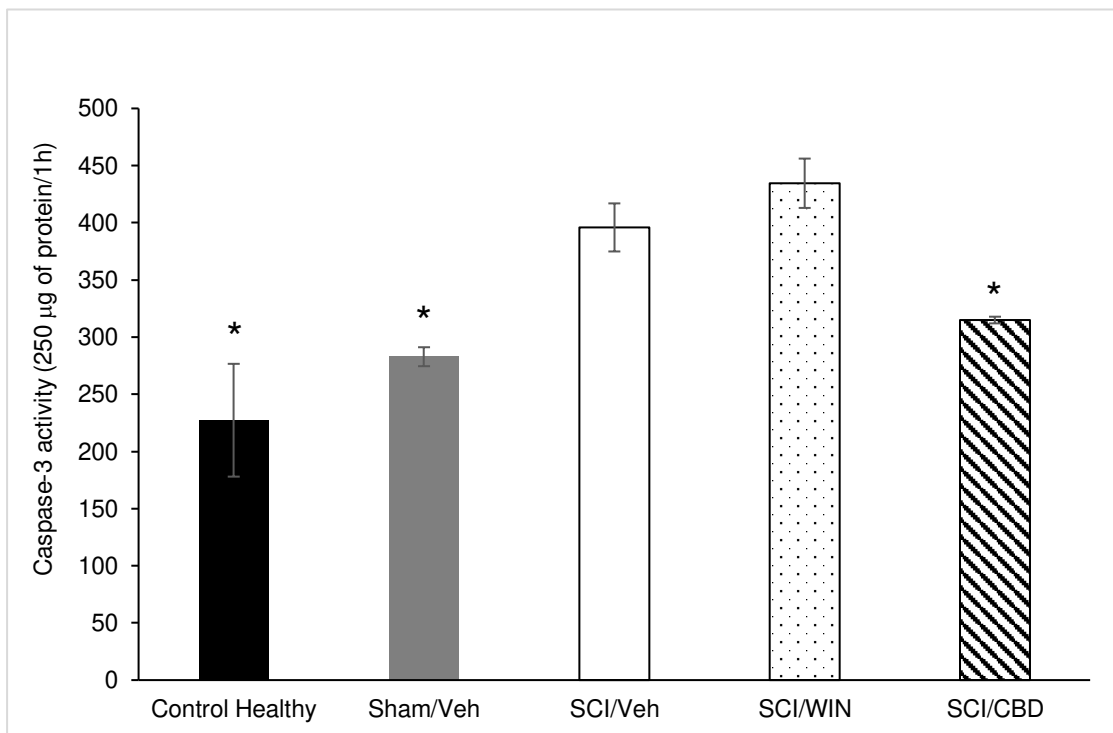


Fig. 8. Se muestra la actividad de la caspasa-3 de la médula espinal, evaluada 24 h después de la lesión. Sham/Veh: animales solo con el procedimiento quirúrgico, SCI/Veh: animales con lesión de

la médula espinal, SCI/WIN: animales con lesión de medula espinal tratados con WIN 55212-2 (3 mg/Kg 3 h después de la lesión), SCI/CBD: animales con lesión de medula espinal tratados con CBD (5 mg/Kg 3 h después de la lesión). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM de 4–6 animales por grupo en unidades de absorbancia arbitrarias / mg de proteína / 1 h de incubación. \* Diferente del grupo SCI/Veh ( $p < 0.05$ ). ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey, la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Mann-Whitney.

Con base a los resultados obtenidos, se demostró que el CBD actúa como agente antiapoptótico debido a que disminuye la actividad de la caspasa-3, en muestras que habían sufrido una lesión traumática de medula espinal. Sin embargo, al no mostrar una disminución en la actividad de la caspasa-8 (iniciada por la inflamación) se descarta que este actúe por la vía extrínseca, dejando la posibilidad que este desencadenara su mecanismo de acción por la vía intrínseca (dependiente de calcio).

Por otra parte, al no presentar ninguna disminución significativa el tratamiento con WIN 55212-2 en la actividad de la caspasa-3, se descarta como un agente antiapoptótico, al menos en las condiciones con las que se realizó el estudio. Finalmente, se concluye que la terapia con CBD puede ser una buena opción para tratar pacientes con algún tipo de LTME.

## **7. Recomendaciones**

El efecto neuroprotector que se reporta de WIN 55212-2 es dosis dependiente. La dosis que se probó fue de 3 mg/Kg, y en los estudios en donde se utilizó y presentó efecto neuroprotector dicha molécula fue a una concentración de 5 mg/Kg, por lo que recomiendo elaborar una curva dosis-respuesta para determinar la concentración eficaz para dicho propósito. Otra propuesta es realizar una segunda administración, para hacer un tratamiento crónico, debido a que el WIN 55212-2 presenta un  $t_{1/2}$  de eliminación de 3 horas cuando se administra por vía intravenosa. Un estudio realizado para demostrar como el WIN 55212-2 podría promover la recuperación funcional después de una SCI traumática, se hace un tratamiento crónico, administrando vía intraperitoneal a 8 y 24 horas después de la SCI el WIN 55212-2 con una formulación del vehículo similar a la utilizada en este estudio.



## Bibliografía

1. Torres, S., Salgado-Ceballos, H., Torres, J. L., Orozco-Suarez, S., Díaz-Ruiz, A., Martínez, A., ... & Guizar-Sahagún, G., 2010. Early metabolic reactivation versus antioxidant therapy after a traumatic spinal cord injury in adult rats. *Neuropathology*, 30(1), 36-43.
2. Park, E., Velumian, A. A., & Fehlings, M. G., 2004. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *Journal of neurotrauma*, 21(6), 754-774.
3. Diaz-Ruiz, A., Rios, C., Duarte, I., Correa, D., Guizar-Sahagun, G., Grijalva, I., & Ibarra, A., 1999. Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neuroscience letters*, 266(1), 61-64.
4. Hausmann, O. N., 2003. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal cord*, 41(7), 369.
5. Beattie, M. S., Hermann, G. E., Rogers, R. C., & Bresnahan, J. C., 2002. Cell death in models of spinal cord injury. In *Progress in brain research* (Vol. 137, pp. 37-47). Elsevier.
6. Yip, P. K., & Malaspina, A., 2012. Spinal cord trauma and the molecular point of no return. *Molecular neurodegeneration*, 7(1), 6.
7. Ríos, C., Orozco-Suarez, S., Salgado-Ceballos, H., Mendez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Santander, I., ... & Diaz-Ruiz, A., 2015. Anti-apoptotic effects of dapsone after spinal cord injury in rats. *Neurochemical research*, 40(6), 1243-1251.
8. Hall, E. D., & Springer, J. E., 2004. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*, 1(1), 80-100.
9. Cadotte, D. W., & Fehlings, M. G., 2011. Spinal cord injury: a systematic review of current treatment options. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 469(3), 732-741.
10. Arevalo-Martin, A., Garcia-Ovejero, D., Sierra-Palomares, Y., Paniagua-Torija, B., Gonzalez-Gil, I., Ortega-Gutierrez, S., & Molina-Holgado, E., 2012. Early endogenous activation of CB1 and CB2 receptors after spinal cord injury is a protective response involved in spontaneous recovery. *PloS one*, 7(11), e49057.
11. Su, B. X., Chen, X., Huo, J., Guo, S. Y., Ma, R., & Liu, Y. W., 2017. The synthetic cannabinoid WIN55212-2 ameliorates traumatic spinal cord injury via inhibition of GAPDH/Siah1 in a CB2-receptor dependent manner. *Brain research*, 1671, 85-92.

12. Beattie, M. S., 2004. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *Trends in molecular medicine*, 10(12), 580-583.
13. Oyinbo, C. A., 2011. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 71(2), 281-99.
14. Abood, M.E., Martin, B.R., 1992. Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 201–206.
15. Dewey, W.L., 1986. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 38, 151–178.
16. Pertwee, R.G., 1988. The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. *Pharmacol. Ther.* 36, 189-261.
17. Mechoulam, R., Gaoni, Y., 1967. The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett.* 12, 1109–1111.
18. Mechoulam, R., Braun, P., Gaoni, Y., 1967. A stereospecific synthesis of (-)-delta 1- and (-)-delta 1(6)-tetrahydrocannabinols. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 4552–4554.
19. Agurell, S., Halldin, M., Lindgren, J.E., Ohlsson, A., Widman, M., Gillespie, H., Hollister, L., 1986. Pharmacokinetics and metabolism of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol. Rev.* 38, 21–43.
20. Hollister, L.E., 1986. Health aspects of cannabis. *Pharmacol. Rev.* 38, 1–20.
21. Bornheim, L.M., Kim, K.Y., Chen, B., Correia, M.A., 1993. The effect of cannabidiol on mouse hepatic microsomal cytochrome P450-dependent anandamide metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 740–746.
22. Martin, B.R., 1986. Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacol. Rev.* 38, 45–74.
23. Compton, D.R., Rice, K.C., De Costa, B.R., Razdan, R.K., Melvin, L.S., Johnson, M.R., Martin, B.R., 1993. Cannabinoid structure-ctivity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 218–226.
24. Pertwee, R.G., 1999. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* 6, 635–664.
25. Howlett, A.C., Berglund, B., Melvin, L.S., 1995. Cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr. Pharm. Des.* 1, 343–354.
26. Compton, D.R., Gold, L.H., Ward, S.J., Balster, R.L., Martin, B.R., 1992. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 1118–1126.

27. Pacheco, M., Childers, S.R., Arnold, R., Casiano, F., Ward, S.J., 1991. Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257, 170–183.
28. Howlett, A.C., 2002. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-9, 619–631.
29. Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., De Costa, B.R., Rice, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583.
30. Margulies, J.E., Hammer Jr, R.P., 1991.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol alters cerebral metabolism in a biphasic, dose-dependent manner in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 202, 373–378.
31. Bloom, A.S., Tershner, S., Fuller, S.A., Stein, E.A., 1997. Cannabinoid- induced alterations in regional cerebral blood flow in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 625–631.
32. Stein, E.A., Fuller, S.A., Edgmond, W.S., Campbell, W.B., 1998. Selective effects of the endogenous cannabinoid arachidonylethanolamide (anandamide) on regional cerebral blood flow in the rat. *Neuropsychopharmacology* 19, 481–491.
33. Freedland, C.S., Whitlow, C.T., Miller, M.D., Porrino, L.J., 2002. Dose-dependent effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on rates of local cerebral glucose utilization in rat. *Synapse* 45, 134–142.
34. Cabral, G.A., Dove Pettit, D.A., 1998. Drugs and immunity: cannabinoids and their role in decreased resistance to infectious disease. *J. Neuroimmunol.* 83, 116–123.
35. Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Barg, J., Mechoulam, R., Vogel, Z., 1995. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and Gprotein coupling. *FEBS Lett.* 375, 143–147.
36. Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., Mitchell, R.L., 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* 48, 443–450.
37. Slipetz, D.M., O’Neill, G.P., Favreau, L., Dufresne, C., Gallant, M., Gareau, Y., Guay, D., Labelle, M., Metters, K.M., 1995. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 48, 352–361.
38. Bidaut-Russell, M., Devane, W.A., Howlett, A.C., 1990. Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J. Neurochem.* 55, 21–26.
39. Childers, S.R., Pacheco, M.A., Bennett, B.A., Edwards, T.A., Hampson, R.E., Mu, J., Deadwyler, S.A., 1993. Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms. *Biochem. Soc. Symp.* 59, 27–50.

40. Caulfield, M.P., Brown, D.A., 1992. Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 106, 231–232.
41. Mackie, K., Devane, W.A., Hille, B., 1993. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* 44, 498–503.
42. Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., Mitchell, R., 1995. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 15, 6552–6561.
43. Shen, M., Piser, T.M., Seybold, V.S., Thayer, S.A., 1996. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci.* 16, 4322–4334.
44. Henry, D.J., Chavkin, C., 1995. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* 186, 91–94.
45. Burstein, S.H., Audette, C.A., Charalambous, A., Doyle, S.A., Guo, Y., Hunter, S.A., Makriyannis, A., 1991. Detection of cannabinoid receptors by photoaffinity labelling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 492–497.
46. Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Le Fur, G., Casellas, P., 1996. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur. J. Biochem.* 237, 704–711.
47. Howlett, A. C., Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., & Porrino, L. J., 2004. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, 47, 345-358.
48. Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C., and Bonner T. I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564.
49. Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M. C., Mackie K., and Walker J. M., 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411.
50. Egertova M. and Elphick M. R., 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J. Comp. Neurol.* 422, 159–171.
51. Moldrich G. and Wenger T., 2000. Localization of the CB (1) cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21, 1735–1742.

52. Szabo B., Dorner L., Pfreundtner C., Norenberg W., and Starke K., 1998. Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85, 395–403.
53. Katona I., Sperlagh B., Sik A., Kafalvi A., Vizi E. S., Mackie K., and Freund T. F., 1999. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 19, 4544–4558.
54. Hoffman A. F. and Lupica C. R., 2000. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *J. Neurosci.* 20, 2470–2479.
55. Takahashi K. A. and Linden D. J., 2000. Cannabinoid receptor modulation of synapses received by cerebellar Purkinje cells. *J. Neurophysiol.* 83, 1167–1180.
56. Waksman Y., Olson J. M., Carlisle S. J., and Cabral G. A., 1999. The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 1357–1366.
57. Coffey R. G., Yamamoto Y., Snella E., and Pross S., 1996. Tetrahydrocannabinol inhibition of macrophage nitric oxide production. *Biochem. Pharmacol.* 52, 743–751.
58. Skaper S. D., Buriani A., Dal Toso R., Petrelli L., Romanello S., Facci L., and Leon A., 1996. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3984–3989.
59. Ross R. A., Coutts A. A., McFarlane S. M., Anavi-Goffer S., Irving A. J., Pertwee R. G., et al., 2001. Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* 40, 221–232.
60. Kearn C. S. and Hillard C. J. (1997) Rat microglial cells express the peripheral type cannabinoid receptor (CB2) which is negatively coupled to adenylate cyclase. (Abstract)
61. Grundy, R. I., Rabuffetti, M., & Beltramo, M., 2001. Cannabinoids and neuroprotection. *Molecular neurobiology*, 24(1-3), 29-51.
62. Arévalo-Martín, A., García-Ovejero, D., Gomez, O., Rubio-Araiz, A., Navarro-Galve, B., Guaza, C., ... & Molina-Holgado, F., 2008. CB2 cannabinoid receptors as an emerging target for demyelinating diseases: from neuroimmune interactions to cell replacement strategies. *British journal of pharmacology*, 153(2), 216-225.
63. Di Marzo, V., 2008. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nature reviews Drug discovery*, 7(5), 438.

64. Hama, A., & Sagen, J., 2007. Antinociceptive effect of cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in rats with a spinal cord injury. *Experimental neurology*, 204(1), 454-457.
65. Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., & Garrido, C., 2005. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*, 24(33), 5137.
66. Wang, Z. B., Liu, Y. Q., & Cui, Y. F., 2005. Pathways to caspase activation. *Cell biology international*, 29(7), 489-496.
67. Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F., & Youle, R. J., 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *The EMBO journal*, 22(17), 4385-4399.
68. Lü, C. X., Fan, T. J., Hu, G. B., & Cong, R. S., 2003. Apoptosis-inducing factor and apoptosis. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 35(10), 881-885.
69. Fu, Y. F., & Fan, T. J., 2002. Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica*, 34(4), 389-394.
70. Wang, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M., & Lenardo, M. J., 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13884-13888.
71. Cowling, V., & Downward, J., 2002. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell death and differentiation*, 9(10), 1046.
72. Fan, T. J., Xia, L., & Han, Y. R., 2001. Mitochondrion and Apoptosis. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica*, 33(1), 7-12.
73. Yuan, C. Q., & Ding, Z. H., 2002. Structure and function of caspases. *Guowai Yixue Fenzi Shengwuxue Fence*, 24, 146-151.
74. Sattar, R., Ali, S. A., & Abbasi, A., 2003. Molecular mechanism of apoptosis: prediction of three-dimensional structure of caspase-6 and its interactions by homology modeling. *Biochemical and biophysical research communications*, 308(3), 497-504.
75. Sadowski-Debbing, K., Coy, J. F., Mier, W., Hug, H., & Los, M. J., 2002. Caspases-their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 50(1), 19-34.
76. Norbury, C. J., and Hickson, I. D., 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 367-401.

77. Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., and Kroemer, G., 1997. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15, 1573–81.
78. Zeiss, C. J., 2003. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40, 481–95.
79. Igney, F. H., and Krammer, P.H., 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277–88.
80. Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J., 2005. Granzyme A induces caspase independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22, 355–70.
81. Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
82. Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., & Liang, J., 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 37(11), 719-727.