

IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB2 Y LA ENZIMA MONOACILGLICEROL LIPASA (MAGL) EN LA NEUROLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Grado en Farmacia



Autora: Roxane Mozaffari Manzanares

**Tutores: Jorge Manzanares Robles y
Francisco Navarrete Rueda**

Modalidad: Trabajo experimental

San Juan de Alicante, 18 de Junio de 2015

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Sujetos	12
Evaluación de la integridad del ARN (RIN)	12
Análisis de la expresión génica: PCR a tiempo real.....	14
Análisis estadísticos.....	16
RESULTADOS	17
Evaluación de la integridad del ARN total en tejido cerebral congelado de PUT y SN de sujetos controles y EP: número de integridad de ARN (RIN) ..	17
Análisis de la expresión génica del rCB _{2A} en el PUT y SN de los sujetos controles y EP mediante PCR a tiempo real	18
Análisis de la expresión génica del enzima MAGL en el PUT y SN de los sujetos controles y EP mediante PCR a tiempo real.....	18
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES.....	26
REFERENCIAS.....	27

RESUMEN

La neuroinflamación es un factor importante en la patología de la enfermedad de Parkinson (EP) por su implicación en los procesos neurodegenerativos responsables de las alteraciones motoras propias de la enfermedad. En los últimos años se han encontrado evidencias del posible papel antiinflamatorio y neuroprotector del receptor cannabinoide CB2 (rCB2) en estudios con diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas que sugieren su posible implicación en la neuropatología de la EP. Asimismo, también se ha observado que el ligando cannabinoide endógeno 2-araquidonilglicerol (2-AG), metabolizado por el enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL), participaría en procesos de neuroprotección.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar los cambios en la expresión génica de la isoforma A del receptor CB2 (rCB2a) y del enzima MAGL en muestras de tejido cerebral *post mortem* de sujetos con EP y sus respectivos controles. Para ello se seleccionaron las áreas del putamen (PUT) y la sustancia negra (SN) y se calculó el número de integridad del ARN (RIN). Los experimentos de expresión génica relativa se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR a tiempo real utilizando la tecnología Taqman.

Se obtuvo una media de RIN superior a 6 que nos aseguró una calidad del ARN apropiada para obtener resultados de expresión génica fiables. Los análisis nos revelaron una disminución significativa del rCB2a en PUT y un aumento en SN de los EP en comparación con los controles. Contrariamente, los análisis de la expresión génica del enzima MAGL mostraron un incremento significativo en el PUT y una disminución en SN.

Los hallazgos de este estudio demuestran que se producen alteraciones en la expresión génica del rCB2a y del enzima MAGL en PUT y SN, reforzando la idea de su posible implicación en el proceso neurodegenerativo que ocurre en la EP. Además, los resultados sugieren que la modulación farmacológica tanto del receptor CB2 como del enzima MAGL podría ser una herramienta importante para el tratamiento de la EP y de otras enfermedades neurodegenerativas, aunque será necesaria la realización de más estudios que puedan demostrarlo.

INTRODUCCIÓN

En el año 1817, James Parkinson describió por primera vez el cuadro clínico principal que hoy se conoce como EP y que se caracteriza por la asociación de temblor, rigidez, acinesia, bradicinesia y pérdida de reflejos posturales, siendo este el prototipo de síndrome rígido-acinético. A medida que la enfermedad progresa los pacientes pueden tener dificultad para caminar, hablar o completar otras tareas sencillas. Todo ello se debe a la neurodegeneración de la vía nigroestriatal dopaminérgica que regula principalmente el sistema motor ¹. Los datos epidemiológicos de los que se disponen muestran que la incidencia de la EP es de 4.5-16 casos por 100.000 habitantes/año con un pico entre los 50 a 60 años, y la prevalencia oscila entre 18 a 320 casos por cada 100.000 habitantes ².

La característica patológica de la EP es la pérdida pronunciada de neuronas productoras de dopamina que se localizan en la parte compacta de la SN *pars compacta* (SNpc) situada en la base del mesencéfalo. Estas neuronas proyectan sus terminales axónicos hacia el cuerpo estriado (caudado y PUT) donde liberan dopamina, configurando el circuito dopaminérgico nigroestriatal. La SN, junto con los ganglios basales (caudado, PUT y globo pálido) está íntimamente implicada en la regulación de las funciones motoras. Cuando se produce una degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal de más del 70-75% se produce una sintomatología característica de alteraciones motoras que permite diagnosticar la EP. Las neuronas dopaminérgicas y muchas de las neuronas que sobreviven contienen inclusiones proteicas citoplasmáticas eosinófilas conocidas como cuerpos de Lewy. Estas estructuras aparecen como consecuencia de la degeneración de su citoplasma y están formadas por el acúmulo anormal de proteínas, fundamentalmente alfa-sinucleína, que se identifica con certeza mediante técnicas inmunohistoquímicas ³.

1. Parkinson, J., An essay on the shaking palsy. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2002. 14(2): p. 223-36; discussion 222.

2. Lewis Rowland, T.A.P.M., Neurología de Merritt. 12 ed. 2011.

3. Braak, H. and E. Braak, Pathoanatomy of Parkinson's disease. J Neurol, 2000. 247 Suppl 2: p. I13-10.

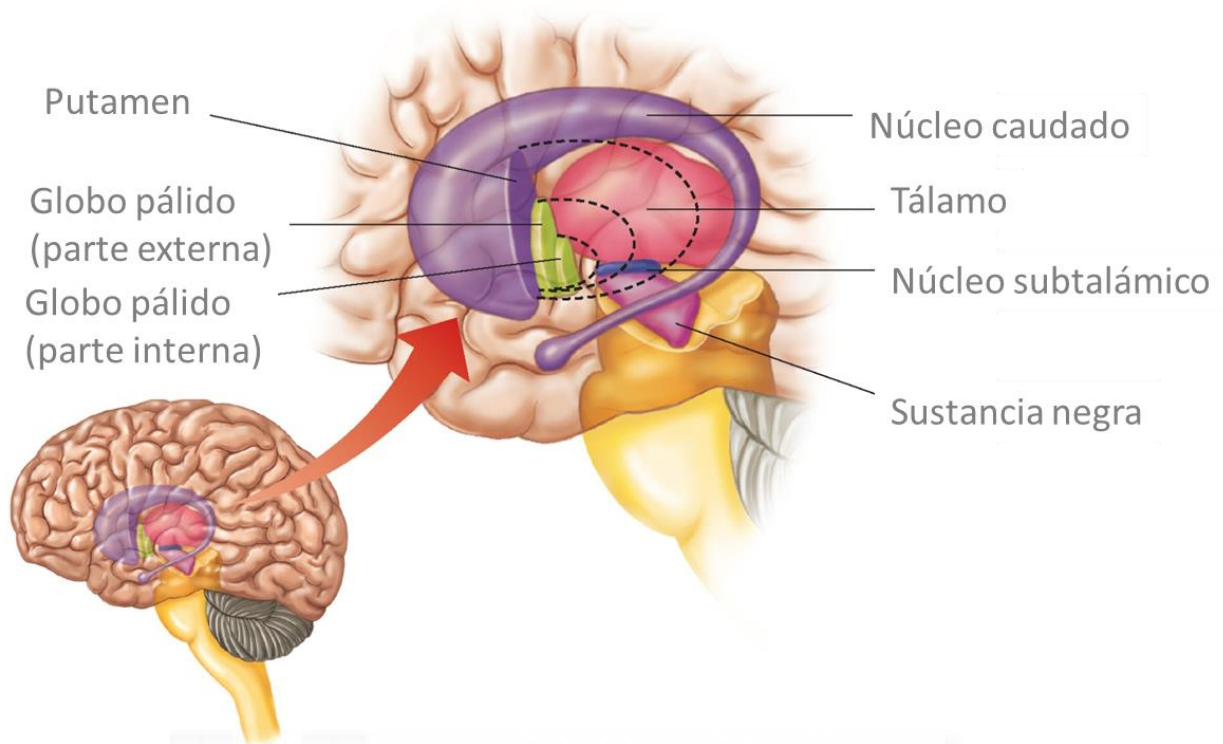


Figura 1. Regiones cerebrales implicadas en la regulación de la función motora.

En esta imagen se detallan las regiones cerebrales que forman parte de la vía dopaminérgica nigroestriatal que regula la función motora. Los cuerpos de las neuronas dopaminérgicas se localizan en la sustancia negra y proyectan sus terminales axónicas hacia los ganglios basales (caudado, putamen, globo pálido).

La EP es difícil de diagnosticar en sus etapas iniciales, ya que se puede confundir con los síntomas propios de otras patologías. Puede evidenciarse un deterioro cognitivo acompañado o no de síntomas depresivos como consecuencia, al menos en parte, del proceso neurodegenerativo que caracteriza a la patología ⁴. El diagnóstico se efectúa a partir de los síntomas motores que manifiesta el paciente entre los que se destacan el temblor en reposo (extremidades o cabeza), la rigidez (resistencia al desplazamiento de una articulación), la acinesia (mucha dificultad para iniciar el movimiento), la bradicinesia (lentitud del movimiento) y la hipocinesia (disminución en la amplitud del movimiento). Para un diagnóstico de la enfermedad deben aparecer al menos dos de estos signos: temblor en reposo o bradicinesia.

4. Cooper, J.A., et al., *Cognitive impairment in early, untreated Parkinson's disease and its relationship to motor disability*. Brain, 1991. **114 (Pt 5)**: p. 2095-122.

Aunque el diagnóstico clínico actualmente tiene una elevada fiabilidad, sólo podemos tener un diagnóstico de certeza mediante el estudio post mórtem del tejido cerebral del paciente, con la demostración de la presencia en la corteza frontal, parietal y temporal, y en la SN, de los cuerpos de Lewy ⁵.

La terapia farmacológica constituye un pilar fundamental en el tratamiento de la EP, pudiendo ser necesaria la terapia quirúrgica en los pacientes que no consiguen una mejoría clínica de los síntomas motores. Los fármacos que se emplean tienen como objetivo reemplazar de forma temporal la dopamina, o imitar sus acciones, en aquellas regiones donde tiene lugar el proceso neurodegenerativo (vía nigroestriatal). De esta forma se puede reducir la velocidad de progresión de la enfermedad y controlar los síntomas motores del paciente vigilando la aparición de efectos secundarios. Entre los fármacos característicos que se emplean en el tratamiento de la EP se encuentran la levodopa, los agonistas dopaminérgicos, los inhibidores de las enzimas de metabolización MAO-B (monoamino oxidasa B) y COMT (catecol O-metiltransferasa), y los anticolinérgicos, entre otros. En las primeras etapas, cuando los síntomas son leves, se utilizan fármacos menos potentes como los anticolinérgicos (antagonistas de la acetilcolina) que ejercen un efecto inhibitor sobre las terminaciones nerviosas dopaminérgicas compensando en parte la falta de dopamina. Cuando se trata de casos severos y avanzados de la enfermedad se utiliza la levodopa, el fármaco más potente hasta el momento y de primera línea para el tratamiento de esta enfermedad. La levodopa se suele combinar con un inhibidor de la dopa descarboxilasa, ya sea carbidopa o benseracida, lo que permite reducir las dosis necesarias en unas 10 veces y amortigua los efectos secundarios periféricos. A veces se administra también un inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa como la entacapona, con el fin de inhibir la degradación de la dopamina en la hendidura sináptica, siendo muy útil en pacientes que sufren molestias por fluctuaciones motoras. Cabe destacar que estudios a largo plazo han demostrado que un inhibidor de la MAO-B como la selegilina en combinación con la levodopa es más eficaz que esta última sola, tanto con respecto al alivio de los síntomas como en cuanto a la

5. H P Rang, M.M.D., J M Ritter, R J Flower, G Henderson, *Rang y Dale Farmacología*. 7ª ed. 2012.

prolongación de la vida. Se ha observado que la inhibición de la MAO-B protege a la dopamina de la degradación extraneuronal sugiriendo una posible capacidad neuroprotectora además de la potenciación de la acción de la levodopa. Por otro lado están los agonistas dopaminérgicos como la apomorfina, el pramipexol, el ropinirol y la rotigotina, con una duración de acción mayor que la levodopa debido a que su vida media es más prolongada. Esto explicaría el hecho de que exista una menor incidencia de fluctuaciones motoras y discinesias que con el uso de levodopa. En los estadios tempranos de la EP, siempre y cuando no se presente un predominio de temblor, se utilizarán estos fármacos como tratamiento único, con el fin de retrasar la administración de levodopa ^{2, 6, 7}.

Las investigaciones que se están realizando pretenden conocer y entender mejor todos los procesos implicados en el desarrollo de la enfermedad con el objetivo de poder diseñar nuevas estrategias que aumenten la eficacia del tratamiento a la vez que minimicen sus efectos adversos. En los últimos años, diversos estudios se han centrado en el sistema endocannabinoide con el objetivo de averiguar su posible implicación en la regulación de la función motora y, especialmente, en el proceso neurodegenerativo que da lugar a la EP ⁸⁻¹¹. El sistema endocannabinoide desempeña un importante papel neuromodulador en el sistema nervioso central ¹² y comprende receptores cannabinoides (CB1 y CB2), ligandos endógenos, y enzimas de síntesis y degradación. Tras el descubrimiento del primer receptor cannabinoide en 1988 ¹³, denominado receptor CB1, algunos científicos

-
2. Lewis Rowland, T.A.P.M., *Neurología de Merritt*. 12 ed. 2011
 6. Jesús Flórez, J.A.A., Africa Mediavilla, *Farmacología humana*. 5ª ed. 2008.
 7. Connolly, B.S. and A.E. Lang, *Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review*. JAMA, 2014. **311**(16): p. 1670-83.
 8. Fernandez-Ruiz, J., *The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(7): p. 1029-40.
 9. Fernandez-Ruiz, J., et al., *The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage*. Expert Opin Ther Targets, 2010. **14**(4): p. 387-404.
 10. Fernandez-Ruiz, J. and S. Gonzales, *Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia*. Handb Exp Pharmacol, 2005(168): p. 479-507.
 11. Pisani, V., et al., *Homeostatic changes of the endocannabinoid system in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2010. **26**(2): p. 216-22.
 12. Marsicano, G. and B. Lutz, *Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(3 Suppl): p. 27-46.
 13. Devane, W.A., et al., *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol Pharmacol, 1988. **34**(5): p. 605-13.

empezaron a buscar un ligando endógeno para este receptor. Los endocannabinoides más importantes que se han descrito hasta el momento son la anandamida (AEA), y el 2-araquidonilglicerol (2-AG). La AEA se une al receptor cannabinoide CB1 (rCB1), y en menor grado al receptor CB2 (rCB2), donde actúa como un agonista parcial, mientras que el 2-AG tiene más afinidad por la unión al rCB2, siendo también un agonista completo del rCB1. Estos ligandos son liberados a la hendidura sináptica, se unen a sus respectivos receptores y son inactivados por dos mecanismos: recaptación y degradación enzimática. La degradación enzimática es llevada a cabo por dos enzimas específicas, la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL). La FAAH degrada en la neurona postsináptica el ligando AEA que a su vez es sintetizado por el enzima N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE PLD). En esta misma neurona postsináptica se produce la síntesis del 2-AG por la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL) y es en la neurona presináptica donde la MAGL cataliza la inactivación de este último ligando. Además de los cannabinoides endógenos, se han descrito hasta sesenta clases diferentes de cannabinoides que provienen de la planta *cannabis sativa*, pudiendo destacar entre estos el tetrahidrocannabinol (THC) o el cannabidiol (CBD) ^{14, 15}.

Se sabe que el receptor cannabinoide CB1 está expresado abundante y extensamente en el cerebro, en particular en los ganglios basales, SN, globo pálido, cerebelo e hipocampo ^{16, 17}. Además, en el cuerpo estriado el rCB1 está co-expresado con los receptores dopaminérgicos D1 y D2, sugiriendo que ambos receptores comparten mecanismos de transducción de señales pudiendo regularse de forma recíproca ¹⁵. Estos hallazgos, entre otros, han

-
14. Mechoulam, R. and L.A. Parker, *The endocannabinoid system and the brain*. Annu Rev Psychol, 2013. **64**: p. 21-47.
 15. Di Iorio, G., et al., *The endocannabinoid system: a putative role in neurodegenerative diseases*. Int J High Risk Behav Addict, 2013. **2**(3): p. 100-6.
 16. Moldrich, G. and T. Wenger, *Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study*. Peptides, 2000. **21**(11): p. 1735-42.
 17. Tsou, K., et al., *Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system*. Neuroscience, 1998. **83**(2): p. 393-411.

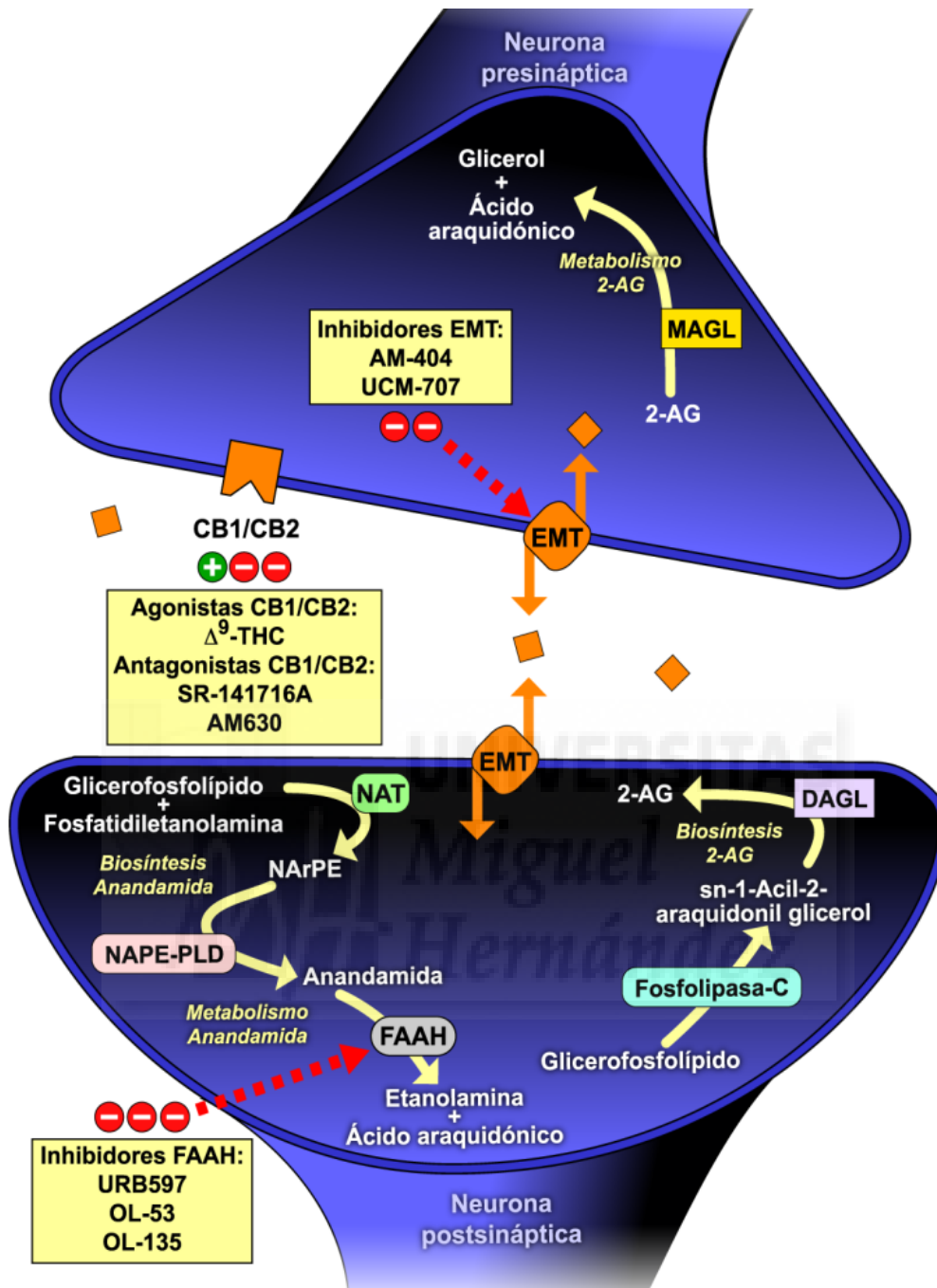


Figura 2. Caracterización del Sistema Cannabinoide Endógeno

MAGL: enzima monoacilglicerol lipasa, 2-AG: 2-araquidonilglicerol, EMT: sistema de transporte de cannabinoides endógenos, NAT: enzima N-aciltransferasa, NArPE: N-araquidonil-fosfatidiletanolamina, NAPE-PLD: enzima fosfodiesterasa selectiva de N-acil-fosfatidiletanolamina, FAAH: enzima amido hidrolasa de ácidos grasos, DAGL: enzima diacilglicerol lipasa, MAGL: enzima monoacilglicerol lipasa.

motivado la realización de muchos estudios acerca del papel que el rCB1 tendría en la regulación de la función motora y especialmente en la EP¹⁸⁻²². Entre estos estudios podemos destacar el que llevó a cabo el grupo de Peter Jenner en pacientes parkinsonianos en el que se observó por primera vez una disminución en los niveles de los rCB1 en los ganglios basales caudado, PUT y globo pálido, aunque no se sabe si esta disminución fue debida a la enfermedad en sí, al tratamiento crónico dopaminérgico, o a una combinación de ambos factores²³. Asimismo, otro estudio en un modelo animal de EP demostró que la eliminación genética del rCB1 (ratones “knock out”) aumentaba la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales a los efectos tóxicos que produce la administración de la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA)²⁴.

Por otro lado, en los últimos años se han llevado a cabo estudios con el rCB2. Inicialmente se pensaba que este receptor sólo estaba presente a nivel periférico en el sistema inmunitario y a nivel central en condiciones patológicas, pero fue en el año 2005 cuando por primera vez se descubrió la presencia del rCB2 en el cerebro de ratas y hurones en condiciones normales. Concretamente la expresión del receptor se localizaba en el cerebelo, corteza y tronco cerebral y se estudió mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)²⁵. Posteriormente se analizó la

-
18. Gilgun-Sherki, Y., et al., *The CB1 cannabinoid receptor agonist, HU-210, reduces levodopa-induced rotations in 6-hydroxydopamine-lesioned rats*. Pharmacol Toxicol, 2003. **93**(2): p. 66-70.
 19. Gonzalez, S., et al., *Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease*. Brain Res, 2006. **1073-1074**: p. 209-19.
 20. Brotchie, J.M., *CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease*. Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(1): p. 54-61.
 21. Cao, X., et al., *Blockade of Cannabinoid CB1 Receptors Augments the Antiparkinsonian Action of Levodopa without Affecting Dyskinesias in MPTP-Treated Rhesus Monkeys*. J Pharmacol Exp Ther, 2007.
 22. Cerri, S., et al., *Neuroprotective potential of adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptor antagonists in an animal model of Parkinson disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2014. **73**(5): p. 414-24.
 23. Hurley, M.J., D.C. Mash, and P. Jenner, *Expression of cannabinoid CB1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain*. J Neural Transm, 2003. **110**(11): p. 1279-88.
 24. Perez-Rial, S., et al., *Increased vulnerability to 6-hydroxydopamine lesion and reduced development of dyskinesias in mice lacking CB1 cannabinoid receptors*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(4): p. 631-45.
 25. Van Sickle, M.D., et al., *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. Science, 2005. **310**(5746): p. 329-32.

distribución de la expresión proteica y génica del rCB2 en el cerebro de roedores ^{26, 27}. Se mostró su presencia en multitud de áreas cerebrales entre las que se encontraban aquellas que regulan la función motora como el estriado (caudado y PUT) o la SN, lo que llevó a pensar en su posible implicación en patologías que cursaran con trastornos del movimiento como la EP. De hecho, en el año 2007 se describieron por primera vez alteraciones en la expresión génica del rCB2 en tejido cerebral *post mortem* entre pacientes controles y pacientes con la EP sugiriendo la posible implicación del rCB2. A partir de entonces se empezó a investigar más en el posible papel del rCB2 en la EP. Por ejemplo, un estudio reciente indica que la sobreexpresión del rCB2 es un factor protector frente a la pérdida de neuronas dopaminérgicas y el deterioro motor inducido por la 6-OHDA ²⁸. Estos resultados sugieren que el rCB2 podría tener un papel neuroprotector y ser una posible diana terapéutica para tratamientos relacionados con enfermedades neurodegenerativas como la EP.



-
26. Gong, J.P., et al., *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain*. Brain Res, 2006. **1071**(1): p. 10-23.
 27. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(7): p. 1773-84.
 28. Ternianov, A., et al., *Overexpression of CB2 cannabinoid receptors results in neuroprotection against behavioral and neurochemical alterations induced by intracaudate administration of 6-hydroxydopamine*. Neurobiol Aging, 2009.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es ampliar el conocimiento sobre la posible implicación del rCB2 en la EP. Para ello se estudió por primera vez la expresión génica del rCB2, en concreto de su isoforma A que se expresa de forma específica en tejido cerebral, en muestras *post mortem* de pacientes de Parkinson y sus respectivos controles obtenidas de diferentes biobancos. Asimismo se analizó la expresión génica de MAGL para poder tener un reflejo indirecto de su actividad metabólica sobre el endocannabinoide 2-AG que como se mencionó anteriormente muestra una elevada afinidad por la activación del rCB2.



MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Las muestras cerebrales congeladas de pacientes con EP y sus respectivos controles se obtuvieron del “Biobanco fundación CIEN (Madrid, España)”, del “Biobanco de enfermedades neurodegenerativas de Londres (Reino Unido)” y del “Biobanco de Parkinson del Reino Unido”. Los datos demográficos y *post mortem* de todos los sujetos incluidos en este estudio se muestran en la tabla 1. Se diseccionaron el PUT y la SN de los controles (n=23-16, respectivamente) y de los pacientes con EP (n=28-25, respectivamente). Los casos incluidos en el presente estudio fueron tanto hombres como mujeres y se parearon lo máximo posible por edades (Controles: 72±13 años; EP: 75±5 años) y por intervalo *post mortem* (IPM, Controles: 23±14 h; EP: 25±21 h), siendo éste el tiempo transcurrido desde que la persona fallece hasta que se realiza la disección de la región cerebral de interés y se congela.

Evaluación de la integridad del ARN (RIN)

El ARN total se aisló del tejido congelado del PUT y la SN utilizando el reactivo *Tri Reagent* (Applied Biosystems, Foster City, CA). A continuación, se analizó la integridad de las muestras de ARN mediante electroforesis utilizando el Bioanalizador 2100 (Agilent technologies, Madrid, España), detectando bandas de ARN ribosómico (18S y 28S). Dependiendo de la proporción entre la abundancia de la banda 28S y la 18S se calculó el nivel de integridad del ARN obteniendo un valor entre 1-10 denominado número de integridad de ARN (RIN), siendo 1 el equivalente a un valor de ARN completamente degradado y 10 a un ARN intacto.

Id. Sujeto	Edad	Género	IPM (horas)	Clasificación	Biobanco
BC1325	68	H	8	C	BT-CIEN
BC1448	56	H	8	C	BT-CIEN
BC1703	68	H	17	C	BT-CIEN
BC1610	58	M	6	C	BT-CIEN
BC1769	80	H	12	C	BT-CIEN
BC1798	80	M	15	C	BT-CIEN
A048/09	81	H	18	C	MRC-BB
A265/08	79	H	47	C	MRC-BB
A049/03	79	H	24	C	MRC-BB
A153/01	71	H	5	C	MRC-BB
A134/00	86	H	6	C	MRC-BB
A401/97	85	H	42	C	MRC-BB
A161/00	60	H	35	C	MRC-BB
A124/04	59	H	50	C	MRC-BB
A284/98	57	H	26	C	MRC-BB
C016	92	H	13	C	UK-PBB
C019	90	M	15	C	UK-PBB
C025	35	H	22	C	UK-PBB
C032	88	H	22	C	UK-PBB
C036	68	H	30	C	UK-PBB
PDC022	65	H	12	C	UK-PBB
PDC023	78	M	23	C	UK-PBB
PDC026	80	M	23	C	UK-PBB
PDC029	82	H	48	C	UK-PBB
BC1523	69	M	13	EP	BT-CIEN
BC1533	67	H	5	EP	BT-CIEN
BC1572	55	H	6	EP	BT-CIEN
BC1600	75	H	8	EP	BT-CIEN
BC1706	85	M	3	EP	BT-CIEN
BC1591	82	H	10	EP	BT-CIEN
A149/92	75	H	40	EP	MRC-BB
A113/93	70	H	49	EP	MRC-BB
A311/94	84	H	34	EP	MRC-BB
A323/94	74	H	10	EP	MRC-BB
A391/94	59	H	23	EP	MRC-BB
A005/95	79	H	89	EP	MRC-BB
A075/95	72	H	29	EP	MRC-BB
A226/95	76	H	66	EP	MRC-BB
A236/96	73	H	40	EP	MRC-BB
PD007	78	H	22	EP	UK-PBB
PD014	79	H	21	EP	UK-PBB
PD017	75	H	22	EP	UK-PBB
PD032	89	H	16	EP	UK-PBB
PD041	77	H	6	EP	UK-PBB
PD045	80	H	16	EP	UK-PBB
PD084	86	H	3	EP	UK-PBB
PD089	70	H	13	EP	UK-PBB
PD099	82	H	10	EP	UK-PBB
PD104	75	H	15	EP	UK-PBB
PD106	75	H	3	EP	UK-PBB
PD109	72	H	9	EP	UK-PBB
PD113	79	H	22	EP	UK-PBB

Tabla 1. Datos de las muestras cerebrales *post mortem* empleadas.

Información sobre las muestras cerebrales *post mortem* de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) y pacientes controles (C). Las muestras cerebrales se obtuvieron del “Biobanco de la Fundación CIEN (Madrid, España)” (BT-CIEN), del “Biobanco de enfermedades neurodegenerativas de Londres (Reino Unido)” (MRC-BB) y del “Biobanco de Parkinson del Reino Unido” (UK-PBB). H: hombre; M: mujer; IPM: intervalo *post mortem*.

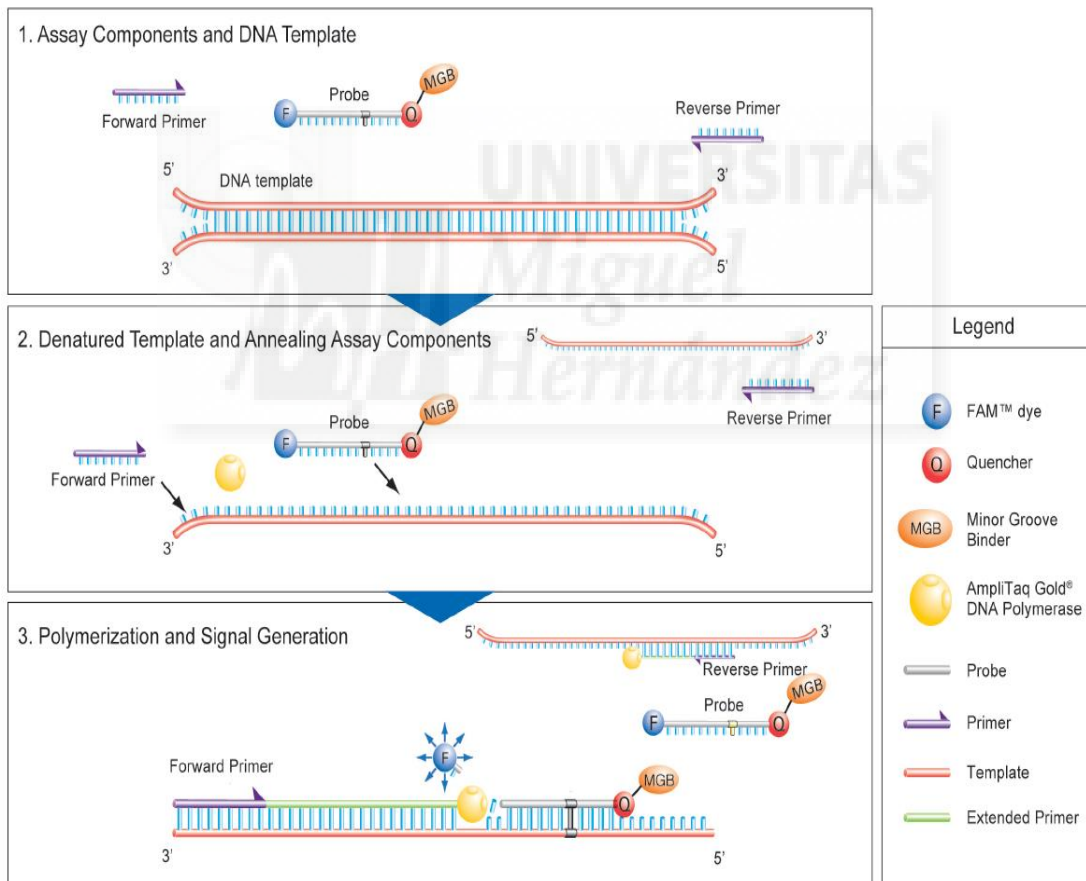
Análisis de la expresión génica: PCR a tiempo real

Los análisis de la expresión génica relativa de la isoforma A del rCB₂ (rCB_{2A}), específica del tejido cerebral²⁹, y del enzima MAGL se llevaron a cabo en las muestras *post mortem* de PUT y SN de los pacientes con EP y sus respectivos controles. Se realizó la retrotranscripción del ARN total a ADN complementario (ADNc) mediante la enzima de transcripción inversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) siguiendo las instrucciones del fabricante (Bioline).

La expresión génica relativa del rCB_{2A} y del enzima MAGL se analizó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real utilizando la tecnología Taqman (Life Technologies). Para ello se adquirieron ensayos Taqman que consisten en secuencias de ADN de doble cadena asociadas a un fluoróforo (en la figura 3 se muestra su funcionamiento). El ensayo Taqman para el rCB_{2A} se fabricó en base a la siguiente secuencia: cebador *forward*, GGAAGAAAGAGAATATTGTTTCAGTTGATT, cebador *reverse*, GCTGGCCTTGGAGAGTGACA, sonda Taqman, CCAGATGCAGCCGC; y el ensayo Taqman para el enzima MAGL corresponde a la siguiente referencia: Hs000200752_m1. Los análisis de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en el aparato StepOne© Sequence Detector System (Life Technologies, Madrid, España) que es capaz de detectar la fluorescencia emitida en cada ciclo de amplificación conforme a la cantidad de ADNc del gen correspondiente presente en la muestra. En este estudio se emplearon dos genes de referencia, la ciclofilina (PPIA, Hs99999904_m1) y la sinaptofisina (SYP, Hs00300531_m1)

29. Liu, Q.R., et al., *Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands.* Genes Brain Behav, 2009. 8(5): p. 519-30.

para asegurar la validez y la reproducibilidad de los resultados. Todos los reactivos se obtuvieron de la empresa Life Technologies siguiendo los protocolos del fabricante y las combinaciones de cebador-sonda fueron optimizados y validados para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los resultados de cada gen (rCB_{2A} y del enzima MAGL) se normalizaron con los genes de referencia endógenos, y el porcentaje de cambio se determinó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ³⁰. De esta forma los niveles de expresión génica correspondiente a los pacientes con EP se expresan de forma relativa a los niveles de los sujetos controles representando los resultados como una media de los valores obtenidos con cada gen de referencia (PPIA y SYP).



30. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.

Figura 3. Diagrama del funcionamiento de la tecnología Taqman®

Pasos de la PCR a tiempo real empleando ensayos Taqman®. 1) Al comenzar la PCR a tiempo real, la temperatura aumenta para desnaturalizar la doble cadena de ADNc. En este punto, la señal del fluoróforo situado en el extremo 5' del ensayo Taqman está inhibida por el supresor no fluorescente MGB situado en el extremo 3' del ensayo. 2) En el siguiente paso, la temperatura disminuye para permitir que los cebadores y la sonda se alineen con sus secuencias diana específicas. 3) Después, el enzima Taq polimerasa sintetiza una cadena complementaria de ADN utilizando los cebadores no marcados y la cadena de ADN que sirve como guía. Cuando la polimerasa alcanza la sonda Taqman® su actividad endonucleasa rompe la sonda separando el fluoróforo del *quencher*, produciendo la emisión de fluorescencia. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando (*FAM dye*: fluoróforo, *Quencher*: supresor, *MGB-Minor Groove Binder*: molécula de unión al surco menor, *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*: polimerasa de ADN, *Probe*: sonda, *Primer*: cebador, *Template*: plantilla de ADN).

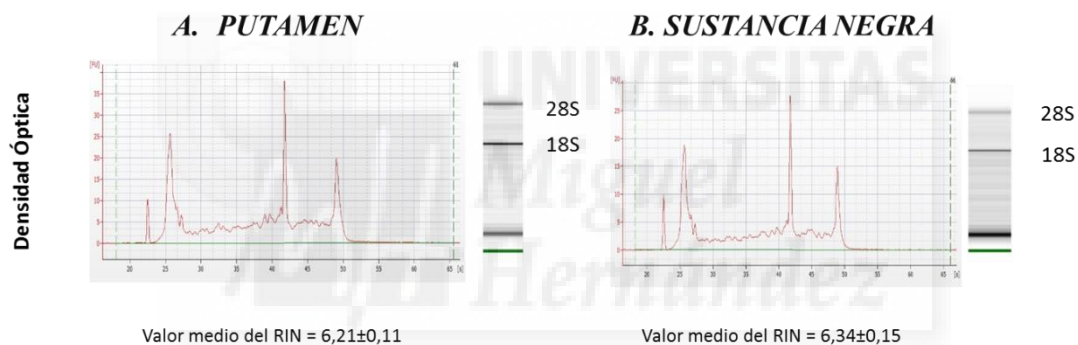
Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados de expresión génica (rCB_{2A} y el enzima MAGL) se realizaron utilizando la prueba estadística *t-Student* para comparar los sujetos controles con los EP. Para ello se empleó el programa informático Sigmaplot v11.0 considerando diferencias significativas si la probabilidad de error es menor al 5%.

RESULTADOS

Evaluación de la integridad del ARN total en tejido cerebral congelado de PUT y SN de sujetos controles y EP: número de integridad de ARN (RIN)

Los resultados mostraron que el valor medio del RIN fue mayor a 6 tanto en el PUT (C= $6,500 \pm 0,185$, rango: 7,10-4,60; PD= $6,21 \pm 0,11$, rango: 8,0-5,5), como en la SN (C= $6,07 \pm 0,21$, rango: 6,9-5,1; PD= $6,34 \pm 0,15$, rango: 6,8-5,3), considerando que este valor corresponde a un ARN de buena calidad que permite obtener resultados de expresión génica fiables ³¹. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los sujetos controles y EP en cuanto al valor medio de RIN de ninguna de las regiones cerebrales estudiadas (PUT: *t-Student*: $t = -1,50$, $p=0,14$, 30 gl; SN: *t-Student*: $t = 0,10$, $p= 0,92$, 19 gl).



Resumen de los valores RIN (media \pm SEM)

	PUT	SN	
CONTROL	$6,50 \pm 0,19$	$6,07 \pm 0,21$	$6,26 \pm 0,15$
PARKINSON	$6,05 \pm 0,11$	$6,61 \pm 0,17$	$6,30 \pm 0,11$
	$6,21 \pm 0,11$	$6,34 \pm 0,15$	

Figura 4. Análisis de integridad del ARN

En la figura 1 se muestran las imágenes de los electroferogramas y geles correspondientes donde se observan las bandas 28S y 18S, representativas del RIN para el PUT (A) y la SN (B); y una tabla resumen con los valores medios del RIN (C).

31. Kap, M., et al., *Fit for purpose frozen tissue collections by RNA integrity number-based quality control assurance at the Erasmus MC tissue bank*. Biopreserv Biobank, 2014. **12**(2): p. 81-90.

Análisis de la expresión génica del rCB_{2A} en el PUT y SN de los sujetos controles y EP mediante PCR a tiempo real

Los análisis de PCR a tiempo real de la expresión génica del rCB_{2A} revelaron una disminución significativa en el PUT (Figura 2A; -42%; *t-Student*: $t = 5,43$, $p < 0,001$, 49 gl) y un aumento en la SN (Figura 2B; 295%; *t-Student*: $t = -5,76$, $p < 0,001$, 36 gl) de los EP comparado con los sujetos controles.

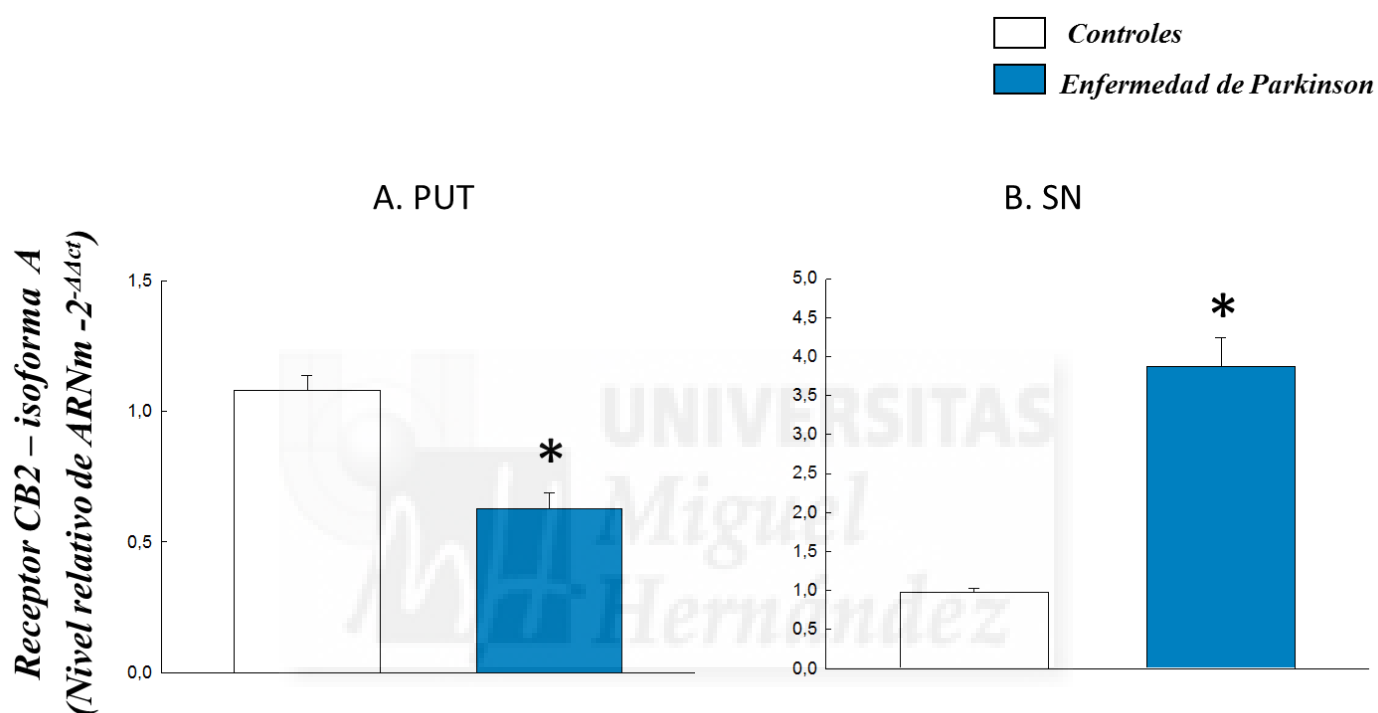


Figura 5. Análisis de la expresión génica del rCB_{2A}.

Evaluación de la expresión génica del rCB_{2A} mediante PCR a tiempo real en el PUT (A) y la SN (B) en pacientes con EP en relación a los sujetos controles. Los valores de expresión génica se representan como la media \pm error estándar medio de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *, valores correspondientes a los EP estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en relación a los sujetos controles.

Análisis de la expresión génica del enzima MAGL en el PUT y SN de los sujetos controles y EP mediante PCR a tiempo real

Los análisis de la expresión génica del enzima MAGL mostraron cambios opuestos en relación al rCB_{2A}. Los pacientes con EP presentaron un incremento significativo en la expresión del gen MAGL en el PUT (Figura 3A; 121.72 %; *t-Student*: $t = -3,30$, $p = 0,002$, 49 gl) y una disminución significativa

en la SN (Figura 3B; -27.70%; *t-Student*: $t = 2,98$, $p=0,005$, 36 gl) en comparación con los controles.

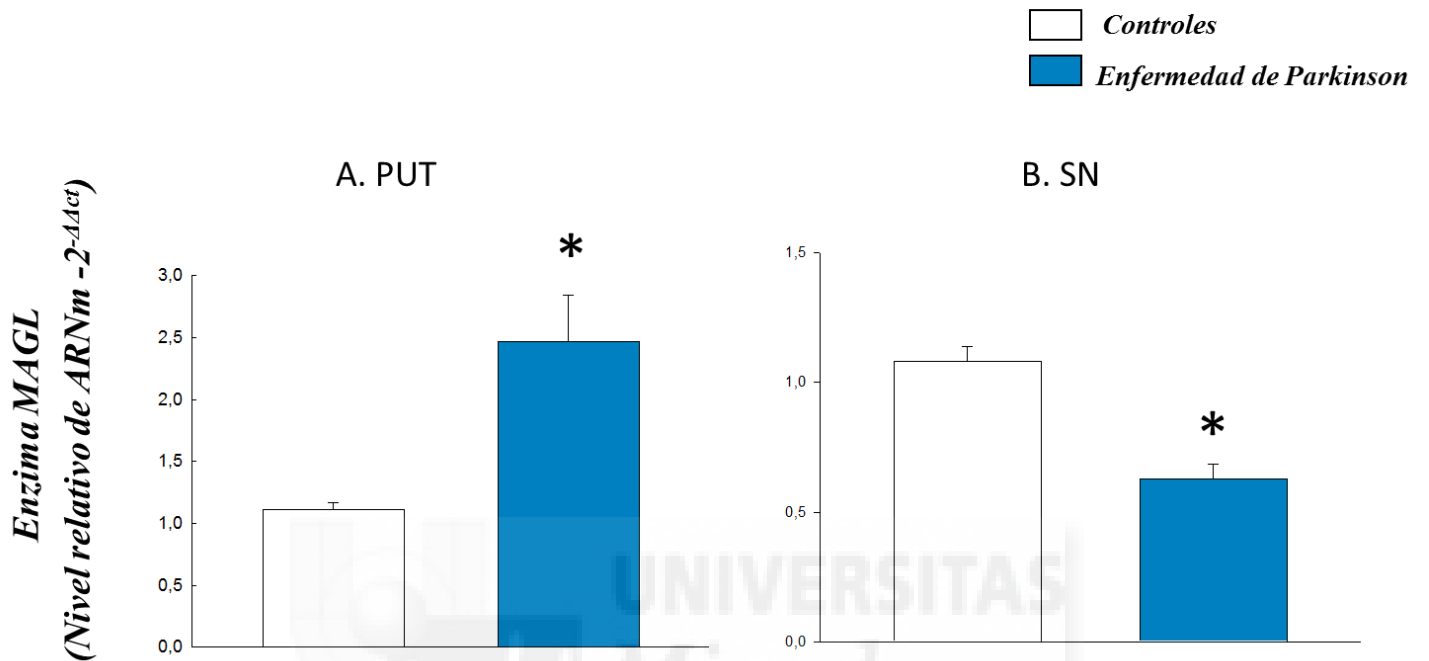


Figura 6. Análisis de la expresión génica del enzima MAGL.

Evaluación de la expresión génica del enzima MAGL mediante PCR a tiempo real en el PUT (A) y la SN (B) en pacientes con EP en relación a los sujetos controles. Los valores de expresión génica se representan como la media \pm error estándar medio de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *, valores correspondientes a los EP estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en relación a los sujetos controles.

DISCUSIÓN

Los hallazgos obtenidos en el presente estudio sugieren que el rCB2 y el enzima MAGL podrían tener un papel importante en el proceso neurodegenerativo de la EP. Esta suposición se apoya en los cambios significativos de expresión génica que se han detectado, evidenciando por un lado una disminución del rCB2A en el PUT y un aumento muy notable en la SN de los EP, mientras que de forma opuesta la expresión génica del enzima MAGL aumentó en el PUT y disminuyó en la SN en comparación con los sujetos controles.

Entre las posibles etiologías que se han propuesto para la EP, los procesos neuroinflamatorios han cobrado mucha importancia en las últimas décadas. Fue en el año 1988 cuando por primera vez McGeer y cols. observaron en tejido cerebral *post mortem* un aumento de la expresión de células microgliales en la SN de pacientes con EP³². Como consecuencia de la mayor activación de la microglía se desencadena la liberación de numerosos factores neuroinflamatorios que finalmente son responsables de producir la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales³³⁻³⁵ produciendo la sintomatología que caracteriza a la enfermedad. Hasta ahora, se tienen evidencias de que el rCB2 podría estar implicado en los fenómenos neuroinflamatorios que acontecen en el cerebro durante el desarrollo de determinadas enfermedades neurodegenerativas³⁶. Algunos estudios han demostrado que la activación de los rCB2 y el aumento de su expresión están relacionados con la reducción del efecto neuroinflamatorio, habiéndose postulado un posible efecto neuroprotector por parte del rCB2. En un modelo animal de la enfermedad de Huntington, que al igual que la EP también tiene su

-
32. McGeer, P.L., et al., *Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process*. Ann Neurol, 1988. **24**(4): p. 574-6.
 33. Braak, H., M. Sastre, and K. Del Tredici, *Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(3): p. 231-41.
 34. Lee, H.J., et al., *Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies*. J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 9262-72.
 35. Gu, X.L., et al., *Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice*. Mol Brain, 2010. **3**: p. 12.
 36. Ashton, J.C. and M. Glass, *The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration*. Curr Neuropharmacol, 2007. **5**(2): p. 73-80.

origen en procesos neurodegenerativos y cursa con alteraciones motoras, se observó que la activación del rCB2 reduce la lesión causada por el malonato, revirtiendo este efecto con la administración de un antagonista selectivo del rCB2³⁷. Asimismo, el agonismo del rCB2 redujo de forma significativa los efectos tóxicos de la administración de beta amiloide en condiciones tanto *in vitro* como *in vivo*, hallazgo que tiene una implicación importante en relación al proceso neurodegenerativo de la enfermedad de Alzheimer³⁸. También cabe destacar que otros autores han demostrado que la administración del AM1241, agonista selectivo del rCB2, retrasa la pérdida de la función motora, la parálisis y la pérdida de peso en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica en ratón³⁹. Por otro lado, en un modelo de lesión dopaminérgica mediante la inyección intracerebral (intraestriatal) de dos toxinas diferentes: LPS (lipopolisacárido) y 6-OHDA, se observó un aumento de la expresión del rCB2. Además, es importante destacar que dicho aumento fue superior ante la administración de LPS, toxina que da lugar a una mayor reacción de tipo neuroinflamatorio⁴⁰. Asimismo, en otro estudio en el que se indujo la lesión dopaminérgica en ratones mediante las toxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y LPS, también se observó un aumento de la expresión del rCB2 en el área nigroestriatal en respuesta a dicha lesión⁴¹. Diversos autores han propuesto que estos efectos beneficiosos como consecuencia de la mayor activación del rCB2 podrían deberse a un bloqueo en la diferenciación de la microglía hacia un fenotipo neurotóxico, y en la inhibición de la liberación de los factores neuroinflamatorios cuando la microglía está activada³⁶.

-
36. Ashton, J.C. and M. Glass, *The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration*. *Curr Neuropharmacol*, 2007. **5**(2): p. 73-80.
 37. Sagredo, O., et al., *Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease*. *Glia*, 2009. **57**(11): p. 1154-67.
 38. Ramirez, B.G., et al., *Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation*. *J Neurosci*, 2005. **25**(8): p. 1904-13.
 39. Kim, K., et al., *AM1241, a cannabinoid CB2 receptor selective compound, delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. *Eur J Pharmacol*, 2006. **542**(1-3): p. 100-5.
 40. Concannon, R.M., et al., *Differential upregulation of the cannabinoid CB receptor in neurotoxic and inflammation-driven rat models of Parkinson's disease*. *Exp Neurol*, 2015. **269**: p. 133-141.
 41. Gomez-Galvez, Y., et al., *Potential of the cannabinoid CB receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2015.

Por tanto, se tienen bastantes evidencias de que ante un fenómeno lesivo que cursa con neuroinflamación y neurodegeneración se produce un aumento significativo de la presencia del rCB2, probablemente como mecanismo de defensa. Los resultados que se han obtenido en el presente estudio estarían de acuerdo con tales hallazgos, demostrando un aumento muy significativo de la expresión génica del rCB2 en la SN de los EP donde se produce una gran pérdida neuronal. Sin embargo, en el PUT se observó una disminución de la expresión génica del rCB2. Este cambio opuesto entre ambas regiones cerebrales se podría atribuir a la diferente regulación regional del sistema endocannabinoide que además dependería de la actividad dopaminérgica ⁴². De hecho, los resultados de un estudio reciente apoyan esta hipótesis ya que los endocannabinoides (AEA y 2-AG) son regulados recíprocamente y diferencialmente por el receptor de dopamina. Los datos de este estudio indican que la disminución de la activación de los receptores D1 y D2 se traduciría en un aumento del contenido endocannabinoide lo que podría contribuir a la disfunción motora que ocurre en la EP. De hecho, se sabe que la administración conjunta de un agonista dopaminérgico D2 y un antagonista CB1 mejora mucho más la estimulación locomotora que la administración sola de un agonista D2. Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en pacientes con EP se evaluó la presencia de rCB1 mediante tomografía de emisión de positrones empleando un radioligando (MK-9470) que se une de forma específica al rCB1. Los sujetos con EP mostraron una disminución significativa en la presencia de rCB1 en la región que comprende la SN en comparación con los controles; mientras que por lo contrario se observó un aumento en el PUT ⁴². Estos resultados apoyan la idea de que la regulación del sistema endocannabinoide puede ser opuesta entre la SN, donde se localizan los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas, y el PUT hacia donde se proyectan sus terminales axónicos. Asimismo la neurodegeneración que se

42. Patel, S., D.J. Rademacher, and C.J. Hillard, *Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **306**(3): p. 880-8.

produce en la SN de los pacientes con EP es muy superior que en el PUT, hecho que también podría explicar la regulación opuesta de la expresión génica del rCB2 entre ambas regiones.

El daño cerebral que ocurre en enfermedades neurodegenerativas como la EP, se acompaña de un aumento en la producción de endocannabinoides en el cerebro. En un estudio llevado a cabo por Sagredo y cols. en el que se revisaban las propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides en modelos animales de enfermedades que afectan a los ganglios basales como la EP o la enfermedad de Huntington, han observado que los niveles de los ligandos endocannabinoides AEA y 2-AG aumentan, lo que sugiere una posible acción neuroprotectora ⁴³. Además, en un estudio de Di Marzo y cols. se midieron los niveles y la distribución de AEA y del 2-AG en cerebro de ratas tratadas con reserpina, toxina que produce la depleción de las vesículas que contienen dopamina de la neurona presináptica. Se observó una disminución de la actividad motora asociada con un aumento muy notable del 2-AG en el globo pálido, sin encontrar diferencias en otras áreas cerebrales. Asimismo, la administración de quinpirol (agonista dopaminérgico) consiguió mejorar la actividad motora de las ratas tratadas con reserpina y además reducir los niveles de 2-AG y AEA en el globo pálido ⁴⁴. Por otro lado, en un modelo de EP realizado en monos lesionados con MPTP, se observa un aumento significativo de los niveles de AEA y 2-AG en el estriado y en la SN ⁴⁵. Por lo tanto, en estos estudios previamente mencionados se observa que ante un proceso lesivo que induce neurodegeneración se produce un aumento en la liberación de los endocannabinoides como mecanismo compensatorio ante la pérdida de función dopaminérgica. Estos hallazgos motivaron la realización de ensayos para evaluar si la inactivación del enzima MAGL, que produce un aumento del 2-AG principalmente, podría tener un efecto neuroprotector. De esta forma, algunas publicaciones han propuesto que el enzima MAGL podría tener un

43. Sagredo, O., et al., *Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders*. Mol Neurobiol, 2007. **36**(1): p. 82-91.

44. Di Marzo, V., et al., *Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease*. FASEB J, 2000. **14**(10): p. 1432-8.

45. van der Stelt, M., et al., *A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease*. FASEB J, 2005. **19**(9): p. 1140-2.

papel importante en la regulación de los niveles de endocannabinoides, pudiendo estar implicada en la regulación de procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos. Un estudio reciente sugiere que la inhibición del enzima MAGL podría prevenir la activación de las células de la astroglia interfiriendo en los procesos de neuroinflamación. Para demostrar dicha hipótesis se utilizaron muestras cerebrales de un modelo animal de Alzheimer, en el que al igual que en la EP, se produce neurodegeneración. Mediante un marcador de neurodegeneración denominado Fluoro-Jade C (FJC) se observó que los niveles de las neuronas marcadas habían disminuido en aquellos animales que habían recibido el fármaco JZL184, un inhibidor irreversible del enzima MAGL. Por tanto, el aumento en la disponibilidad de 2-AG como consecuencia de la inhibición del enzima MAGL redujo los procesos neurodegenerativos característicos del modelo animal empleado ⁴⁶. También se evaluó el efecto de la inhibición farmacológica del enzima MAGL en ratones a los que se les administró MPTP y probenecid. Tras tratar a los ratones con JZL184 se llegó a la conclusión de que el inhibidor del enzima MAGL podría tener un posible efecto neuroprotector en el área nigroestriatal ya que éste induce un cambio en la activación de microglía y astroglia, que a su vez participan en la respuesta neuroinflamatoria ⁴⁷. Por tanto, de acuerdo con los trabajos previos se podría hipotetizar que en el PUT de los EP se produciría probablemente un aumento significativo de 2-AG que justificaría que se produzca un aumento de la expresión génica del enzima MAGL y una disminución del rCB2 como fenómenos compensatorios (aumento de la metabolización de 2-AG y regulación a la baja de los rCB2). Por el contrario, se hipotetiza que se pudiera tener una situación contraria en la SN quizás como consecuencia de la mayor neurodegeneración dopaminérgica en esta región cerebral. Esto conllevaría una menor presencia de 2-AG y como consecuencia una disminución del enzima MAGL y un aumento notable del rCB2 (disminución de la metabolización de 2AG y regulación al alta de los rCB2). Sin embargo, no se

46. Chen, R., et al., *Monoacylglycerol lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease*. Cell Rep, 2012. **2**(5): p. 1329-39.

47. Fernandez-Suarez, D., et al., *The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL 184 is neuroprotective and alters glial cell phenotype in the chronic MPTP mouse model*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(11): p. 2603-16

puede descartar que haya otros factores implicados por lo que sería necesario realizar estudios adicionales tanto para demostrar los cambios hipotetizados en los niveles de endocannabinoides como para evaluar qué otras dianas estarían participando.

En definitiva, los hallazgos obtenidos con este trabajo han ayudado a incrementar nuestro conocimiento sobre el papel que el rCB2 y el enzima MAGL podrían tener en la neuropatología de la EP. Las alteraciones en la expresión génica de ambas dianas sugieren la potencial utilidad del desarrollo de nuevas herramientas farmacoterapéuticas que regulen su actividad para el tratamiento de la EP y otras patologías neurodegenerativas.



CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran la existencia de alteraciones a nivel de la expresión génica del rCB2 y del enzima MAGL tanto en PUT como en SN, sugiriendo su implicación en la neuropatología de la EP.

La modulación farmacológica tanto del rCB2 como del enzima MAGL podría ser una herramienta terapéutica para el tratamiento de la EP y otras patologías neurodegenerativas que cursen con alteraciones motoras.

Se requieren estudios adicionales que ayuden a entender y conocer mejor la implicación del rCB2 y del enzima MAGL en la neuropatología de la EP y su posible papel neuroprotector, esclareciendo los procesos de regulación opuesta entre la SN y el PUT que se han observado.



REFERENCIAS

1. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy*. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2002. **14**(2): p. 223-36; discussion 222.
2. Lewis Rowland, T.A.P.M., *Neurología de Merritt*. 12 ed. 2011.
3. Braak, H. and E. Braak, *Pathoanatomy of Parkinson's disease*. J Neurol, 2000. **247 Suppl 2**: p. II3-10.
4. Cooper, J.A., et al., *Cognitive impairment in early, untreated Parkinson's disease and its relationship to motor disability*. Brain, 1991. **114 (Pt 5)**: p. 2095-122.
5. H P Rang, M.M.D., J M Ritter, R J Flower, G Henderson, *Rang y Dale Farmacología*. 7ª ed. 2012.
6. Jesús Flórez, J.A.A., Africa Mediavilla, *Farmacología humana*. 5ª ed. 2008.
7. Connolly, B.S. and A.E. Lang, *Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review*. JAMA, 2014. **311**(16): p. 1670-83.
8. Fernandez-Ruiz, J., *The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(7): p. 1029-40.
9. Fernandez-Ruiz, J., et al., *The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage*. Expert Opin Ther Targets, 2010. **14**(4): p. 387-404.
10. Fernandez-Ruiz, J. and S. Gonzales, *Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia*. Handb Exp Pharmacol, 2005(168): p. 479-507.
11. Pisani, V., et al., *Homeostatic changes of the endocannabinoid system in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2010. **26**(2): p. 216-22.
12. Marsicano, G. and B. Lutz, *Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(3 Suppl): p. 27-46.
13. Devane, W.A., et al., *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol Pharmacol, 1988. **34**(5): p. 605-13.
14. Mechoulam, R. and L.A. Parker, *The endocannabinoid system and the brain*. Annu Rev Psychol, 2013. **64**: p. 21-47.
15. Di Iorio, G., et al., *The endocannabinoid system: a putative role in neurodegenerative diseases*. Int J High Risk Behav Addict, 2013. **2**(3): p. 100-6.
16. Moldrich, G. and T. Wenger, *Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study*. Peptides, 2000. **21**(11): p. 1735-42.
17. Tsou, K., et al., *Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system*. Neuroscience, 1998. **83**(2): p. 393-411.
18. Gilgun-Sherki, Y., et al., *The CB1 cannabinoid receptor agonist, HU-210, reduces levodopa-induced rotations in 6-hydroxydopamine-lesioned rats*. Pharmacol Toxicol, 2003. **93**(2): p. 66-70.
19. Gonzalez, S., et al., *Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease*. Brain Res, 2006. **1073-1074**: p. 209-19.

20. Brotchie, J.M., *CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease*. *Curr Opin Pharmacol*, 2003. **3**(1): p. 54-61.
21. Cao, X., et al., *Blockade of Cannabinoid CB1 Receptors Augments the Antiparkinsonian Action of Levodopa without Affecting Dyskinesias in MPTP-Treated Rhesus Monkeys*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007.
22. Cerri, S., et al., *Neuroprotective potential of adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptor antagonists in an animal model of Parkinson disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014. **73**(5): p. 414-24.
23. Hurley, M.J., D.C. Mash, and P. Jenner, *Expression of cannabinoid CB1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain*. *J Neural Transm*, 2003. **110**(11): p. 1279-88.
24. Perez-Rial, S., et al., *Increased vulnerability to 6-hydroxydopamine lesion and reduced development of dyskinesias in mice lacking CB1 cannabinoid receptors*. *Neurobiol Aging*, 2011. **32**(4): p. 631-45.
25. Van Sickle, M.D., et al., *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. *Science*, 2005. **310**(5746): p. 329-32.
26. Gong, J.P., et al., *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain*. *Brain Res*, 2006. **1071**(1): p. 10-23.
27. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors*. *Br J Pharmacol*, 2010. **160**(7): p. 1773-84.
28. Ternianov, A., et al., *Overexpression of CB2 cannabinoid receptors results in neuroprotection against behavioral and neurochemical alterations induced by intracaudate administration of 6-hydroxydopamine*. *Neurobiol Aging*, 2009.
29. Liu, Q.R., et al., *Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands*. *Genes Brain Behav*, 2009. **8**(5): p. 519-30.
30. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
31. Kap, M., et al., *Fit for purpose frozen tissue collections by RNA integrity number-based quality control assurance at the Erasmus MC tissue bank*. *Biopreserv Biobank*, 2014. **12**(2): p. 81-90.
32. McGeer, P.L., et al., *Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process*. *Ann Neurol*, 1988. **24**(4): p. 574-6.
33. Braak, H., M. Sastre, and K. Del Tredici, *Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease*. *Acta Neuropathol*, 2007. **114**(3): p. 231-41.
34. Lee, H.J., et al., *Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(12): p. 9262-72.
35. Gu, X.L., et al., *Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice*. *Mol Brain*, 2010. **3**: p. 12.

36. Ashton, J.C. and M. Glass, *The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration*. *Curr Neuropharmacol*, 2007. **5**(2): p. 73-80.
37. Sagredo, O., et al., *Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease*. *Glia*, 2009. **57**(11): p. 1154-67.
38. Ramirez, B.G., et al., *Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation*. *J Neurosci*, 2005. **25**(8): p. 1904-13.
39. Kim, K., et al., *AM1241, a cannabinoid CB2 receptor selective compound, delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. *Eur J Pharmacol*, 2006. **542**(1-3): p. 100-5.
40. Concannon, R.M., et al., *Differential upregulation of the cannabinoid CB receptor in neurotoxic and inflammation-driven rat models of Parkinson's disease*. *Exp Neurol*, 2015. **269**: p. 133-141.
41. Gomez-Galvez, Y., et al., *Potential of the cannabinoid CB receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2015.
42. Patel, S., D.J. Rademacher, and C.J. Hillard, *Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **306**(3): p. 880-8.
43. Sagredo, O., et al., *Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders*. *Mol Neurobiol*, 2007. **36**(1): p. 82-91.
44. Di Marzo, V., et al., *Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease*. *FASEB J*, 2000. **14**(10): p. 1432-8.
45. van der Stelt, M., et al., *A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease*. *FASEB J*, 2005. **19**(9): p. 1140-2.
46. Chen, R., et al., *Monoacylglycerol lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease*. *Cell Rep*, 2012. **2**(5): p. 1329-39.
47. Fernandez-Suarez, D., et al., *The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 is neuroprotective and alters glial cell phenotype in the chronic MPTP mouse model*. *Neurobiol Aging*, 2014. **35**(11): p. 2603-16.