

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**ARQUITECTURA SUBCELULAR DEL
SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
EN EL NÚCLEO VENTROMEDIAL
DEL HIPOTÁLAMO DE RATÓN**

TESIS DOCTORAL

LEIRE REGUERO ACEBAL

2012



Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**ARQUITECTURA SUBCELULAR DEL
SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
EN EL NÚCLEO VENTROMEDIAL
DEL HIPOTÁLAMO DE RATÓN**

TESIS DOCTORAL

LEIRE REGUERO ACEBAL

2012

Tesis Doctoral presentada por la Lda.

LEIRE REGUERO ACEBAL

Financiada por una beca predoctoral para la
formación de investigadores del Gobierno Vasco.

Referencia: BFI07.286

DIRECTOR

Prof. Dr. PEDRO ROLANDO GRANDES MORENO

Departamento de Neurociencias

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Leioa, 2012

Chiayu, Paola y Catherine, por su gran apoyo, contribuyendo a que mi estancia allí fuera lo mejor posible.

Finalmente, y sin embargo quizás lo más importante de todo, a mi familia, especialmente a mis padres, por apoyarme en todo esto a pesar del desconocimiento, a mi hermana, por estar siempre a mi lado y a Borja, por compartir esta ilusión. Sin ellos nada de esto habría sido posible. Así que a vosotr@s en especial MUCHAS GRACIAS POR TODO.

Y a todas las personas que han formado parte importante en mi vida, las más grandes y las más pequeñas, por caminar a mi lado y darme la mano cuando caigo para poder volver a levantarme y seguir caminando. Porque como decía el principito, no se ve bien sino con el corazón, lo esencial es invisible a los ojos.

MUCHAS GRACIAS A TOD@S.

*“Hay personas que nos hablan y ni las escuchamos,
hay personas que nos hieren y no dejan ni cicatriz,
pero hay personas que simplemente aparecen
en nuestra vida y nos marcan para siempre.”*

Cecilia Meireles

*Mientras los pensamientos de una persona
se hallen dispersos, no logrará ningún resultado;
mas si su pensamiento se concentra en un único punto,
sus frutos serán maravillosos.*

“Abdu l-Bahá, Selección de los escritos”

0. ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cannabinoides	3
1.2. Sistema endocannabinoide	5
1.2.1. Receptores de cannabinoides	5
1.2.2. Distribución de los receptores de cannabinoides.....	8
1.2.3. Mecanismos de transducción de señales	12
1.2.4. Endocannabinoides.....	15
1.2.5. Localización y características farmacológicas de los endocannabinoides.....	16
1.2.6. Metabolismo de los endocannabinoides.....	18
1.2.6.1. Biosíntesis y degradación de anandamida	18
1.2.6.2. Biosíntesis y degradación de 2-AG	22
1.2.6.3. Transporte de los endocannabinoides	25
1.2.7. Acciones fisiológicas del sistema endocannabinoide	26
1.2.8. Perspectivas terapéuticas	28
1.3. Hipotálamo.....	31
1.3.1. Generalidades	31
1.3.2. Núcleo ventromedial del hipotálamo	34
1.3.2.1. Anatomía y citoarquitectura	34
1.3.2.2. Formación del VMH: neurogénesis y migración	38
1.3.2.3. Conexiones	39
1.3.2.4. Funciones.....	42
1.3.2.5. VMH y regulación de la ingesta	43
1.3.3. Esquema básico sobre la regulación de la ingesta.....	47
1.4. Hipótesis de trabajo.....	50

2. OBJETIVOS	55
---------------------------	-----------

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Plan de trabajo	59
3.2. Anticuerpos	60
3.3. Animales de experimentación	66
3.3.1. Generación de los ratones CB_1 -KO.....	67
3.3.2. Generación de los ratones Glu- CB_1 -KO.....	67
3.3.3. Generación de los ratones GABA- CB_1 -KO	68
3.3.4. Generación de los ratones GFAP- CB_1 -KO.....	69
3.4. Fundamento de las técnicas inmunocitoquímicas	70
3.4.1. Método de la avidina-biotina peroxidasa	70
3.4.2. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica	72
3.4.3. Método de doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica	73
3.4.4. Método de inmunofluorescencia.....	74
3.5. Procesado del tejido	75
3.5.1. Perfusión transcardíaca de los animales.....	75
3.5.2. Método de la avidina-biotina peroxidasa para microscopía de luz	75
3.5.3. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica	77
3.5.4. Método de doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica	78
3.5.5. Método de inmunofluorescencia.....	80
3.6. Análisis estadístico.....	81

4. RESULTADOS

4.1. Arquitectura celular y subcelular del receptor CB₁ en las terminales sinápticas del VMH	85
4.1.1. Microscopía de luz	85
4.1.1.1. Patrón de expresión de CB ₁ en el VMH	85
4.1.1.2. Controles de especificidad para CB ₁	87
4.1.2. Microscopía confocal	87
4.1.3. Microscopía electrónica de transmisión.....	89
4.1.3.1. Distribución subcelular de CB ₁ en el VMH.....	89
4.2. Localización ultraestructural del receptor CB₁ en la astrogliá del VMH.....	97
4.3. Inmunolocalización de las enzimas de síntesis y degradación de anandamida en el VMH	103
4.3.1. Microscopía de luz	103
4.3.1.1. Patrón de expresión de NAPE-PLD y FAAH en el VMH.....	103
4.3.1.2. Controles de especificidad para NAPE-PLD y FAAH	104
4.3.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	104
4.3.2.1. Distribución subcelular de NAPE-PLD en el VMH.....	104
4.3.2.2. Distribución subcelular de FAAH en el VMH	106
4.4. Inmunolocalización de las enzimas de síntesis y degradación de 2-AG en el VMH.....	109
4.4.1. Microscopía de luz	109
4.4.1.1. Patrón de expresión de DAGL- α y MAGL en el VMH.....	109
4.4.1.2. Controles de especificidad para DAGL- α y MAGL	110
4.4.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	110
4.4.2.1. Distribución subcelular de DAGL- α en el VMH.....	110
4.4.2.2. Distribución subcelular de MAGL en el VMH	113
4.5. Comparación entre las enzimas	116

5. DISCUSIÓN

5.1. Localización del receptor CB₁ en el VMH.....	121
5.1.1. Localización de CB ₁ en las terminales sinápticas excitadoras e inhibitoras del VMH	121
5.2. Localización ultraestructural del receptor CB₁ en los astrocitos del VMH	126
5.3. Localización de las enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides en el VMH	133
5.3.1. Localización ultraestructural de NAPE-PLD en el VMH.....	133
5.3.2. Localización ultraestructural de FAAH en el VMH	137
5.3.3. Localización ultraestructural de DAGL- α en el VMH	139
5.3.4. Localización ultraestructural de MAGL en el VMH	141
5.4. Esquemas finales	143

6. CONCLUSIONES.....	147
-----------------------------	------------

7. BIBLIOGRAFÍA	151
------------------------------	------------

ANEXOS

Anexo I. Publicaciones en revistas científicas	183
Anexo II. Estancia en el extranjero	193
Anexo III. Concursos de microfotografías	205

VERSIÓN RESUMIDA EN INGLÉS	215
---	------------

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CANNABINOIDES

La descripción de la planta *Cannabis sativa* así como sus propiedades medicinales ya eran conocidas por los griegos y romanos desde el siglo I a. C., cuando Dioscórides la incluyó en su obra clásica de farmacología titulada *Materia Medica* (Freund y cols., 2003).

La planta *Cannabis sativa* contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes de los que unos 60 se consideran dentro del grupo de los cannabinoides (Dewey, 1986). El principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), que fue aislado a partir de la misma en el año 1964 por Gaoni y Mechoulam.

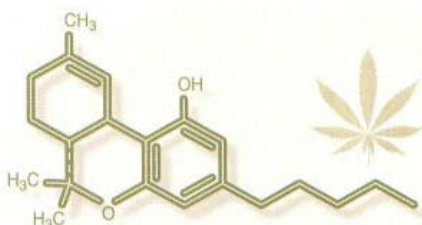


Figura 1. Estructura química del Δ^9 -THC.

Sin embargo, hubo que esperar más de dos décadas hasta que se descubriera que los principios activos de esta planta tienen sus efectos psicotrópicos a través de la activación de una serie de receptores de membrana presentes en las células nerviosas (Howlett, 1995; Pertwee, 1997). A estos receptores se unen el Δ^9 -THC y otros cannabinoides de la *Cannabis sativa*, pero también una serie de ligandos endógenos que por analogía funcional se denominan cannabinoides endógenos o “endocannabinoides” (Mechoulam y cols., 1994; Martin y cols., 1999).

Por tanto, bajo el término “cannabinoide” se agrupan numerosas sustancias con estructuras químicas diferentes, pero que tienen en común la capacidad de actuar a nivel de algunos de los elementos constituyentes del sistema endocannabinoide (Pertwee, 2000).

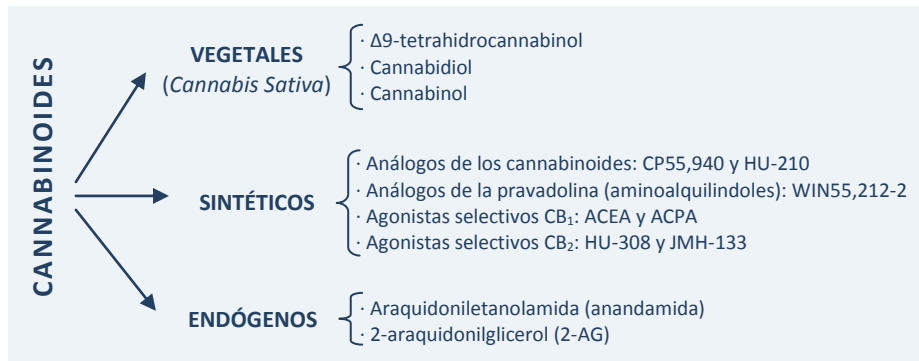


Figura 2. Principales cannabinoides y compuestos relacionados.

1.2. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

El sistema endocannabinoide es un complejo sistema endógeno de señalización que interviene en múltiples vías metabólicas (Cota y Woods, 2005). Está formado por los receptores de cannabinoides, sus ligandos endógenos o endocannabinoides y las proteínas involucradas en su síntesis e inactivación, así como las vías de señalización intracelulares reguladas por los endocannabinoides (De Petrocellis y cols., 2004).

1.2.1. Receptores de cannabinoides

- Receptores clásicos: CB₁ y CB₂

Los cannabinoides ejercen sus efectos mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta el momento se han clonado dos receptores para cannabinoides: el receptor CB₁ (Matsuda y cols., 1990) y el receptor CB₂ (Munro y cols., 1993).

El **receptor CB₁** fue clonado y secuenciado en el año 1990 a partir de cerebro de rata (Matsuda y cols., 1990), donde se expresa abundantemente. Contiene 472-473 aminoácidos organizados en una secuencia característica, altamente conservada entre las distintas especies estudiadas (Herkenham y cols., 1991; Glass y cols., 1997). El receptor CB₁ humano fue clonado poco después a partir de muestras de tronco del encéfalo (Gérard y cols., 1990) identificándose la localización del gen en la región q14-q15 del cromosoma 6 (Caenazzo y cols., 1991; Hoehe y cols., 1991). El receptor CB₁ humano presenta una homología con el de la rata del 93% en la secuencia nucleotídica y del 98% en la secuencia aminoacídica (Gérard y cols., 1991).

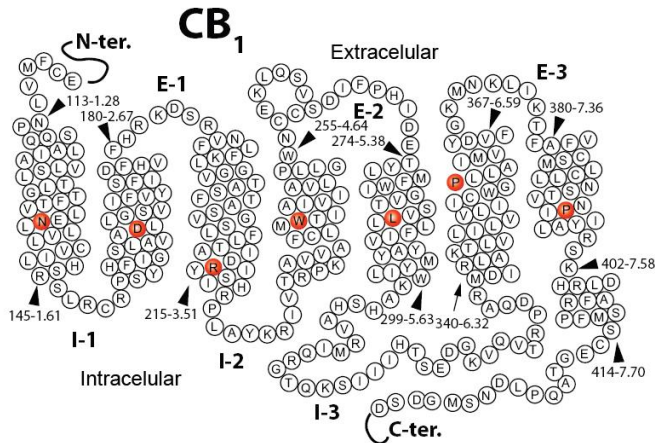


Figura 3. Representación de la secuencia del receptor CB₁ humano. La imagen ha sido adaptada de Mackie, 2008a.

También se ha descrito la existencia de una variante del receptor CB₁, denominado CB_{1(b)}, resultante de un ensamblaje alternativo y que origina una isoforma con 61 aminoácidos menos en el extremo amino-terminal. La distribución del ARN mensajero (ARNm) que codifica este receptor es similar a la del receptor CB₁, tanto dentro como fuera del sistema nervioso central, aunque su nivel de expresión es mucho menor (Shire y cols., 1995). Sin embargo, hasta el momento la proteína CB_{1(b)} no ha sido detectada *in vivo*, por lo que su existencia y posible relevancia funcional siguen estando en entredicho.

Se han identificado varios polimorfismos para el receptor CB₁ (Norrod y Puffenbarger, 2007) relacionándose algunos de ellos con fenotipos de obesidad (Gazzerro y cols., 2007; Russo y cols., 2007), esquizofrenia (Ujike y Morita, 2004; Chavarria-Siles y cols., 2008), trastorno por déficit de atención e hiperactividad (Ponce y cols., 2003) o depresión en la enfermedad de Parkinson (Barrero y cols., 2005).

El **receptor CB₂** fue clonado en 1993 (Munro y cols., 1993) a partir de células de bazo de rata y se localiza fundamentalmente a nivel del sistema inmune.

Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por la presencia de siete dominios transmembrana, un dominio amino-terminal extracelular y un dominio carboxi-terminal intracelular. Además, exhiben una homología global del 44%, siendo del 68% en las regiones transmembrana. El receptor CB₁ es mayor que el receptor CB₂, observándose en la rata 72 aminoácidos

adicionales en el extremo N-terminal, 15 residuos extra en el tercer lazo extracelular y 13 aminoácidos adicionales en la región C-terminal. Las regiones transmembranales TM2, TM3, TM5 y TM6 son las zonas que presentan el mayor grado de homología entre ambos receptores.

- **Receptor TRPV1**

El receptor de vanilloides tipo 1 o TRPV1 fue clonado por primera vez en 1997 y presenta una secuencia de 828 aminoácidos (Caterina y cols., 1997). Este receptor es un canal homotetramérico catiónico no selectivo, permeable a Na^+ , Ca^{2+} y H^+ . Es activado por temperaturas superiores a 42°C , pH menor de 6 y farmacológicamente por la capsaicina (el componente picante de los pimientos rojos y del chile). A nivel fisiológico, es activado por sustancias endógenas como los endovanilloides, metabolitos de la lipooxigenasa (Starowicz y cols., 2007), así como por el endocannabinoide anandamida. A pesar de que no es activado por otros endocannabinoides, algunos autores consideran que el TRPV1 podría ser el receptor ionotrópico del sistema endocannabinoide.

- **Otros posibles receptores de cannabinoides**

Por otro lado, estudios en ratones *knock-out* para el receptor CB_1 y CB_2 sugieren la existencia de receptores de cannabinoides adicionales (Wilson y Nicoll, 2002; Kawamura y cols., 2006). Por ejemplo, varios agonistas cannabinoides se unen y activan el receptor huérfano acoplado a proteína G **GPR55**, el cual se expresa en cerebro y varios tejidos periféricos humanos y de rata (Baker y cols., 2006) y se propone que el receptor huérfano **GPR119** podría ser el receptor de oleiletanolamida (Brown, 2007). También hay evidencias de un receptor endocannabinoide vascular distinto de GPR55, CB_1 o CB_2 . Además, los endocannabinoides pueden producir efectos que no son mediados por receptores acoplados a proteínas G (van der Stelt y cols., 2005a; Lee y cols., 2006). Estos

mecanismos mediados por receptores no cannabinoides están siendo investigados en la actualidad (Demuth y Molleman, 2006).

Finalmente, los endocannabinoides también son ligandos potenciales de los receptores nucleares activados por proliferados de peroxisomas o **PPAR**. Los PPAR son una familia de receptores nucleares o factores de transcripción activados por ligandos, que ejercen un papel importante en la regulación del metabolismo lipídico, homeostasis de la glucosa y sensibilidad a la insulina. Existen 3 subfamilias denominadas PPAR α , PPAR β y PPAR γ , que disponen de diferente distribución tisular (Stahel y cols., 2008). Los ligandos endógenos de estos receptores son ácidos grasos y derivados de eicosanoides. Se ha descrito que la oleiletanolamida ejerce sus efectos orexígenos a través de la unión a PPAR α . También otros endocannabinoides como la anandamida, noladin éter y virodamina se pueden unir a PPAR α (Sun y Bennet, 2007).

1.2.2. Distribución de los receptores de cannabinoides

- Receptor CB₁

El receptor CB₁ se localiza principalmente en el **sistema nervioso central**. Es el receptor acoplado a proteína G más abundante en el cerebro (Pagotto y cols., 2006) y su densidad en el cerebro es muy alta, semejante a la de los canales iónicos para el GABA y glutamato (Howlett y cols., 2004). Mediante la aplicación de diferentes técnicas autorradiográficas y de estudios inmunohistoquímicos, se ha descrito de forma detallada la distribución de este receptor en el cerebro de rata (Herkenham y cols., 1990; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y cols., 1998). Así, la mayor densidad del receptor CB₁ se encuentra en los ganglios basales (sustancia negra, globo pálido, núcleo entopeduncular y caudado-putamen lateral), capa molecular del cerebelo y ciertas partes del hipocampo (región CA3 del asta de Ammón y capa molecular del giro dentado). La densidad de este receptor es más moderada en las capas I y IV de la corteza cerebral, mientras que un

escaso número de receptores se encuentran en el hipotálamo, tronco del encéfalo y médula espinal.

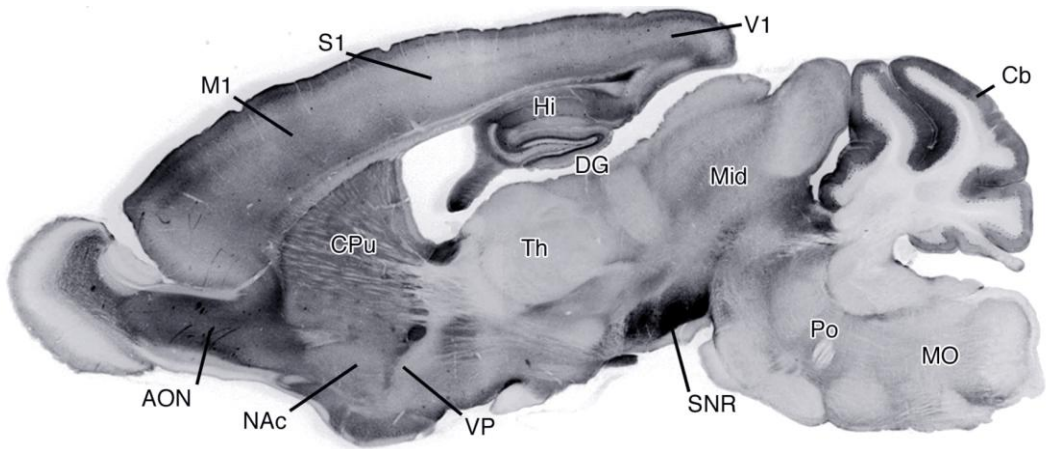


Figura 4. Distribución de la inmunorreactividad frente al receptor CB₁ en un corte parasagital de cerebro de ratón adulto. AON: núcleo olfativo anterior, Cb: corteza cerebelosa, CPU: caudado-putamen, DG: giro dentado, Hi: hipocampo, M1: corteza motora primaria, Mid: mesencéfalo, MO: bulbo raquídeo, NAc: núcleo accumbens, Po: puente, S1: corteza somatosensorial primaria, SNR: sustancia negra, Th: tálamo, V1: corteza visual primaria, VP: pálido ventral. La imagen ha sido modificada de Kano y cols., 2009.

En general, la distribución del receptor CB₁ se encuentra estrechamente relacionada con bastantes de los efectos farmacológicos que producen los cannabinoides. Así, la alta densidad de receptores en los ganglios basales se relaciona con los marcados efectos que estos compuestos ejercen sobre la actividad locomotora de los roedores, llegando a producir catalepsia a dosis elevadas (Little y cols., 1988). La presencia del receptor CB₁ en áreas hipocampales y corticales explicaría los efectos de los cannabinoides sobre el aprendizaje y la memoria, así como las propiedades anticonvulsivantes de los mismos. Finalmente, la baja densidad de receptores en el tronco del encéfalo, área que controla las funciones cardiovascular y respiratoria, explica la baja toxicidad y ausencia de letalidad de la marihuana.

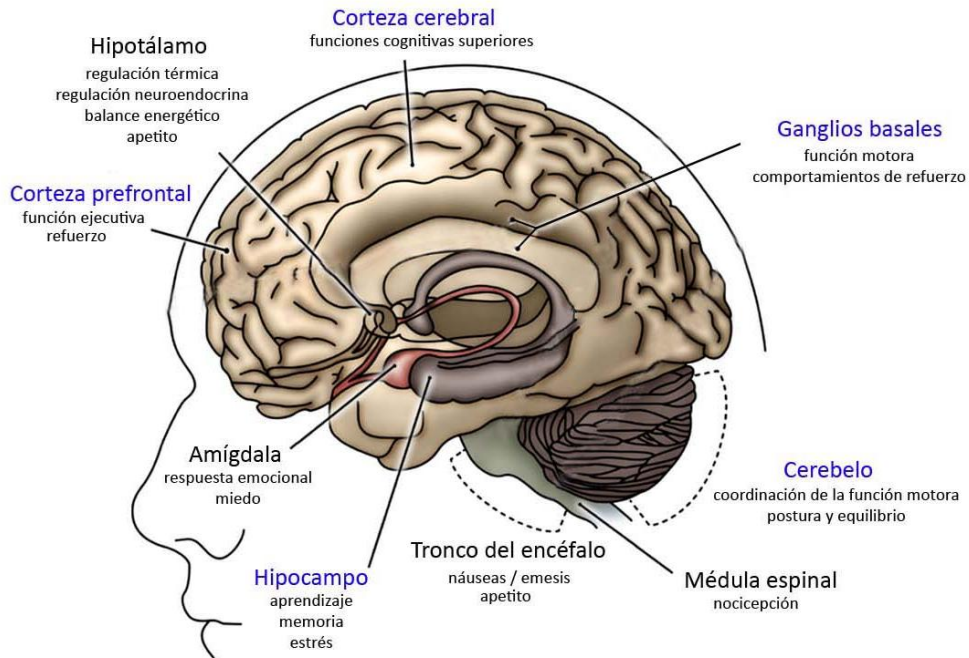


Figura 5. Regiones que expresan el receptor CB₁ y funciones en las que intervienen. En azul están marcadas las regiones con una expresión abundante del receptor CB₁ y en negro las que presentan una expresión moderadamente abundante. La imagen ha sido adaptada de "Endocannabinoid System Network".

Además de su localización en el cerebro, el receptor CB₁ también está presente a nivel periférico. De esta forma, se han encontrado receptores CB₁ en el bazo, amígdalas, corazón, próstata, útero, ovario y a nivel presináptico en terminales nerviosas simpáticas (Galiegue y cols., 1995; Ishac y cols., 1996). Otras localizaciones periféricas para el receptor CB₁ incluyen el tejido adiposo, hígado, tracto gastrointestinal y páncreas (Howlett y cols., 2002; Cota y Woods, 2005; Juan-Picó y cols., 2006; Pagotto y cols., 2006).

Tabla 1. Tejidos y órganos humanos que expresan el gen para el receptor CB₁ (Di Marzo y cols., 2004; Pagotto y cols., 2006).

Sistema nervioso central	Aparato genitourinario / reproductor	Aparato gastrointestinal	Otros
<ul style="list-style-type: none"> · Cerebro · Médula espinal 	<ul style="list-style-type: none"> · Riñón · Placenta · Próstata · Testículos y esperma · Útero 	<ul style="list-style-type: none"> · Íleon · Hígado · Estómago · Páncreas 	<ul style="list-style-type: none"> · Tejido adiposo · Pulmón · Músculo esquelético · Bazo

- **Receptor CB₂**

El receptor CB₂ se localiza fundamentalmente en el **bazo, amígdalas** y en distintas células del **sistema inmune** (linfocitos B, aunque también en monocitos y linfocitos T) (Galiegue y cols., 1995; Schatz y cols., 1997). El receptor CB₂ presente en estos tejidos y células parece ser el responsable de las propiedades inmunosupresoras de la marihuana (Klein y cols., 1998). También podría expresarse en tejido nervioso, particularmente tras una lesión (Demuth y Molleman, 2006).

- **Receptor TRPV1**

Inicialmente, el receptor TRPV1 fue identificado y clonado en las fibras aferentes periféricas (Caterina y cols., 1997) pero cada vez existen más evidencias de su presencia a nivel cerebral (Kauer y Gibson, 2009). El empleo de diversas técnicas inmunohistoquímicas (Sanchez y cols., 2001a; Cristino y cols., 2006; Puente y cols., 2011), hibridación *in situ*, PCR (Sasamura y cols., 1998; Mezey y cols., 2000) y autorradiografía (Roberts y cols., 2004) han permitido demostrar la distribución de TRPV1 en la corteza prefrontal, amígdala, hipotálamo, sustancia gris periacueductal, *locus coeruleus*, cerebelo, hipocampo y giro dentado.

1.2.3. Mecanismos de transducción de señales

- Receptor CB₁

Los principales mecanismos intracelulares en los que están implicados los receptores CB₁ incluyen la inhibición de la adenilato ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos y la activación de la vía de las MAP quinasas (Howlett, 1998). El acoplamiento de estos receptores a proteínas G_{i/o} constituye la base de todos estos efectos.

La activación de los receptores CB₁ produce una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa, lo que da lugar a un descenso en los niveles de AMPc intracelular. De esta forma, se ve afectada la capacidad de fosforilación de proteínas quinasas dependientes de este nucleótido cíclico. La activación de los receptores CB₁ también induce una inhibición de los canales de Ca²⁺ tipo N y P/Q y un aumento de la conductancia del K⁺. El efecto combinado sobre ambos tipos de canales parece ser la base de la inhibición que ejercen los cannabinoides en la liberación del neurotransmisor. Finalmente, los cannabinoides también activan la ruta de las MAP quinasas, vía involucrada en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación (Bouaboula y cols., 1995).

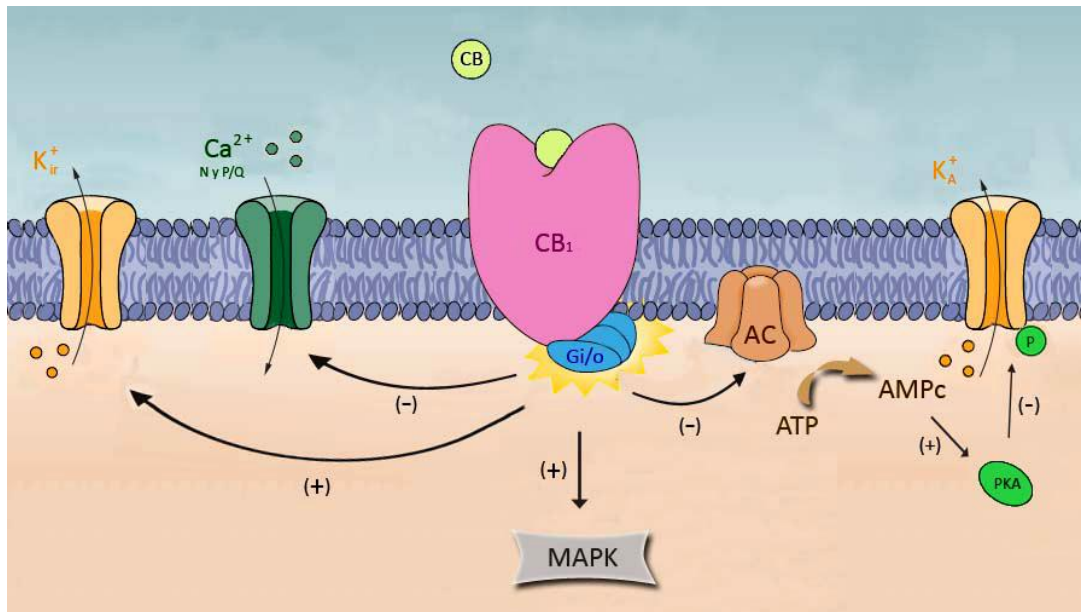


Figura 6. Mecanismos de transducción de señales de los receptores CB₁. La imagen ha sido modificada de Purves y cols., 2008.

La activación de los receptores CB₁ mediada por endocannabinoideos en las terminales nerviosas inhibe la neurotransmisión en múltiples regiones cerebrales, como el estriado, hipocampo, cerebelo, corteza, hipotálamo y núcleo accumbens entre otros (Kawamura y cols., 2006). La inhibición de los canales de Ca²⁺ y la estimulación de los canales de K⁺ contribuyen a la inhibición de la excitabilidad neuronal y la supresión de la liberación del neurotransmisor (Di Marzo y cols., 2004). La activación del receptor CB₁ inhibe la liberación de GABA y glutamato, según el tipo de neurona que expresa dicho receptor, y también inhibe la liberación de neuropéptidos de terminales nerviosas que contienen el receptor CB₁ (Mackie, 2006).

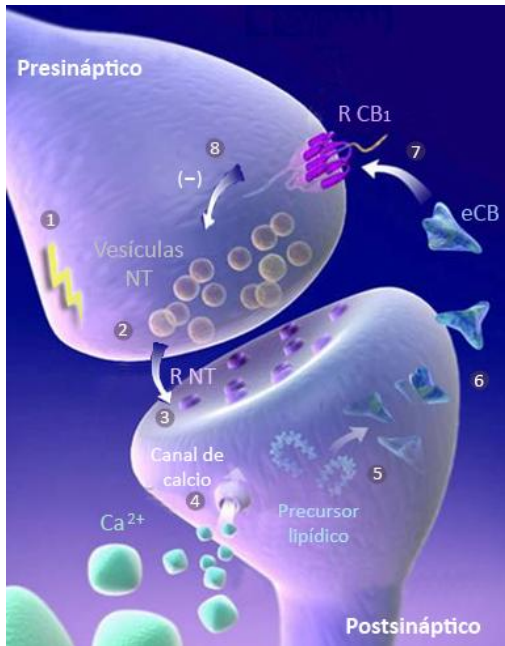


Figura 7. Señalización retrógrada mediada por los endocannabinoides:

1. Llegada del impulso nervioso y despolarización de la terminal presináptica.
2. Liberación del neurotransmisor (NT).
3. Unión del neurotransmisor a su receptor postsináptico (R NT).
4. Entrada de calcio en el elemento postsináptico.
5. Síntesis de endocannabinoides (eCB) a partir de precursores lipídicos.
6. Difusión del endocannabinoide a través de la membrana plasmática.
7. Unión del endocannabinoide al receptor CB₁ a nivel presináptico (R CB₁).
8. Inhibición de la liberación del neurotransmisor.

La imagen ha sido adaptada de "Endocannabinoid System Network" (cortesía Dr. V. Di Marzo).

- **Receptor CB₂**

En cuanto al receptor CB₂, su activación también produce una inhibición de la adenilato ciclasa y activación de la vía de las MAP quinasas. Sin embargo, a diferencia del CB₁, el receptor CB₂ no es capaz de modificar las corrientes de los canales de Ca²⁺ y K⁺ (Felder y cols., 1995).

- **Otros mecanismos**

En determinadas circunstancias, los receptores CB₁ también pueden acoplarse a proteínas G_s y G_{q/11} (Díaz-Laviada y Ruiz-Llorente, 2005; Childers, 2006; Demuth y Molleman, 2006). También se ha observado en numerosas ocasiones que los ligandos cannabinoides inducen un aumento en la concentración de calcio intracelular, principalmente a través de la activación de la fosfolipasa C y los receptores de inositol

trifosfato (IP₃) del retículo (Díaz-Laviada y Ruiz-Llorente, 2005; De Petrocellis y cols., 2007). Además, algunos endocannabinoides como la anandamida pueden unirse al TRPV1, el cual es un canal catiónico no selectivo permeable a Na⁺, Ca²⁺ y H⁺, como he descrito anteriormente.

1.2.4. Endocannabinoides

Por definición, los endocannabinoides son compuestos endógenos, producidos en diferentes órganos y tejidos, capaces de unirse a los receptores de cannabinoides. Algunos endocannabinoides además pueden unirse a otros receptores como el TRPV1 o PPAR.

En general, son compuestos de naturaleza lipídica y derivados de ácidos grasos poliinsaturados. Los más representativos son la etanolamida del ácido araquidónico o **anandamida** (del sánscrito *ananda*, que significa placer interno) (Devane y cols., 1992) y el **2-araquidonilglicerol** (2-AG) (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995).

Otros endocannabinoides propuestos recientemente incluyen el 2-araquidonilglicerol éter (2-AGE o noladin éter) (Hanus y cols., 2001), la O-araquidonil etanolamina (virodamina) (Porter y cols., 2002), la N-araquidonil dopamina (NADA) (Huang y cols., 2002) y posiblemente la oleamida (Leggett y cols., 2004). La importancia fisiológica del noladin éter, virodamina, NADA y otros endocannabinoides emergentes está siendo investigada en la actualidad (De Petrocellis y cols., 2004; Pagotto y cols., 2006).

Además, se han descrito otros lípidos relacionados, que presentan actividades biológicas similares a los cannabinoides pero que no se unen a los receptores, denominados en general compuestos cannabimiméticos. Ejemplos de estos compuestos son la palmitoiletanolamida, que presenta efectos analgésicos y antiinflamatorios, o la estearoiletanolamida, que tiene efectos anorexígenos (Bisogno, 2008).

1.2.5. Localización y características farmacológicas de los endocannabinoides

Las concentraciones de anandamida en el cerebro son muy bajas ya que, como se detallará en el siguiente apartado, no es almacenada en las células en su forma biológicamente activa sino que es sintetizada en respuesta a un determinado estímulo a partir de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular. En general, dentro del cerebro, los niveles más altos de anandamida se corresponden con áreas que también presentan una elevada densidad de receptores de cannabinoides, como el hipocampo, la corteza o el estriado (Felder y cols., 1996). Sin embargo, esta correlación no es completa ya que otras áreas, como el tálamo o el tronco del encéfalo, poseen pocos receptores y un alto nivel del endocannabinoide (Felder y cols., 1996; Bisogno y cols., 1999).

Las concentraciones que se alcanzan en el cerebro de 2-AG son mucho mayores que las de anandamida (Stella y cols., 1997), aunque en general hay una buena correlación entre los dos endocannabinoides en las distintas áreas cerebrales en las que estos compuestos han sido analizados (Bisogno y cols., 1999).

Los niveles de 2-AG en el cerebro son unas 200 veces superiores a los de anandamida y se comporta como agonista total frente a CB₁ y CB₂ (a diferencia de la anandamida, que parece actuar como agonista parcial), por lo que algunos autores proponen al 2-AG como el verdadero agonista endógeno (Sugiura y cols., 2006).

Además, los niveles de endocannabinoides varían en respuesta a diferentes estímulos, en los distintos estadios del desarrollo y en diversas situaciones patológicas (Di Marzo y Petrosino, 2007), lo cual pone en evidencia la importancia fisiopatológica del sistema endocannabinoide y posibilita la intervención sobre dicho sistema con fines terapéuticos.

Región cerebral	Anandamida	2-AG	Receptor CB ₁
Estriado	+++	++++	++++
Mesencéfalo	++	++	++
Tronco del encéfalo	++++	+++++	++
Cerebelo	+	++	+++++
Hipocampo	+++	+++++	++++
Sistema límbico	++	++++	++
Corteza cerebral	+	++	++
Diencéfalo	+	+	+++
Médula espinal	+++	++++	++
Anandamida (pmol/g tejido): + (<20); ++ (20-40); +++ (40-60); ++++ (60-80); +++++ (>80) 2-AG (nmol/g tejido): + (<3); ++ (3-6); +++ (6-9); ++++ (9-12); +++++ (>12) Receptor CB ₁ (fmol/mg tejido): + (<250); ++ (250-500); +++ (500-750); ++++ (750-1000); +++++ (>1000)			

Tabla 2. Concentraciones del receptor CB₁ y de los endocannabinoides en diversas regiones del cerebro de rata.

Desde el punto de vista farmacológico, el 2-AG se une a ambos receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ con una afinidad similar y los activa con una eficacia parecida. Por el contrario, la anandamida tiene menor afinidad por los receptores CB₂ que CB₁ y es un agonista de baja eficacia para ambos receptores. Así, la anandamida actúa normalmente como agonista parcial de los receptores CB₁ y CB₂, mientras que el 2-AG muestra normalmente agonismo completo para ambos receptores (Sugiura y cols., 1999).

A pesar de que la anandamida comparte con el Δ 9-THC así como con otros cannabinoides la mayoría de sus propiedades farmacológicas tanto en el sistema nervioso central como a nivel periférico, existen diversos efectos ejercidos por este

endocannabinoide que no son mediados por los receptores de cannabinoides conocidos hasta el momento. De hecho, otros receptores diferentes a los de cannabinoides, como son los receptores de vanilloides TRPV1, pueden ser activados también por la anandamida y mediar alguno de los efectos de la misma (Zygmunt y cols., 1999), como he mencionado anteriormente.

Además, el sistema endocannabinoide parece influenciar otros sistemas fisiológicos mediante la interacción con sus receptores, vías de señalización intracelular, hormonas y neurotransmisores. De esta forma, algunos o bastantes de los efectos biológicos del sistema endocannabinoide podrían ocurrir a través de una compleja interacción con otros sistemas. Algunos de los sistemas implicados incluyen el receptor de vanilloides TRPV1, el receptor serotoninérgico 5-HT₃, el receptor de glutamato NMDA y los receptores nicotínicos de acetilcolina (Mackie, 2008a).

1.2.6. Metabolismo de los endocannabinoides

Los endocannabinoides son sintetizados “a demanda” en el momento en que se necesitan, son capaces de unirse y activar sus receptores específicos y finalmente son inactivados o degradados. En este sentido, son similares a otros moduladores como prostaglandinas y leucotrienos y se diferencian de los neurotransmisores clásicos ya que éstos últimos son almacenados en vesículas sinápticas antes de su liberación.

1.2.6.1. Biosíntesis y degradación de anandamida

Se han propuesto varias rutas posibles para la biosíntesis de anandamida, pero todavía no se ha descrito un mecanismo realmente eficiente para la misma.

La anandamida se puede formar a partir de ácido araquidónico y etanolamina, mediante una reacción catalizada por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH, del inglés *fatty acid amido hidrolase*) (Ueda y cols., 1995). Sin embargo, es posible que esta

vía no tenga relevancia a nivel fisiológico ya que para que se produzca esta reacción se requieren concentraciones excesivamente elevadas de los sustratos (Okamoto y cols., 2007).

La anandamida también puede ser sintetizada a partir de la fosfatidiletanolamina (PE) presente en las membranas, tras ser hidrolizada por fosfodiesterasas. Esta ruta consta de dos pasos. En primer lugar, a partir de la fosfatidiletanolamina y un glicerofosfolípido se forma el precursor N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (N-ArPE), reacción catalizada por una N-aciltransferasa dependiente de calcio (NAT). Esta enzima aún no ha sido clonada pero ha sido parcialmente purificada de cerebro y testículo de rata y de cerebro y corazón de perro (Okamoto y cols., 2007). Además, se ha aislado parcialmente una enzima de cerebro de rata que presenta actividad N-aciltransferasa que también podría participar en la síntesis del precursor (Jin y cols., 2007). En segundo lugar, se produce la hidrólisis de N-ArPE liberándose ácido fosfatídico y anandamida. Esta reacción está catalizada por una fosfolipasa D (**NAPE-PLD**) dependiente de calcio (Okamoto y cols., 2004, 2007; Wang y cols., 2006a; Jin y cols., 2007). La NAPE-PLD es una enzima constitutivamente activa, por lo que la etapa limitante en la síntesis de anandamida debe ser la primera. Esta reacción es también la ruta principal de síntesis de otras N-aciletanolaminas.

Existen otros dos mecanismos posibles para la síntesis de anandamida. El primero consistiría en la hidrólisis de N-ArPE por una fosfolipasa C (PLC), produciéndose fosfoanandamida, que sería posteriormente desfosforilada por fosfatasas como la inositol 5'fosfatasa SHIP1 o la tirosina fosfatasa PTPN22 (Liu y cols., 2008). La segunda vía sería una doble desacilación de N-ArPE mediante una hidrolasa Abh4 (Simon y Cravatt, 2006) y posterior hidrólisis del glicerofosfoN-ArPE produciéndose anandamida y glicerol-P (Liu y cols., 2008).

En cuanto a la degradación de la anandamida, ésta ocurre a través de una amido hidrolasa de ácidos grasos (del inglés *fatty acid amido hydrolase* o **FAAH**) que hidroliza la anandamida dando lugar a etanolamina y ácido araquidónico (para revisión: Basavarajappa, 2007).

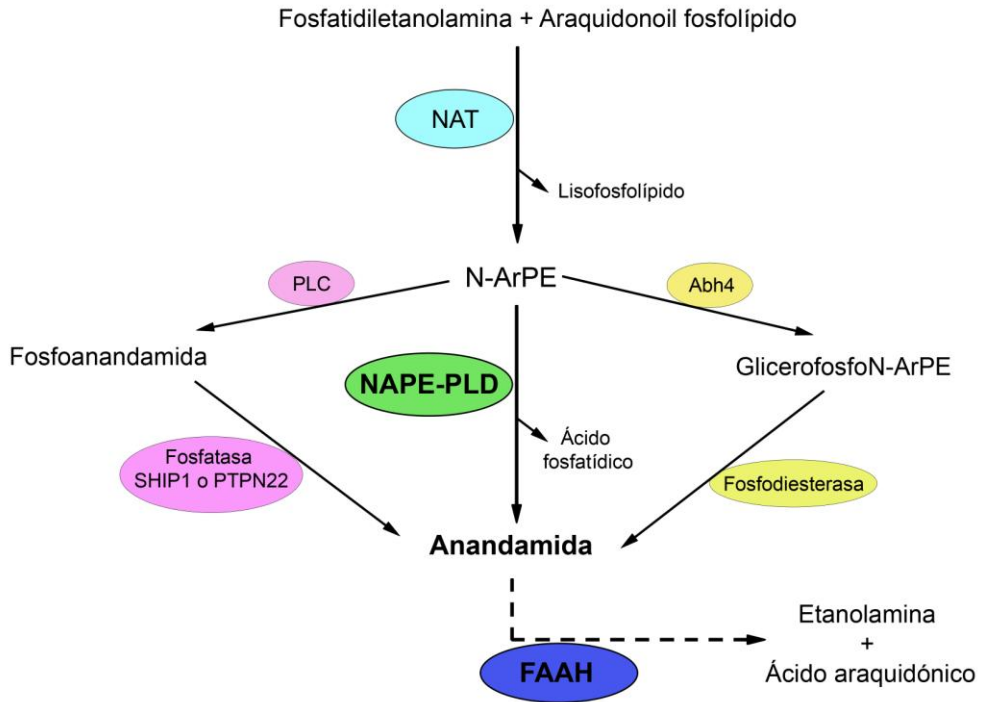


Figura 8. Principales vías de síntesis y degradación de la anandamida.

- NAPE-PLD

NAPE-PLD es una enzima diferente a otras PLDs conocidas, que pertenece al grupo de metalo-β-lactamasas y ha sido clonada a nivel molecular en ratón, rata y humano, identificándose también su secuencia aminoacídica (Okamoto y cols., 2004, 2007; Wang y cols., 2006a; Jin y cols., 2007). La secuencia de esta enzima está compuesta por 396 aminoácidos en rata y ratón y 393 aminoácidos en humano, mostrando una homología del 95,5% entre rata y ratón, 89,1% entre ratón y humano y 90,4% entre rata y humano, respectivamente (Okamoto y cols., 2007).

La actividad de NAPE-PLD está ampliamente distribuida en los tejidos de distintos mamíferos. La mayoría de los órganos del ratón presentan actividad enzimática,

alcanzándose las concentraciones más altas en el cerebro, riñón y testículos. Además, el ARNm y la proteína de NAPE-PLD tienen una distribución similar a la descrita para la actividad enzimática (Okamoto y cols., 2004), destacando el cerebro por presentar los niveles más elevados de actividad de NAPE-PLD en todas las especies animales (Okamoto y cols., 2007).

- **FAAH**

FAAH es una enzima amido hidrolasa de ácidos grasos asociada a membrana, que presenta una secuencia rica en serina, glicina y alanina, conservada en la mayoría de las amidasas (Basavarajappa, 2007) y cuya estructura cristalina ha sido descrita mediante cristalografía de rayos X (Bracey y cols., 2002). La proteína de rata, ratón y humano presenta una secuencia de 579 aminoácidos y se encuentra en varios órganos, entre ellos el cerebro (Kano y cols., 2009). Los genes que codifican esta enzima en el ratón y humano se localizan en los cromosomas 1 y 4, respectivamente (Wan y cols., 1998; Basavarajappa, 2007). FAAH puede hidrolizar también 2-AG, oleamida y otras amidas de ácidos grasos (Labar y Michaux, 2007) pero su sustrato preferido es la anandamida (Kano y cols., 2009).

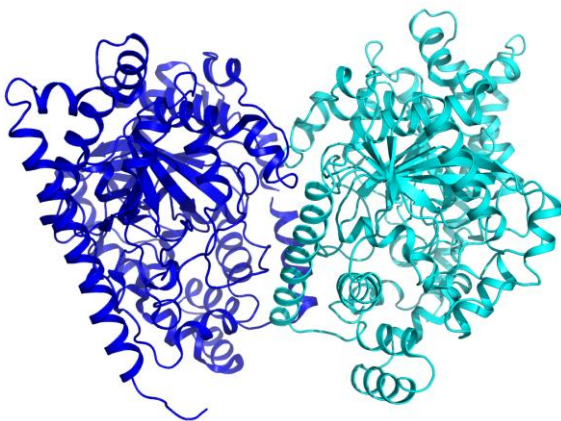


Figura 9. Estructura cristalina de FAAH mediante cristalografía de rayos X con una resolución de 2,90Å.

Esta imagen ha sido realizada mediante un software de visualización molecular (The PyMOL Molecular Graphics System, Open-source PyMOL™ 1.1.x, Schrödinger, LLC.), a partir del archivo 3QJ8 del banco de datos de proteínas (*protein data bank*) de libre acceso a través de internet.

Por otro lado, en humanos se ha descrito mediante técnicas de proteómica la existencia de otra amidohidrolasa, denominada FAAH-2 y codificada en otra región del ADN. A pesar de tener una homología del 20% con FAAH, presenta un perfil semejante de localización tisular, inhibición farmacológica y especificidad de sustrato (Wei y cols., 2006). Por último, un polimorfismo espontáneo en un único nucleótido del gen de la FAAH, 385A, está fuertemente asociado con un factor de riesgo endocannabinoide de sobrepeso y obesidad (Sipe y cols., 2005) y abuso de drogas (Sipe y cols., 2002) en humanos.

1.2.6.2. Biosíntesis y degradación de 2-AG

La biosíntesis de 2-AG se produce principalmente a partir del diacilglicerol (DAG) con ácido araquidónico en la posición 2. El DAG es un mediador lipídico habitual en las células y puede formarse mediante la hidrólisis de fosfoinositol-bis-fosfato (PIP₂) por una fosfolipasa C (PLC) o tras la retirada del grupo fosfato del ácido fosfatídico por una fosfohidrolasa. El paso de DAG a 2-AG está catalizado por dos **DAG lipasas (DAGL- α y DAGL- β)**, selectivas para la posición 1 (para revisión: Oudin y cols., 2011). También se ha sugerido la existencia de otra vía de síntesis de 2-AG que sería responsable de mantener los niveles basales de este endocannabinoide (Wettschureck y cols., 2006).

La degradación de 2-AG se realiza mayoritariamente por la enzima monoacilglicerol lipasa (**MAGL**), dando lugar a glicerol y ácido araquidónico (para revisión: Basavarajappa, 2007).

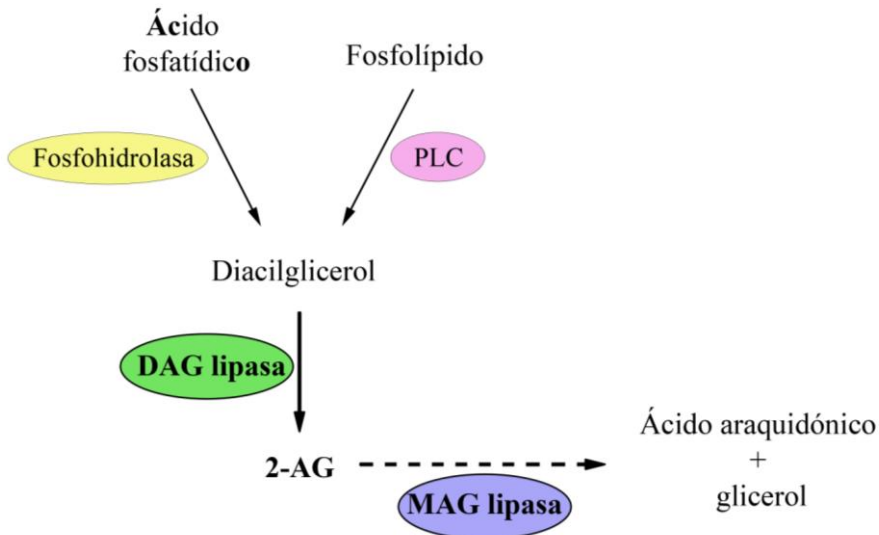


Figura 10. Principal vía de síntesis y degradación de 2-AG.

- DAGL

Las DAGL (DAGL- α y DAGL- β) fueron clonadas en el año 2003 (Bisogno y cols., 2003). Estas enzimas se localizan en la membrana plasmática, son estimuladas por Ca^{2+} y por glutatión y contienen una secuencia típica de serina lipasas (Bisogno, 2008).

Las dos formas enzimáticas, DAGL- α y DAGL- β , surgen a partir de una duplicación génica y están muy relacionadas. Ambas contienen un motivo lipasa-3 y un motivo serina lipasa en el dominio catalítico intracelular de $\sim 30\text{kDa}$, además de un extremo N-terminal con cuatro dominios transmembrana (Bisogno y cols., 2003). La principal diferencia entre ambas enzimas radica en la presencia de un extremo C-terminal (~ 300 aminoácidos) en DAGL- α ausente en DAGL- β , que no determina diferencias sustanciales en su actividad catalítica (Bisogno y cols., 2003). Aunque la razón sobre la existencia de ambas no está clara, se ha demostrado su expresión diferencial en distintas células, ya que se encuentran bajo el control de sus propios promotores (Oudin y cols., 2011). DAGL- β presenta una distribución más amplia y uniforme entre tejidos, mientras que DAGL- α se

expresa mucho más en el sistema nervioso que en órganos periféricos (Bisogno y cols., 2003). Aunque ambas enzimas están en el cerebro adulto, DAGL- α es la única responsable de la señalización sináptica retrógrada (Oudin y cols., 2011), probablemente debido a la interacción de DAGL- α con proteínas Homer (Jung y cols., 2007). Finalmente, la expresión de estas enzimas es muy dinámica ocurriendo en el lugar concreto y en el momento preciso, orquestando así las funciones endocannabinoides tanto en el cerebro en desarrollo como en el adulto (Oudin y cols., 2011).

Los niveles de 2-AG descienden alrededor del 80% en el cerebro y médula espinal de ratones *DAGL- α -KO* y del 50% en el cerebro de los ratones *DAGL- β -KO* (Gao y cols., 2010). Sin embargo, esta reducción de 2-AG alcanza el 90% en el hígado de ratones *DAGL- β -KO*, siendo del 60% en los ratones *DAGL- α -KO* (Gao y cols., 2010), lo que indica que en algunos órganos periféricos la primera enzima es más relevante que la segunda. En la actualidad se considera que las DAGLs son responsables de la mayoría, sino de todo, el 2-AG presente en los tejidos, operando con un cierto grado de cooperación y/o redundancia entre ambas enzimas. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el 10-20% de 2-AG sea debido a una vía de síntesis diferente (Oudin y cols., 2011).

- [MAGL](#)

MAGL es una serina lipasa, identificada en 1976 (Tornqvist y Belfrage, 1976) y clonada por primera vez a partir de tejido adiposo de ratón (Karlsson y cols., 1997). La secuencia de esta enzima en ratón, rata y humano consta de 303 aminoácidos (Karlsson y cols., 1997, 2001; Dinh y cols., 2002) y su ARNm se encuentra en varios órganos, incluido el cerebro (Dinh y cols., 2002). El gen para MAGL en ratón se localiza en el cromosoma 6, en una región que presenta una conocida homología con el cromosoma humano 3q21 (Karlsson y cols., 1997). El ADNc de la MAGL humana presenta una identidad del 84% con la MAGL de ratón (Karlsson y cols., 2001) y del 85% con la MAGL de rata (Basavarajappa, 2007).

En la actualidad se considera que MAGL es la principal enzima que cataliza la hidrólisis de 2-AG *in vivo* (Dinh y cols., 2002, 2004; Vandevoorde y Lambert, 2007), aunque varios estudios sugieren la existencia de enzimas adicionales que hidrolizan 2-AG en el cerebro (Saario y cols., 2004; Blankman y cols., 2007; Muccioli y cols., 2007). De hecho, MAGL es responsable del 85% de la hidrólisis de 2-AG, mientras que el 15% restante es catalizado mayoritariamente por otras dos enzimas (Blankman y cols., 2007).

1.2.6.3. Transporte de los endocannabinoides

La degradación de los endocannabinoides ocurre a nivel intracelular por lo que es necesario que entren en la célula para ser metabolizados. Se han propuesto al menos tres modelos para la recaptación de anandamida:

- 1- Difusión simple a través de la membrana, ya que los endocannabinoides son compuestos lipofílicos. Este proceso se vería favorecido por el gradiente de concentración producido por la degradación enzimática en el interior de la célula (Glaser y cols., 2003).
- 2- Transporte mediante una proteína transportadora que traslada la anandamida de un lado al otro de la membrana (Fegley y cols., 2004; Ligresti y cols., 2004). Este modelo se basa en los datos que indican que el transporte de anandamida es un proceso saturable (Beltramo y cols., 1997), dependiente de la temperatura e inhibido farmacológicamente. De hecho, se han descrito varios análogos estructurales de la anandamida, como el AM404, que inhiben la recaptación de la misma (Beltramo y cols., 1997; Piomelli y cols., 1999), denominados inhibidores del transporte de anandamida, y que parecen ser eficaces en diversos modelos patológicos (Fowler y Jacobsson, 2002). Sin embargo, aún se desconoce la caracterización molecular de estos inhibidores. Recientemente, se ha identificado una variante de la parte citosólica de FAAH-1, denominada FLAT (del inglés *FAAH-like anandamide transporter*), que carece de actividad amidasa pero que se une a la anandamida con una afinidad

micromolar facilitando su transporte a las células (Fu y cols., 2011). Las propiedades funcionales de FLAT sugieren que esta proteína es un componente molecular clave en el sistema de transporte de anandamida en las células neurales, constituyendo una diana potencial de nuevos fármacos (Fu y cols., 2011).

- 3- Mecanismo rápido de endocitosis tras su concentración en *lipid rafts* ricos en caveolina (McFarland y cols., 2004; Danise y cols., 2007).

A diferencia de los numerosos estudios sobre la recaptación de anandamida, existe poca información sobre la captación de 2-AG. Sin embargo, varios trabajos sugieren que 2-AG y anandamida son transportados por el mismo sistema (Piomelli y cols., 1999; Beltramo y Piomelli, 2000; Bisogno y cols., 2001). En este sentido, se han desarrollado una serie de compuestos de gran interés, tanto desde el punto de vista de su uso en investigación como por sus posibles aplicaciones clínicas, capaces de potenciar el tono cannabinoide endógeno al actuar sobre algunas moléculas diana de este sistema. Ejemplos de los mismos son el AM374 (Gifford y cols., 1999) y el AM404 (Beltramo y cols., 1997), inhibidores de la FAAH y del transportador que media la recaptación de anandamida respectivamente.

1.2.7. Acciones fisiológicas del sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide parece estar presente en todos los vertebrados, lo que implica un papel en funciones biológicas vitales (De Petrocellis y cols., 2004; Cota y Woods, 2005; McPartland y cols., 2006).

Se cree que el sistema endocannabinoide interviene en una amplia variedad de procesos fisiológicos incluyendo **nocicepción, control motor, memoria y aprendizaje, miedo y ansiedad, apetito, ingesta y balance energético** (Di Marzo y cols., 1998; Ameri, 1999; Pagotto y cols., 2006). Otras funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide podrían estar relacionadas con **funciones endocrinas, respuestas vasculares, modulación**

del sistema inmune, neuroprotección y remodelación ósea (Correa y cols., 2005; Idris y cols., 2005; van der Stelt y Di Marzo, 2005b; Arenos y cols., 2006; de Oliveira y cols., 2006; Guindon y cols., 2006; Mikics y cols., 2006; Wang y cols., 2006b).



Figura 11. Acciones fisiológicas del sistema endocannabinoide.

El espectro de las acciones fisiológicas de los cannabinoides ha aumentado de forma espectacular en los últimos años y podría decirse que el sistema endocannabinoide es un sistema modulador que influye en los tres sistemas esenciales de regulación fisiológica: el sistema neurotransmisor, el sistema endocrino y el sistema inmune (Díaz-Laviada, 2009).

En cuanto a la regulación de la plasticidad neuronal, una de las acciones mejor establecidas de los cannabinoides es la atenuación de la neurotransmisión. Así, la activación de los receptores de cannabinoides en la neurona presináptica produce una inhibición, en diferentes regiones del cerebro, de la liberación de neurotransmisores excitadores e inhibidores como glutamato, GABA, serotonina, noradrenalina, dopamina o

acetilcolina. Si la sinapsis es de tipo excitador, la acción del cannabinoide sería la de suprimir una excitación, produciéndose el fenómeno conocido como “supresión de la excitación mediada por despolarización” o DSE (del inglés *depolarization-induced suppression of excitation*). Por otro lado, si la sinapsis es de tipo inhibitorio, el cannabinoide produciría la “supresión de la inhibición mediada por despolarización” o DSI (del inglés *depolarization-induced suppression of inhibition*) (Mackie, 2008b). Aunque aún quedan algunas cuestiones por aclarar, éste sería el mecanismo por el cual el sistema endocannabinoide regularía la plasticidad neuronal produciendo los efectos fisiológicos conocidos sobre la memoria, el aprendizaje, procesos de recompensa (Solinas y cols., 2008), funciones motoras, respuesta al dolor y control del apetito (Matias y cols., 2006).

1.2.8. Perspectivas terapéuticas

El sistema endocannabinoide parece jugar un papel importante en la regulación de múltiples procesos fisiológicos por lo que el desarrollo de compuestos farmacológicamente activos sobre los distintos componentes del sistema podría resultar de utilidad en el tratamiento de diversas patologías. La modulación del sistema endocannabinoide incluye básicamente su potenciación mediante agonistas específicos o inhibidores de las enzimas de degradación de los endocannabinoides o el recaptador de anandamida, y la inhibición del sistema mediante fármacos antagonistas o agonistas inversos. Sin embargo, el éxito real de estas aproximaciones dependerá de la realización de ensayos clínicos estrictos y controlados y de la valoración objetiva del balance beneficio/riesgo de los mismos (para revisión: Ramos JA y cols., 2009).

- **Potenciación cannabinoide**

La potenciación del sistema endocannabinoide parece resultar de utilidad, en base a evidencias contrastadas, en la acción analgésica para el dolor postoperatorio neuropático particularmente en pacientes con trastornos espásticos o neoplásicos, en el tratamiento de las náuseas y vómitos asociados a la quimioterapia, en trastornos espásticos principalmente en pacientes con esclerosis múltiple, Huntington o lesiones medulares y en el síndrome de anorexia-caquexia en pacientes con SIDA o cáncer terminal. Por otro lado, aunque todavía no se disponen de evidencias clínicas definitivas existen otras indicaciones teóricas en las que la potenciación cannabinoide podría ser útil, como el glaucoma, los trastornos inflamatorios del tubo digestivo, ciertos tipos de shock, trastornos de carácter ansioso, depresión y patología tumoral. Finalmente, otras posibles aplicaciones podrían ser la osteoporosis, las alteraciones motoras de la enfermedad de Parkinson, incluyendo las discinesias inducidas por el tratamiento con levodopa (Sagredo y cols., 2007; Pertwee, 2008) y la patología hepática crónica.

En la actualidad, existen varios compuestos cannabinoideos comercializados que potencian dicho sistema. Así, el dronabinol (Marinol®) y la nabilona (Cesamet®) están aprobados en Estados Unidos y en Europa para el tratamiento de las náuseas y vómitos asociados a la quimioterapia en pacientes que no responden adecuadamente a los tratamientos antieméticos convencionales. Además, el Sativex®, un extracto de cannabis que contiene cantidades similares de Δ^9 -THC y cannabidiol, está autorizado en Canadá y varios países europeos, incluyendo España desde el 2010, para el tratamiento de la espasticidad asociada a la esclerosis múltiple en pacientes que no respondan adecuadamente a los tratamientos antiespasmódicos convencionales.

- **Inhibición cannabinoide**

Entre las principales patologías en las que la inhibición del sistema endocannabinoide podría resultar de utilidad se encuentran la obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 o adicción a drogas. Otras propuestas incluyen la isquemia cerebral, íleo paralítico, Alzheimer o esquizofrenia.

De hecho, el rimonabant (Acomplia®), que es un antagonista selectivo de los receptores CB₁, fue aprobado en Europa en el año 2006 para el tratamiento de la obesidad y los problemas metabólicos asociados a la misma. Sin embargo, debido a los efectos secundarios de tipo psiquiátrico se aconsejó su suspensión en el año 2008 y se produjo su retirada definitiva del mercado en el año 2009.

1.3. HIPOTÁLAMO

1.3.1. Generalidades

El hipotálamo se localiza en la base del cerebro, limitado por el quiasma óptico rostralmente y el tegmento mesencefálico hacia la región caudal. Forma el suelo y las paredes laterales del tercer ventrículo y se continúa a través del tallo infundibular con la hipófisis posterior. El hipotálamo, desde su posición central en el encéfalo y proximidad con la hipófisis, integra información procedente de regiones encefálicas anteriores, el tronco del encéfalo, la médula espinal y distintas neuronas quimiosensitivas intrínsecas.

Las diversas funciones en las que se conoce, al menos parcialmente, la participación del hipotálamo son:

- El **control del flujo sanguíneo**, ya que promueve adaptaciones del volumen minuto, el tono vasomotor, la osmolaridad sanguínea y la depuración renal. Asimismo, estimula la ingesta de líquidos y el consumo de sal.
- La **regulación del metabolismo energético**, mediante el control de la glucemia y la regulación de la conducta alimentaria, de las funciones digestivas, así como del índice metabólico y la temperatura.
- La **regulación de la actividad reproductora**, al influir en la identidad de género, la orientación sexual y el comportamiento de apareamiento. En las mujeres, además, controla los ciclos menstruales, el embarazo y la lactancia.
- La **coordinación de las respuestas en condiciones de amenaza**, a través del control de la liberación de las hormonas reguladoras del estrés, la modulación del equilibrio entre el tono simpático y el parasimpático y la influencia sobre la distribución regional del flujo sanguíneo.

El hipotálamo comprende gran cantidad de núcleos distintos, cada uno de los cuales posee un patrón específico de conexiones y funciones (Purves y cols., 2008).

Se divide en tres regiones: anterior, medio y posterior.

La parte más anterior del hipotálamo, superpuesta al quiasma óptico, es el **área preóptica**. Los núcleos preópticos, que incluyen el núcleo supraquiasmático (marcapasos circadiano), se encargan de controlar la presión arterial y la composición de la sangre, los ciclos de actividad, la temperatura corporal, los niveles hormonales, así como la actividad reproductora.

El tercio medio del hipotálamo, superpuesto al tallo hipofisario, contiene los núcleos **arcuato, ventromedial, dorsomedial, paraventricular, periventricular, supraóptico** e **infundibular**. El núcleo paraventricular tiene los componentes neuroendocrinos magnocelular y parvocelular que controlan la adenohipófisis y la neurohipófisis. También contiene neuronas que inervan las neuronas preganglionares parasimpáticas y simpáticas del bulbo raquídeo y la médula espinal, por lo que desempeña un papel importante en la regulación de las respuestas autónomas. Los núcleos infundibular y periventricular están situados a lo largo de la pared del tercer ventrículo y contienen neuronas neuroendocrinas parvocelulares, mientras que el núcleo supraóptico contiene neuronas neuroendocrinas magnocelulares. Los núcleos ventromedial y dorsomedial proyectan sobre todo localmente en el hipotálamo y a la sustancia gris periacueductal, regulando funciones complejas de integración como el control del crecimiento, la alimentación, la maduración y la reproducción. El arcuato junto con el hipotálamo lateral participa de forma importante en la regulación de la ingesta, pues son considerados núcleos orexigénicos a través de las neuronas que contienen el neuropéptido Y en el caso del arcuato, y de las que contienen orexina en el hipotálamo lateral.

Por último, el tercio posterior del hipotálamo comprende el **cuerpo mamilar** y el **área hipotalámica posterior** situada sobre él. Además, también incluye el núcleo tuberomamilar, que es un grupo celular histaminérgico importante para la regulación de la vigilia y la excitación.

Los principales núcleos hipotalámicos están situados en la parte medial del hipotálamo, entre dos sistemas de fibras importantes. El primero es un sistema masivo de fibras longitudinales, denominado **fascículo prosencefálico medial**. Discurre por la parte lateral del hipotálamo y lo conecta con el tronco del encéfalo por abajo y con el prosencéfalo basal, la amígdala y la corteza cerebral por arriba. El segundo sistema de fibras es más pequeño y se localiza en posición medial a los principales núcleos hipotalámicos, en la pared del tercer ventrículo. Este sistema de **fibras periventriculares** contiene fibras longitudinales que conectan el hipotálamo con la sustancia gris periacueductal, y se piensa que tiene importancia en la activación de los patrones conductuales estereotipados simples, como las posturas durante la conducta sexual (Kandel y cols., 2001).

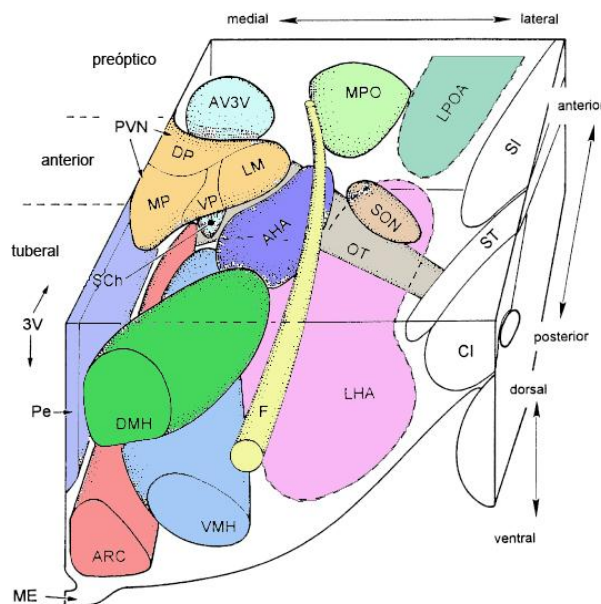


Figura 12. Visión tridimensional del hipotálamo de ratona (modificado de Berthoud, 2002).

AHA: área hipotalámica anterior; ARC: núcleo arcuato; AV3V: área anteroventral del tercer ventrículo; CI: cápsula interna; DP: subnúcleo parvocelular dorsal del núcleo paraventricular (PVN); DMH: núcleo dorsomedial; F: fórnix; LHA: área hipotalámica lateral; LM: subnúcleo magnocelular lateral del núcleo paraventricular; LPOA: área preóptica lateral; ME: eminencia media; MP: subnúcleo parvocelular medial del núcleo paraventricular; MPO: área preóptica medial; OT: tracto óptico; PVN: núcleo paraventricular; SCh: núcleo supraquiasmático; SON: núcleo supraóptico; SI: sustancia innominada; ST: núcleo subtalámico; VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo; VP: subnúcleo parvocelular ventral del núcleo paraventricular.

1.3.2. Núcleo ventromedial del hipotálamo

1.3.2.1. Anatomía y citoarquitectura

El núcleo ventromedial del hipotálamo (del inglés *ventromedial hypothalamic nucleus* o VMH) está situado en la zona medial, cerca de la base del diencefalo, adyacente al tercer ventrículo por encima de la eminencia media y la hipófisis. Es un núcleo bilateral, formado por un grupo de células y con forma elíptica. En los cortes más rostrales, aparece como un núcleo circular junto al tercer ventrículo y se va alargando hacia una forma más ovoidea hacia cortes más caudales (McClellan y cols., 2006).

Su citoarquitectura queda fuertemente definida por la zona que lo rodea, pobre en células y rica en fibras. La zona pobre en células es rica en procesos dendríticos (Millhouse, 1973; Crandall y cols., 1989), suministrando una extensa superficie receptiva para las fibras de la estría terminal (Heimer y Nauta, 1969).

Dentro del VMH se han delimitado los subgrupos dorsomedial, central y ventrolateral, en base a las proyecciones y los tipos celulares (Saper y cols., 1976; Van Houten y Brawer, 1978; Canteras y cols., 1994). En la zona ventrolateral, a su vez, se distingue el núcleo tuberal, que es un subnúcleo basal definido por el momento de aparición de sus neuronas y el fenotipo celular que presenta (Altman y Bayer, 1986; Whorf y Tobet, 1992; Canteras y cols., 1994).

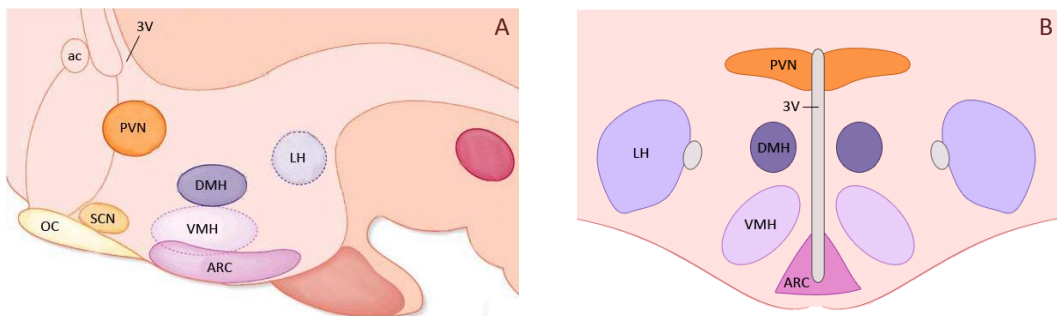


Figura 13. Localización del VMH en un corte parasagital (A) y un corte coronal (B) de cerebro de rata. 3V: tercer ventrículo; ac: comisura anterior; ARC: núcleo arcuato; DMH: núcleo dorsomedial; LH: hipotálamo lateral; OC: quiasma óptico; PVN: núcleo paraventricular; SCN: núcleo supraquiasmático; VMH: núcleo ventromedial. La imagen A ha sido modificada de Herzog y Muglia, 2006.

Por tanto, se considera que el VMH consiste en una colección de tipos celulares heterogéneos, algunos de los cuales ya han sido identificados (McClellan y cols., 2006), como se resume a continuación (Fig. 14 y tabla 3).

En cuanto a la expresión de receptores de membrana, CB_1 se expresa por todo el núcleo, mientras que el receptor para la leptina se localiza en la porción dorsomedial. Por otra parte, el receptor para la oxitocina y el receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (del inglés *growth hormone secretagogue* o GHS) aparecen en la zona ventrolateral.

En cuanto a los neuropéptidos, la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (del inglés *brain derived neurotrophic factor* o BDNF), el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (del inglés *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* o PACAP) y el slit3 tiene lugar por todo el núcleo. Por otro lado, la sintetasa de óxido nítrico neuronal (del inglés *neuronal nitric oxide synthase* o nNOS), somatostatina, encefalina y colecistoquinina (CCK) se localizan en la región ventrolateral, extendiéndose la nNOS hasta zonas más dorsolaterales. También está identificado en el VMH el patrón de expresión de varios factores de transcripción. De esta forma, los receptores androgénicos, los factores de transcripción Coup 1 y 2 y Sox 14 se expresan

por todo el núcleo; el factor esteroideogénico 1 (SF-1) se encuentra en la región más dorsal y central; el receptor estrogénico α y el islet-1 (isl-1) se expresan en el cuadrante ventrolateral del núcleo y el nkx2.1 se localiza en la región lateral del mismo.

Finalmente, en cuanto a la neurotransmisión inhibitoria, GAD65/67 y GABA se expresan en fibras dispuestas alrededor del VMH, mientras que los receptores GABA_A y GABA_B se encuentran dentro del núcleo. En concreto, las subunidades del receptor GABA_B se expresan por todo el núcleo. Las subunidades del receptor GABA_A también se expresan por todo el núcleo, sin embargo, cada subunidad tiene un patrón de expresión distinto. Así, la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABA_A se expresa por la mayor parte de la región dorsomedial, la subunidad $\alpha 5$ se localiza en la zona central y las subunidades $\beta 2$, $\beta 3$ y $\gamma 3$ se expresan en la porción más ventrolateral.

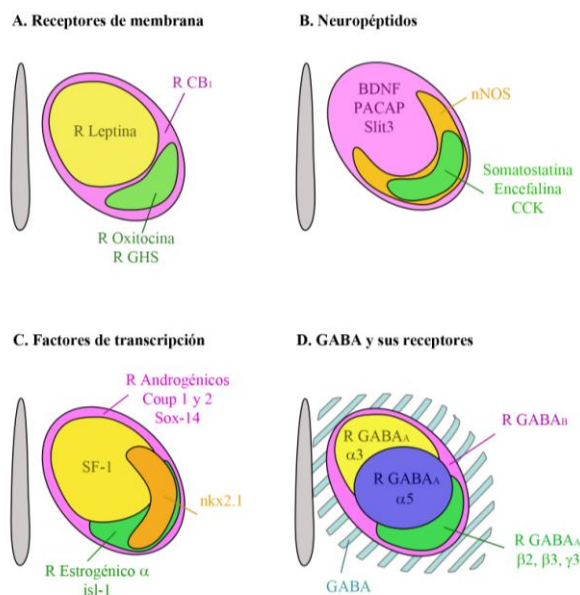


Figura 14. Patrón de expresión de receptores de membrana (A), neuropéptidos (B), factores de transcripción (C) y subunidades del receptor GABA (D) en el VMH. BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro, CCK: colecistoquinina, isl-1: islet 1, nNOS: sintetasa de óxido nítrico neuronal, PACAP: polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria, R CB₁: receptor de cannabinoides tipo 1, R GHS: receptor secretagogo de la hormona de crecimiento, SF-1: factor esteroideogénico 1.

Identidad celular	Región	Referencia
CRF-2	DM, C, VL	Chalmers y cols., 1995; Van Pett y cols., 2000; Miyata y cols., 2001.
COUP TF-1	DM, C, VL	Tsai y Tsai, 1997; Yamaguchi y cols., 2004.
Islet-1	C, VL	Davis y cols., 2004a; Davis y cols., 2004b.
Nkx2.1 (TTF-1)	C, VL	Nakamura y cols., 2001; Davis y cols., 2004a.
Cerebelina 1	DM, C, VL	Segal y cols., 2005.
Sox 14	DM, C, VL	Gray y cols., 2004.
SF-1	DM, C	Luo y cols., 1999.
Receptor estrogénico α	VL	Yokosuka y cols., 1997; Dellovade y cols., 2000.
R GHS	DM, C	Guan y cols., 1997; Kamegai y cols., 1999.
Receptor GABA_A	DM, C, VL	Dellovade y cols., 2001.
Receptor GABA_B	DM, C, VL	Davis y cols., 2002.
Receptor androgénico	DM, C, VL	Simerly y cols., 1990.
R CB₁	DM, C, VL	Berrendero y cols., 1998.
BDNF	DM, C	Sugiyama y cols., 2003.
Neuropéptido Y	DM, C	Dellovade y cols., 2000; Wang y cols., 2001.
Encefalina	VL	Harlan y cols., 1987; Romano y cols., 1990; Akesson y Micevych, 1991.
Somatostatina	VL	Herbison, 1994.
Sustancia P	VL	Nielsen y Blaustein, 1990.
Receptor de oxitocina	VL	Johnson y cols., 1989; Coirini y cols., 1992.
Colecistoquinina	VL	Akesson y cols., 1987.
PACAP	DM, C, VL	Zhou y cols., 2000; Segal y cols., 2005.
Slit 3	DM, C, VL	Ringstedt y cols., 2000; Segal y cols., 2005.
nNOS	C, VL	De Vente y cols., 1998.

Tabla 3. Identidades celulares y localización dentro del VMH (McClellan y cols., 2006). DM: dorsomedial, C: central, VL: ventrolateral.

1.3.2.2. Formación del VMH: neurogénesis y migración

Las neuronas que forman el VMH derivan principalmente de precursores de la zona proliferativa que rodea la porción más ventral del tercer ventrículo, dorsal al núcleo arcuato (Altman y Bayer, 1986). Se originan entre los días embrionarios E10-E15 en ratón, E13-E17 en ratas y alrededor de E30 en primates (Shimada y Nakamura, 1973; van Eerdenburg y Rakic, 1994; Tran y cols., 2003). Una vez formadas, estas neuronas migran desde la zona proliferativa del tercer ventrículo hacia su posición final para conformar el núcleo. De esta forma, el VMH se identifica claramente como núcleo entre los días embrionarios E16-E17 en el ratón (Schambra y cols., 1991; Tobet y cols., 1999), E18-E19 en ratas (Coggeshall, 1964; Hyypä, 1969) y entre las semanas 9-15 de gestación en humanos (Koutcherov y cols., 2002).

La migración de las neuronas ocurre de forma radial desde la zona ventricular guiada por procesos gliales radiales y tangencial a dichas fibras frecuentemente a lo largo de procesos neuronales (Rakic y cols., 1994). Las fibras gliales radiales actúan normalmente como guías para la migración neuronal en el cerebro. En el VMH, las fibras gliales radiales se extienden desde el tercer ventrículo hasta la superficie del cerebro en dirección dorsomedial a ventrolateral. Existen evidencias de movimientos tanto radiales (medial-lateral) como tangenciales (dorsal-ventral) en la región del VMH en desarrollo en el ratón. El patrón de migración es de dorsomedial a ventrolateral (Altman y Bayer, 1986) coincidiendo con el patrón de las fibras gliales radiales que cruzan el VMH (Levitt y Rakic, 1980; Tobet y Fox, 1989; Dellovade y cols., 2001). La migración ocurre dorsal/ventral cerca del ventrículo, con un patrón radial en la mayor parte del VMH y dorsal/ventral en los laterales del núcleo. Al contrario que el patrón de adentro hacia afuera de la corteza, en el hipotálamo las primeras células que se forman son las que migran más lejos del ventrículo. En este proceso de migración el GABA y el SF-1 son factores importantes, de forma que el SF-1 actúa de forma intrínseca entre las células del VMH y el GABA actúa de forma extrínseca como una molécula señalizadora para las células en migración (McClellan y cols., 2006).

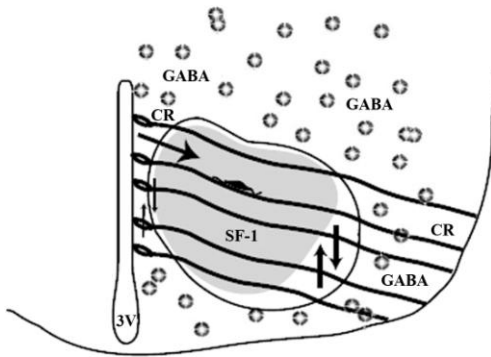


Figura 15. Migración de las células del VMH. Las células del VMH migran de forma radial desde la zona proliferativa hasta alcanzar su posición definitiva en el núcleo. 3V: tercer ventrículo, CR: célula radial. Modificada de McClellan y cols., 2006.

1.3.2.3. Conexiones

Las principales aferencias al VMH llegan desde el área preóptica, áreas talámicas y epitalámicas, amígdala y mesencéfalo dorsal, incluyendo la sustancia gris periacueductal (Fahrbach y cols., 1989; Canteras y cols., 1994). Las eferencias más importantes alcanzan la amígdala, área preóptica, hipotálamo anterior, núcleo del lecho de la estría terminal, sustancia gris periacueductal, zona incerta y núcleo peripeduncular (Saper y cols., 1976).

Muchas neuronas del VMH conectan con el hipotálamo anterior y el área preóptica medial, mientras que unas pocas mandan conexiones al hipotálamo dorsomedial, núcleo paraventricular y área retroquiasmática. Además, el VMH establece conexiones extrahipotalámicas con la amígdala, núcleo del lecho de la estría terminal y sustancia gris periacueductal (McClellan y cols., 2006).

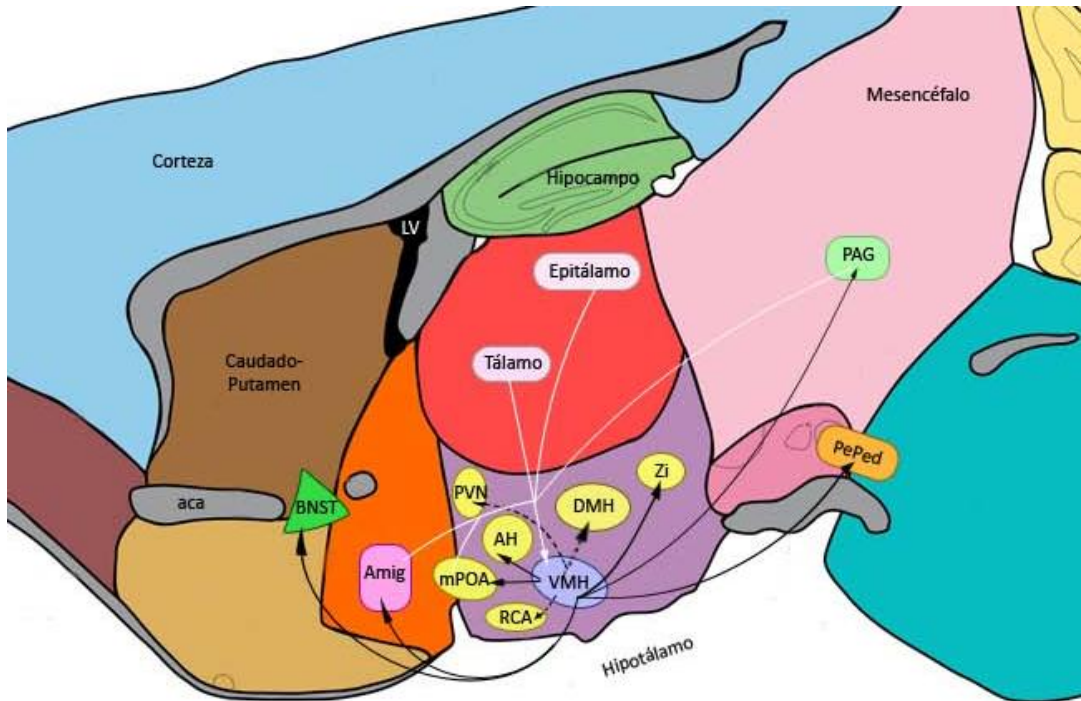


Figura 16. Principales conexiones del VMH: aferencias (flechas blancas), eferencias más importantes (flechas negras continuas) y otras eferencias menores (flechas negras discontinuas). aca: comisura anterior; AH: hipotálamo anterior; Amig: amígdala; BNST: núcleo del lecho de la estría terminal; DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo; mPOA: área preóptica medial; PAG: sustancia gris periacueductal; PePed: núcleo peripeduncular; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; RCA: área retroquiasmática; VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo; Zi: zona incerta.

Como ya he mencionado, el VMH está formado por los subnúcleos dorsomedial y ventrolateral, los cuales proyectan a regiones específicas participando de esta manera en varias funciones y comportamientos. Así, la región dorsomedial del VMH conecta con el hipotálamo anterior, el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo accumbens, la corteza prefrontal medial, la amígdala y la sustancia gris periacueductal. Por su parte, la región ventrolateral del VMH mantiene conexiones con el hipotálamo anterior, la amígdala y la sustancia gris periacueductal (al igual que la región dorsomedial) pero además contacta con los núcleos talámicos, el área retroquiasmática, los núcleos del rafe y el núcleo dorsomedial del hipotálamo (McClellan y cols., 2006).

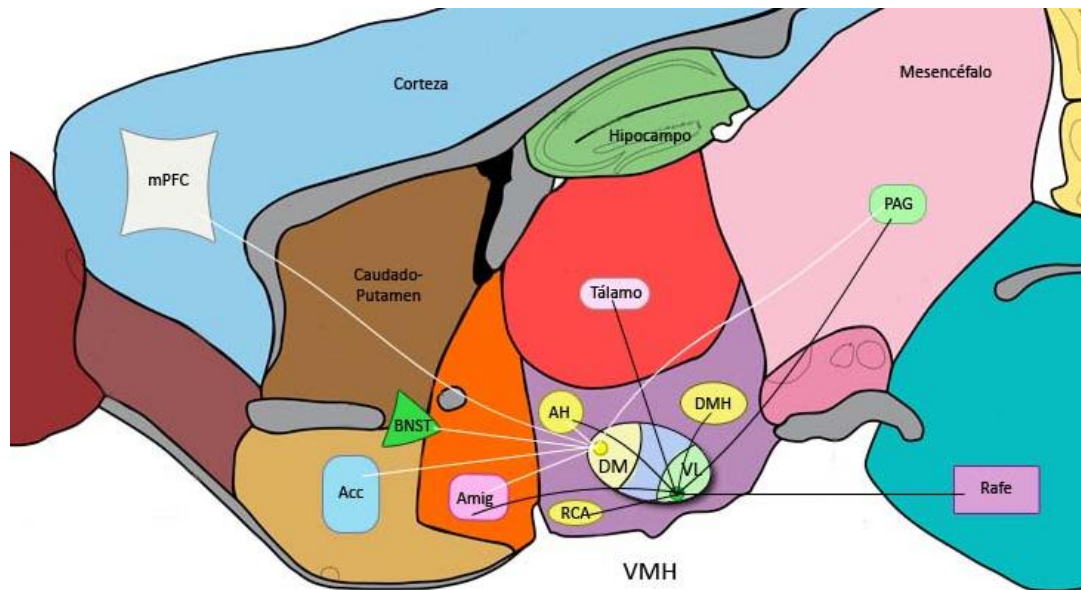


Figura 17. Conexiones específicas de los subnúcleos del VMH: conexiones de la región dorsomedial (líneas blancas) y conexiones de la región ventrolateral (líneas negras). Acc: núcleo accumbens; AH: hipotálamo anterior; Amig: amígdala; BNST: núcleo del lecho de la estria terminal; DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo; mPFC: corteza prefrontal medial; PAG: sustancia gris periacueductal; RCA: área retroquiasmática.

Un estudio más detallado ha analizado las proyecciones de subregiones específicas del VMH de ratas adultas (Canteras y cols., 1994). Las neuronas que contienen receptores de hormonas esteroideas en el VMH ventrolateral proyectan al mesencéfalo dorsal (Morrell y Pfaff, 1982) y el 30% de las neuronas de la región ventrolateral que expresan somatostatina y el receptor estrogénico alfa proyectan a la sustancia gris periacueductal en cobayas (Dufourny y Warembourg, 2001). Además, la mayoría de las aferencias alcanzan la región ventrolateral del VMH (Fahrbach y cols., 1989).

Las proyecciones desde el VMH intervienen en varias funciones asociadas con la región ventrolateral. En concreto, esta región, con su gran población de receptores de hormonas esteroideas, está involucrada en el comportamiento sexual. Es interesante el hecho de que en cobayas hembras las zonas del hipotálamo que contienen receptores

estrogénicos conectan con otros sitios también inmunorreactivos para estos receptores (Turcotte y Blaustein, 1999). Asimismo, sus proyecciones a la sustancia gris periacueductal integran la vía que causa la respuesta de lordosis en ratas hembras (Flanagan-Cato y cols., 2001).

Por otra parte, la subdivisión dorsomedial del VMH es importante en la conducta alimentaria. Las fibras positivas para el neuropéptido Y (NPY) viajan a través de la porción dorsomedial y central del VMH, que son los lugares donde se localiza el receptor de la leptina. Aunque no se conoce mucho sobre los eventos durante el desarrollo que contribuyen a la obesidad en el adulto, el posicionamiento de los tipos celulares durante el desarrollo del VMH podría ser un factor importante a la hora de establecerse las conexiones nerviosas relacionadas con la conducta alimentaria y la obesidad (McClellan y cols., 2006).

1.3.2.4. Funciones

El VMH se ha relacionado con funciones comportamentales y homeostáticas, como la conducta sexual, la conducta afectiva y la ingesta (Canteras y cols., 1994).

Tradicionalmente los estudios sobre la regulación del peso y el comportamiento alimentario se han centrado en el núcleo arcuato. Sin embargo, las alteraciones del VMH también pueden conducir a obesidad en el adulto (Majdic y cols., 2002). Gracias a los diversos estudios realizados sobre el VMH, se han ido descubriendo nuevas moléculas y tipos celulares específicos en dicho núcleo que podrían desempeñar un papel en la **regulación del comportamiento alimentario y balance energético** (Ohata y cols., 2000).

El VMH también desempeña un papel importante en la **regulación de la conducta sexual** de las hembras, como ya ha sido descrito. Concretamente, la respuesta de lordosis depende de las neuronas del VMH ventrolateral, específicamente de aquellas que expresan receptores estrogénicos. De esta forma, las lesiones electrolíticas de las neuronas del VMH ventrolateral que contienen receptores de hormonas esteroideas

(receptores de estrógenos y progesterona) inhiben el comportamiento de lordosis tanto en ratas (Emery y Moss, 1984) como en gatos (Leedy y Hart, 1985). Por el contrario, dicho comportamiento se activa tras la implantación directa de hormonas esteroideas en el VMH (Rubin y Bartfield, 1983).

Además, el VMH participa en la regulación de la **función cardiovascular**, ya que la estimulación de sus neuronas produce un cambio en la presión sanguínea y/o frecuencia cardíaca (Hirasawa y cols., 1996).

Por último, el VMH también ejerce un papel en la vía del **dolor**. La estimulación eléctrica de este núcleo induce analgesia en roedores (Rhodes y Liebeskind, 1978; Culhane y Carstens, 1988; Duysens y cols., 1989), mientras que las alteraciones del VMH causan hiperalgesia en ratas (Mukherjee y cols., 2002). El efecto analgésico se explica por un mecanismo de unión de la prostaglandina E2 a sus receptores EP1, estimulando así una vía analgésica (Hosoi y cols., 1999).

1.3.2.5. VMH y regulación de la ingesta

A lo largo de la historia y al avanzar los hallazgos científicos, ha ido cambiando el papel que se atribuía al VMH en la regulación de la ingesta y balance energético (para revisión: King, 2006). En un principio, se consideraba al VMH como uno de los dos principales núcleos implicados en la regulación de la ingesta, pasando unos años después a un segundo plano. Sin embargo, su importancia ha vuelto a resurgir en los últimos tiempos al considerarse el VMH un componente más de los múltiples circuitos centrales y periféricos que regulan el comportamiento alimentario y balance energético del organismo.

- **1ª fase: auge del VMH en la regulación de la ingesta**

Los primeros datos aparecen alrededor de 1840 con el síndrome de Frolich, que cursaba con obesidad y estaba asociado a lesiones en el hipotálamo basomedial. En 1939, los experimentos de Hetherington en ratones permitieron describir los efectos sobre el

peso corporal de la lesión estereotáxica de diferentes núcleos hipotalámicos. Así, únicamente se producía obesidad al lesionar el VMH, pero no cuando se afectaban otros núcleos hipotalámicos. Otros estudios determinaron la existencia de una correlación entre el tamaño de la lesión del VMH y la ganancia de peso. La obesidad por lesión del VMH fue atribuida a la hiperfagia presentada, ya que los animales lesionados comían vorazmente, 2-3 veces más que los animales normales, incluso antes de haberse recuperado totalmente de la anestesia. Estos animales presentaban un aumento de la frecuencia y cantidad de las comidas, así como un aumento de la ingesta diurna (posiblemente por daño de fibras del núcleo supraquiasmático), sin verse alterada la velocidad de la ingesta. Tras la lesión del VMH aparecían dos fases: una primera fase dinámica, en la que el animal sufría hiperfagia y doblaba su peso en 30 días, y una segunda fase estática, en la que la ingesta disminuía hasta los niveles preoperatorios y el peso se estabilizaba en un nuevo nivel obeso.



Figura 18. Fotografía de una rata con lesión bilateral en el VMH. La rata hembra con lesión bilateral del VMH pesa 988g, mientras que la rata control emparejada por edad y sexo pesa 312g (imagen tomada de King, 2006).

Estos experimentos llevaron en 1950 a la formulación según Kennedy de la **hipótesis del VMH como el centro de la saciedad**, cuya activación inhibiría la ingesta, y la **teoría lipostática**, según la cual el VMH monitorizaría en sangre algún metabolito de los niveles de grasa corporal. Posteriormente, los estudios de Anand y Brobeck, en los que se demostró que las lesiones del hipotálamo lateral (LH) producían afagia y pérdida de peso, condujeron en 1951 a proponer al **LH como el centro del hambre**. Según esta hipótesis, la activación del LH desencadenaría el hambre y el VMH produciría saciedad al inhibir al LH adyacente. En base a todos estos hallazgos, se propuso según Elliot Stellar la **hipótesis dual de las conductas motivadas**, de forma que todos los comportamientos motivados

(hambre, sed, sexo) estarían controlados por un centro cerebral excitador y otro inhibidor.

Sin embargo, la teoría lipostática permitía explicar la regulación del peso a largo plazo pero no a corto plazo, por lo que se propuso, según Mayer, la **teoría glucostática de la ingesta**, según la cual el VMH monitorizaría los niveles de glucosa sanguíneos. Esta teoría se apoyaba en los siguientes experimentos: 1) El 25-45% de las neuronas del VMH son glucorreactivas y se localizan en la región central del núcleo. 2) Los niveles de radioactividad son muy altos en el VMH al inyectar glucosa marcada radioactivamente por vía intraperitoneal. 3) La inyección intracarotidea de 2-deoxiglucosa o 2-DG, que es un inhibidor competitivo de la glucosa, disminuye la actividad espontánea de las neuronas del VMH a un 20% de lo normal. 4) La inyección del tóxico neuronal gold-tioglucoosa causa hiperfagia y obesidad por un gran daño en el VMH de los animales tratados. El daño en el VMH aumenta con la administración previa de insulina, ya que promueve la captación de glucosa, y disminuye con la administración previa de 2-DG o en animales diabéticos. Además, no se observa hiperfagia y obesidad en animales inyectados con otros gold-tiocompuestos.

- **2ª fase: dudas sobre el papel del VMH en la ingesta**

En los años siguientes varios experimentos pusieron en duda la importancia del VMH en la ingesta. Por un lado, se observó que los animales con el VMH lesionado tenían menos motivación por la comida ya que, aunque comían más cuando disponían libremente de comida, su rendimiento empeoraba cuando tenían que presionar muchas veces una palanca para obtener la comida. Además, las lesiones electrolíticas mediante el paso de corriente que se hacían en épocas anteriores, destruían el tejido por el depósito de iones metálicos. Sin embargo, las lesiones por radiofrecuencia, que destruían el VMH mediante calor y minimizaban el depósito de iones metálicos, no producían aumento de peso. Por ello, en 1963 se propuso la **teoría irritativa de Reynolds**, según la cual la hiperfagia y obesidad observadas en los experimentos previos no eran debidas a la lesión del VMH, sino al depósito de iones metálicos que irritaban o estimulaban el LH adyacente.

En 1974 se produjo la publicación del artículo “*Obesidad hipotalámica, el mito del VMH*” por Richard Gold. Se propuso la lesión de la zona rostral al VMH como un método más efectivo para producir obesidad, atribuyéndolo al daño causado en el fascículo noradrenérgico ventral. Posteriormente, se demostró que la lesión del VMH producía un desorden metabólico primario con alteraciones del metabolismo graso (independiente de la hiperfagia y obesidad) e hiperinsulinemia. Así se propuso, según Cox y Powley, la **hipótesis autónoma general**, según la cual la obesidad producida por el daño del VMH era debida a un aumento de todos los reflejos digestivos del sistema nervioso parasimpático, mediado por el nervio vago, y que la hiperfagia era secundaria a las alteraciones del metabolismo visceral. Finalmente, se demostró que la lesión selectiva del núcleo paraventricular del hipotálamo, sin dañar el VMH, también causaba hiperfagia y obesidad. Por todo ello, el papel del VMH en la regulación de la ingesta pasó a un segundo plano durante muchos años.

- **3ª fase: resurgimiento de la importancia del VMH en la ingesta**

Estudios posteriores volvieron a proponer el papel relevante del VMH en la regulación de la ingesta. Por un lado, en cuanto a la hipótesis irritativa, se demostró que las diferencias obtenidas en distintos experimentos eran debidas a la utilización de animales de distintos sexos. En general, los machos ganaban menos peso que las hembras independientemente del tipo de lesión y las lesiones no irritativas producían menor ganancia de peso que las electrolíticas. En cualquier caso, se ha demostrado que el daño del VMH puede resultar en obesidad. Por otro lado, en cuanto a los estudios de motivación por la comida, se ha visto que las ratas lesionadas en el VMH son hiperreactivas al manejo y a los estímulos aversivos, lo que explica su bajo rendimiento en los tests de motivación. Sin embargo, si reciben previamente un entrenamiento, su rendimiento es semejante al de los controles. Además, existen diferencias en la obesidad producida por la lesión del VMH, PVN o fascículo noradrenérgico ventral. En la actualidad, se considera que la lesión del VMH produce un desorden metabólico primario e hiperfagia independiente de las alteraciones metabólicas. Por último, los ratones *SF1-KO*,

que carecen de glándulas adrenales y mueren tras el nacimiento por insuficiencia adrenal, son capaces de sobrevivir tras un trasplante adrenal. Estos animales muestran alterada la estructura del VMH y desarrollan obesidad, lo que corrobora el papel del VMH en la regulación de la ingesta.

1.3.3. Esquema básico sobre la regulación de la ingesta

- **Regulación periférica**

La información sobre el estado metabólico del cuerpo converge desde la periferia en el cerebro a través de hormonas, péptidos y nutrientes. La regulación periférica incluye señales orexigénicas por el aumento de los niveles de ghrelina o corticosteroides como el cortisol, y señales anorexigénicas por el incremento de leptina, insulina así como la liberación de varios péptidos intestinales (Dietrich y Horvath, 2010).

- **Regulación central**

En la actualidad, el modelo de la hipótesis dual de la ingesta descrito anteriormente, en el que se proponía el VMH como el centro de la saciedad y el LH como el centro del hambre, se considera excesivamente simplista, ya que se ha demostrado que otras múltiples regiones cerebrales juegan también un papel importante en la regulación de la ingesta y comportamiento alimentario.

Entre estas regiones se incluyen: 1) El núcleo del tracto solitario en el tronco del encéfalo, que recibe las aferencias vagales que transmiten los indicadores periféricos de los niveles de energía. 2) Los órganos circunventriculares, que presentan terminaciones nerviosas fuera de la barrera hematoencefálica y pueden estar en contacto directo con factores circulantes relacionados con el balance de energía. 3) El núcleo accumbens y el área tegmental ventral, que intervienen en los aspectos de motivación y recompensa de las conductas alimentarias. 4) La amígdala, que procesa las experiencias emocionales y de

recompensa asociadas con la comida. 5) Varias regiones de la corteza cerebral, que contribuyen con información visual, del gusto o el olor, que también afectan a la ingesta.

En cualquier caso, el hipotálamo continúa considerándose como el principal centro regulador de la ingesta en el cerebro, ya que es capaz de percibir inmediatamente el estado energético del organismo y recuperar la homeostasis del balance energético. Además del VMH y LH, existen otros núcleos hipotalámicos que también están implicados de forma importante en el mantenimiento del balance energético, como el núcleo arcuato, núcleo dorsomedial del hipotálamo, área perifornical y núcleo paraventricular. La señalización neuronal en los circuitos centrales de la ingesta está mediada por varias clases de neurotransmisores, entre los que se hallan transmisores de aminoácidos o aminos, citoquinas, cannabinoides y de forma más importante neuropéptidos. La neurotransmisión química, incluyendo los neuropéptidos, se identifica como orexigénica o anorexigénica, si estimula o inhibe la ingesta, respectivamente.

En resumen, las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo proyectan al área hipotalámica lateral, que a su vez proyecta al área tegmental ventral y ésta al núcleo accumbens, capaz de mediar la mayor parte de los efectos reforzantes de la ingesta. Las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral también proyectan a otras regiones cerebrales que median los aspectos hedónicos de la ingesta, como la amígdala y el estriado dorsal. Asimismo, las neuronas del arcuato proyectan al núcleo parabraquial, que participa en la aversión a la comida. Además, las proyecciones del arcuato regulan la actividad de neuronas del núcleo paraventricular, núcleo dorsomedial y VMH, todas ellas interviniendo en el mantenimiento del balance energético. Finalmente, el arcuato también proyecta al núcleo del tracto solitario en el tronco del encéfalo. Las conexiones locales troncoencefálicas y entre el núcleo del tracto solitario y el núcleo motor dorsal del nervio vago, integran estímulos hormonales y neuronales, contribuyendo así a la regulación de la ingesta (Dietrich y Horvath, 2010).

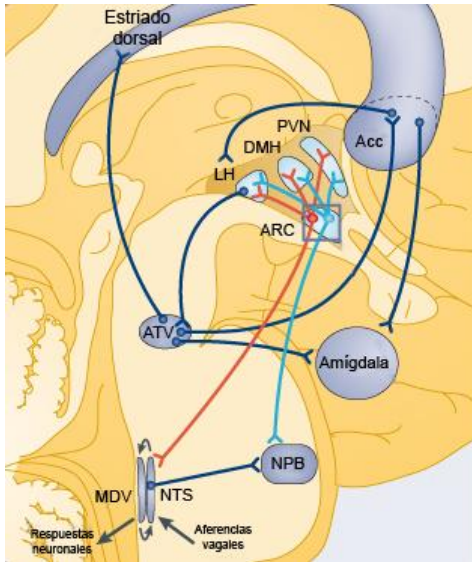


Figura 19. Esquema de los núcleos cerebrales implicados en la regulación de la ingesta y el balance energético.

Acc: núcleo accumbens, ARC: arcuato, ATV: área tegmental ventral, DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo, LH: hipotálamo lateral, MDV: núcleo motor dorsal del vago, NPB: núcleo parabraquial, NTS: núcleo del tracto solitario, PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo. La imagen ha sido adaptada de Dietrich y Horvath, 2010.

1.4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Como ha quedado descrito, el hipotálamo juega un papel importante en la regulación de la ingesta y el balance energético (Berthoud, 2002) estando la región dorsomedial del VMH, en particular, implicada directamente en estas funciones (McClellan y cols., 2006). El VMH ha sido considerado clásicamente como un núcleo de saciedad y más recientemente se ha descrito que transmite una fuerte señal excitadora a las neuronas POMC (que expresan proopiomelanocortina) del núcleo arcuato, contribuyendo así a la activación de vías neuronales anorexígenas (Sternson y cols., 2005).

Por otro lado, los derivados de la planta *Cannabis sativa* regulan la ingesta a la vez que el sistema endocannabinoide controla la señalización neuronal de vías hipotalámicas (Pagotto y cols., 2006). En general, el *binding* específico y la baja expresión de receptores de cannabinoides en el hipotálamo (Herkenham y cols., 1991; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992), se correlacionan con una menor intensidad de tinción inmunocitoquímica para CB₁ (Wittmann y cols., 2007), pero estos receptores muestran una mayor eficiencia en el hipotálamo que en otras regiones cerebrales (Breivogel y cols., 1997). El VMH en concreto contiene unos niveles muy altos de ARNm para el receptor CB₁ (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992) que se traduce en una inmunotinción moderada en este núcleo (Wittmann y cols., 2007).

En cuanto a los endocannabinoides, los niveles de anandamida y 2-AG en el hipotálamo aumentan durante el ayuno y disminuyen tras la ingesta, alcanzando un punto crítico que favorece un estado motivacional proclive a la toma de alimentos (Kirkham y cols., 2002; Di Marzo y Matias, 2005; Pagotto y cols., 2006; Matias y Di Marzo, 2007). La administración de anandamida en el VMH estimula el apetito en ratas (Jamshidi y Taylor, 2001), mientras que los animales tratados crónicamente con antagonistas de CB₁ (Colombo y cols., 1998; Di Marzo y cols., 2001; Pagotto y cols., 2006) y los ratones CB₁-KO (Di Marzo y cols., 2001; Cota y cols., 2003; Pagotto y cols., 2006) presentan un fenotipo anorexígeno. La activación presináptica de CB₁ inhibe la neurotransmisión excitadora e

inhibidora en circuitos neuronales implicados en la conducta alimentaria (Piomelli, 2003; Pagotto y cols., 2006; Matias y Di Marzo, 2007; Kano y cols., 2009). Se ha demostrado recientemente en un estudio en el que ha participado nuestro laboratorio, que los ratones mutantes condicionales *Glu-CB₁-KO*, que carecen de *CB₁* en las neuronas glutamatérgicas de origen cortical, presentan un fenotipo hipofágico tras un período de ayuno muy similar a los ratones *CB₁-KO* completos. Por el contrario, los ratones *GABA-CB₁-KO*, que carecen de *CB₁* en las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo, muestran un fenotipo hiperfágico en las mismas condiciones experimentales (Bellocchio y cols., 2010). Por lo tanto, el sistema endocannabinoide ejerce una modulación neuronal a través de la activación de los receptores *CB₁* presinápticos presentes tanto en vías excitadoras como inhibitoras de distintas redes cerebrales que regulan funciones homeostáticas y comportamentales, incluyendo la ingesta.

En vista de los antecedentes descritos, nuestra hipótesis de trabajo supone que los principales componentes del sistema endocannabinoide, como son el receptor *CB₁* y las enzimas de síntesis y degradación de los dos principales endocannabinoides, deben estar en los circuitos nerviosos que convergen en el núcleo ventromedial del hipotálamo.

2. OBJETIVOS

- 1- Analizar la arquitectura celular y subcelular del receptor CB₁ en las terminales sinápticas del VMH de ratón:
 - a. Describir la distribución del receptor CB₁ en el VMH de ratones silvestres y mutantes condicionales para dicho receptor.
 - b. Estudiar la localización subcelular del receptor CB₁ en el VMH de ratón.
 - c. Analizar la contribución del receptor CB₁ en la región dorsomedial del VMH de ratón en función de la naturaleza excitadora o inhibidora de los perfiles en los que se exprese.

- 2- Estudiar la localización subcelular del receptor CB₁ en los astrocitos del VMH de ratón.

- 3- Analizar la distribución celular y subcelular de las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides en el VMH de ratón:
 - a. Enzimas de síntesis y degradación de anandamida: NAPE-PLD y FAAH.
 - b. Enzimas de síntesis y degradación de 2-AG: DAGL- α y MAGL.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PLAN DE TRABAJO

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos, hemos utilizado anticuerpos específicos en combinación con las técnicas inmunocitoquímicas de inmunoperoxidasa para microscopía de luz, inmunofluorescencia para microscopía confocal, inmuno-oro intensificado con plata preinclusión y doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica. Además, hemos llevado a cabo controles de especificidad de los anticuerpos mediante técnicas inmunocitoquímicas y realizado la cuantificación y el correspondiente análisis estadístico de los datos obtenidos en los experimentos de microscopía electrónica.

TIPO DE MICROSCOPIA	Microscopía de luz	Microscopía confocal	Microscopía electrónica	
	TÉCNICA INMUNOCITOQUÍMICA	Inmuno- peroxidasa	Doble inmuno- fluorescencia	Inmuno-oro intensificado con plata preinclusión
ANTICUERPOS	CB ₁	CB ₁ y vGluT-1	CB ₁	CB ₁ y GFAP
	NAPE-PLD		NAPE-PLD	
	FAAH		FAAH	
	DAGL-α		DAGL-α	
	MAGL		MAGL	
ANIMALES	CB ₁ -WT	CB ₁ -WT	CB ₁ -WT	GFAP-CB ₁ -WT GFAP-CB ₁ -KO CB ₁ -KO
	Glu-CB ₁ -KO	Glu-CB ₁ -KO	Glu-CB ₁ -KO	
	GABA-CB ₁ -KO	GABA-CB ₁ -KO	GABA-CB ₁ -KO	
	CB ₁ -KO	CB ₁ -KO	CB ₁ -KO	

Tabla 4. Técnicas inmunocitoquímicas, anticuerpos y animales utilizados.

3.2. ANTICUERPOS

En este trabajo de Tesis Doctoral hemos empleado los anticuerpos que se describen a continuación:

Anticuerpos primarios:

- **CB₁** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal, producido en cabra, que reconoce 31 aminoácidos del extremo C-terminal (NM007726) del receptor CB₁ de ratón.
- **CB₁** (suministrado por el Dr. K. Mackie): Anticuerpo L15, producido en conejo, que reconoce los últimos 15 aminoácidos del receptor CB₁ de rata. Este anticuerpo ha sido suministrado generosamente por el Dr. K. Mackie (Indiana University, Bloomington, IN), al que estamos profundamente agradecidos.
- **NAPE-PLD** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal, producido en cobaya, que reconoce los aminoácidos 1-41 del extremo N-terminal (AB112350) de la NAPE-PLD de ratón.
- **FAAH** (Cayman Chemical Company): Anticuerpo policlonal, producido en conejo, que reconoce los aminoácidos 561-579 del péptido sintético de la FAAH de rata.
- **DAGL- α** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal, producido en conejo, que reconoce 42 aminoácidos del extremo C-terminal (NM198114) de la DAGL- α de ratón.
- **MAGL** (Cayman Chemical Company): Anticuerpo policlonal, producido en conejo, que reconoce los aminoácidos 1-14 de la MAGL de origen humano.

- **vGluT-1** (Millipore): Anticuerpo policlonal, producido en cobaya, que reconoce la región C-terminal del péptido sintético lineal de la proteína vGluT-1 (transportador vesicular de glutamato tipo 1) de rata.
- **GFAP** (Sigma-Aldrich): Anticuerpo monoclonal, producido en ratón, que reconoce la GFAP (proteína ácida fibrilar glial, del inglés *glial fibrillary acidic protein*).

Anticuerpo	Casa comercial y código	Especie	Concentración
CB ₁	Frontier Science Cat. No. CB1-Go-Af450-2	Cabra	2 µg/ml
CB ₁	Suministrado por el Dr. K. Mackie Código: L15	Conejo	1:1000
NAPE-PLD	Frontier Science Cat. No. NAPE-PLD-GP-Af720-1	Cobaya	4 µg/ml
FAAH	Cayman Chemical Cat. No. 101600	Conejo	1:100
DAGL-α	Frontier Science Cat. No. DGLa-Rb-Af380-1	Conejo	2 µg/ml
MAGL	Cayman Chemical Cat. No. 100035	Conejo	1:100
vGluT-1	Millipore Cat. No. AB5905	Cobaya	1:1000
GFAP	Sigma-Aldrich Cat. No. G-3893	Ratón	1:1000

Tabla 5. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados.

Caracterización de los anticuerpos primarios:

En todos los casos hemos realizado en las mismas condiciones experimentales los siguientes controles de especificidad: control positivo tomando de referencia el hipocampo y control negativo en el que se omite la incubación con el anticuerpo primario.

La especificidad de los anticuerpos empleados frente a CB₁ fue analizada en tejido de ratones knock-out para CB₁ (CB₁-KO). En el caso de los demás anticuerpos empleados en trabajo de Tesis Doctoral, no dispusimos de tejido *knock-out* para cada una de las proteínas identificadas por ellos. A pesar de que la utilización de este material es preceptivo, obligado y necesario, la garantía de especificidad de los anticuerpos empleados vino en este caso avalada en cierta forma por lo detectado con estos mismos anticuerpos en publicaciones previas, como se expone a continuación.

- **CB₁** (Frontier Science co. Ltd.): El inmunoblot reconoce una única banda proteica de 52kDa y marca de forma selectiva terminales y preterminales nerviosas de neuronas excitadoras e inhibitoras (Hoja de datos del anticuerpo, Frontier Science). Referencias: Yoshida y cols., 2006; Uchigashima y cols., 2007; Puente y cols., 2010.
- **CB₁** (suministrado por el Dr. K. Mackie): La especificidad de este anticuerpo (L15) aparece descrita en Nyíri y cols., 2005. Otras referencias: Han y cols., 2012.
- **NAPE-PLD** (Frontier Science co. Ltd.): El inmunoblot detecta una banda proteica de unos 45kDa y se observa mediante inmunohistoquímica un marcado selectivo en el cerebro de ratones silvestres, que no aparece en el cerebro de ratones *NAPE-PLD-KO* (Hoja de datos del anticuerpo, Frontier Science). Referencias: Nyilas y cols., 2008; Puente y cols., 2011.
- **FAAH** (Cayman Chemical Company): La enzima purificada de rata presenta una masa molecular estimada de 63kDa (Cravatt y cols., 1996). El anticuerpo reconoce mediante *western blot* una banda de 63kDa en el cerebelo de rata, como era de

esperar, que desaparece al preincubar el anticuerpo con el correspondiente péptido inmunógeno (20µg/ml, Cayman Chemical) (Suárez y cols., 2008, 2010).

- **DAGL-α** (Frontier Science co. Ltd.): El inmunoblot reconoce una banda de 105 o 120kDa en hipocampo y cerebelo respectivamente (Yoshida y cols., 2006). Otras referencias: Uchigashima y cols., 2007; Puente y cols., 2011.
- **MAGL** (Cayman Chemical Company): Reconoce las bandas que eran de esperar (35, 37 y 62kDa) (Dinh y cols., 2002; Suárez y cols., 2008, 2010), que no se ven tras la adsorción del anticuerpo con el péptido inmunógeno (Dinh y cols., 2002).
- **vGluT-1** (Millipore): La especificidad de este anticuerpo se describe en su hoja de datos correspondiente (Millipore). El anticuerpo ha sido testado en secciones del sistema nervioso central de rata mediante inmunofluorescencia e histoquímica, marcando principalmente fibras nerviosas y terminales. El patrón de marcado de este anticuerpo se corresponde con el descrito para otros anticuerpos frente a vGluT-1 (Bellocchio y cols., 1998; Fremeau y cols., 2001; Fujiyama y cols., 2001; Sakata-Haga y cols., 2001; Kaneko y cols., 2002; Varoqui y cols., 2002). La preadsorción del anticuerpo con el péptido inmunógeno (Cat. No. AG208, Millipore) elimina por completo el marcado.
- **GFAP** (Sigma-Aldrich): Este anticuerpo ha sido testado para la localización inmunocitoquímica de GFAP en tejido de rata, cerdo y humano. Marca los astrocitos, células de la glía de Bergmann, gliomas y tumores derivados de otras células gliales, mediante inmunofluorescencia indirecta en secciones congeladas, fijadas con alcohol o embebidas en parafina. El anticuerpo reconoce específicamente la GFAP mediante la técnica de inmunoblot. Además, no produce reacción cruzada con la vimentina, la cual se coexpresa frecuentemente en células de gliomas y algunos astrocitos (Hoja de datos del anticuerpo, Sigma-Aldrich). Referencias: Han y cols., 2012.

Anticuerpos secundarios:

- **Nanogold anti-cabra** (Nanoprobes, Inc.): Corresponde a la fracción Fab' de una IgG producida en conejo frente a cabra, marcada con una partícula de oro de 1,4nm de diámetro.
- **Nanogold anti-conejo** (Nanoprobes, Inc.): Corresponde a la fracción Fab' de una IgG producida en cabra frente a conejo, marcada con una partícula de oro de 1,4nm de diámetro.
- **Nanogold anti-cobaya** (Nanoprobes, Inc.): Corresponde a la fracción Fab' de una IgG producida en cabra frente a cobaya, marcada con una partícula de oro de 1,4nm de diámetro.
- **Biotinilado anti-cabra** (Vector Laboratories, Inc.): Inmunoglobulina IgG (H+L) biotinilada, producida en caballo frente a cabra.
- **Biotinilado anti-conejo** (Vector Laboratories, Inc.): Inmunoglobulina IgG (H+L) biotinilada, producida en cabra frente a conejo.
- **Biotinilado anti-cobaya** (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.): Inmunoglobulina IgG (H+L) biotinilada, producida en caballo frente a cobaya.
- **Biotinilado anti-ratón** (Vector Laboratories, Inc.): Inmunoglobulina IgG (H+L) biotinilada, producida en caballo frente a ratón.
- **A488 anti-cabra** (Molecular Probes, Life Technologies Corporation): IgG (H+L) producida en burro frente a cabra, unida al fluorocromo Alexa Fluor® 488.
- **Cy5 anti-cobaya** (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.): IgG (H+L) producida en burro frente a cobaya, conjugada con el fluorocromo Cy5.

Anticuerpo	Casa comercial y código	Especie	Concentración
Nanogold anti-cabra	Nanoprobes Cat. No. 2006	Conejo	1:100
Nanogold anti-conejo	Nanoprobes Cat. No. 2004	Cabra	1:100
Nanogold anti-cobaya	Nanoprobes Cat. No. 2055	Cabra	1:100
Biotinilado anti-cabra	Vector Laboratories Cat. No. BA-9500	Caballo	1:200
Biotinilado anti-conejo	Vector Laboratories Cat. No. BA-1000	Cabra	1:200
Biotinilado anti-cobaya	Jackson ImmunoResearch Cat. No. 706-065-148	Caballo	1:200
Biotinilado anti-ratón	Vector Laboratories Cat. No. BA-2000	Caballo	1:200
A488 anti-cabra	Molecular Probes Cat. No. A-11055	Burro	1:650
Cy5 anti-cobaya	Jackson ImmunoResearch Cat. No. 706-175-148	Burro	1:650

Tabla 6. Resumen de los anticuerpos secundarios utilizados.

3.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los procedimientos experimentales realizados en este estudio se han regido según la Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de Julio de 2003 y el Real Decreto español 1201/2005, de 10 de Octubre (BOE 21 de Octubre de 2005), sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos; la Ley 32/2007, de 7 de Noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE 8 de Noviembre de 2007) y la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de Septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. El protocolo para el uso y cuidado de los animales de experimentación ha sido aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (CEBA/93/2010/GRANDESMORENO). Además, se ha realizado un gran esfuerzo para minimizar el número de animales utilizados así como evitar su sufrimiento.

En este trabajo de Tesis Doctoral hemos empleado los siguientes animales de experimentación:

- **CB₁-WT**: Son ratones C57 silvestres o también denominados *CB₁-wild-type* y presentan una distribución normal del receptor CB₁.
- **CB₁-KO**: Son ratones *CB₁-knock-out*, que carecen del receptor CB₁.
- **Glu-CB₁-KO**: Son ratones mutantes condicionales que carecen del receptor CB₁ en la mayoría de las neuronas glutamatérgicas corticales.
- **GABA-CB₁-KO**: Son ratones mutantes condiciones que carecen del receptor CB₁ en las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo.
- **GFAP-CB₁-KO**: Son ratones mutantes condicionales que carecen del receptor CB₁ específicamente en los astrocitos. Los ratones control correspondientes se denominan *GFAP-CB₁-WT* y presentan una distribución normal de CB₁.

Todos estos ratones han sido suministrados por el Dr. Giovanni Marsicano (Neurocentre Magendie, INSERM U862, Burdeos, Francia), en el marco de la colaboración establecida con su laboratorio. En general, para los diferentes estudios hemos utilizado al menos 3 animales de cada condición experimental.

3.3.1. Generación de los ratones CB_1 -KO

La generación, genotipado y caracterización comportamental de los ratones CB_1 -KO ha sido descrita previamente por Giovanni Marsicano (Marsicano y cols., 2002, información suplementaria).

En resumen, se generó un constructo que contenía el gen CB_1 flanqueado por dos sitios *loxP* y se electroporó a células madre embrionarias de ratón E14 (día embrionario 14) para obtener así el alelo *floxed-neo*. Los ratones que portaban este alelo *floxed-neo* ($CB_1^{f/f}$) fueron cruzados con ratones transgénicos que expresaban la recombinasa Cre de forma ubicua (Schwenk y cols., 1995). A continuación, se cruzaron los ratones que portaban una delección transmisible de línea germinal de CB_1 durante 5 generaciones con ratones C57BL/6N (Charles River) y se obtuvieron ratones homocigotos deficientes de CB_1 (denominados $CB_1^{-/-}$ o CB_1 -KO) y sus correspondientes ratones *wild-type* o silvestres (denominados $CB_1^{+/+}$ o CB_1 -WT).

3.3.2. Generación de los ratones Glu- CB_1 -KO

La generación y caracterización de los ratones Glu- CB_1 -KO (también denominados $CB_1^{f/f}$ NEX-Cre) ha sido descrita previamente por Krisztina Monory (Monory y cols., 2006, información suplementaria).

En resumen, los ratones Glu- CB_1 -KO fueron obtenidos mediante el cruce de ratones $CB_1^{f/f}$, que portan el gen CB_1 flanqueado por dos sitios *loxP* (Marsicano y cols., 2003), con ratones transgénicos NEX-Cre, los cuales expresan la recombinasa Cre bajo la regulación

del factor NEX (Schwab y cols., 2000; Kleppisch y cols., 2003; Wu y cols., 2005). El factor de transcripción NEX es un marcador de progenitores embrionarios de neuronas corticales (Wu y cols., 2005), que se expresa sobre todo en neuronas glutamatérgicas corticales maduras del cerebro adulto, pero no en interneuronas corticales GABAérgicas y apenas en regiones subcorticales (Bartholomä y Nave, 1994). La expresión de Cre bajo el control de las secuencias reguladoras de NEX en los ratones transgénicos NEX-Cre generados mediante *knock-in* en el locus NEX, conlleva la delección específica de los alelos *floxed* en las neuronas del prosencéfalo (Kleppisch y cols., 2003).

3.3.3. Generación de los ratones GABA- CB_1 -KO

La generación y caracterización de los ratones GABA- CB_1 -KO (también denominados $CB_1^{f/f \text{ Dlx5/6-Cre}}$) ha sido descrita previamente por Krisztina Monory (Monory y cols., 2006, información suplementaria).

En resumen, los ratones GABA- CB_1 -KO fueron obtenidos mediante el cruce de los ratones $CB_1^{f/f}$, que portan el gen CB_1 flanqueado por dos sitios *loxP* (Marsicano y cols., 2003) con los ratones transgénicos Dlx5/6-Cre (cuya obtención se describe en Zerucha y cols., 2000). Los genes Dlx5/Dlx6 son genes homeobox que se expresan en neuronas GABAérgicas del prosencéfalo en proceso de diferenciación y migración durante el desarrollo embrionario (Stühmer y cols., 2002). Así, la expresión de la recombinasa Cre bajo el control de las secuencias reguladoras de los genes Dlx5/Dlx6 produciría la recombinación de los sitios *loxP* en las neuronas GABAérgicas.

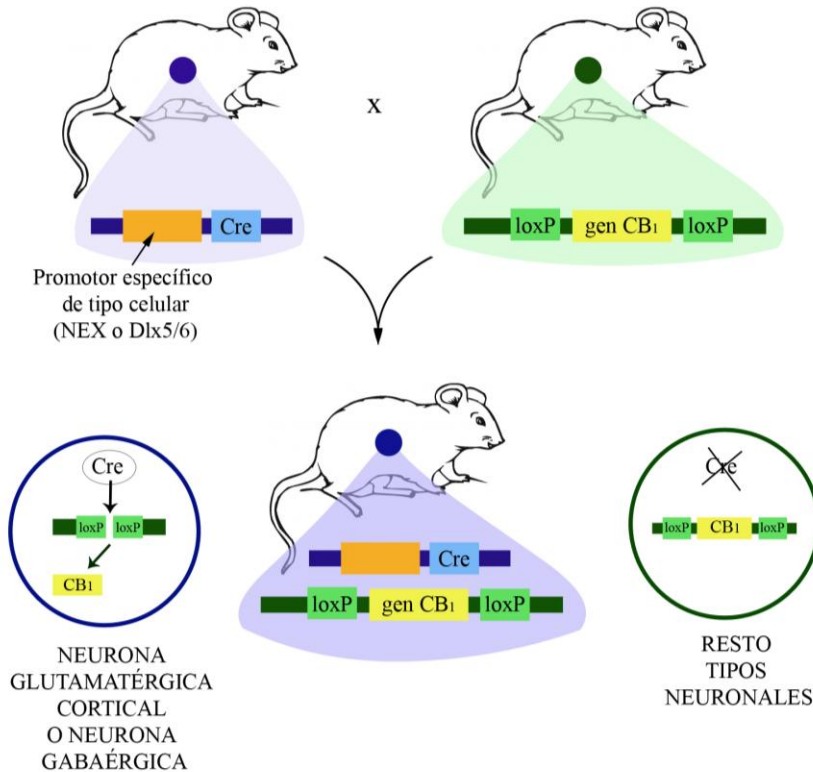


Figura 20. Generación de los ratones mutantes condicionales $\text{Glu-CB}_1\text{-KO}$ y $\text{GABA-CB}_1\text{-KO}$. Estos ratones mutantes condicionales se obtienen cruzando el ratón $\text{CB}_1^{f/f}$ con el correspondiente ratón que expresa la recombinasa Cre en un tipo celular específico.

3.3.4. Generación de los ratones $\text{GFAP-CB}_1\text{-KO}$

La generación de los ratones $\text{GFAP-CB}_1\text{-KO}$ (también denominados $\text{CB}_1^{f/f} \text{GFAP-CreERT2}$) se describe con más detalle en Han y cols., 2012, información suplementaria. En resumen, los ratones $\text{GFAP-CB}_1\text{-KO}$ fueron obtenidos mediante el cruce de ratones $\text{CB}_1^{f/f}$, que portan el gen CB_1 flanqueado por dos sitios *loxP* (Marsicano y cols., 2003), con ratones transgénicos GFAP-CreERT2 tratados con tamoxifeno, ya que la proteína CreERT2 es inactiva en ausencia de dicho tratamiento (Hirrlinger y cols., 2006). La GFAP o proteína ácida fibrilar glial es una proteína que se expresa de forma característica en los astrocitos (para revisión: Eng y cols., 2000).

3.4. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS

Las técnicas inmunocitoquímicas se basan en la capacidad de los anticuerpos para reconocer y unirse de forma específica al antígeno frente al cual han sido sintetizados. Posteriormente, esta reacción antígeno-anticuerpo es visualizada por medio de marcadores.

3.4.1. Método de la avidina-biotina peroxidasa

El método de la avidina-biotina peroxidasa se fundamenta en la gran afinidad que presentan las moléculas de avidina y biotina entre sí. La avidina es una glicoproteína de alto peso molecular (68kDa) compuesta por cuatro subunidades que configuran una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas de unión a la vitamina biotina de bajo peso molecular (244Da). Además, la avidina se puede utilizar como molécula puente entre diferentes moléculas biotiniladas, como son, en este caso, el anticuerpo y la peroxidasa. La biotinilización es un proceso bioquímico en el cual se conjuga la biotina a diferentes moléculas. Además, el pequeño tamaño de la biotina hace que este proceso no modifique las propiedades inmunológicas, enzimáticas o físicas de las moléculas marcadoras. Se estima que el número de moléculas de biotina que se pueden unir a un anticuerpo es del orden de 150, lo que permite incubar el anticuerpo primario a concentraciones muy bajas.

Este método inmunocitoquímico consiste en la incubación del tejido con un anticuerpo primario frente a la proteína que se quiere detectar. Sobre éste se aplica un anticuerpo secundario biotinilado producido frente al animal en el que se ha sintetizado el anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario se unirá a través de su biotina a un complejo formado por avidina conjugada a peroxidasa biotinilada, que posee un lugar de unión libre para la biotina. El cromógeno empleado es la 3,3'-diaminobencidina (DAB), que se oxida en un medio que contiene peróxido de hidrógeno y la peroxidasa del

complejo avidina-biotina. La peroxidasa cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno, de forma que el oxígeno liberado oxida la DAB. Este óxido de diaminobencidina es insoluble y da un precipitado de color marrón rojizo al microscopio de luz. La DAB difunde fácilmente rellenando los perfiles celulares en los que se localiza, por lo que a nivel de microscopía electrónica, esta técnica proporciona información sobre el compartimento neuronal que ocupa una proteína o neurotransmisor, pero no del lugar exacto en el que se dispone.

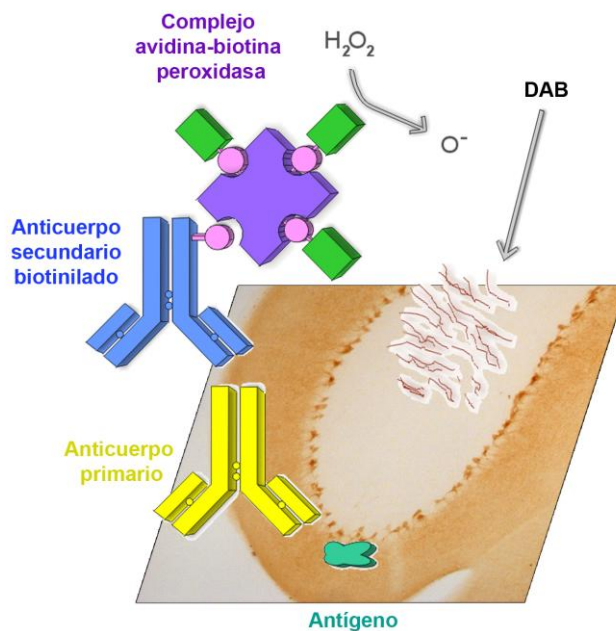


Figura 21. Principales etapas de la técnica inmunocitoquímica de la avidina-biotina peroxidasa.

3.4.2. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica

La técnica de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión da una información mucho más exacta sobre la localización ultraestructural de proteínas. Este método consiste en la incubación del tejido con un anticuerpo primario frente a la proteína que se quiere detectar. Sobre éste se aplica un anticuerpo secundario nanogold producido frente al animal en el que se ha sintetizado el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario nanogold consiste en la fracción Fab' de la inmunoglobulina conjugada a una partícula de oro de 1,4nm y que reconoce la fracción constante de los anticuerpos primarios. Su pequeño tamaño le permite una mayor penetración en el tejido, incrementando la sensibilidad de la técnica. Una vez realizada la unión antígeno-anticuerpo, las pequeñas partículas de oro se intensifican con plata con el fin de aumentar su tamaño y de esta forma hacerlas visibles en el microscopio electrónico. La reacción antígeno-anticuerpo en esta técnica de preinclusión no presenta alteraciones con el osmio ni con la polimerización de las resinas a altas temperaturas.

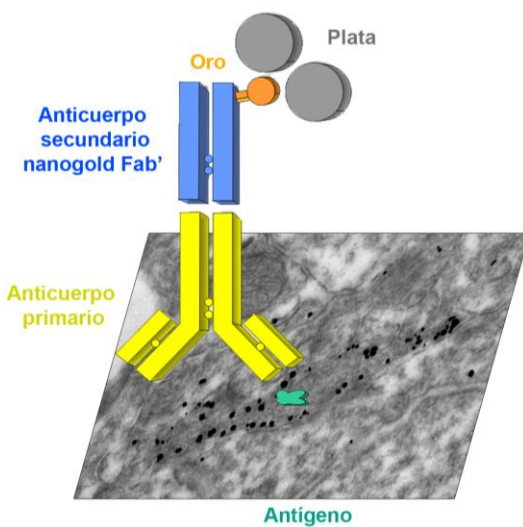


Figura 22. Principales etapas de la técnica inmunocitoquímica de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica.

3.4.3. Método de doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica

La combinación del método de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión facilita los estudios de colocalización ultraestructural de diferentes proteínas. Esta combinación de métodos inmunocitoquímicos sólo es posible si los anticuerpos primarios han sido sintetizados en diferentes especies animales frente a los cuales se unen los respectivos anticuerpos secundarios específicos. Finalmente, estos anticuerpos secundarios son visualizados mediante marcadores claramente diferenciables entre sí (partículas de oro intensificadas con plata e inmunoprecipitado de DAB).

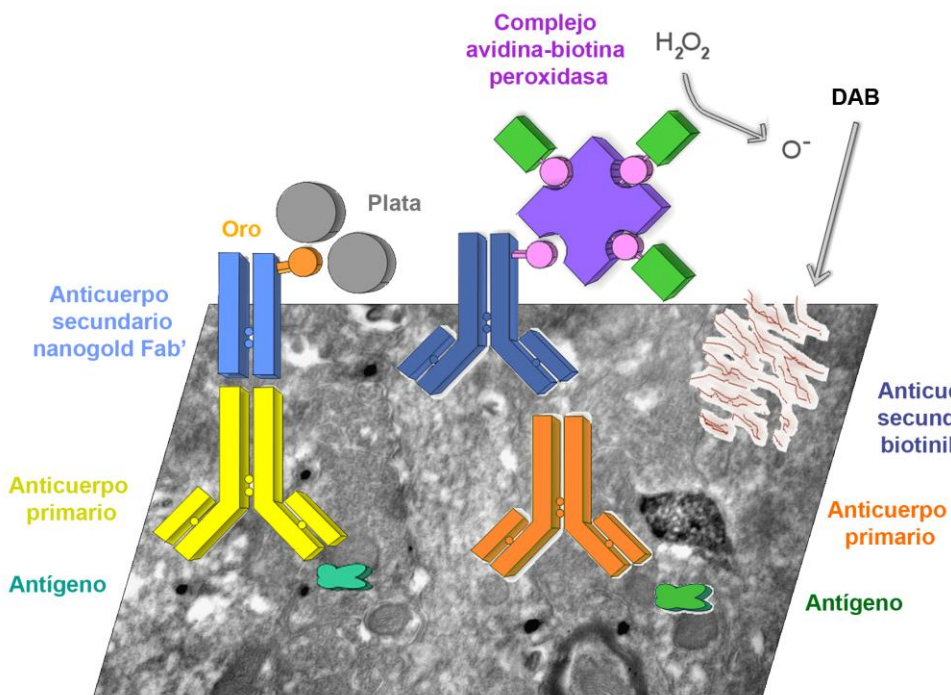


Figura 23. Principales etapas de la técnica inmunocitoquímica de doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica.

3.4.4. Método de inmunofluorescencia

Este método inmunocitoquímico consiste en la incubación del tejido con un anticuerpo primario frente a la proteína que se quiere detectar. Sobre éste se aplica un anticuerpo secundario frente al animal en el que se ha sintetizado el anticuerpo primario y que está unido a un fluorocromo. El fluorocromo es una molécula que al ser excitada con la energía de una determinada longitud de onda es capaz de emitir energía de una longitud de onda mayor, permitiendo observar una señal fluorescente en el microscopio de fluorescencia. Este método también permite la colocalización de proteínas mediante la utilización de anticuerpos primarios sintetizados en diferentes especies animales, frente a los cuales se unen los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos que presenten un espectro de excitación y emisión claramente diferenciables en el microscopio confocal.

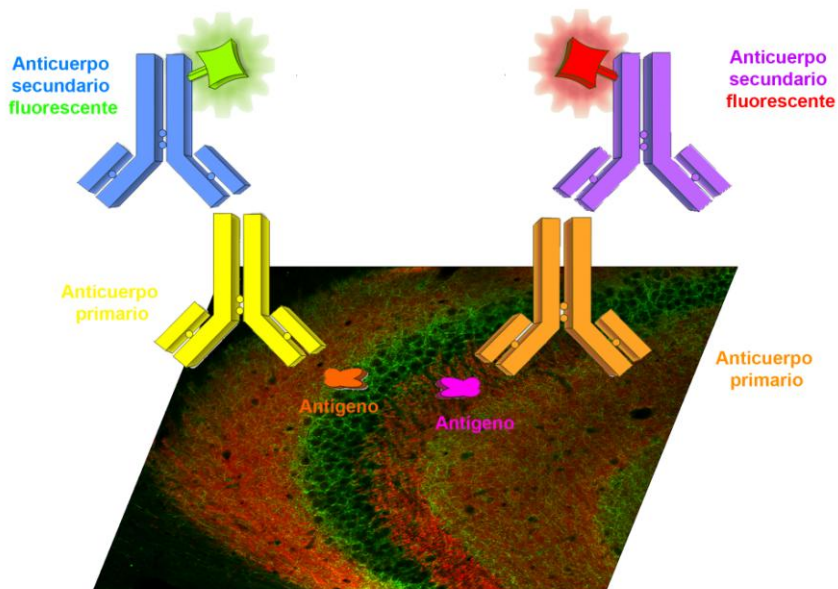


Figura 24. Principales etapas de la técnica inmunocitoquímica de inmunofluorescencia.

3.5. PROCESADO DEL TEJIDO

A continuación se describen detalladamente los protocolos de las técnicas empleadas en este trabajo de Tesis Doctoral.

3.5.1. Perfusión transcardíaca de los animales

1. Anestesia de los animales con ketamina/xilacina (80/10 mg/kg) por vía intraperitoneal.
2. Perfusión transcardíaca con tampón fosfato salino (TFS 1X, pH 7,4) durante 20 segundos (s), seguido por 250 ml de una solución fijadora compuesta por paraformaldehído 4%, ácido pícrico saturado 0,2% y glutaraldehído 0,1% en tampón fosfato (TF) 0,1M (pH 7,4) durante 10-15 minutos (min), estando todas las soluciones a temperatura ambiente (20-25°C). Únicamente para el estudio de CB₁ en astrocitos se empleó la solución fijadora de Zamboni, compuesta por paraformaldehído 2% y ácido pícrico saturado 15% (Stefanini y cols., 1967) en TF 0,1M (pH 7,4).
3. Extracción de los cerebros e inmersión en fijador puro durante 1 semana a 4°C.
4. Conservación en fijador diluido 1:10 y azida sódica 0,025% a 4°C, hasta su utilización.

3.5.2. Método de la avidina-biotina peroxidasa para microscopía de luz

1. Cortes en vibrotomo, secciones coronales de 50µm recogidas en TF 0,1M.
2. Bloqueo de uniones inespecíficas durante 30 min a temperatura ambiente con la solución de bloqueo compuesta por tampón tris-HCl salino (TBS 1X), albúmina de

suero bovino (del inglés *bovine serum albumine* o BSA) 10%, azida sódica 0,1% y tritón X-100 0,5%.

3. Incubación con el anticuerpo primario correspondiente: CB₁ (2µg/ml, Frontier Science), NAPE-PLD (4µg/ml), FAAH (1:100), DAGL-α (2µg/ml) o MAGL (1:100) en la misma solución del bloqueo durante 2 días a 4°C y agitación constante.
4. Lavados en TBS 1X, BSA 1% y tritón X-100 0,5% durante 30 min.
5. Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (1:200) en la solución de lavado durante 1 hora (h) a temperatura ambiente y agitación constante.
6. Lavados en TBS 1X, BSA 1% y tritón X-100 0,5% durante 30 min.
7. Incubación con el complejo avidina-biotina (1:50) en la solución de lavado durante 1 h a temperatura ambiente.
8. Lavados en TBS 1X, BSA 1% y tritón X-100 0,5% durante 30 min. Los últimos lavados en TF 0,1M y tritón X-100 0,5%.
9. Revelado con DAB al 0,05% en TF 0,1M y tritón X-100 0,5% y peróxido de hidrógeno al 0,01% durante 5 min a temperatura ambiente.
10. Lavados en TF 0,1M y tritón X-100 0,5% durante 30 min.
11. Montar las secciones sobre portaobjetos gelatinizados y dejar secar.
12. Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96°, 100°) durante 5 min cada uno.
13. Aclarado en xilol (3 veces de 5 min).
14. Cubrir los portaobjetos con el medio de montaje DPX.
15. Observación del material en el microscopio de luz Zeiss Axiophot.

3.5.3. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica

1. Cortes en vibrotomo, secciones coronales de 50µm recogidas en TF 0,1M.
2. Bloqueo de uniones inespecíficas durante 30 min a temperatura ambiente con la solución de bloqueo compuesta por TBS 1X, BSA 10%, azida sódica 0,1% y saponina 0,02%.
3. Incubación con el anticuerpo primario correspondiente: CB₁ (2µg/ml, Frontier Science), NAPE-PLD (4µg/ml), FAAH (1:100), DAGL-α (2µg/ml) o MAGL (1:100) en la misma solución del bloqueo pero con saponina 0,004% durante 2 días a 4°C y agitación constante.
4. Lavados en TBS 1X y BSA 1% durante 30 min.
5. Incubación con el correspondiente anticuerpo secundario nanogold (1:100) en TBS 1X, BSA 1% y saponina 0,004% durante 3 h a temperatura ambiente.
6. Lavados en TBS 1X y BSA 1% durante 24 h a 4°C y agitación constante.
7. Postfijación en glutaraldehído al 1% en TBS 1X durante 10 min.
8. Lavados en agua bidestilada durante 30 min.
9. Intensificación de las partículas de oro, utilizando el intensificador comercial HQ Silver kit (Nanoprobes), durante 12 min en oscuridad.
10. Lavados en agua bidestilada durante 30 min.
11. Lavados en TF 0,1M durante 30 min.
12. Osmificación con tetróxido de osmio al 1% en TF 0,1M durante 20 min.
13. Lavados en TF 0,1M durante 30 min.
14. Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96° y 100°) durante 5 min cada uno y 3 pasos de 5 min para el de 100°.
15. Aclarado en óxido de propileno en tres pasos de 5 min cada uno.
16. Inclusión en resina Epon 812 y óxido de propileno 1:1 durante toda la noche a

temperatura ambiente y agitación suave.

17. Inclusión en resina Epon 812.

18. Polimerización de la resina en una estufa a 60°C durante 2 días.

19. Obtención de secciones semifinas de 1µm en el ultramicrotomo.

20. Obtención de secciones ultrafinas de 80nm en el ultramicrotomo, recogidas en rejillas de níquel.

21. Contraste de las secciones con citrato de plomo al 2,5% durante 20 min.

22. Observación en el microscopio electrónico de transmisión Philips EM208S.

3.5.4. Método de doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica

1. Cortes en vibrotomo, secciones coronales de 50µm recogidas en TF 0,1M.

2. Bloqueo de uniones inespecíficas durante 30 min a temperatura ambiente con la solución de bloqueo compuesta por TBS 1X, BSA 10%, azida sódica 0,1% y saponina 0,02%.

3. Incubación con el anticuerpo primario anti-CB₁ (1:1000, suministrado generosamente por el Dr. K. Mackie) y anti-GFAP (1:1000) en la misma solución del bloqueo pero con saponina 0,004% durante 2 días a 4°C y agitación constante.

4. Lavados en TBS 1X y BSA 1% durante 30 min.

5. Incubación con el correspondiente anticuerpo secundario nanogold (1:100) y el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado (1:200) en TBS 1X, BSA 1% y saponina 0,004% durante 4 h a temperatura ambiente.

6. Lavados en TBS 1X y BSA 1% durante 30 min.

7. Incubación con el complejo avidina-biotina (1:50) en la solución de lavado durante 1,5 h a temperatura ambiente.

8. Lavados en TBS 1X y BSA 1% durante 24 h a 4°C y agitación constante.
9. Postfijación en glutaraldehído al 1% en TBS 1X durante 10 min.
10. Lavados en agua bidestilada durante 30 min.
11. Intensificación de las partículas de oro, utilizando el intensificador comercial HQ Silver kit (Nanoprobes), durante 12 min en oscuridad.
12. Lavados en agua bidestilada durante 30 min.
13. Lavados en TF 0,1M durante 30 min.
14. Revelado con DAB al 0,05% en TF 0,1M y peróxido de hidrógeno al 0,01% durante 5 min a temperatura ambiente.
15. Lavados en TF 0,1M durante 30 min.
16. Osmificación con tetróxido de osmio al 1% en TF 0,1M durante 20 min.
17. Lavados en TF 0,1M durante 30 min.
18. Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96° y 100°) durante 5 min cada uno y 3 pasos de 5 min para el de 100°.
19. Aclarado en óxido de propileno en tres pasos de 5 min cada uno.
20. Inclusión en resina Epon 812 y óxido de propileno 1:1 durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación suave.
21. Inclusión en resina Epon 812.
22. Polimerización de la resina en una estufa a 60°C durante 2 días.
23. Obtención de secciones semifinas de 1µm en el ultramicrotomo.
24. Obtención de secciones ultrafinas de 80nm en el ultramicrotomo, recogidas en rejillas de níquel.
25. Contraste de las secciones con citrato de plomo al 2,5% durante 20 min.
26. Observación en el microscopio electrónico de transmisión Philips EM208S.

3.5.5. Método de inmunofluorescencia

1. Cortes en vibratomo, secciones coronales de 50µm recogidas en TF 0,1M.
2. Bloqueo de uniones inespecíficas durante 1 h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo compuesta por TFS 1X, suero de ternera (del inglés *newborn calf serum* o NCS) 3%, azida sódica 0,025% y tritón X-100 0,5%.
3. Incubación con el anticuerpo primario anti-CB₁ (2µg/ml, Frontier Science) y anti-vGluT-1 (1:1000) en la misma solución del bloqueo durante 2 días a 4°C y agitación constante.
4. Lavados en TFS 1X y NCS 1,5% durante 30 min.
5. Incubación con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes (1:650) en la solución de lavado durante 24 h a 4°C y agitación constante.
6. Lavados en TFS 1X y NCS 1,5% durante 30 min.
7. Montar las secciones sobre portaobjetos gelatinizados y dejar secar.
8. Montar con el medio de montaje Vectashield, cubrir y guardar a 4°C.
9. Observación del material en el microscopio confocal Olympus fluoview FV500.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Hicimos ultramicrofotografías con el microscopio electrónico (18.000-28.000X) a partir de las rejillas que portaban las secciones ultrafinas de 80nm. Todas las secciones mostraban una intensidad de marcado semejante, lo que indica que fueron obtenidas de un nivel similar de profundidad del tejido. Además, para evitar falsos negativos, únicamente examinamos las secciones ultrafinas de las primeras 1,5 μ m desde la superficie de la vibrosección tisular.

En los estudios de localización subcelular de CB₁ y DAGL- α , consideramos marcado positivo la presencia de al menos 1 inmunopartícula situada en un rango extendido desde la inmediata proximidad a la membrana plasmática, hasta aproximadamente un máximo de 30nm alejada de la misma. Este mismo criterio fue aplicado y extendido al interior del perfil en los estudios de distribución subcelular de las enzimas NAPE-PLD y MAGL. Finalmente, en el caso de FAAH, debido a la intensidad del inmunomarcado observado, las dendritas consideradas positivas debían presentar al menos 6 inmunopartículas y las terminales sinápticas al menos 1 inmunopartícula, situadas en ambos perfiles en la membrana (en el rango de 0-30nm) o en el interior de dicho perfil. Utilizamos el programa Image-J (versión 1.43u, NIH, USA) para medir la longitud de las membranas y el área estudiada. Analizamos los porcentajes de los perfiles positivos para cada proteína de estudio, presentando los datos como la media \pm SEM, utilizando un programa estadístico (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc, San Diego, USA) y estudiamos las diferencias entre los grupos mediante el test de chi-cuadrado, $p < 0,05$. Utilizamos el mismo programa estadístico en la estimación de la densidad del inmunomarcado (inmunopartículas/ μ m membrana para CB₁ y DAGL- α e inmunopartículas/ μ m² para NAPE-PLD, FAAH, DAGL- α y MAGL) mostrada como la media \pm SEM. Finalmente, analizamos las diferencias entre los grupos, siempre que fue posible, mediante el test de Mann Whitney, $p < 0,05$, tras observar que no se cumplía el requisito de normalidad.

4. RESULTADOS

4.1. ARQUITECTURA CELULAR Y SUBCELULAR DEL RECEPTOR CB₁ EN LAS TERMINALES SINÁPTICAS DEL VMH

4.1.1. MICROSCOPIA DE LUZ

4.1.1.1. Patrón de expresión de CB₁ en el VMH

La inmunorreactividad para CB₁ se distribuye de manera uniforme por todo el VMH del ratón *CB₁-WT* (Fig. 25A) y *Glu-CB₁-KO* (Fig. 25B). A mayores aumentos, el patrón de marcado consiste en numerosos puntos inmunorreactivos de pequeño tamaño compactados en la zona oval correspondiente al núcleo (Fig. 25A', B'). Sin embargo, el marcado para CB₁ disminuye drásticamente en el VMH del ratón *GABA-CB₁-KO* (Fig. 25C), sobre todo en su región dorsomedial (Fig. 25C'), lo que sugiere la presencia mayoritaria del receptor CB₁ en perfiles GABAérgicos. Es de resaltar que el inmunomarcado desaparece completamente en el VMH del ratón *CB₁-KO* (Fig. 25D, D').

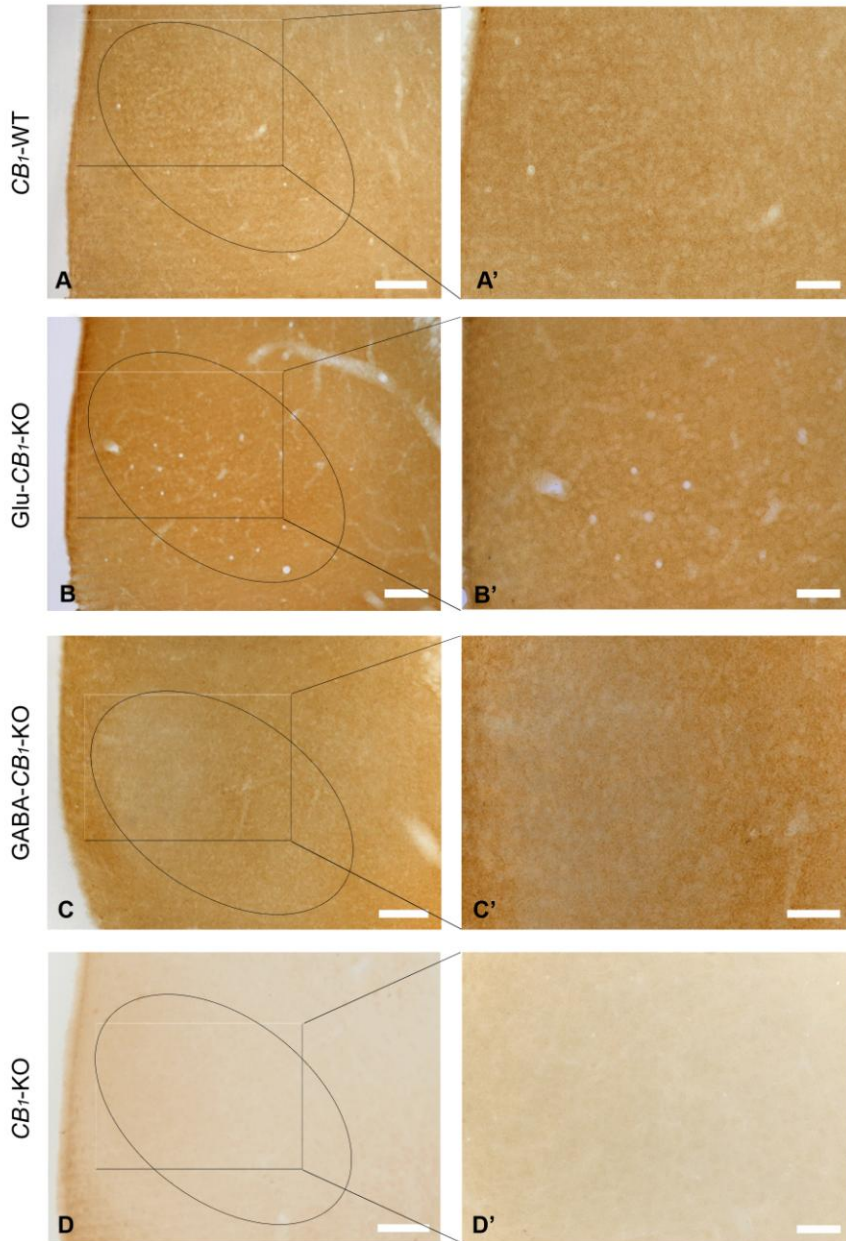


Figura 25. Inmunomarcado para CB_1 en el VMH de ratón. Método de inmunoperoxidasa para microscopía de luz. El VMH (delimitado por un círculo ovalado en A-D) muestra una inmunotinción moderada de apariencia punteada en el ratón CB_1 -WT (A, A') y $Glu-CB_1$ -KO (B, B'). Sin embargo, la inmunorreactividad disminuye en la región dorsomedial del VMH del ratón $GABA-CB_1$ -KO (C, C'). El marcado desaparece en el tejido del ratón CB_1 -KO (D, D'). Las áreas encuadradas en A-D se muestran aumentadas en A'-D'. Barras de escala: 100 μ m (A-D), 50 μ m (A'-D').

4.1.1.2. Controles de especificidad para CB₁

Los controles de especificidad realizados fueron los siguientes: control positivo, control en el animal *knock-out* y control negativo. El marcado en el control positivo y la ausencia del mismo en el control negativo y sobre todo en el animal CB₁-KO corroboran la especificidad y fiabilidad del anticuerpo frente a CB₁ (Frontier Science) empleado en este estudio (Fig. 26).



Figura 26. Controles de especificidad del anticuerpo CB₁ (Frontier Science). Método de inmunoperoxidasa para microscopía de luz. Obsérvese el marcado típico de CB₁ en el control positivo de hipocampo (A) y las secciones de hipotálamo donde no hay marcado para CB₁ en tejido del ratón CB₁-KO (B) ni en el control negativo (C). Barras de escala: 500μm.

4.1.2. MICROSCOPIA CONFOCAL

A continuación, analizamos mediante la técnica de inmunofluorescencia para microscopía confocal la distribución de CB₁ y el transportador vesicular de glutamato tipo 1 (vGluT-1), el cual identifica las terminales glutamatérgicas de origen cortical (Fig. 27). A bajos aumentos observamos que el patrón de marcado para CB₁ (en verde) es similar al que hemos descrito antes para microscopía de luz. De esta forma, la inmunofluorescencia es homogénea por todo el núcleo en los ratones CB₁-WT (Fig. 27A) y Glu-CB₁-KO (Fig. 27B), disminuyendo sobre todo en la región dorsomedial del VMH en el ratón GABA-CB₁-

KO (Fig. 27C) y desapareciendo por completo en el animal CB_1 -KO (Fig. 27D). La inmunofluorescencia para vGluT-1 (en rojo) se mantiene en todos los casos y se caracteriza por marcar un conjunto de fibras inmunopositivas que rodean al núcleo. A mayores aumentos, CB_1 y vGluT-1 presentan una distribución punteada, que no se ve para CB_1 pero se mantiene para vGluT-1 en el animal CB_1 -KO (Fig. 27A'-D').

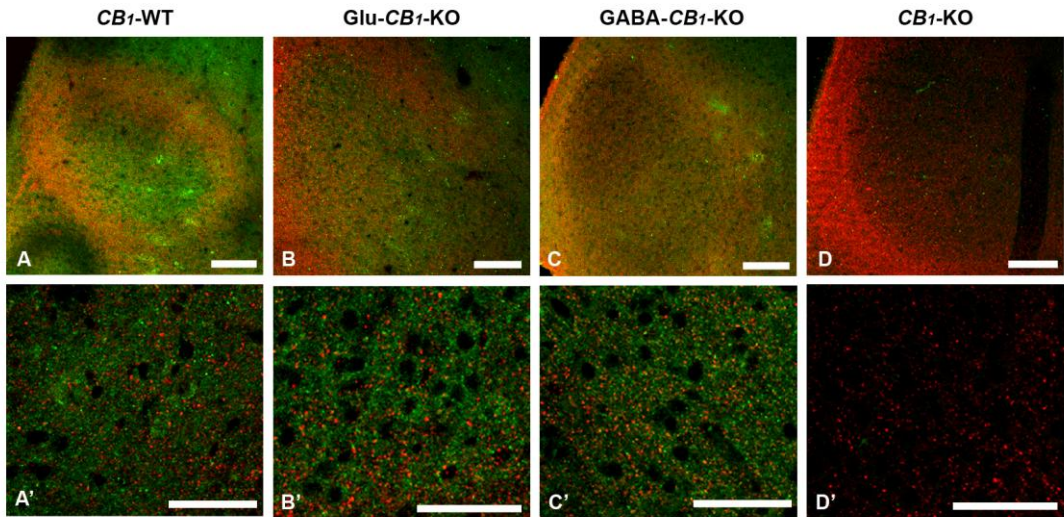


Figura 27. Localización de CB_1 y vGluT-1 en el VMH de ratón. Método de inmunofluorescencia para microscopía confocal. La inmunofluorescencia para CB_1 (en verde) aparece de forma homogénea en los ratones CB_1 -WT y $Glu-CB_1$ -KO, disminuyendo en la región dorsomedial del ratón $GABA-CB_1$ -KO y desapareciendo por completo en el ratón CB_1 -KO. La inmunofluorescencia para vGluT-1 (en rojo), que identifica las fibras glutamatérgicas corticales que rodean al VMH, se mantiene en todos los animales. Barras de escala: 100 μ m (A-D), 50 μ m (A'-D').

4.1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

4.1.3.1. Distribución subcelular de CB₁ en el VMH

A continuación, analizamos la localización ultraestructural del receptor CB₁ en la región dorsomedial del VMH mediante el método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica (Figs. 28 y 30-32).

En el ratón *CB₁-WT*, las inmunopartículas que identifican CB₁ se encuentran, como era de esperar, alejadas de las zonas de especialización sináptica de las membranas de terminales sinápticas que contactan con dendritas o espinas dendríticas. Estas terminales inmunopositivas para CB₁ forman sinapsis excitadoras (identificadas por contener abundantes vesículas sinápticas claras y esféricas y realizar sinapsis asimétricas con una mayor densidad postsináptica) o inhibitoras (identificadas por las vesículas sinápticas más pleomórficas y sinapsis simétricas), como se observa en la figura 28.

El análisis semicuantitativo realizado demuestra que una proporción de las sinapsis asimétricas (24,0±2,9%) y simétricas (28,9±7,5%) son inmunopositivas para CB₁ en el ratón *CB₁-WT* (Fig. 29A), no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de perfiles ($p=0,4406$). La densidad de CB₁ en estos animales es de 0,42 inmunopartículas/ μm de membrana en las sinapsis asimétricas y 0,47 inmunopartículas/ μm en las sinapsis simétricas (Fig. 29B), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,6553$).

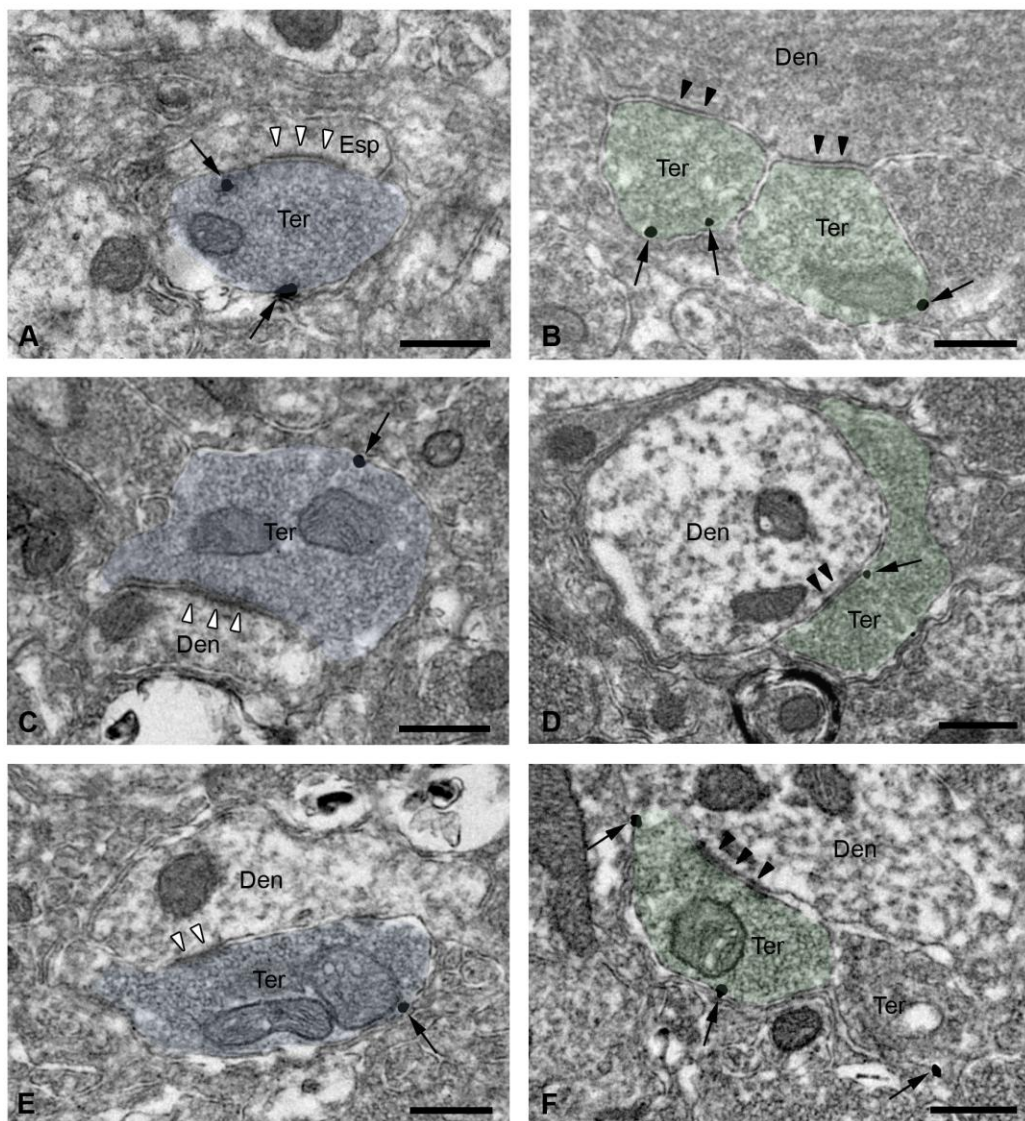
CB₁-WT

Figura 28. Localización ultraestructural de CB₁ en el VMH del ratón CB₁-WT. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas de CB₁ (flechas) se distribuyen sobre las membranas de terminales sinápticas (Ter) que hacen sinapsis asimétricas (puntas de flecha blancas) o simétricas (puntas de flecha negras) con dendritas (Den) y espinas dendríticas (Esp). Barras de escala: 0,4μm.

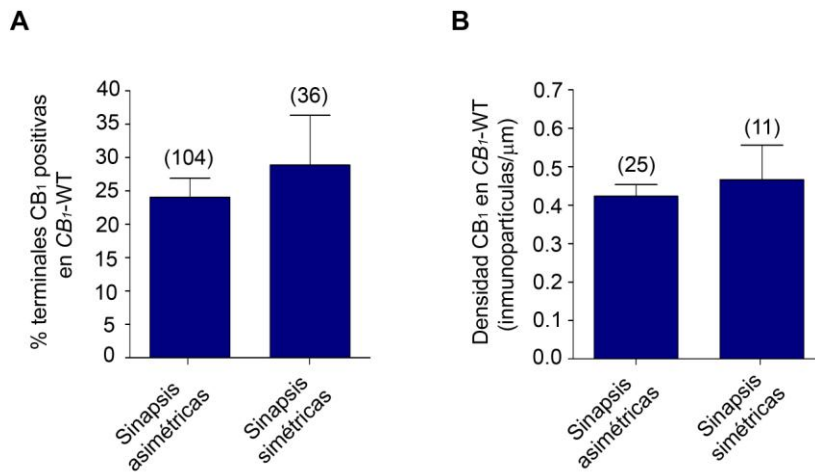


Figura 29. Análisis estadístico del receptor CB₁ en terminales con sinapsis asimétricas y simétricas en el VMH del ratón CB₁-WT. **A:** Una proporción de terminales con sinapsis asimétricas (24,0±2,9%) y simétricas (28,9±7,5%) son CB₁ inmunopositivas, no apreciándose diferencias significativas entre ambos tipos de perfiles ($\chi^2=0,5946$, $p=0,4406$, área total analizada: 2.376 μm^2). **B:** La densidad de CB₁ tras la sustracción del marcado de fondo (0,015±0,003 inmunopartículas/ μm medidas en el VMH del ratón CB₁-KO) es similar en las terminales sinápticas asimétricas y simétricas (0,42±0,03 y 0,47±0,09 inmunopartículas/ μm respectivamente, $p=0,6553$). Entre paréntesis se indica el número total de perfiles analizados en cada caso.

Con el fin de definir la contribución de las terminales glutamatérgicas corticales y terminales GABAérgicas al patrón de marcado de CB₁ observado en el VMH, empleamos ratones mutantes condicionales que carecen de CB₁ en la mayoría de las neuronas glutamatérgicas corticales (*Glu-CB₁-KO*) o en las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo (*GABA-CB₁-KO*). El receptor CB₁ está presente en las terminales axónicas del VMH que sinaptan con espinas y dendritas en ambas cepas de mutantes condicionales (Figs. 30, 31). En el ratón *Glu-CB₁-KO*, las terminales inmunopositivas hacen sinapsis tanto asimétricas (Fig. 30A, C, D) como simétricas (Fig. 30B, E). Sin embargo, en el ratón *GABA-CB₁-KO*, las inmunopartículas de CB₁ decoran las membranas de perfiles presinápticos asimétricos (Fig. 31A, B, G) pero no de aquellos que realizan sinapsis simétricas (Fig. 31C, F). El patrón de CB₁ desaparece en el VMH del ratón *CB₁-KO* (Fig. 32).

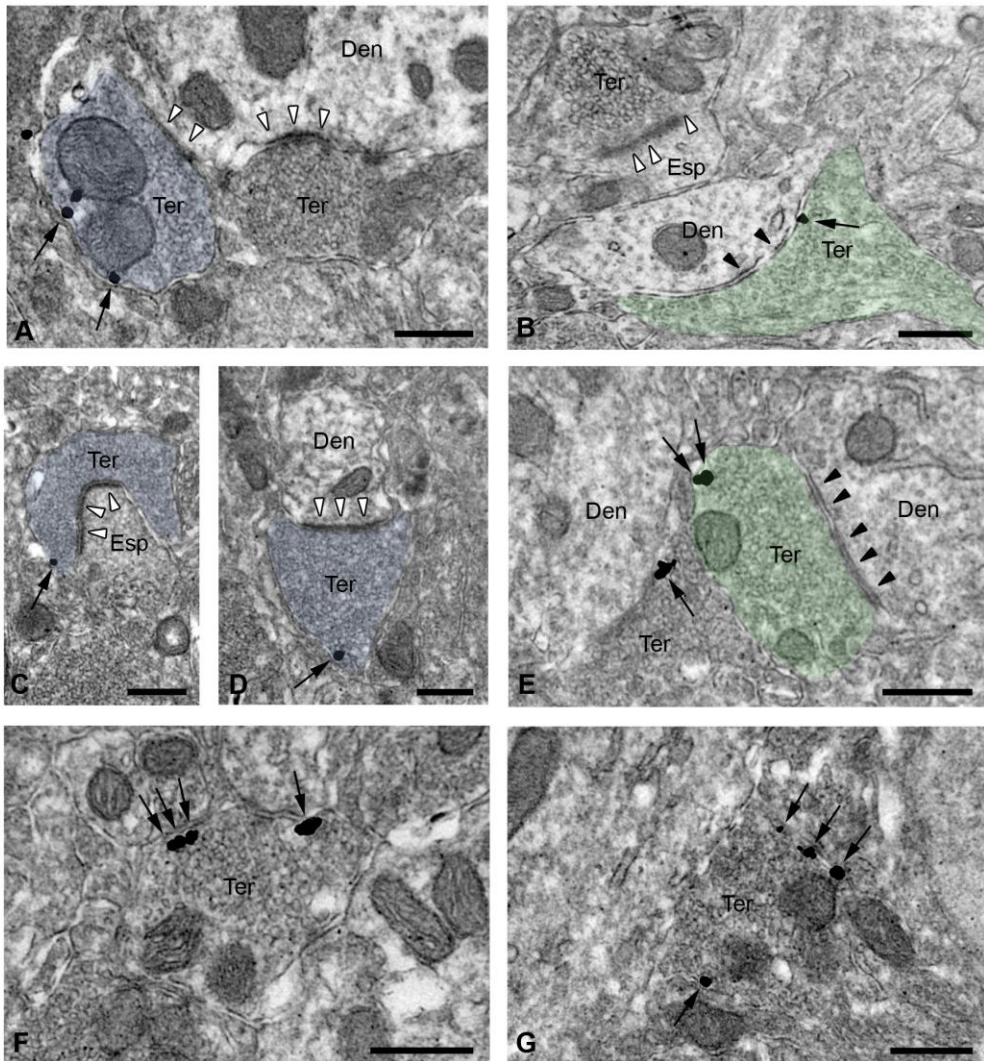
Glu-*CB₁*-KO

Figura 30. Localización ultraestructural de CB_1 en el VMH del ratón Glu- CB_1 -KO. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas de CB_1 (flechas) se localizan en terminales sinápticas asimétricas (Ter) presumiblemente de neuronas excitadoras subcorticales (obsérvese claramente la gruesa densidad postsináptica indicada con puntas de flecha blancas en C y D) y en terminales inhibitorias (Ter) que hacen sinapsis simétricas (puntas de flecha negras en B y E). En A y B se pueden observar terminales axónicas (Ter) inmunonegativas para CB_1 que forman sinapsis asimétricas (puntas de flecha blancas) con dendritas (Den) o espinas dendríticas (Esp). También aparecen en F y G terminales (Ter) inmunopositivas para CB_1 , aunque no es posible apreciar la especialización sináptica en estos casos. Barras de escala: $0,4\mu\text{m}$.

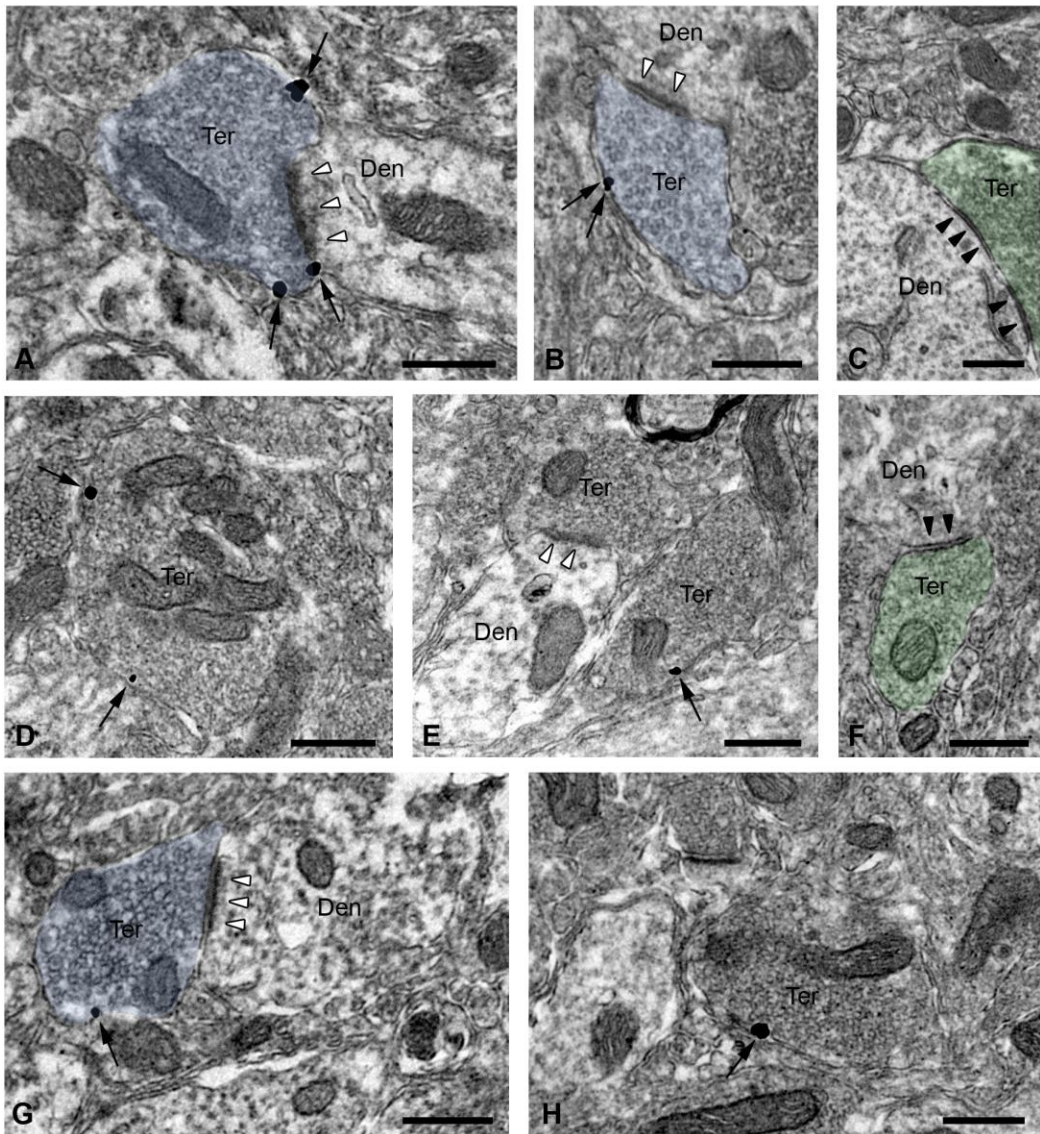
GABA- CB_1 -KO

Figura 31. Localización ultraestructural de CB_1 en el VMH del ratón GABA- CB_1 -KO. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. El inmunomarcado (flechas) aparece en terminales sinápticas excitadoras (Ter) que forman sinapsis asimétricas (puntas de flecha blancas en A, B y G) sobre perfiles dendríticos (Den). Obsérvense en C y F terminales (Ter) inmunonegativas para CB_1 realizando sinapsis simétricas (puntas de flecha negras) sobre dendritas (Den). En D, E y H aparecen terminales (Ter) inmunopositivas para CB_1 aunque no se aprecia la especialización sináptica. Barras de escala: 0,4 μ m.

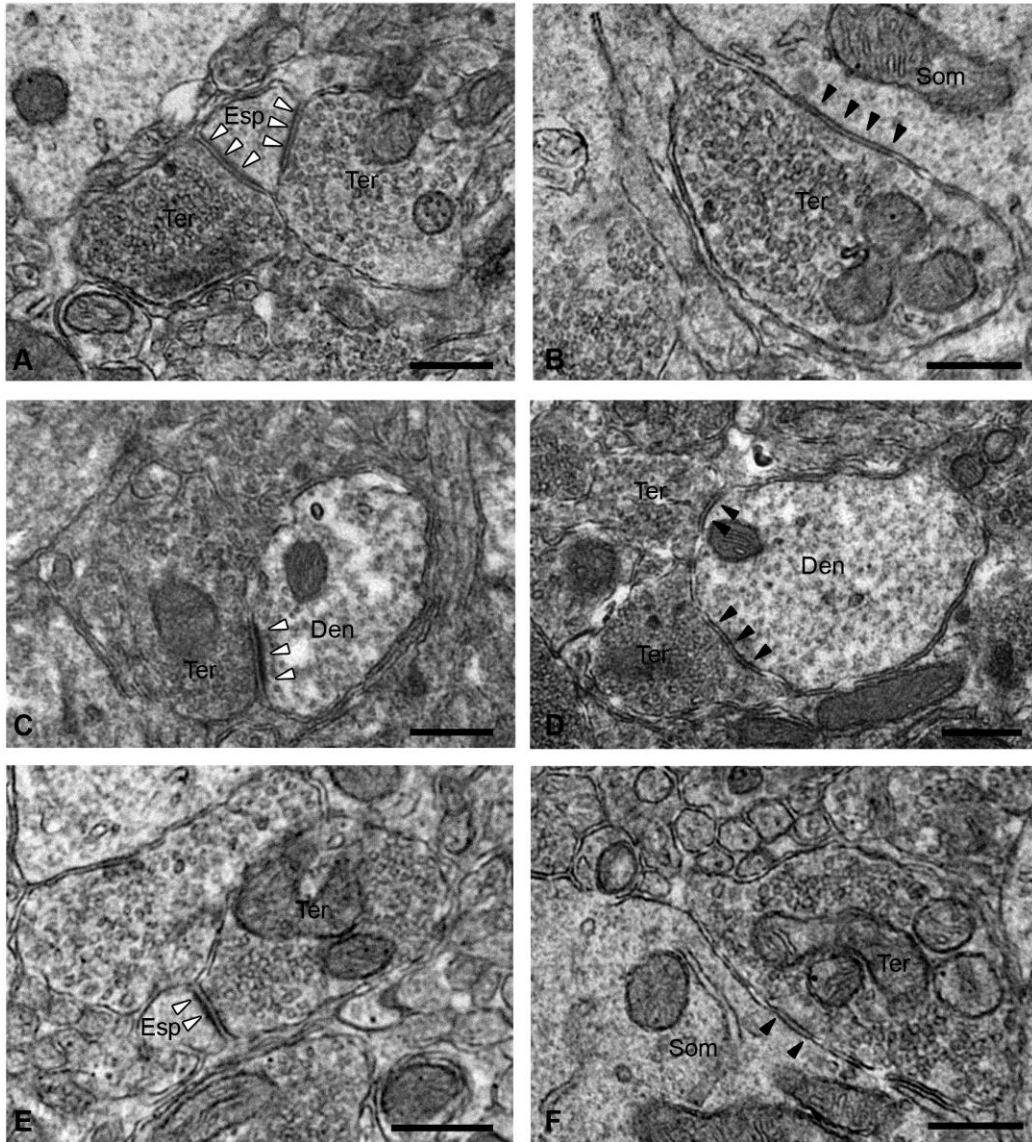
CB₁-KO

Figura 32. Localización ultraestructural de CB₁ en el VMH del ratón CB₁-KO. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. En estos animales el inmunomarcado desaparece completamente en las mismas condiciones inmunocitoquímicas, indicando la especificidad del anticuerpo frente a CB₁. Obsérvense terminales sinápticas (Ter) inmunonegativas para CB₁ que forman sinapsis asimétricas (puntas de flecha blancas en A, C y E) y simétricas (puntas de flecha negras en B, D y F) sobre perfiles dendríticos (Den), espinas (Esp) o somas (Som). Barras de escala: 0,4μm.

El porcentaje de terminales inmunopositivas para CB_1 en el ratón CB_1 -WT (20,5%) se mantiene en el ratón $Glu-CB_1$ -KO (20,8%), disminuye en el ratón $GABA-CB_1$ -KO (12,4%) y prácticamente desaparece en el VMH del ratón CB_1 -KO (Fig. 33A). La densidad de CB_1 se sitúa entre 0,40-0,50 inmunopartículas/ μm de membrana en el animal CB_1 -WT y en ambos mutantes condicionales, no observándose diferencias significativas entre los distintos animales (Fig. 33B).

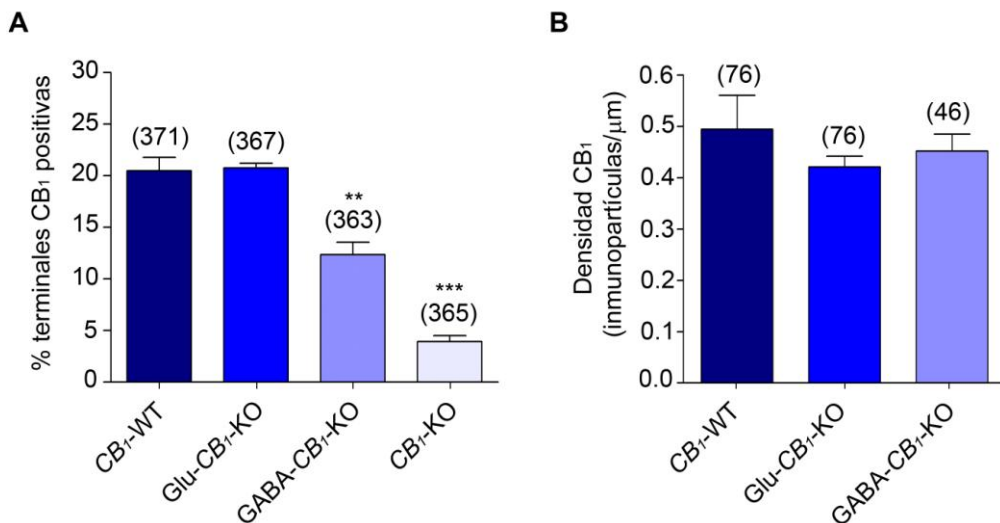


Figura 33. Análisis estadístico del receptor CB_1 en las terminales del VMH. **A:** La proporción de las terminales inmunopositivas para CB_1 en el ratón CB_1 -WT (20,5±1,3%) se mantiene en el ratón $Glu-CB_1$ -KO (20,8±0,5%, $\chi^2=0,00024$, $p=0,9876$), disminuye en el ratón $GABA-CB_1$ -KO (12,4±1,2%, $\chi^2=8,593$, $p=0,0034$) y prácticamente desaparece en el ratón CB_1 -KO (3,9±0,6%, $\chi^2=48,61$, $p<0,0001$). El área analizada para cada condición fue: 1.467 μm^2 en CB_1 -WT, 1.562 μm^2 en $Glu-CB_1$ -KO, 1.646 μm^2 en $GABA-CB_1$ -KO y 1.519 μm^2 en CB_1 -KO. **B:** La densidad de inmunopartículas de CB_1 tras la sustracción del marcado de fondo (0,015±0,003 partículas/ μm en el VMH del ratón CB_1 -KO) es parecida en los ratones CB_1 -WT (0,49±0,07), $Glu-CB_1$ -KO (0,42±0,02, $p=0,7000$) y $GABA-CB_1$ -KO (0,45±0,03, $p=0,7000$). Entre paréntesis se indica el número total de perfiles analizados en cada caso.

Estudiamos la contribución de los axones de origen cortical al patrón de marcado de CB_1 observado en el VMH a través del análisis semicuantitativo de las terminales

sinápticas excitadoras inmunopositivas para CB_1 . Tuvimos en cuenta únicamente las terminales excitadoras con abundantes vesículas esféricas y claras y sinapsis claramente asimétricas con una densidad postsináptica evidente. En estas condiciones específicas de análisis, observamos una ligera disminución de las terminales asimétricas inmunopositivas en el ratón $Glu-CB_1-KO$ ($21,3\pm 2,5\%$) con respecto al ratón CB_1-WT ($27,2\pm 0,7\%$), aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($\chi^2=0,4189$, $p=0,5175$). Finalmente, el porcentaje de terminales asimétricas inmunopositivas es prácticamente despreciable en el animal CB_1-KO (Fig. 34).

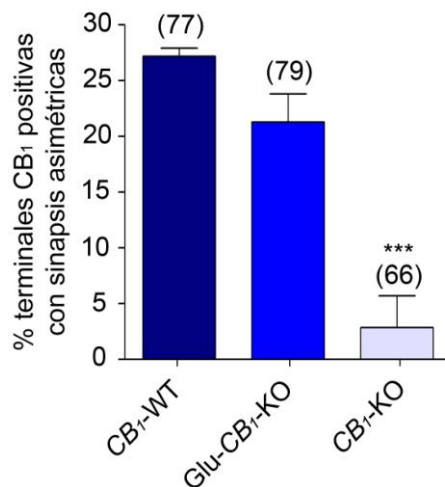


Figura 34. Análisis estadístico de CB_1 en las terminales asimétricas del VMH. El porcentaje de terminales asimétricas CB_1 inmunopositivas en el ratón $Glu-CB_1-KO$ ($21,3\pm 2,5\%$) es ligeramente inferior con respecto al ratón CB_1-WT ($27,2\pm 0,7\%$), aunque no se detectan diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2= 0,4189$, $p=0,5175$). Este valor prácticamente desaparece en el ratón CB_1-KO ($2,9\pm 2,9\%$, $\chi^2=15,47$, $p<0,0001$). El área analizada para cada condición fue: $1.352\mu m^2$ en CB_1-WT , $1.547\mu m^2$ en $Glu-CB_1-KO$ y $1.274\mu m^2$ en CB_1-KO . Entre paréntesis se indica el número total de perfiles analizados en cada caso.

En conjunto, estos resultados indican que el receptor CB_1 en el VMH se localiza en terminales sinápticas GABAérgicas, así como en glutamatérgicas mayoritariamente de origen subcortical y en menor medida de origen cortical.

4.2. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL RECEPTOR CB₁ EN LA ASTROGLIA DEL VMH

Las evidencias indican que la localización de CB₁ en el sistema nervioso central no está restringida a los compartimentos neuronales, sino que se extiende también a la glía (para revisión: Stella, 2004, 2010). Por ello, analizamos la localización ultraestructural del receptor CB₁ en los compartimentos gliales de la región dorsomedial del VMH, con el método de doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica (Figs. 35-37).

En el ratón control GFAP-CB₁-WT de los ratones transgénicos condicionales que carecen de CB₁ en compartimentos que contienen la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP, por lo tanto, astrocitos), observamos que la localización presináptica de CB₁ en membranas de terminales que hacen sinapsis con perfiles dendríticos, corresponde con la descrita en el ratón CB₁-WT. Además, la distribución de las inmunopartículas de CB₁ también se da en membranas de compartimentos astrocíticos identificados por el inmunodepósito de la diaminobencidina (Fig. 35).

En el caso del VMH de los ratones GFAP-CB₁-KO, que carecen selectivamente de CB₁ en los astrocitos, el patrón de marcado para CB₁ se mantiene en las terminales sinápticas, a la vez que no se observa en los perfiles astrocíticos (Fig. 36). Es de destacar que el patrón de distribución neuronal y glial de CB₁ desaparece por completo en el ratón CB₁-KO (Fig. 37).

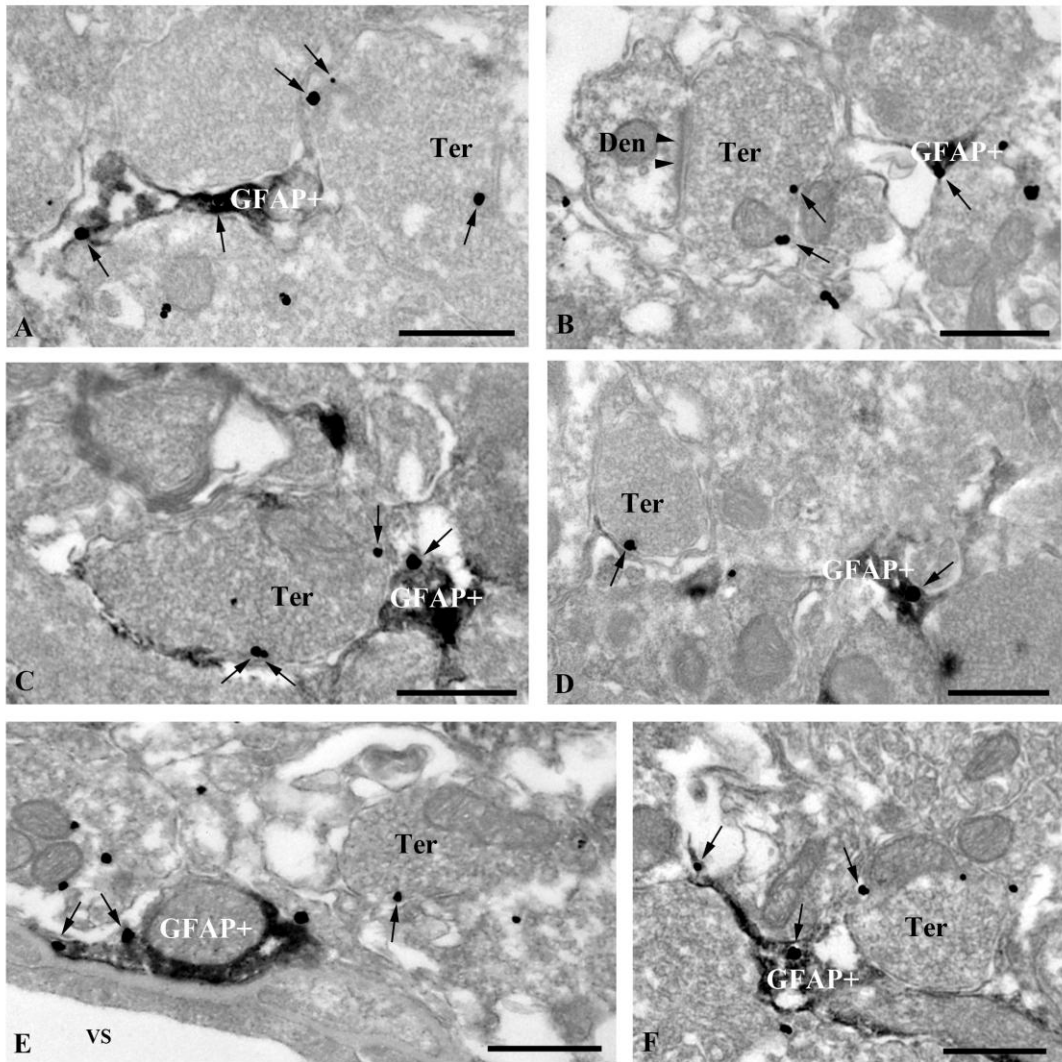
GFAP-CB₁-WT

Figura 35. Localización ultraestructural de CB₁ en el VMH del ratón GFAP-CB₁-WT. Método de doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas de CB₁ (flechas) se localizan en membranas de terminales sinápticas (Ter) y en membranas de astrocitos (perfiles GFAP+ marcados con DAB). En B se aprecia un astrocito CB₁ inmunopositivo junto a una terminal marcada con CB₁ que sinapta (puntas de flecha) con una dendrita pequeña (Den). Obsérvese en todas las ultramicrofotografías la extensión de los procesos astrocíticos relleno el neuropelo de los perfiles neuronales. En E se aprecia un astrocito perivascular (GFAP+) con CB₁ próximo a un vaso sanguíneo (VS). Barras de escala: 0,5μm.

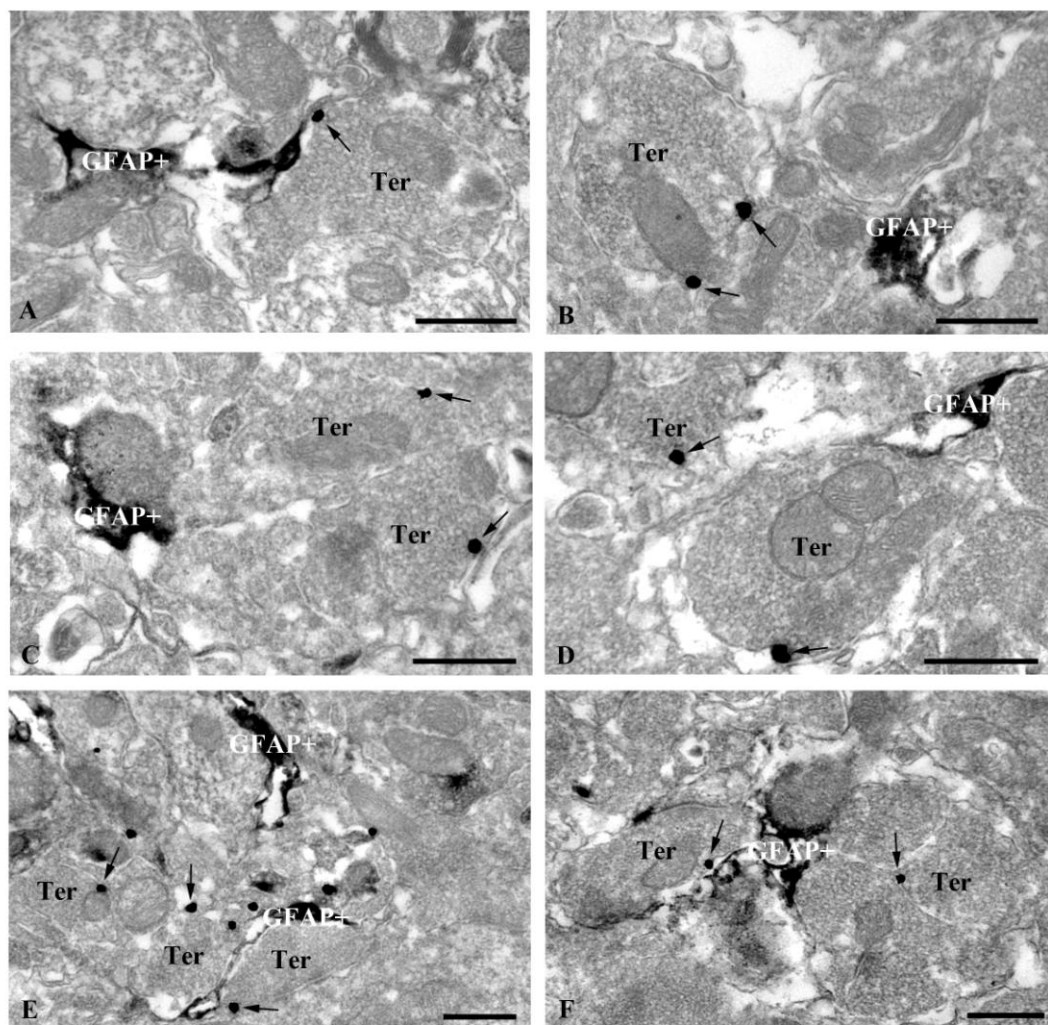
GFAP-*CB1*-KO

Figura 36. Localización ultraestructural de CB_1 en el VMH del ratón GFAP- CB_1 -KO. Método de doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas de CB_1 (flechas) aparecen únicamente en las membranas de terminales sinápticas (Ter), mientras que los compartimentos astrocíticos (GFAP+) se encuentran desprovistos de dicho receptor, como corresponde con el genotipo de estos animales. Barras de escala: 0,5 μ m.

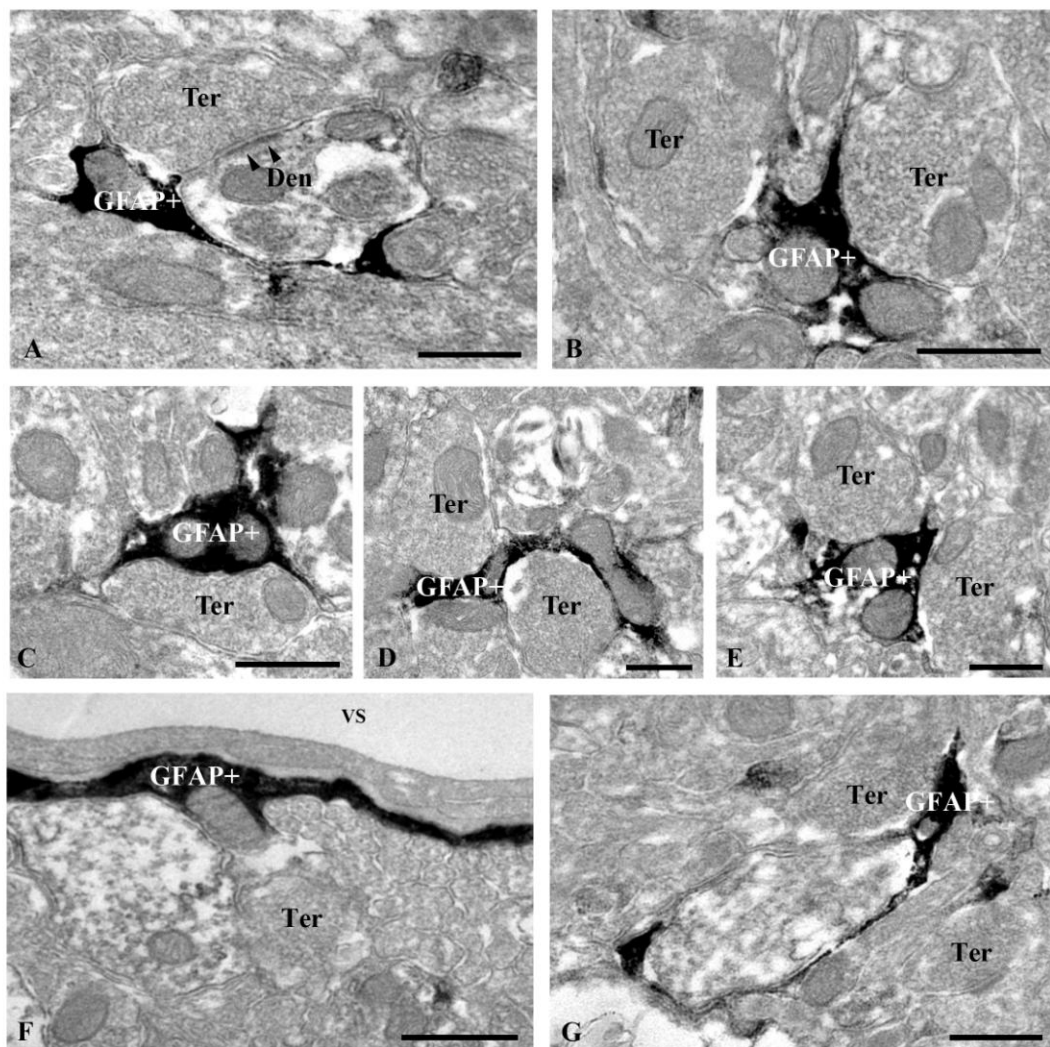
CB₁-KO

Figura 37. Localización ultraestructural de CB₁ en el VMH del ratón *CB₁-KO*. Método de doble marcado de inmuno-oro intensificado con plata e inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica. El inmunomarcado de CB₁ desaparece por completo en estos animales, manteniéndose el inmunodepósito del cromógeno DAB que identifica a los astrocitos. En las imágenes se muestran terminales (Ter) y astrocitos (GFAP+) inmunonegativos para CB₁. En A se observa una terminal sinaptando (puntas de flecha) sobre una dendrita (Den) y en F un astrocito perivasculare (GFAP+) rodeando un vaso sanguíneo (VS). Barras de escala: 0,5μm.

El 40,1% de los astrocitos GFAP positivos en el VMH del ratón GFAP- CB_1 -WT son inmunopositivos para CB_1 , mientras que este porcentaje disminuye drásticamente en el ratón GFAP- CB_1 -KO (12,1%) y prácticamente desaparece en el ratón CB_1 -KO (5,7%), resultando estas diferencias estadísticamente significativas (Fig. 38).

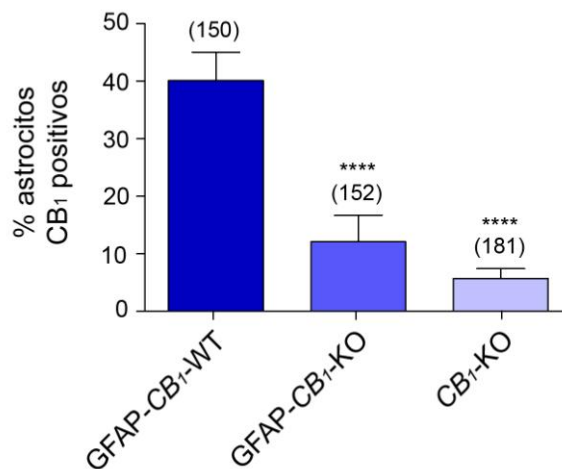


Figura 38. Análisis estadístico del receptor CB_1 en los astrocitos del VMH. En el ratón GFAP- CB_1 -WT, el 40,1±5,0% de los astrocitos son CB_1 inmunopositivos. Este porcentaje disminuye drásticamente hasta el 12,1±4,6% ($\chi^2=30,55$, $p<0,0001$) en el ratón GFAP- CB_1 -KO y prácticamente desaparece en el ratón CB_1 -KO (5,7±1,7%, $\chi^2=52,80$, $p<0,0001$). El área analizada para cada condición fue: 1.652 μm^2 en GFAP- CB_1 -WT, 1.737 μm^2 en GFAP- CB_1 -KO y 2.018 μm^2 en CB_1 -KO. Entre paréntesis se indica el número total de perfiles analizados en cada caso.

Como control interno, analizamos el porcentaje de terminales CB_1 inmunopositivas en el VMH de estos 3 tipos de animales. El 20,3% de las terminales en el ratón GFAP- CB_1 -WT son inmunopositivas para CB_1 , lo que coincide con los resultados obtenidos previamente en el ratón CB_1 -WT. Por otra parte, aunque el porcentaje disminuye ligeramente en el ratón GFAP- CB_1 -KO (14,8%) no se detectan diferencias estadísticamente

significativas ($\chi^2=1,490$, $p=0,2222$). Sin embargo, este porcentaje prácticamente desaparece en el ratón CB_1 -KO (4,5%) con una amplia significación estadística ($\chi^2=21,50$, $p<0,0001$). Este análisis corrobora que, en efecto, en los ratones $GFAP-CB_1$ -KO sólo se produce una disminución de CB_1 en los astrocitos, mientras que el marcado se mantiene en los perfiles sinápticos neuronales (Fig. 39).

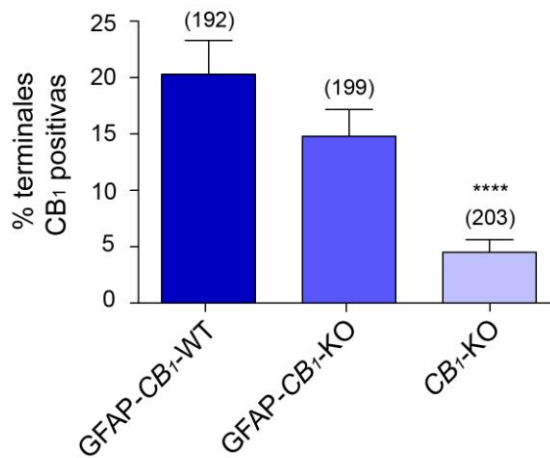


Figura 39. Análisis estadístico del receptor CB_1 en las terminales sinápticas del VMH. No se detectan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de terminales CB_1 inmunopositivas observadas en los ratones $GFAP-CB_1$ -WT (20,3±3,0%) y $GFAP-CB_1$ -KO (14,8±2,4%, $\chi^2=1,490$, $p=0,2222$). Este valor prácticamente desaparece en el ratón CB_1 -KO (4,5±1,1%, $\chi^2=21,50$, $p<0,0001$). El área analizada para cada condición fue: 936 μm^2 en $GFAP-CB_1$ -WT, 969 μm^2 en $GFAP-CB_1$ -KO y 936 μm^2 en CB_1 -KO. Entre paréntesis se indica el número total de perfiles analizados en cada caso.

En conjunto, estos resultados indican que el receptor CB_1 además de localizarse en las terminales sinápticas como hemos detallado en el apartado anterior, también se localiza ampliamente en los astrocitos de la región dorsomedial del VMH.

4.3. INMUNOLocalIZACIÓN DE LAS ENZIMAS DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ANANDAMIDA EN EL VMH

4.3.1. MICROSCOPIA DE LUZ

4.3.1.1. Patrón de expresión de NAPE-PLD y FAAH en el VMH

La inmunorreactividad para ambas enzimas se distribuye de manera uniforme por todo el VMH (Fig. 40), observándose a mayores aumentos un patrón de marcado formado por numerosos puntos inmunorreactivos de pequeño tamaño distribuidos por el neuropelo que rodea a las células del núcleo. Estas células son inmunonegativas para ambas enzimas.

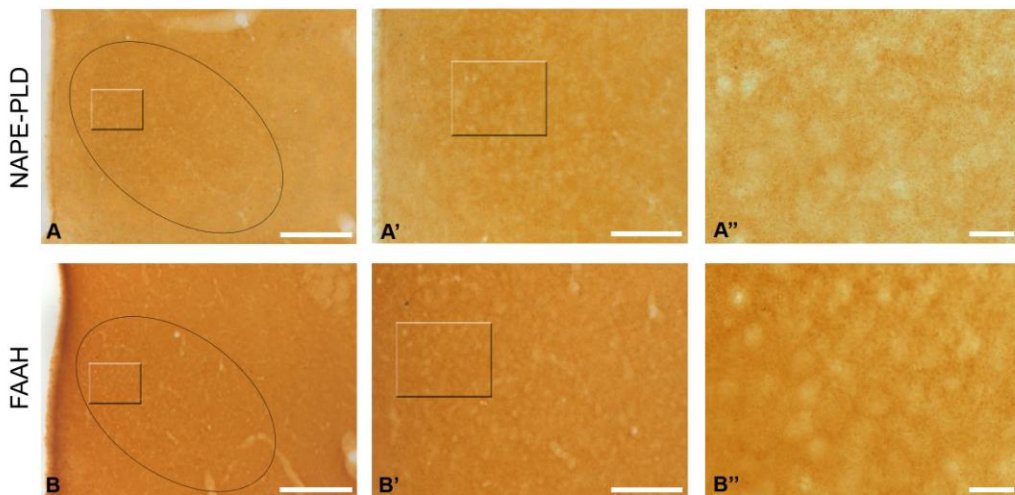


Figura 40. Inmunomarcado para NAPE-PLD y FAAH en el VMH de ratón. Método de inmunoperoxidasa para microscopía de luz. El VMH (delimitado por un círculo ovalado en A y B) presenta para ambas enzimas una inmunotinción moderada de apariencia punteada. Las áreas encuadradas en A, A' y B, B' están aumentadas en A'' y B'' respectivamente. Barras de escala: 200µm (A y B), 100µm (A' y B'), 20µm (A'' y B').

4.3.1.2. Controles de especificidad para NAPE-PLD y FAAH

El control positivo fue el hipocampo (Fig. 41), que presentaba el típico marcado ya descrito para NAPE-PLD (Egertová y cols., 2008; Nyilas y cols., 2008). El marcado para FAAH es similar y concuerda con el observado en el VMH a este nivel de resolución. También hicimos un control negativo por omisión del anticuerpo primario, apareciendo las secciones prácticamente transparentes, hasta el punto de imposibilitar su fotografiado al microscopio de luz.

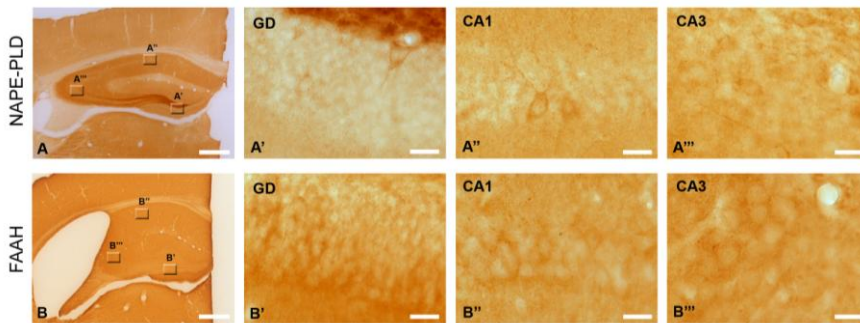


Figura 41. Control positivo para NAPE-PLD y FAAH. Método de inmunoperoxidasa para microscopía de luz. Obsérvese el marcado de ambas enzimas en las regiones del hipocampo (giro dentado o GD, CA1 y CA3). Las zonas encuadradas en A y B se muestran aumentadas en A'-A''' y B'-B''' respectivamente. Barras de escala: 500 μ m (A y B), 20 μ m (A'-A''' y B'-B''').

4.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Analizamos la localización subcelular de las enzimas de síntesis y degradación de anandamida (NAPE-PLD y FAAH, respectivamente) en la región dorsomedial del VMH del ratón silvestre mediante el método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica.

4.3.2.1. Distribución subcelular de NAPE-PLD en el VMH

Las inmunopartículas que identifican NAPE-PLD tienen una distribución tanto postsináptica como presináptica en cercanía de las membranas de dendritas y terminales. También aparecen dentro de dichos perfiles, en numerosas ocasiones posiblemente asociadas a orgánulos intracelulares como el retículo endoplasmático liso (Fig. 42).

NAPE-PLD

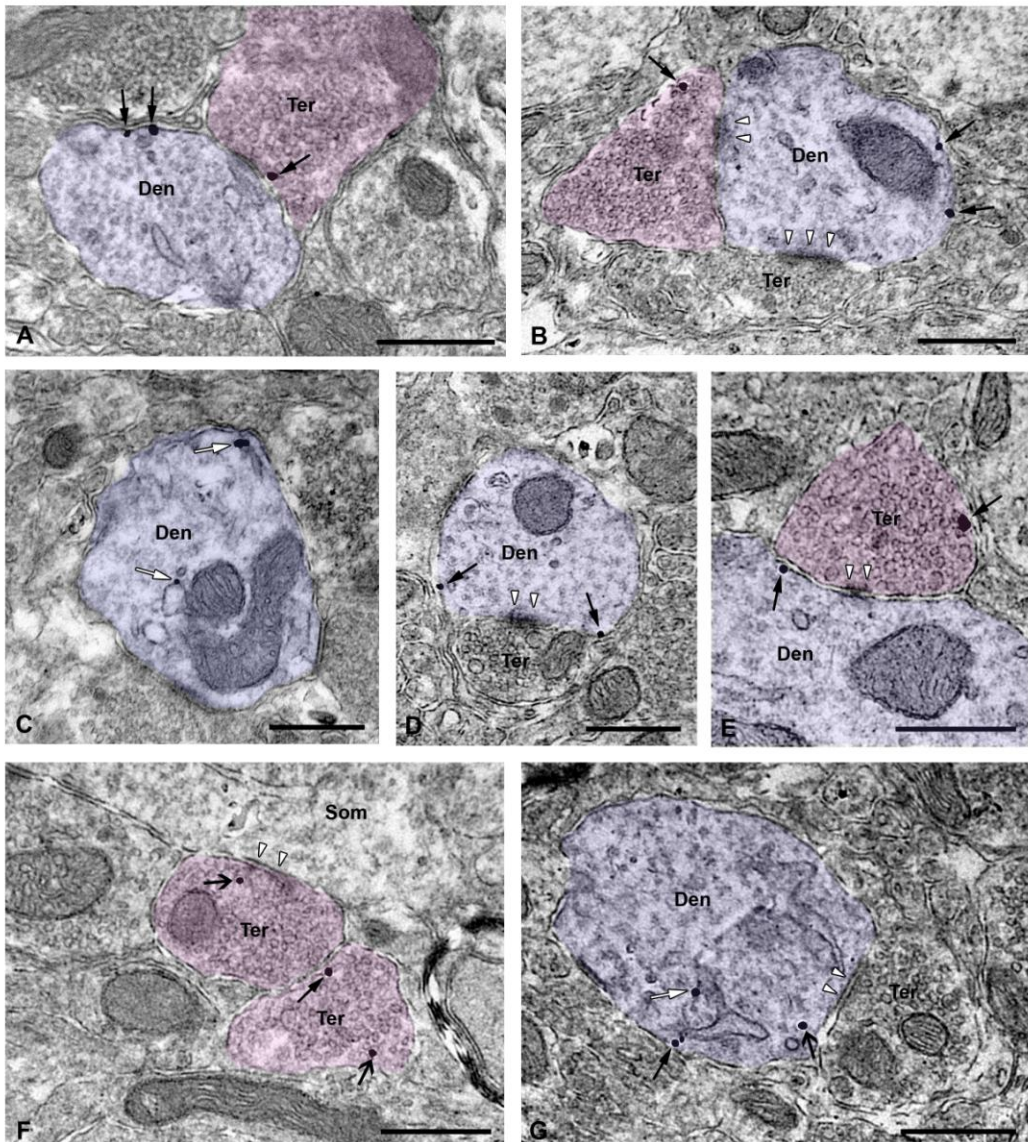


Figura 42. Localización ultraestructural de NAPE-PLD en el VMH. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas de NAPE-PLD aparecen a nivel postsináptico y presináptico asociadas a las membranas (flechas cerradas negras) de dendritas (Den) y terminales sinápticas (Ter) respectivamente, así como en el interior de dichos perfiles (flechas abiertas negras). Obsérvese en B y E una terminal haciendo sinapsis (puntas de flecha blancas) con una dendrita, siendo ambos perfiles inmunopositivos para NAPE-PLD. En ocasiones, NAPE-PLD también aparece asociada a reservorios intracelulares como el retículo endoplasmático liso (flechas cerradas blancas), como se aprecia con más detalle en C y G. Barras de escala: 0,5 μ m.

El análisis de la distribución del marcado para NAPE-PLD en los principales compartimentos neuronales indica que el 45,2% y 41,5% de las inmunopartículas se distribuyen en perfiles dendríticos y en terminales, respectivamente (Fig. 43A). Sin embargo, el porcentaje de dendritas NAPE-PLD inmunopositivas (49,5%) es superior al de terminales (30,9%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($\chi^2=13,71$, $p=0,0002$). Por el contrario, la densidad del marcado es mayor en terminales (3,0 partículas/ μm^2) que en dendritas (1,9 partículas/ μm^2) (Fig. 43B, C).

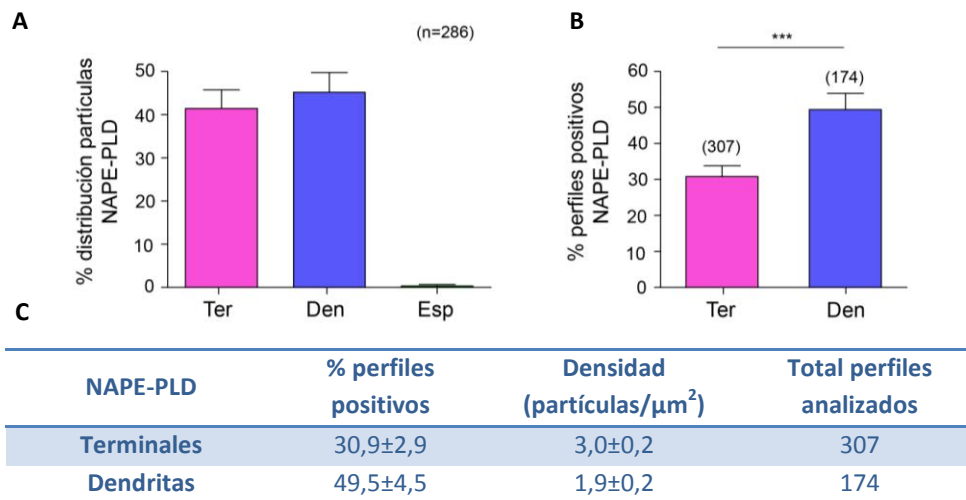


Figura 43. Análisis estadístico de NAPE-PLD en el VMH. **A:** El porcentaje de distribución de NAPE-PLD muestra que el 41,5±4,3% de las partículas aparece en terminales, el 45,2±4,6% en dendritas y el 0,4±0,4% en espinas. Total de partículas analizadas: 286. **B y C:** El porcentaje de dendritas positivas (49,5±4,5%) resulta significativamente superior al de terminales positivas (30,9±2,9%, $\chi^2=13,71$, $p=0,0002$). La densidad del marcado es de 3,0±0,2 partículas/ μm^2 en terminales y 1,9±0,2 partículas/ μm^2 en dendritas. Área total analizada: 998 μm^2 .

4.3.2.2. Distribución subcelular de FAAH en el VMH

Las inmunopartículas de FAAH se localizan mayoritariamente a nivel postsináptico. Algunas partículas se encuentran junto a las membranas dendríticas, sin embargo, la mayor parte aparecen en el interior, posiblemente asociadas a membranas intracelulares del retículo endoplasmático o a la membrana externa de las mitocondrias (Fig. 44).

FAAH

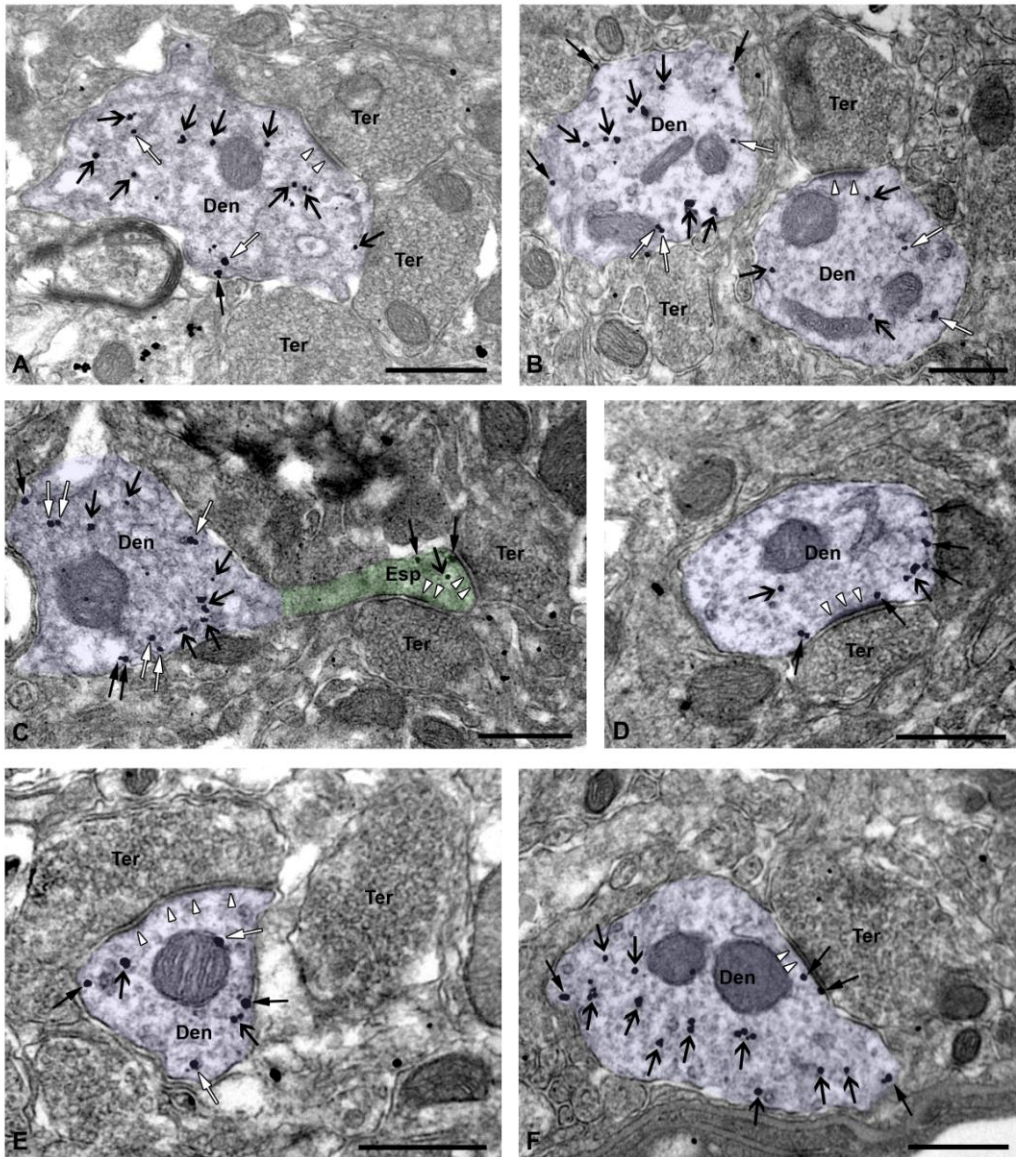


Figura 44. Localización ultraestructural de FAAH en el VMH. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas (flechas abiertas negras) se localizan a nivel postsináptico en el interior de dendritas (Den) sobre las que contactan (puntas de flecha blancas) terminales sinápticas (Ter). En ocasiones la localización de las inmunopartículas se asocia a las membranas de dendritas (flechas cerradas negras) o a las membranas intracelulares del retículo endoplasmático o la membrana externa de la mitocondria (flechas cerradas blancas). En C se observa una espina (Esp) con inmunopartículas emergiendo de una dendrita claramente positiva. Barras de escala: 0,5 μ m.

Realizamos un análisis semi-cuantitativo de la distribución de las inmunopartículas en los principales compartimentos neuronales de la región dorsomedial del VMH, corroborando la presencia mayoritaria de FAAH en perfiles dendríticos (78,6% de las inmunopartículas) (Fig. 45A). De todas las dendritas analizadas, el 57,5% son inmunopositivas para FAAH, las cuales presentan una alta densidad de inmunomarcado ($8,6 \text{ partículas}/\mu\text{m}^2$) (Fig. 45B, C).

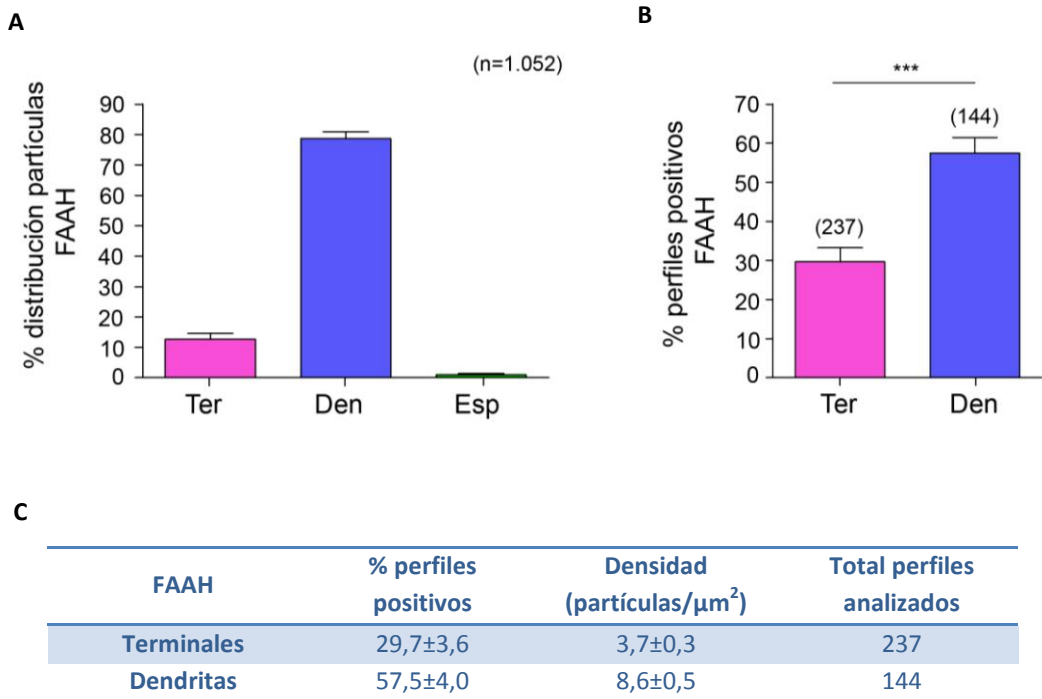


Figura 45. Análisis estadístico de FAAH en el VMH. A: El porcentaje de distribución de inmunopartículas de FAAH muestra que la gran mayoría de las partículas ($78,6 \pm 2,3\%$) se localizan en perfiles dendríticos, mientras que sólo un $12,6 \pm 2,0\%$ y un $0,9 \pm 0,5\%$ de ellas aparecen en terminales o espinas, respectivamente. Total de partículas analizadas: 1.052. B y C: El porcentaje de dendritas inmunopositivas ($57,5 \pm 4,0\%$) es significativamente mayor que el porcentaje de terminales positivas ($29,7 \pm 3,6\%$, $\chi^2=26,25$, $p < 0,0001$). Las dendritas FAAH inmunopositivas presentan una alta densidad de marcado ($8,6 \pm 0,5 \text{ partículas}/\mu\text{m}^2$), mientras que la densidad en las terminales es de $3,7 \pm 0,3 \text{ partículas}/\mu\text{m}^2$. Área total analizada: $702 \mu\text{m}^2$.

4.4. INMUNOLocalIZACIÓN DE LAS ENZIMAS DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE 2-AG EN EL VMH

4.4.1. MICROSCOPIA DE LUZ

4.4.1.1. Patrón de expresión de DAGL- α y MAGL en el VMH

Ambas enzimas presentan una inmunorreactividad uniforme por todo el VMH (Fig. 46). A mayores aumentos se observan puntos inmunorreactivos de pequeño tamaño, así como un marcado difuso en las células del núcleo.

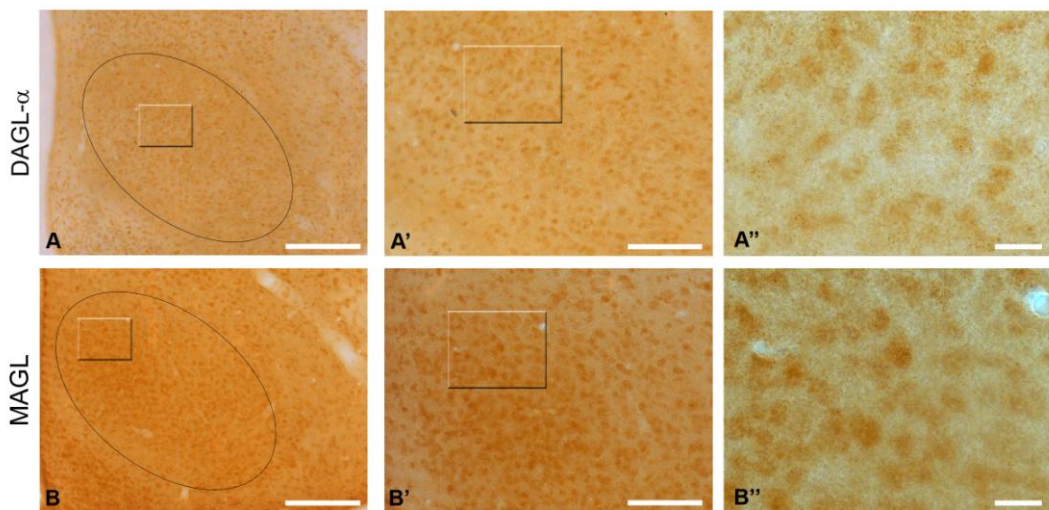


Figura 46. Inmunomarcado para DAGL- α y MAGL en el VMH de ratón. Método de inmunoperoxidasa para microscopía de luz. El VMH (delimitado por un círculo ovalado en A y B) presenta un inmunomarcado moderado para ambas enzimas. Las áreas encuadradas en A, A' y B, B' se muestran aumentadas en A'' y B'' respectivamente. Barras de escala: 200 μ m (A y B), 100 μ m (A' y B'), 20 μ m (A'' y B'').

4.4.1.2. Controles de especificidad para DAGL- α y MAGL

Empleamos el hipocampo como control positivo, que presenta el marcado observado en la Fig. 47 y que concuerda con el ya descrito para DAGL- α (Katona y cols., 2006). El marcado hipocampal de MAGL es sobre todo celular, coincidiendo con lo observado en el VMH a este nivel de resolución. No observamos rastro de inmunorreactividad en el control negativo.

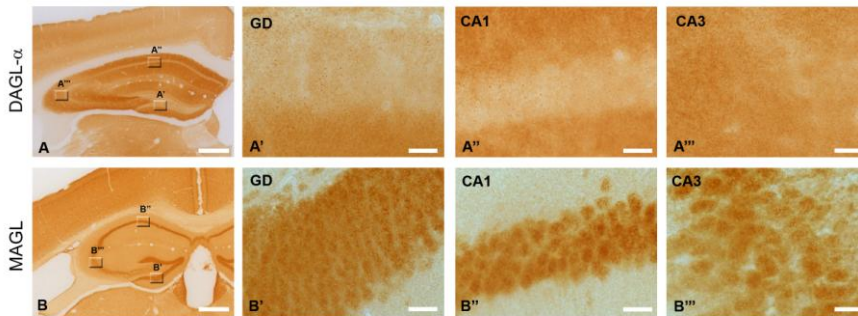


Figura 47. Control positivo para DAGL- α y MAGL. Método de inmunoperoxidasa para microscopía de luz. Obsérvese el marcado de ambas enzimas en las distintas regiones del hipocampo (giro dentado o GD, CA1 y CA3). Las zonas encuadradas en A y B se muestran aumentadas en A'-A''' y B'-B''' respectivamente. Barras de escala: 500 μ m (A y B), 20 μ m (A'-A''' y B'-B''').

4.4.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Analizamos la localización ultraestructural de las enzimas de síntesis y degradación de 2-AG (DAGL- α y MAGL, respectivamente) en la región dorsomedial del VMH del ratón silvestre mediante el método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica.

4.4.2.1. Distribución subcelular de DAGL- α en el VMH

La enzima DAGL- α presenta una localización postsináptica típica en las membranas de dendritas (Fig. 48) y espinas dendríticas (Fig. 49), que es donde las inmunopartículas parecen concentrarse en mayor número.

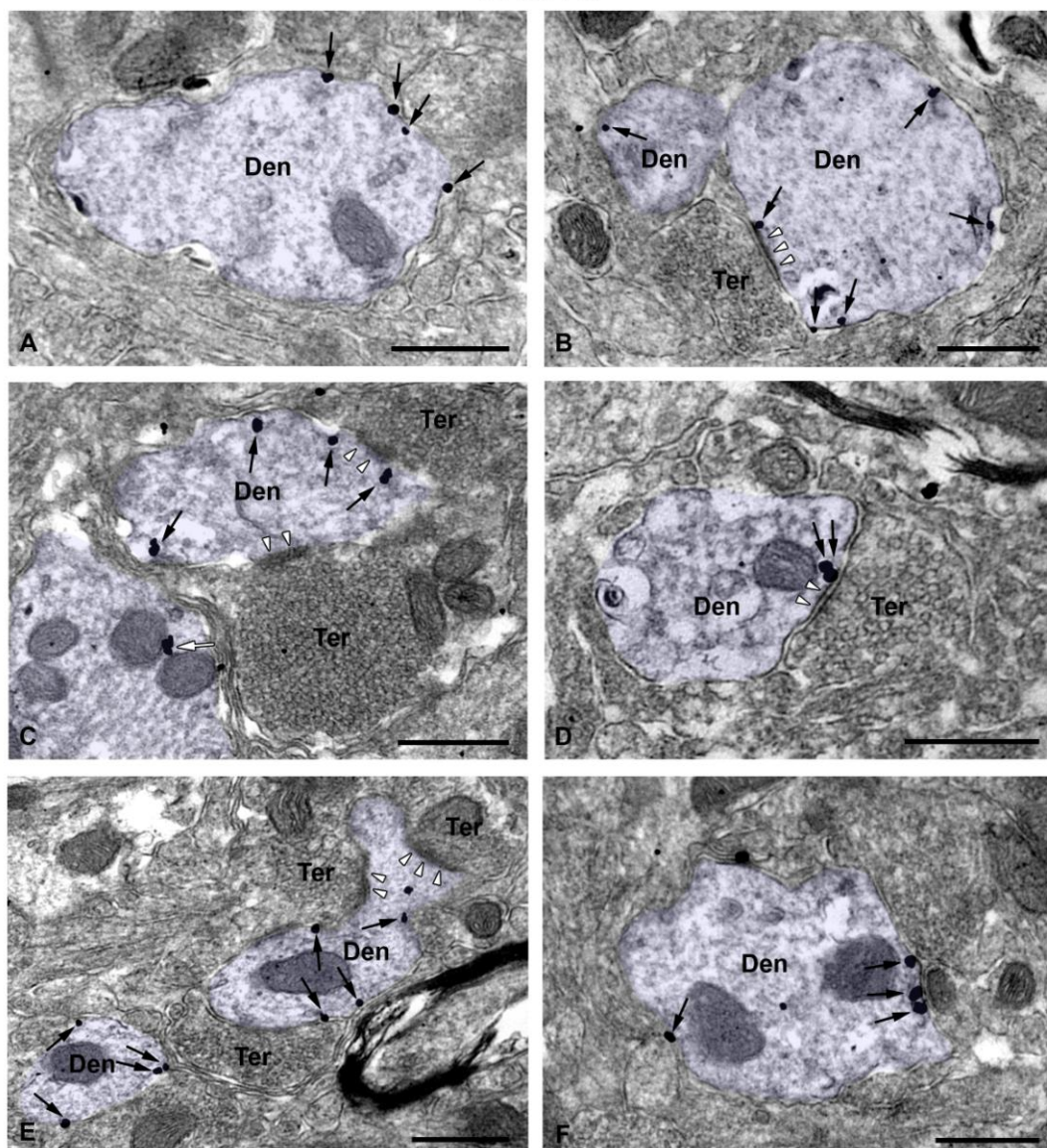
DAGL- α 

Figura 48. Localización ultraestructural de DAGL- α en el VMH. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas (flechas cerradas negras) se localizan sobre las membranas de dendritas (Den) que reciben sinapsis (puntas de flecha blancas) de terminales sinápticas (Ter) inmunonegativas. En B se observa claramente una terminal excitadora haciendo sinapsis con una dendrita DAGL- α positiva. En D se muestra una terminal realizando una sinapsis inhibitoria (simétrica) sobre una dendrita inmunopositiva. Barras de escala: 0,5 μ m.

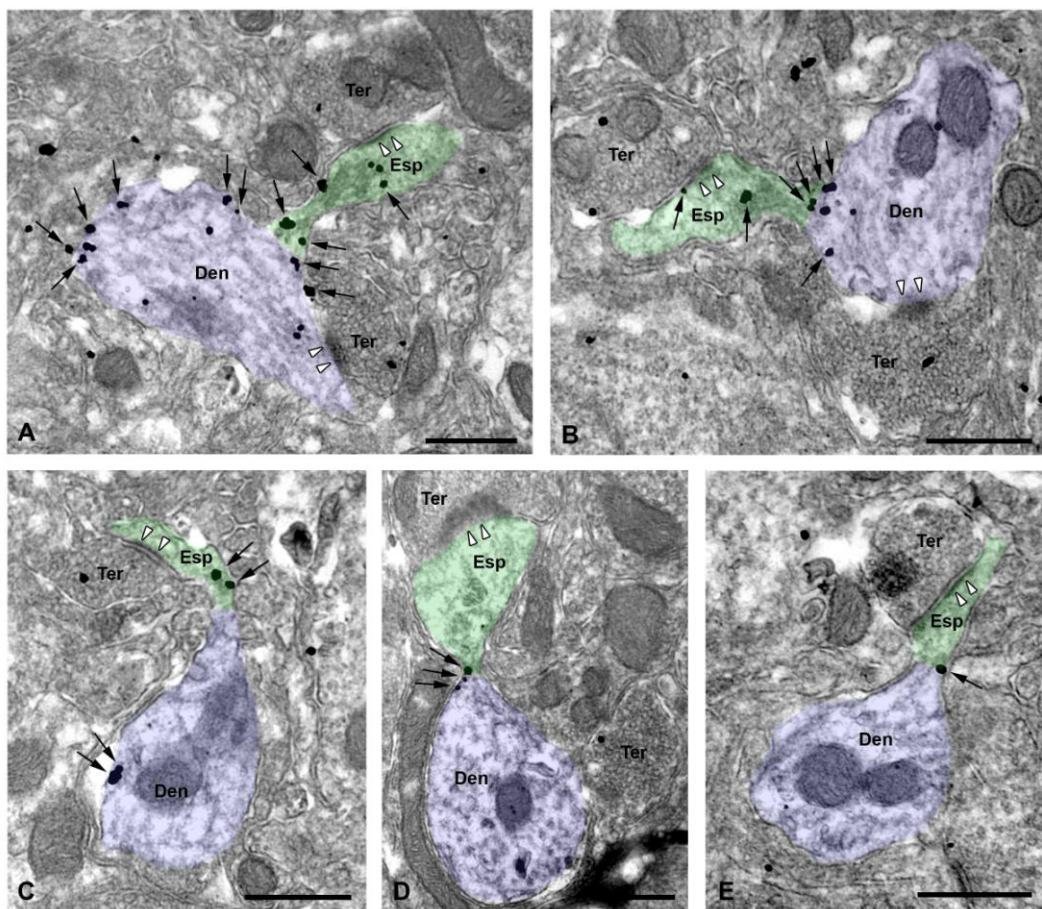
DAGL- α 

Figura 49. Localización ultraestructural de DAGL- α en el VMH. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica (continuación). En estas imágenes aparece en detalle la distribución de las inmunopartículas de DAGL- α (flechas cerradas negras) en espinas dendríticas (Esp), especialmente en el cuello de las mismas. Obsérvese la emergencia de las espinas de sus correspondientes dendritas (Den) que se elongan para recibir el contacto sináptico (puntas de flecha blancas) de la terminal correspondiente (Ter). Barras de escala: 0,5 μ m.

El porcentaje de distribución de las inmunopartículas en los principales compartimentos neuronales confirma la localización preferente de DAGL- α en dendritas postsinápticas (52,6%) (Fig. 50A). Además, el 54,4% de las dendritas y el 44,4% de las espinas son inmunopositivas para DAGL- α , no detectándose diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2=2,220$, $p=0,1363$). La densidad del inmunomarcado oscila entre 0,57 partículas/ μm en dendritas y 1,02 partículas/ μm en espinas (Fig. 50B, C).

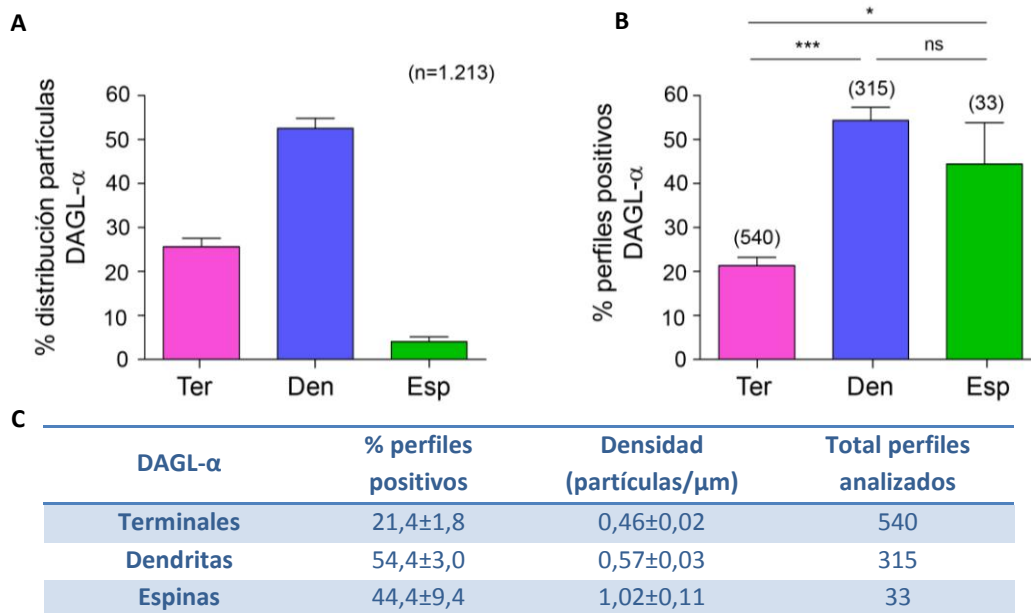


Figura 50. Análisis estadístico de DAGL- α en el VMH. **A:** El 52,6±2,3% de las inmunopartículas aparecen en dendritas, el 25,7±1,9% en terminales y el 4,1±1,1% en espinas dendríticas. Total de partículas analizadas: 1.213. **B y C:** El 54,4±3,0% de las dendritas y el 44,4±9,4% de las espinas son DAGL- α inmunopositivas, no observándose diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2=2,220$, $p=0,1363$). Estos porcentajes son significativamente mayores que el porcentaje de terminales positivas (21,4±1,8%, $\chi^2=88,14$, $p<0,0001$ para las dendritas y $\chi^2=5,572$, $p=0,018$ para las espinas). La densidad del marcado es de 0,46±0,02 partículas/ μm , 0,57±0,03 partículas/ μm y 1,02±0,11 partículas/ μm en terminales, dendritas y espinas respectivamente. Área total analizada: 1.889 μm^2 .

4.4.2.2. Distribución subcelular de MAGL en el VMH

La enzima MAGL aparece a nivel presináptico, pero sobre todo a nivel de perfiles dendríticos postsinápticos. La localización subcelular en estos perfiles está asociada tanto a la membrana como al interior de dichos compartimentos (Fig. 51).

MAGL

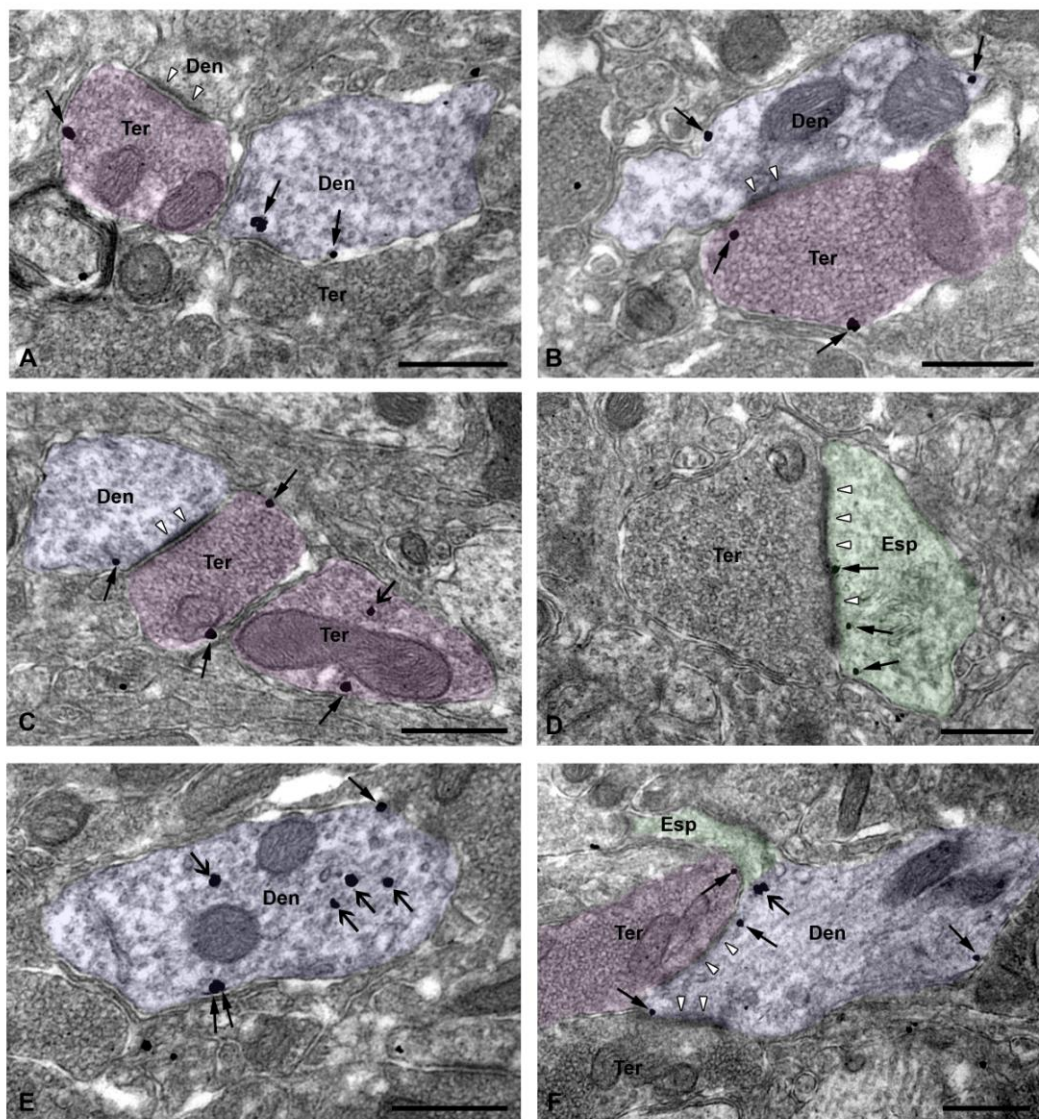


Figura 51. Localización ultraestructural de MAGL en el VMH. Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas se distribuyen en las membranas (flechas cerradas negras) de terminales (Ter) y dendritas (Den) así como dentro de dichos perfiles (flechas abiertas negras). En B y C observamos una terminal haciendo sinapsis (puntas de flecha blancas) sobre una dendrita, siendo ambos perfiles inmunopositivos para MAGL. Nótese en D una espina dendrítica (Esp) MAGL positiva con el aparato espinoso característico. En F se ilustra una espina saliendo de una dendrita MAGL positiva, con las inmunopartículas próximas a la emergencia del cuello de la espina. Barras de escala: 0,5μm.

La distribución de las inmunopartículas de MAGL es mayor en dendritas (57,1%) que en terminales (29,2%) (Fig. 52A). Por otro lado, el 84,1% de las dendritas son MAGL positivas, mientras que este porcentaje es del 45,8% para las terminales, siendo la diferencia entre ambos perfiles estadísticamente significativa ($\chi^2=53,17$, $p<0,0001$). La densidad del inmunomarcado es similar en ambos compartimentos neuronales, estimándose en $3,6$ partículas/ μm^2 para las terminales y $3,4$ partículas/ μm^2 para las dendritas (Fig. 52B, C).

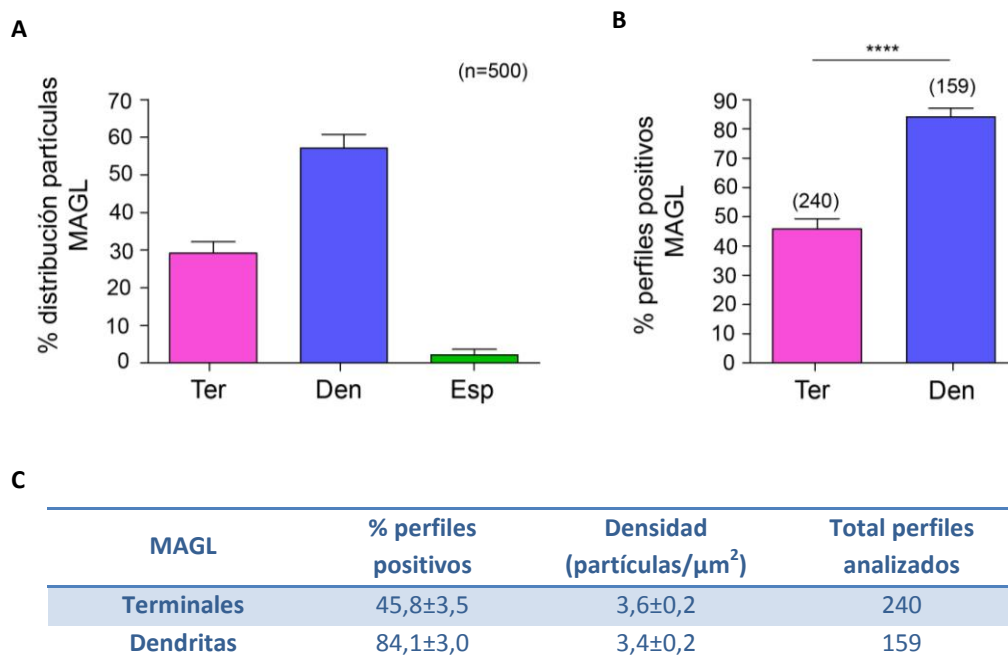


Figura 52. Análisis estadístico de MAGL en el VMH. **A:** El porcentaje de inmunopartículas presentes en dendritas es del $57,1\pm 3,6\%$, del $29,2\pm 3,0\%$ en terminales y del $2,2\pm 1,4\%$ en espinas. Total de partículas analizadas: 500. **B y C:** La proporción de perfiles MAGL inmunopositivos es significativamente mayor en las dendritas ($84,1\pm 3,0\%$) que en las terminales ($45,8\pm 3,5\%$, $\chi^2=53,14$, $p<0,0001$), con una densidad de marcado similar en ambos compartimentos ($3,4\pm 0,2$ partículas/ μm^2 y $3,6\pm 0,2$ partículas/ μm^2 respectivamente). Área total analizada: $698\mu\text{m}^2$.

4.5. COMPARACIÓN ENTRE LAS ENZIMAS

Finalmente, comparamos la densidad de marcado (inmunopartículas/ μm^2) para las distintas enzimas en las terminales sinápticas o compartimentos dendríticos respectivamente (Fig. 53). Los resultados muestran que las terminales sinápticas presentan una densidad de marcado similar para todas las enzimas analizadas (entre 3,0-3,7 partículas/ μm^2). Sin embargo, la densidad de marcado para las dendritas es más heterogénea, observándose claramente una mayor densidad para la enzima FAAH (8,6 partículas/ μm^2) en comparación con el resto de las enzimas, que presentan unos valores más homogéneos entre ellos y similares a los valores descritos para las terminales sinápticas (entre 1,9-3,9 partículas/ μm^2).

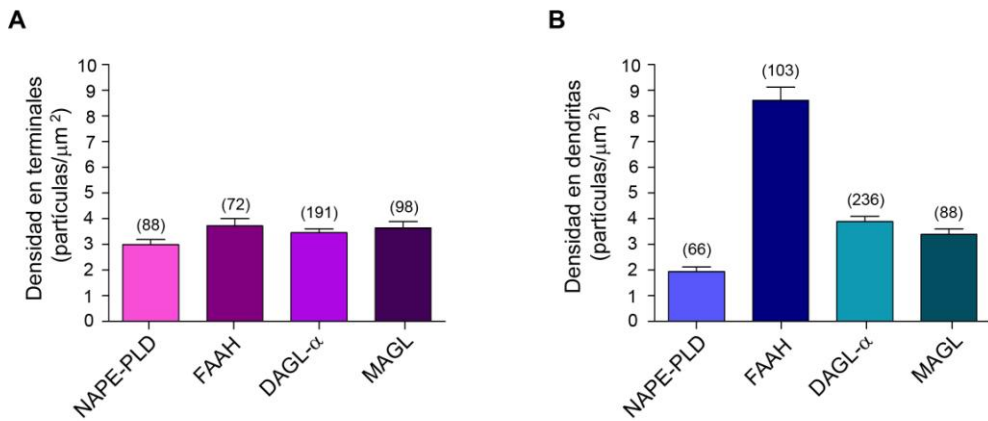


Figura 53. Comparación de la densidad de marcado para las diferentes enzimas en las terminales o dendritas del VMH. A: La densidad de marcado (inmunopartículas/ μm^2) para las terminales sinápticas es de $3,0 \pm 0,2$ para NAPE-PLD, $3,7 \pm 0,3$ para FAAH, $3,5 \pm 0,1$ para DAGL- α y $3,6 \pm 0,2$ para MAGL. **B:** En el caso de las dendritas, estos valores son de $1,9 \pm 0,2$ para NAPE-PLD, $8,6 \pm 0,5$ para FAAH, $3,9 \pm 0,2$ para DAGL- α y $3,4 \pm 0,2$ para MAGL. Área total analizada: $998\mu\text{m}^2$, $702\mu\text{m}^2$, $1.889\mu\text{m}^2$ y $698\mu\text{m}^2$ para NAPE-PLD, FAAH, DAGL- α y MAGL respectivamente. Entre paréntesis se indica el número total de perfiles analizados en cada caso.

Por último, mostramos un resumen (tabla 7) de la distribución de las inmunopartículas presentes en la membrana o en el interior de los perfiles analizados. En cuanto a las enzimas de síntesis de endocannabinoides, cabe destacar la distribución más o menos homogénea de NAPE-PLD tanto en la membrana como el interior de terminales sinápticas y dendritas, mientras que DAGL- α predomina en la membrana de los perfiles dendríticos. Por otro lado, sobre las enzimas de degradación, podemos apreciar la presencia masiva de FAAH en el interior de los perfiles dendríticos, así como la mayor distribución de MAGL en el interior de estos mismos compartimentos.

ENZIMA	TER		DEN	
	% partículas en membrana	% partículas en el interior	% partículas en membrana	% partículas en el interior
NAPE-PLD	19,55 ± 2,7	28,8 ± 3,6	22,1 ± 3,9	29,55 ± 4,1
FAAH	4,8 ± 1,0	9,0 ± 1,7	12,7 ± 1,6	73,5 ± 2,2
DAGL-α	17,1 ± 1,7	15,6 ± 1,6	34,9 ± 2,5	32,4 ± 2,2
MAGL	17,1 ± 2,1	17,3 ± 3,3	20,7 ± 2,3	44,9 ± 3,8

Tabla 7. Porcentaje de distribución de las inmunopartículas en la membrana o el interior de las terminales sinápticas o dendritas para las diferentes enzimas estudiadas. Los porcentajes han sido calculados sobre el total de partículas presentes únicamente en las terminales sinápticas y dendritas para cada enzima estudiada.

5. DISCUSIÓN

5.1. LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR CB₁ EN EL VMH

5.1.1. Localización de CB₁ en las terminales sinápticas excitadoras e inhibitoras del VMH

El principal hallazgo de esta parte de mi Tesis Doctoral ha sido la demostración de la localización del receptor CB₁ en las terminales axónicas que hacen sinapsis con dendritas y espinas dendríticas en el VMH de ratones CB₁-WT, Glu-CB₁-KO y GABA-CB₁-KO. El análisis de la proporción de los perfiles inmunomarcados de aferencias GABAérgicas y glutamatérgicas subcorticales y corticales ha servido para definir con más exactitud la contribución del CB₁ en la arquitectura molecular de las terminales sinápticas inhibitoras y excitadoras de diferentes orígenes que convergen en el VMH.

Una extensa red de conexiones sinápticas constituye la base anatómica de las funciones vegetativas y neuroendocrinas reguladas por el hipotálamo. En concreto, el complejo circuito de conexiones que se da en el VMH está constituido por numerosas proyecciones que surgen de núcleos extrahipotalámicos situados en el tronco del encéfalo, tálamo y sistema límbico, así como de núcleos hipotalámicos, como el área preóptica, el hipotálamo anterior, el hipotálamo lateral y la mayoría de los núcleos del hipotálamo medial, entre los que se encuentran el núcleo dorsomedial y paraventricular (Berthoud, 2002; McClellan y cols., 2006). Por su parte, las proyecciones eferentes del VMH alcanzan mayoritariamente el tronco del encéfalo, tálamo, sistema límbico y otros núcleos hipotalámicos; en particular caben destacar las proyecciones del VMH al área preóptica medial, hipotálamo anterior, núcleo dorsomedial y núcleo arcuato (Berthoud, 2002; Sternson y cols., 2005; McClellan y cols., 2006).

La mayoría de las neuronas ventromediales expresan ARNm para vGluT-2 y no contienen ARNm para GAD65 o GAD67 (Hrabovszky y cols., 2005, 2012; Meister, 2007). Estos datos sugieren que el VMH ejerce un efecto neto excitador sobre sus dianas cerebrales. Por otro lado, la transmisión sináptica de las eferencias ventromediales podría

estar controlada por el receptor CB₁, ya que el VMH expresa niveles muy altos de ARNm que codifica este receptor (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Marsicano y Lutz, 1999; Cota y cols., 2003; Jelsing y cols., 2008; Hrabovszky y cols., 2012), a pesar de que la intensidad de inmunoreactividad observada sólo alcanza niveles intermedios (Wittmann y cols., 2007). Por el contrario, la desafrenciación hipotalámica no tiene consecuencias evidentes sobre el *binding* de CB₁ en el hipotálamo, lo que sugiere que el CB₁ hipotalámico procede de neuronas intrínsecas (Romero y cols., 1998).

En este trabajo de Tesis Doctoral hemos observado que la proporción de terminales sinápticas inmunopositivas para CB₁ en el VMH de ratones deficientes de CB₁ en neuronas glutamatérgicas corticales (Glu-CB₁-KO) es idéntica a la de los ratones silvestres o CB₁-WT (en torno al 20%). Estos resultados indican que el receptor CB₁ se encuentra probablemente en terminales sinápticas excitadoras de neuronas hipotalámicas intrínsecas. Sin embargo, observamos en el ratón Glu-CB₁-KO con respecto al ratón CB₁-WT una ligera disminución (~22%, aunque no resulta estadísticamente significativa) de las terminales sinápticas excitadoras claramente asimétricas positivas para CB₁. En conjunto, estos resultados indican que el receptor CB₁ se localiza mayoritariamente en terminales axónicas excitadoras de origen subcortical y, en menor medida, en botones sinápticos excitadores de origen cortical.

De hecho, se han descrito neuronas glutamatérgicas/aspartatérgicas no corticales que proyectan desde el área preóptica medial, núcleo paraventricular y área hipotalámica anterior al VMH, así como en el propio VMH (Kiss y cols., 2011). Todos estos núcleos a su vez contienen ARNm codificante para CB₁ (Marsicano y Lutz, 1999; Cota y cols., 2003; Jelsing y cols., 2008; Hrabovszky y cols., 2012). Las aferencias corticales al VMH proceden de varias porciones de la amígdala, el complejo hipocampal (corteza entorrinal, CA1, giro dentado, subículo) y la corteza prefrontal (Berthoud, 2002); y se han identificado neuronas glutamatérgicas/aspartatérgicas que proyectan al VMH en el septo lateral, el núcleo del lecho de la estría terminal y la amígdala (Kiss y cols., 2011). Además, se han detectado niveles bajos, pero significativos, de ARNm para CB₁ en neuronas glutamatérgicas de la neocorteza, amígdala, hipocampo y corteza entorrinal (Marsicano y

Lutz, 1999; Monory y cols., 2006), así como en el núcleo del lecho de la estría terminal (Marsicano y Lutz, 1999).

Por otro lado, observamos que la falta de CB₁ en las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo (GABA-CB₁-KO) provoca una disminución de las terminales sinápticas inmunomarcadas para este receptor (12,4%). Estos resultados indican que el receptor CB₁ también es un componente molecular de los botones axónicos GABAérgicos del VMH. Cabe la posibilidad técnica de que los ratones DLX, como son los ratones mutantes GABA-CB₁-KO, porten la recombinación en neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (Yee y cols., 2009) y por lo tanto, presenten CB₁ en las terminales sinápticas dopaminérgicas del VMH. Sin embargo, esto resulta improbable al no detectarse inmunorreactividad para la tirosina hidroxilasa en este núcleo (Yee y cols., 2009).

En conjunto, nuestros hallazgos permiten interpretar que las terminales presinápticas GABAérgicas de vías inhibitoras intrínsecas del propio VMH y de otros núcleos hipotalámicos contienen el receptor CB₁. De hecho, numerosas neuronas del área preóptica medial, el núcleo dorsomedial y el hipotálamo lateral expresan ARNm para GAD65 o GAD67 (Bowers y cols., 1998; Hrabovszky y cols., 2005, 2012; Meister, 2007). Estos núcleos hipotalámicos proyectan al VMH (Berthoud, 2002; McClellan y cols., 2006) y expresan ARNm para CB₁ (Marsicano y Lutz, 1999; Cota y cols., 2003; Jelsing y cols., 2008; Hrabovszky y cols., 2012). El núcleo arcuato también es principalmente GABAérgico (Bowers y cols., 1998; Hrabovszky y cols., 2005, 2012; Meister, 2007) e interacciona funcionalmente con el VMH (Chee y cols., 2010). Sin embargo, la expresión de ARNm para CB₁ no se ha encontrado o se ha detectado en niveles bajos en el núcleo arcuato (Cota y cols., 2003; Jelsing y cols., 2008; Hrabovszky y cols., 2012), por lo que no resulta probable que los axones de este núcleo contribuyan al patrón de CB₁ observado en el VMH.

Significado funcional

Nuestra investigación ha demostrado que el patrón de expresión de CB₁ observado en el núcleo ventromedial del hipotálamo, se corresponde con la distribución del receptor CB₁ en terminales GABAérgicas y glutamatérgicas que convergen en el VMH. La densidad

de CB₁ comparada con la hallada en otras regiones cerebrales (Lafourcade y cols., 2007; Puente y cols., 2010), resulta bastante baja tanto en los botones GABAérgicos como glutamatérgicos (0,40-0,50 partículas/μm), en particular para las terminales sinápticas inhibitoras (Kawamura y cols., 2006). Sin embargo, la eficiencia de CB₁ en la activación de proteínas GTP es mucho mayor en el hipotálamo que en otras regiones cerebrales (Breivogel y cols., 1997), lo que puede tener un significado funcional. A nivel fisiológico, la identificación de los receptores CB₁ en las terminales sinápticas GABAérgicas y glutamatérgicas del VMH, podría suponer uno de los sustratos neuronales de los efectos ejercidos por los cannabinoides endógenos y exógenos sobre las conductas alimentarias. En este sentido, los ratones deficientes de CB₁ presentan un fenotipo anorexigénico, que también se observa en animales silvestres tras la aplicación de un antagonista de CB₁. Por otra parte, la leptina, que es una molécula anorexigénica, reduce los niveles de anandamida y 2-AG en el hipotálamo (Di Marzo y cols., 2001), mientras que la falta de receptores de leptina, muy abundantes en el VMH, produce un incremento de CB₁ en estructuras límbicas (Thanos y cols., 2008).

Los ratones Glu-CB₁-KO presentan un comportamiento hipofágico tras un período de ayuno, muy similar al observado en los ratones CB₁-KO. Por el contrario, los ratones GABA-CB₁-KO son hiperfágicos en las mismas condiciones experimentales (Bellocchio y cols., 2010). En base a estas observaciones, es plausible que los ratones hipofágicos tras el ayuno (CB₁-KO y Glu-CB₁-KO) podrían tener una mayor activación (o menor inhibición) de los núcleos hipotalámicos anorexígenos, como el VMH y el núcleo paraventricular. Por otro lado, los ratones mutantes que presentan un comportamiento hiperfágico tras el ayuno (GABA-CB₁-KO) podrían presentar un aumento de la actividad de los núcleos hipotalámicos orexigénicos, como las neuronas que contienen el neuropéptido Y en el núcleo arcuato y las neuronas que contienen orexina en el hipotálamo lateral.

Como conclusión, el núcleo ventromedial del hipotálamo puede suponer un buen lugar de regulación de las conductas alimentarias por el sistema endocannabinoide, a través de la modulación de la neurotransmisión inhibitora y excitadora mediada por la activación de los receptores CB₁ distribuidos en las terminales sinápticas GABAérgicas y

glutamatérgicas, respectivamente (Fig. 54). Por tanto, creemos que nuestros resultados anatómicos contribuyen a la mejor comprensión de la compleja regulación del balance energético ejercida por el sistema endocannabinoide.

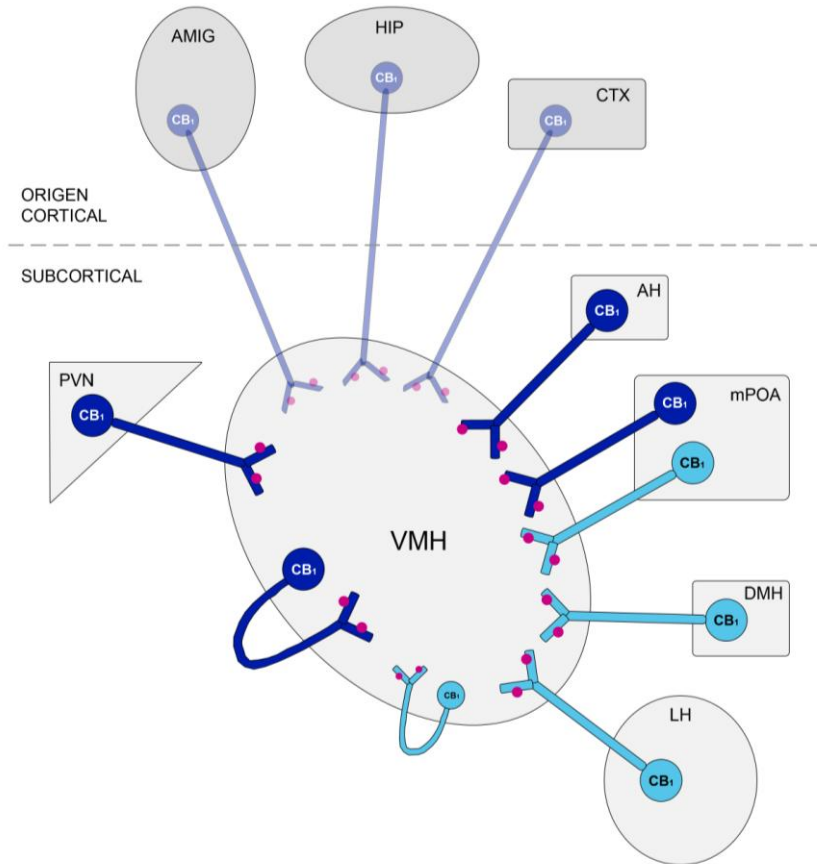


Figura 54. Esquema de la distribución de CB₁ en terminales sinápticas excitadoras e inhibitoras identificada en esta Tesis Doctoral y su posible correlación con aferencias corticales y subcorticales que expresan ARNm para CB₁ y convergen en el VMH. Las aferencias excitadoras (glutamatérgicas, en azul oscuro) e inhibitoras (GABAérgicas, en azul claro) que llegan al VMH representan poblaciones neuronales que expresan ARNm para CB₁. Las aferencias glutamatérgicas corticales se muestran en azul semi-transparente para indicar su menor contribución al patrón de marcado de CB₁ observado en el VMH. El receptor CB₁ se muestra como pequeños círculos rosas en las terminales axónicas tanto excitadoras como inhibitoras que convergen en el VMH. AH: hipotálamo anterior, Amig: amígdala, ARC: arcuato, CTX: corteza, DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo, HIP: hipocampo, LH: hipotálamo lateral, mPOA: área preóptica medial, PVN: núcleo paraventricular, VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo.

5.2. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL RECEPTOR CB₁ EN LOS ASTROCITOS DEL VMH

Esta parte de mi Tesis Doctoral constituye la primera evidencia ultraestructural de la localización del receptor CB₁ en los astrocitos del hipotálamo, para lo cual hemos utilizado técnicas inmunocitoquímicas de alta resolución para microscopía electrónica aplicadas en el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratones silvestres y *knock-out* específicos para CB₁ en astrocitos (GFAP-CB₁-KO). En nuestro trabajo, hemos demostrado que cerca del 40% de los astrocitos GFAP positivos del VMH contienen el receptor CB₁ en el ratón silvestre, cuyo marcado desaparece en el ratón CB₁-KO que no tiene el receptor en los compartimentos neuronales ni gliales. Es de resaltar, puesto que no lo ha hecho ningún otro laboratorio previamente, que este marcado es específico ya que no se observa en el VMH del ratón GFAP-CB₁-KO, que carece de CB₁ selectivamente en los astrocitos, mientras que no se modifica el porcentaje de terminales sinápticas CB₁ inmunopositivas con respecto al ratón silvestre.

Las células gliales constituyen la población celular más abundante del sistema nervioso central. Estas células son capaces de comunicarse entre sí y con las neuronas de forma dinámica y cooperativa (Zorec y cols., 2012). Las células gliales y las neuronas por medio de una comunicación bidireccional constituyen una unidad metabólica, a la vez que la glía supone un importante depósito energético. De tal modo, el glucógeno, el gran reservorio de energía cerebral, se localiza sobre todo en astrocitos (Lajtha y cols., 1981). Sus niveles en el cerebro dependen directamente de la actividad sináptica (Magistretti y cols., 1993) y son regulados por varios neurotransmisores. Por ejemplo, las monoaminas, algunos péptidos y la adenosina son glucogenolíticos a través de la puesta en marcha de segundos mensajeros intracelulares activados por la adenilatociclasa o fosfolipasa C (Sorg y Magistretti, 1991). Por el contrario, la activación de ciertos receptores de glutamato, como los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II (en particular mGluR3) localizados en la glía (Elezgarai y cols., 2001) produce una inhibición de la adenilatociclasa que resulta en una reducción de los niveles de AMP cíclico. Por lo tanto, es plausible que

el glutamato, actuando sobre estos receptores gliales, tenga un efecto positivo sobre el mantenimiento de los niveles de glucógeno necesarios para las altas demandas energéticas que tienen lugar, por ejemplo, durante la maduración del sistema nervioso central.

La glía juega también un papel fundamental en el desarrollo y maduración del sistema nervioso central, por medio del suministro de proteínas de matriz extracelular, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y citoquinas esenciales para el desarrollo y la capacidad regenerativa del tejido cerebral. Por otra parte, la glía también expresa una amplia variedad de canales iónicos, sistemas de transporte y receptores de neurotransmisores (Hof y cols., 2008).

De todos los tipos celulares que la integran, los astrocitos destacan por su participación en el procesamiento de la información cerebral (Volterra y Meldolesi, 2005), a través de la comunicación que establecen con las neuronas en ambos sentidos, como ya hemos comentado (Araque y cols., 2001; Volterra y Bezzi, 2002; Haydon y Carmignoto, 2006), gracias a que presentan intrincadas interacciones morfológicas con las neuronas y otros astrocitos. Por ejemplo, un único astrocito se relaciona con cientos de dendritas (Halassa y cols., 2007), con cerca de cien sinapsis (Bushong y cols., 2002) y se acopla con otros astrocitos a través de *gap junctions* (Giaume y Venance, 1998). En el hipocampo, una neurona atraviesa el territorio de numerosos astrocitos (~5 astrocitos/8000 μm^2) (Nixdorf-Bergweiler y cols., 1994), por lo que la estimulación neuronal provoca respuestas de calcio en un conjunto de astrocitos (Bernardinelli y cols., 2011).

De este modo, los astrocitos muestran una elevación de calcio intracelular tras la liberación del neurotransmisor excitador glutamato desde las terminales sinápticas (Cornell-Bell y cols., 1990; Porter y McCarthy, 1996; Perea y Araque, 2005), produciendo la liberación de gliotransmisores que modulan la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Araque y cols., 1999; Beattie y cols., 2002; Volterra y Bezzi, 2002; Perea y Araque, 2007) actuando a través de los receptores de glutamato NMDA (Parri y cols., 2001) y AMPA (Fiacco y McCarthy, 2004), así como a través de las sinapsis inhibitoras (Kang y cols., 1998). También modulan la depresión heterosináptica (Serrano y cols.,

2006), la liberación presináptica de glutamato (Jourdain y cols., 2007) y la potenciación a largo plazo (Henneberger y cols., 2010). La señalización neurona-glia gradúa la fuerza sináptica en el hipotálamo (Gordon y cols., 2009) y modula la actividad de las redes neuronales corticales *in vivo* (Fellin y cols., 2009). A pesar de todo, algunos trabajos cuestionan la importancia de la señalización astrocítica de calcio en la transmisión sináptica y plasticidad neuronal (Fiacco y cols., 2007; Petravicz y cols., 2008; Agulhon y cols., 2010).

La demostración de la presencia de receptores de cannabinoides en la astroglia no ha sido tarea fácil e incluso ha resultado controvertida (Stella, 2004, 2010), ya que algunos estudios no han visto efectos de los cannabinoides en astrocitos; mientras que otros, sin embargo, han localizado el receptor CB₁ en cultivos de células gliales (Molina-Holgado y cols., 2003; Walter y Stella, 2003; Stella, 2004). En tejido cerebral, el receptor CB₁ ha sido identificado en astrocitos del caudado-putamen (Rodríguez y cols., 2001), de la corteza cingulada, del fascículo prosencefálico medial, de la amígdala y de las láminas I y II de la médula espinal (Moldrich y Wenger 2000; Salio y cols., 2002). En este último caso, casi la mitad de los astrocitos GFAP inmunorreactivos presentan inmunomarcado para CB₁ en las láminas I y II del asta dorsal espinal (Hegyí y cols., 2009).

Desde el punto de vista funcional, los endocannabinoides a través de los receptores CB₁ promueven la diferenciación astrogliar (Aguado y cols., 2006) y median la comunicación neurona-astrocito (Navarrete y Araque, 2008) potenciando la transmisión sináptica (Navarrete y Araque, 2010). También se ha descrito que los astrocitos pueden contribuir, al menos en parte, al desarrollo de los efectos reforzantes de las drogas de abuso en el núcleo accumbens y corteza cingulada (Narita y cols., 2008). Por otro lado, la activación de CB₁ aumenta la tasa de oxidación de glucosa y cetogénesis en los astrocitos, siendo éstos fenómenos implicados en el aporte de energía al cerebro (Sánchez y cols., 1998; Blázquez y cols., 1999). Puesto que los astrocitos perivasculares se localizan entre los vasos cerebrales y las neuronas regulando el aporte energético a las neuronas cercanas (Magistretti, 2000; Voutsinos-Porche y cols., 2003), los receptores CB₁ de los pies chupadores de los astrocitos probablemente regulen el aporte de energía desde el

torrente sanguíneo a las neuronas (Stella, 2004, 2010). En concordancia con esta hipótesis, se ha visto que el THC aumenta el metabolismo energético en el cerebro de rata (Costa y Colleoni, 2000).

Además, los astrocitos son capaces de producir anandamida y otras aciletanolaminas y de inactivar endocannabinoides mediante su captación y subsiguiente hidrólisis (Di Marzo y cols., 1994; Beltramo y cols., 1997; Piomelli y cols., 1999; Rodriguez y cols., 2001; Walter y cols., 2002), sugiriendo la existencia de un sistema de señalización endocannabinoide funcional en estas células. Por ejemplo, la exposición a THC aumenta la hidrólisis de esfingomielina, fenómeno que no responde a la *toxina pertussis*, lo que sugiere que estos receptores podrían actuar a través de un mecanismo independiente de las proteínas $G_{i/o}$ (Sánchez y cols., 2001b).

El laboratorio del Dr. Araque ha demostrado que los astrocitos de la región CA1 del hipocampo expresan CB_1 , cuya activación por los endocannabinoides neuronales producidos por la actividad sináptica, estimula la fosfolipasa C. Ésta incrementa la movilización de calcio desde los depósitos astrocíticos intracelulares, produciendo una liberación de glutamato glial. Finalmente, este glutamato activa los receptores NMDA localizados en las neuronas piramidales de CA1 (Navarrete y Araque, 2008). Más recientemente, este mismo grupo ha observado que la liberación de glutamato astroglial dependiente de la activación de CB_1 , produce una activación heterosináptica presináptica de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I situados a nivel de las terminales sinápticas que reciben otras neuronas de CA1 más distantes. Esto tiene como resultado una potenciación de la transmisión (LTP, del inglés *long term potentiation*) debido al aumento de la liberación de glutamato desde esas terminales sinápticas neuronales activadas más alejadas (Navarrete y Araque, 2010).

Si estos autores han demostrado el papel del CB_1 astroglial en la potenciación heterosináptica a largo plazo de la comunicación neuronal, nuestro laboratorio ha colaborado en los últimos meses con el grupo del Dr. Xia Zhang de la Universidad de Ottawa (Canadá) y del Dr. Giovanni Marsicano de la Universidad de Burdeos (Francia), junto con otros siete laboratorios de cuatro países distribuidos por tres continentes, en el

estudio del papel crucial que tiene la activación del receptor CB_1 localizado en los astrocitos (pero no los distribuidos en las neuronas) de la región CA1 del hipocampo, en el deterioro de la memoria operativa que tiene lugar *in vivo* por la exposición aguda a cannabinoides exógenos (Han y cols., 2012). En nuestro laboratorio hemos identificado en la región CA1 hipocampal la localización de CB_1 en procesos astrocíticos GFAP positivos de ratones GFAP- CB_1 -WT, como los utilizados en esta Tesis Doctoral. Una proporción de alrededor del 50% de los perfiles GFAP positivos presentaron inmunopartículas de CB_1 (Han y cols., 2012), que es comparable al porcentaje de procesos doblemente marcados en el VMH del hipotálamo. Al igual que en el VMH, el porcentaje de los perfiles GFAP positivos que tienen CB_1 cae drásticamente en el mutante GFAP- CB_1 -KO y prácticamente desaparece en el ratón CB_1 -KO.

Tras la localización anatómica de CB_1 en los astrocitos, hemos observado por medio de la utilización de mutagénesis condicional, electrofisiología *in vivo* y tests de conducta que la activación de CB_1 astroglial causa un aumento de glutamato ambiental, el cual activa la subunidad NR2B de los receptores NMDA produciendo la internalización de los receptores AMPA de glutamato situados en las neuronas piramidales de CA1, las cuales reciben las terminales sinápticas excitadoras de las neuronas piramidales de CA3. Ello induce una depresión sináptica a largo plazo (LTD, del inglés *long term depression*) de estas sinapsis que altera la función de los circuitos hipocampales, tornándose éstos incapaces de procesar la memoria operativa de forma adecuada (Han y cols., 2012). Los animales utilizados en esta Tesis Doctoral que carecen de CB_1 en las células positivas para GFAP (GFAP- CB_1 -KO), presentan una memoria operativa normal y no responden a THC aplicado exógenamente. Estos resultados suponen la evidencia del papel imprescindible de los receptores CB_1 astrogliales en este deterioro cognitivo inducido por los cannabinoides exógenos (Han y cols., 2012). Finalmente, es de mencionar que la exposición a cannabinoides exógenos *in vivo* induce una LTD dependiente de cannabinoides completamente normal en las sinapsis CA3-CA1 tanto en el ratón silvestre como en los mutantes condicionales Glu- CB_1 -KO y GABA- CB_1 -KO. Estos datos, por tanto, no apoyan la implicación en la LTD *in vivo* de los receptores CB_1 dispuestos en las terminales glutamatérgicas o GABAérgicas de las sinapsis de CA3-CA1 (Han y cols., 2012).

Con respecto a la implicación funcional que puedan tener los receptores CB₁ en los astrocitos del núcleo ventromedial del hipotálamo, es por el momento una incógnita. Sin embargo, debido al papel destacado del VMH en la ingesta, es asumible de entrada la participación del CB₁ astrogial en estas conductas. Uno de los efectos bien conocidos del consumo de cannabis es un estado orexigénico a través de la activación del receptor de cannabinoides CB₁. Sin embargo, el grado de complejidad es mucho mayor ya que la utilización de dosis bajas o moderadas de fármacos agonistas del receptor CB₁ produce hiperfagia, mientras que dosis más altas causan hipofagia en animales de experimentación (Wiley y cols., 2005; Pagotto y cols., 2006). Estos efectos de la activación de CB₁ son debidos a la expresión del receptor en regiones cerebrales que controlan la ingesta, donde regula la transmisión sináptica entre neuronas. Con el empleo de técnicas genéticas, farmacológicas y anatómicas en ratones, observamos que los cannabinoides endógenos y exógenos ejercen una acción dual sobre el control de la ingesta alimentaria estimulada (Bellocchio y cols., 2010). Los resultados de esta investigación, en la que también ha participado nuestro laboratorio, han demostrado que la activación de CB₁ por dosis bajas (1mg/kg) del agonista exógeno THC provoca hiperfagia a través de la inhibición de la transmisión sináptica glutamatérgica excitadora en neuronas telencefálicas corticales; mientras que dosis altas de THC (2,5mg/kg) producen hipofagia por la inhibición de la transmisión sináptica inhibitoria local debida a la activación de los receptores CB₁ localizados en terminales nerviosas GABAérgicas inhibitorias del estriado ventral implicado en el control de la ingesta (Bellocchio y cols., 2010).

Como queda claro, por tanto, los efectos descritos sobre la toma de alimentos en roedores dependen de la presencia del receptor CB₁ en las terminales nerviosas. Por otra parte, se ha descrito que la obesidad induce receptores de leptina funcionales en los astrocitos hipotalámicos (Hsuchou y cols., 2009) y que los astrocitos modulan la distribución y señalización neuronal de la leptina en el hipotálamo de ratones obesos A^{vy} (Pan y cols., 2011). Por último, se ha visto mediante el test condicionado de preferencia de lugar que la ingesta de una dieta rica en grasa durante 2 semanas induce una preferencia hacia dicha dieta, así como un aumento de la expresión de GFAP en el hipotálamo. Además, el antagonista del receptor cannabinoide CB₁ O-2050 reduce esta

preferencia por la dieta rica en grasa y también disminuye la expresión de GFAP en el hipotálamo, lo que sugiere que la ingesta de una dieta rica en grasa lleva al desarrollo de una preferencia por dicha dieta mediado por los receptores CB₁ de los astrocitos hipotalámicos (Higuchi y cols., 2010).

Además de esto, existen evidencias todavía sin publicar (Dra. Barbara Bosier, comunicación personal) de que la falta de CB₁ en astrocitos (ratones GFAP-CB₁-KO) induce un fenotipo particular hipofágico tras la fase oscura del ritmo circadiano, que no es debida a la aparición de un cuadro de ansiedad o a una modificación de la actividad. Además, la expresión del receptor de leptina en astrocitos de la corteza cerebral e hipotálamo en cultivo se ve reducida en ausencia de CB₁, al igual que ocurre tras la aplicación del antagonista de CB₁ rimonabant. Por el contrario, el inhibidor de la MAGL, JZL, aumenta la expresión de los receptores de leptina, lo que sugiere una contribución directa de los endocannabinoides en este fenómeno. Por lo tanto, la demostración en esta Tesis Doctoral de la presencia de CB₁ en los astrocitos del núcleo ventromedial del hipotálamo apunta hacia una relevancia funcional del CB₁ astrogliar de extraordinaria importancia en las conductas alimentarias.

5.3. LOCALIZACIÓN DE LAS ENZIMAS DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ENDOCANNABINOIDES EN EL VMH

5.3.1. Localización ultraestructural de NAPE-PLD en el VMH

A pesar del creciente interés que suscita la investigación del sistema endocannabinoide, existen muy pocos estudios en la literatura sobre la localización ultraestructural de NAPE-PLD (Nyilas y cols., 2008; Puente y cols., 2011). Esta parte de mi Tesis Doctoral constituye la primera evidencia sobre la distribución subcelular de esta enzima en el núcleo ventromedial del hipotálamo, contribuyendo por tanto a ampliar los datos disponibles al respecto. Nuestros resultados dejan claro que la localización de las inmunopartículas de NAPE-PLD en la región dorsomedial del VMH es tanto postsináptica como presináptica, siendo el porcentaje de las dendritas inmunopositivas significativamente mayor que el de las terminales.

Existe cierta discrepancia sobre la localización de NAPE-PLD en distintas regiones cerebrales, ya que algunos estudios sitúan la enzima en una localización presináptica (Egertová y cols., 2008; Nyilas y cols., 2008), mientras que otros describen una localización postsináptica en algunas poblaciones neuronales concretas (Cristino y cols., 2008; Puente y cols., 2011). Se ha postulado que la expresión de NAPE-PLD en zonas encefálicas que también expresan FAAH y CB₁ (ganglios basales, hipocampo, corteza cerebral, bulbo olfativo y cerebelo) explicaría que la anandamida generada por la NAPE-PLD actuase como endocannabinoide clásico en estas regiones. Por el contrario, el diferente patrón de expresión para NAPE-PLD y CB₁ en otras regiones, como el tálamo, sugiere otras funciones para los productos de la NAPE-PLD (Morishita y cols., 2005). Por ejemplo, la anandamida puede ejercer sus acciones biológicas a través de la activación de los receptores TRPV1 en varias áreas cerebrales (Van der Stelt y Di Marzo, 2004).

La expresión de NAPE-PLD en el cerebro y otros órganos aumenta con la edad (Morishita y cols., 2005). La distribución encefálica de la expresión de NAPE-PLD en el

cerebro de rata es manifiesta en el bulbo olfativo, tronco del encéfalo, cerebelo, corteza cerebral, ganglios basales, hipocampo e hipotálamo, pero sobre todo se da en el tálamo. Asimismo, el patrón del nivel de expresión del ARNm que codifica para NAPE-PLD y de la proteína es semejante, según los resultados obtenidos con técnicas de RT-PCR y *western blot* (Morishita y cols., 2005). En ratón, los mayores niveles de expresión cerebral del ARNm codificante para NAPE-PLD tienen lugar en las células granulares del giro dentado, seguidas por las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo. Los niveles son bajos o moderados en las capas II-III de la neocorteza, la capa II de la corteza piriforme, el bulbo olfativo, las células granulares y de Purkinje del cerebelo y los núcleos talámicos e hipotalámicos, siendo evidente el marcado de las células del VMH (Egertová y cols., 2008; Nyilas y cols., 2008). Es de destacar que los máximos niveles de expresión de NAPE-PLD se obtienen en el tálamo de la rata y la formación hipocampal del ratón, por lo que podría haber diferencias en la abundancia relativa de NAPE-PLD entre diversas especies (Egertová y cols., 2008).

En cuanto a la localización inmunocitoquímica de NAPE-PLD, el giro dentado y otras zonas del hipocampo, así como los núcleos talámicos, neocorteza, corteza piriforme, complejo amigdalino e hipotálamo, contienen la enzima. Esta inmunorreactividad aun no siendo evidente en los somas neuronales, parece localizarse en fibras marcadas que rodean cuerpos celulares y dendritas inmunonegativas (Egertová y cols., 2008). Concretamente en el hipocampo, de acuerdo con la expresión del ARNm descrita, los niveles más altos de inmunorreactividad para NAPE-PLD están en la región hilar del giro dentado y el estrato lúcido de CA3, lugar de terminación de las fibras musgosas (axones de las células granulares), seguidos por el estrato radiado de CA1, que es la zona alcanzada por las colaterales de Schaffer (axones ipsilaterales de las neuronas piramidales de CA3) y los axones contralaterales de las neuronas piramidales de CA3. Esta inmunorreactividad se distribuye de forma homogénea en el neuropelo, apreciándose pequeños gránulos inmunopositivos a mayores aumentos. Finalmente, el estudio ultraestructural en el hipocampo corrobora la localización presináptica de esta enzima en las terminales axónicas excitadoras de las fibras musgosas y en las colaterales de Schaffer, particularmente asociada a compartimentos membranosos intracelulares, como las

cisternas del retículo endoplasmático liso o los reservorios de calcio axónicos (Nyilas y cols., 2008). Esta posición de NAPE-PLD sugiere que la anandamida así como otras N-aciletanolaminas pueden actuar como moléculas de señalización sináptica pero sin estar involucradas en la señalización retrógrada, ya que es improbable que actúen localmente a través de los receptores CB₁, al no estar localizados en las terminales musgosas ni en las espinas postsinápticas (Nyilas y cols., 2008). En concordancia con esta localización, la actividad específica de NAPE-PLD en fracciones subcelulares es mayor en la fracción de partículas (mitocondrias y microsomas) que en la fracción citosólica, mostrando una tendencia similar en los análisis de *western blot*, lo que confirma que NAPE-PLD se expresa en el cerebro como una proteína de membrana (Morishita y cols., 2005).

En conjunto, la distribución presináptica de NAPE-PLD en axones (Egertová y cols., 2008; Nyilas y cols., 2008) sugiere que la anandamida y otras N-aciletanolaminas relacionadas podrían sintetizarse en elementos presinápticos y actuar como mensajeros anterógrados (Kano y cols., 2009); incluso se ha especulado sobre la posibilidad de la actuación de N-aciletanolaminas sobre receptores de N-aciletanolaminas aún no caracterizados que medien nuevas formas de plasticidad sináptica (Nyilas y cols., 2008).

Sin embargo, como ya hemos mencionado, existen otros estudios que sugieren la localización de NAPE-PLD a nivel postsináptico. Por ejemplo, en el hipocampo, la inmunorreactividad frente a esta enzima también se ha descrito en el citoplasma y en las porciones proximales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3, dándose aquí un alto porcentaje de colocalización de NAPE-PLD con TRPV1 (Cristino y cols., 2008). Por el contrario, el inmunomarcado en CA1 aparece rodeando las neuronas piramidales, probablemente con una localización presináptica. En el cerebelo, el citoplasma de algunas células de Purkinje exhiben inmunofluorescencia para NAPE-PLD (Cristino y cols., 2008).

Nuestro laboratorio ha descrito en el microscopio electrónico que las inmunopartículas de NAPE-PLD en el núcleo del lecho de la estría terminal (núcleo perteneciente a la amígdala extendida y que participa en funciones relacionadas con el estrés y fenómenos de recompensa) se localizan tanto en el retículo endoplasmático liso

de dendritas, como en las membranas de perfiles dendríticos y espinas, con una distribución preferentemente perisináptica (Puente y cols., 2011). Desde el punto de vista funcional observamos en este núcleo que la activación postsináptica del receptor metabotrópico 5 de glutamato pone en marcha la NAPE-PLD que sintetiza anandamida, la cual actuando sobre los receptores TRPV1 postsinápticos induce un proceso de depresión sináptica de larga duración o LTD (Puente y cols., 2011). En este mismo sentido, la activación postsináptica de TRPV1 por anandamida produce una internalización de los receptores AMPA postsinápticos provocando una supresión a largo plazo de la transmisión sináptica excitadora de la vía entorrino-dentada (perforante) medial independiente de la activación del receptor CB₁ (Chávez y cols., 2010). Por lo tanto, una localización postsináptica de NAPE-PLD explica la síntesis de anandamida en este compartimento, y desde ahí actúa bien retrógradamente como otros endocannabinoides para activar los receptores CB₁ presinápticos, o postsinápticamente sobre el receptor TRPV1, modulando de esta forma la transmisión sináptica. Esta situación combinada se ha observado en las neuronas espinosas de medio tamaño de la vía indirecta en el núcleo accumbens, en las que la activación del receptor metabotrópico 5 de glutamato determina la producción de endocannabinoides, probablemente anandamida, que activa simultáneamente tanto a los receptores CB₁ presinápticos produciendo una LTD (eCB-LTD), como a los canales TRPV1 postsinápticos desencadenando una LTD resultante de la endocitosis de los receptores AMPA y que no es dependiente de la activación de CB₁ (Grueter y cols., 2010).

Por lo tanto, a la vista de los estudios previos y de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral, la localización presináptica y postsináptica de NAPE-PLD permite sugerir que la anandamida y/u otras N-aciletanolaminas pueden actuar como mensajeros anterógrados y/o retrógrados en el VMH. En cualquier caso, hacen falta estudios electrofisiológicos que complementen los resultados anatómicos aquí obtenidos con el fin de intentar conocer, por un lado, el papel que juega la anandamida en todos estos procesos de señalización sináptica y entender, por otro, los mecanismos por los que la administración de anandamida en el VMH estimula el apetito (Jamshidi y Taylor, 2001).

5.3.2. Localización ultraestructural de FAAH en el VMH

Nuestros resultados sobre la distribución de FAAH muestran que se trata de una enzima con una localización claramente postsináptica, apareciendo en los perfiles somatodendríticos y espinas dendríticas de las neuronas del VMH. Además, FAAH presenta una alta densidad de marcado, notablemente mayor que el resto de enzimas analizadas. En general, nuestros resultados concuerdan con estudios previos que describen la localización postsináptica de FAAH en el hipocampo, el cerebelo y la amígdala (Gulyas y cols., 2004; Cristino y cols., 2008). En el hipocampo, FAAH se localiza específicamente en el soma y dendritas de las neuronas principales pero no en las interneuronas GABAérgicas (Gulyas y cols., 2004). Asimismo, nuestros resultados también sugieren la localización de FAAH en neuronas de naturaleza excitadora, ya que las neuronas del VMH son principalmente glutamatérgicas, puesto que expresan niveles elevados de ARNm para vGlut-2 y no expresan ARNm para GAD65 o GAD67 (Hrabovszky y cols., 2005, 2012; Meister, 2007). La ausencia de FAAH en las interneuronas GABAérgicas podría servir de guía para la identificación de la función precisa de dicha enzima en diferentes formas de plasticidad sináptica (Gulyas y cols., 2004). En este sentido, nuestro laboratorio ha demostrado que la inhibición de FAAH es capaz de desencadenar, al aumentar el tono de anandamida, una depresión prolongada de la transmisión sináptica excitadora en neuronas del núcleo del lecho de la estría terminal tras la aplicación de un protocolo de estimulación sub-umbral que por sí solo no es capaz de inducir LTD (Puente y cols., 2011).

Los estudios ultraestructurales realizados en el hipocampo y el cerebelo indican que la localización de FAAH es sobre todo postsináptica, en orgánulos membranosos intracelulares como las cisternas del retículo endoplasmático liso o la membrana externa mitocondrial (Gulyas y cols., 2004). Nosotros también hemos observado esta localización en el VMH, de forma que numerosas inmunopartículas localizadas en el interior de los perfiles dendríticos aparecen relacionadas con la membrana externa mitocondrial y otras membranas intracelulares, identificadas en ocasiones como del retículo endoplasmático liso.

Por otro lado, también observamos un pequeño porcentaje de inmunopartículas presentes en las terminales sinápticas del VMH, lo cual coincide con lo visto en el cerebelo, donde FAAH se distribuye en el soma y las dendritas de las células de Purkinje y en una pequeña subpoblación de terminales axónicas (Gulyas y cols., 2004).

Estudios de inmunofluorescencia han mostrado la colocalización de FAAH y TRPV1 en los somas y dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo y en los somas de las neuronas de Purkinje en el cerebelo (Cristino y cols., 2008). Estos resultados sugieren que FAAH está posicionada para degradar los endovanilloides, principalmente anandamida y N-aciletanolaminas, cerca de su lugar de acción, esto es, en perfiles positivos también para TRPV1, cuyo sitio de unión de hecho se localiza a nivel intracelular y que la actividad de FAAH está íntimamente relacionada con la regulación local de TRPV1 (Cristino y cols., 2008). De hecho, nuestros resultados en la amígdala extendida apoyan esta hipótesis ya que, como hemos mencionado anteriormente, la aplicación de un protocolo de estimulación sub-umbral en presencia de la inhibición de FAAH, provoca una LTD de la transmisión excitadora por el aumento del nivel de anandamida que activa los canales TRPV1 postsinápticos (Puente y cols., 2011).

La presencia de FAAH también se ha observado en regiones cerebrales inmunopositivas para CB₁, como el hipocampo, cerebelo o neocorteza, donde presentan un patrón de distribución subcelular complementario, al encontrarse somas neuronales y dendritas inmunorreactivas para FAAH rodeadas de terminales de fibras axónicas CB₁ inmunopositivas (Egertová y cols., 1998, 2003). La actividad enzimática de FAAH en el cerebro de rata es elevada en el hipocampo y corteza, y más baja en el tronco del encéfalo e hipotálamo (Thomas y cols., 1997, Egertová y cols., 1998; Morishita y cols., 2005). Esto tiene su importancia, ya que se ha sugerido que la actividad de FAAH en las células piramidales del hipocampo podría ser un factor clave en la dinámica espacial y temporal de la señalización cannabinoide (Egertová y cols., 2003).

En resumen, a la vista de todo lo expuesto anteriormente, la localización subcelular de CB₁ en las terminales sinápticas y la distribución preferente de FAAH en perfiles dendríticos, sugieren que podría existir en el VMH, al igual que en otras regiones, una

distribución complementaria de CB₁ y FAAH. Es necesario desarrollar estrategias anatómicas de colocalización que confirmen esta hipótesis, junto con estudios electrofisiológicos, de cara a investigar la repercusión funcional de esta parcela de la señalización endocannabinoide en el núcleo ventromedial del hipotálamo.

5.3.3. Localización ultraestructural de DAGL- α en el VMH

Las enzimas DAGL- α y DAGL- β son responsables de la biosíntesis de 2-AG; sin embargo, DAGL- α predomina en el sistema nervioso central. Esta afirmación se sustenta en las observaciones derivadas de los ratones mutantes *DAGL- α -KO* y *DAGL- β -KO* que presentan, respectivamente, una reducción del 80% y 50% de los niveles de 2-AG en el cerebro (Gao y cols., 2010). Por el contrario, de las dos enzimas, DAGL- β es la más relevante en el hígado (Gao y cols., 2010). En este trabajo de Tesis Doctoral, hemos descrito en la porción dorsomedial del VMH la localización subcelular de DAGL- α mayoritariamente en perfiles dendríticos postsinápticos. Estos resultados en general concuerdan con estudios previos que describen la distribución postsináptica de DAGL- α más allá de las especializaciones postsinápticas, a nivel de compartimentos somatodendríticos y sobre todo en las espinas dendríticas de las neuronas de Purkinje del cerebelo, neuronas medianas espinosas del estriado, neuronas de la corteza prefrontal, neuronas piramidales hipocampales, células granulares del giro dentado y neuronas del núcleo del lecho de la estría terminal (Katona y cols., 2006; Yoshida y cols., 2006; Lafourcade y cols., 2007; Uchigashima y cols., 2007, 2011; Puente y cols., 2011).

Nuestro análisis estadístico muestra que la mayoría de las inmunopartículas de DAGL- α (54,0%) están presentes en dendritas, siendo este valor más escaso (3,6%) en las espinas dendríticas. Este hecho puede explicarse debido al escaso número de espinas (n=33) encontradas en el VMH en comparación con el resto de perfiles analizados de dendritas y terminales (n=855). De hecho, el análisis posterior sobre el porcentaje de perfiles positivos indica que cerca del 54% de las dendritas y del 44% de las espinas dendríticas son inmunopositivas para DAGL- α .

La localización de DAGL- α en las espinas es muy precisa y varía entre los distintos tipos neuronales (Kano y cols., 2009). Por ejemplo, DAGL- α se concentra en la base del cuello, y no en la cabeza, de las espinas dendríticas de las células de Purkinje y en las membranas de las dendritas próximas (Yoshida y cols., 2006), al igual que ocurre en las neuronas de la amígdala extendida (Puente y cols., 2011). Asimismo, DAGL- α se distribuye preferentemente en las espinas y troncos dendríticos de las células granulares del giro dentado del hipocampo, pero destacando su mayor presencia en el cuello de las espinas (Uchigashima y cols., 2011). Sin embargo, en las neuronas piramidales del hipocampo, DAGL- α se concentra principalmente en la cabeza de las espinas (Katona y cols., 2006) o en la cabeza o cuello de las espinas o en ambos (Yoshida y cols., 2006). Por último, DAGL- α presenta una amplia distribución en gradiente sobre la superficie somatodendrítica extrasináptica de las neuronas espinosas de mediano tamaño del estriado, concentrando su mayor densidad en la espina, después en el tronco dendrítico y finalmente en el soma (Uchigashima y cols., 2007). En nuestro caso, en el VMH, del total de 33 espinas dendríticas identificadas, 13 fueron DAGL- α inmunopositivas, de las cuales 6 presentaban inmunopartículas en el cuello y 7 en la cabeza de la espina. Estos resultados en un número bajo de espinas indican una tendencia de distribución más homogénea que en otras regiones cerebrales.

La estimación de la densidad del marcado de DAGL- α en el VMH fue de 0,57 partículas/ μm en dendritas y 1,02 partículas/ μm en espinas. Esta densidad es mayor que la descrita de 0,24 y 0,30 partículas/ μm en dendritas y espinas, respectivamente, de las células granulares del giro dentado (Uchigashima y cols., 2011). Sin embargo, la densidad de DAGL- α es mucho mayor en las células de Purkinje, estimándose en 3,46 partículas/ μm en dendritas proximales, 13,68 partículas/ μm en dendritas pequeñas espinosas y 5,47 partículas/ μm en espinas (Yoshida y cols., 2006). Por lo tanto, la densidad del marcado de DAGL- α varía entre los diferentes tipos neuronales y compartimentos subcelulares. Esta diferente y fina localización de DAGL- α en distintos tipos neuronales sugiere que la especificidad y eficiencia de la supresión retrógrada mediada por endocannabinoides depende no sólo de los niveles de expresión de CB₁ en los elementos presinápticos, sino también de la distancia entre el sitio postsináptico de producción de 2-AG y el CB₁

presináptico (Yoshida y cols., 2006). En el hipotálamo, los niveles de los dos principales endocannabinoides, anandamida y 2-AG, aumentan después del ayuno y disminuyen tras la ingesta (Kirkham y cols., 2002; Di Marzo y Matias, 2005; Pagotto y cols., 2006; Matias y Di Marzo, 2007). En el caso concreto del 2-AG, por lo tanto, la presencia de la enzima de síntesis debe regularse al alza o a la baja según el estado de hambre o saciedad en el que se encuentre el animal, que debe a su vez sintonizarse con los niveles correspondientes de su principal enzima de degradación MAGL. Por lo tanto, la precisa localización subsináptica de DAGL- α demostrada aquí es la piedra angular que determina los niveles de 2-AG disponibles para alcanzar los receptores CB₁ presinápticos distribuidos en las sinapsis excitadoras o inhibitoras del VMH (Reguero y cols., 2011), de tal modo que podría facilitar la ingesta tras un ayuno si un nivel bajo de 2-AG actúa sobre CB₁ en terminales excitadoras, o reducirla si niveles más altos de 2-AG actúan sobre CB₁ en terminales inhibitoras (Bellocchio y cols., 2010).

5.3.4. Localización ultraestructural de MAGL en el VMH

El ARNm que codifica la enzima MAGL se expresa ampliamente en tejido cerebral, mostrando los niveles más elevados en la neocorteza, región CA3 hipocampal, tálamo anterior y capa granular del cerebelo, y niveles bajos en el hipotálamo y en el tronco del encéfalo (Dinh y cols., 2002).

Con respecto a la proteína, la inmunorreactividad frente a MAGL se distribuye por el neuropelo del hipocampo, amígdala y corteza cerebelosa a modo de un denso marcado puntiforme, que sugiere su localización en terminales axónicas (Dinh y cols., 2002; Gulyas y cols., 2004). Estas observaciones fueron confirmadas mediante microscopía electrónica, por la que la presencia de MAGL se demostró en terminales axónicas formando sinapsis asimétricas y simétricas sobre somas y dendritas de neuronas principales e interneuronas (Gulyas y cols., 2004). La localización presináptica de MAGL sugiere que podría limitar la extensión espacial y temporal del 2-AG liberado desde las neuronas postsinápticas al espacio extracelular (Kano y cols., 2009). Por otra parte, la MAGL presináptica en el

hipocampo no sólo hidroliza el 2-AG liberado por las neuronas postsinápticas, sino que también contribuye a la degradación del 2-AG producido de forma constitutiva y previene su acumulación alrededor de las terminales presinápticas. De esta forma, la actividad de MAGL determina el tono endocannabinoide basal y finaliza la señalización retrógrada endocannabinoide (Hashimoto y cols., 2007; Kano y cols., 2009). Recientemente, se ha descrito la localización de MAGL en astrocitos y terminales inhibitoras del tercio interno de la capa molecular del giro dentado, estando esta distribución dispuesta en el citoplasma y estructuras membranosas (Uchigashima y cols., 2011), lo que es consistente con estudios previos (Dinh y cols., 2002; Blankman y cols., 2007).

A pesar de las evidencias descritas en la literatura que muestran una localización presináptica de MAGL, nuestros resultados de esta Tesis Doctoral indican que, aunque hay una proporción de inmunopartículas que identifican MAGL en terminales, la mayoría de ellas se distribuyen postsinápticamente en las dendritas del VMH. Además, el porcentaje de dendritas MAGL positivas es casi el doble del porcentaje de terminales inmunomarcadas, lo que demuestra la preferente distribución postsináptica de MAGL en este núcleo. La presencia de la enzima de degradación en el VMH deberá regularse para modular los niveles de 2-AG según el estado de apetito en el que se encuentre el animal, que debe a su vez sintonizarse con los niveles correspondientes de su principal enzima de síntesis DAGL- α . Por lo tanto, la predominante localización postsináptica de MAGL demostrada en nuestro estudio contribuirá a mantener los niveles de 2-AG disponibles para alcanzar los receptores CB₁ presinápticos distribuidos en las sinapsis excitadoras o inhibitoras del VMH (Reguero y cols., 2011) y modular así el aumento o disminución del apetito según los niveles de 2-AG disponibles para activar los receptores CB₁ en las sinapsis excitadoras o inhibitoras (Bellocchio y cols., 2010).

5.4. ESQUEMAS FINALES

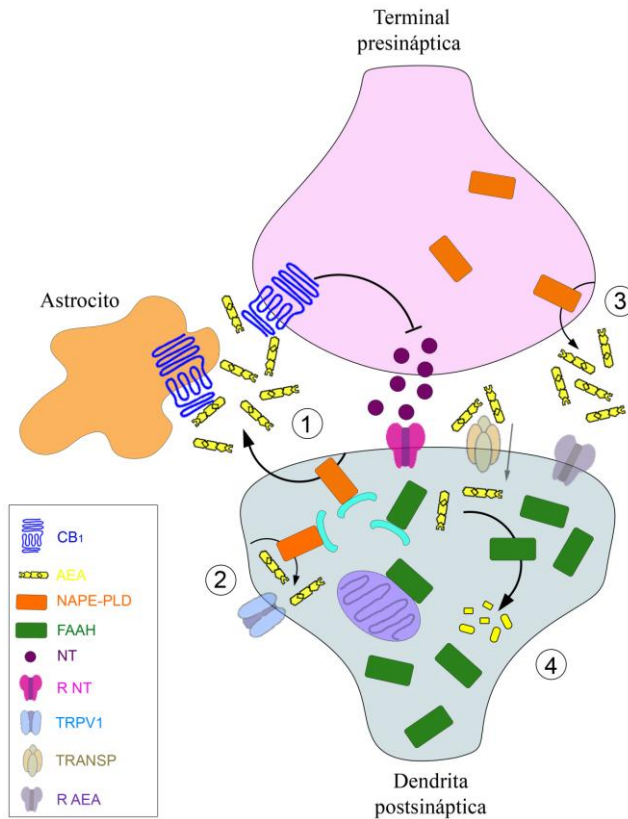


Figura 55. Esquema de las posibles explicaciones de los resultados observados sobre la distribución ultraestructural de CB_1 y las enzimas de síntesis y degradación de anandamida en el VMH. 1- La explicación más plausible en base a nuestros hallazgos anatómicos consiste en que la presencia mayoritaria de NAPE-PLD a nivel postsináptico produciría la síntesis de anandamida en las dendritas, la cual podría actuar como mensajero retrógrado, activando el receptor CB_1 presináptico presente en las terminales nerviosas y astrocitos del VMH, produciéndose por ejemplo una inhibición en la liberación del neurotransmisor. 2- Además, la anandamida sintetizada en las dendritas podría activar el receptor TRPV1 presente a nivel postsináptico en el VMH (resultados no mostrados). 3- Por último, la presencia presináptica de NAPE-PLD podría explicar la síntesis de anandamida en las terminales que podría actuar como un mensajero anterógrado activando posibles receptores de N-aciletanolaminas aún no caracterizados y dando lugar a nuevas formas de plasticidad sináptica. 4- Finalmente, la anandamida volvería al interior del perfil dendrítico (posiblemente mediante un transportador aún no caracterizado), donde se observa la mayor expresión de FAAH para producirse su degradación intracelular y finalización de la señalización. AEA: anandamida, NT: neurotransmisor, R NT: receptor para el neurotransmisor, R AEA: posible receptor de anandamida u otras N-aciletanolaminas, TRANSP: posible transportador de anandamida.

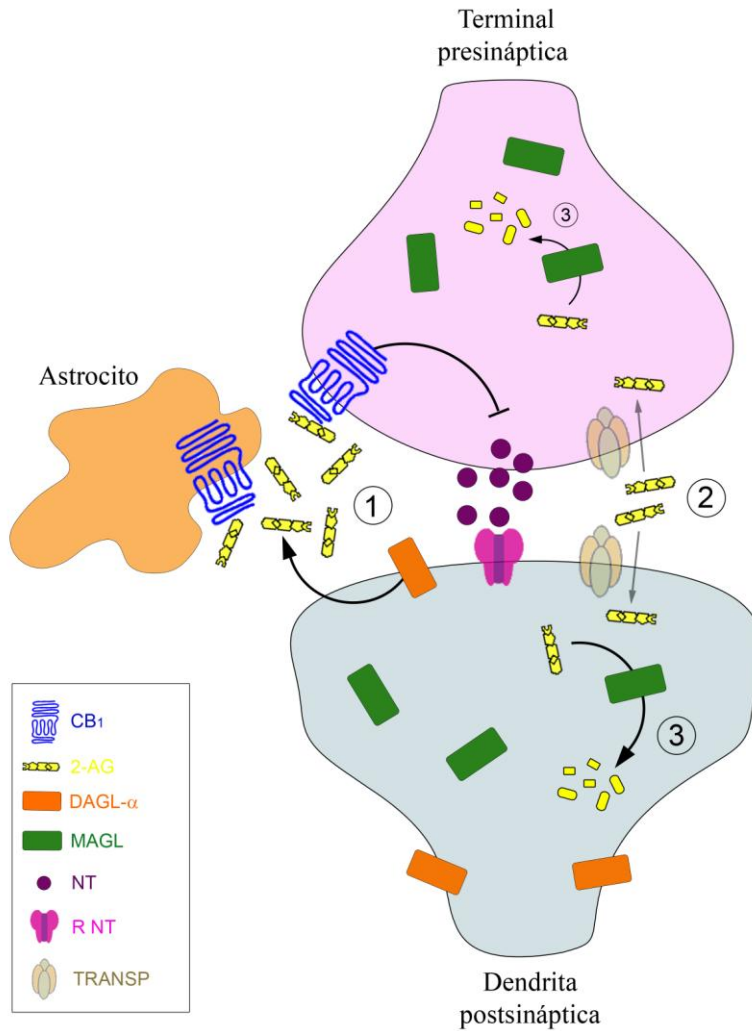


Figura 56. Esquema de las posibles explicaciones de los resultados observados sobre la distribución ultraestructural de CB₁ y las enzimas de síntesis y degradación de 2-AG en el VMH. 1- La presencia mayoritaria de DAGL- α en las dendritas explicaría la síntesis de 2-AG a nivel postsináptico, el cual actuaría como mensajero retrógrado, activando el receptor CB₁ presináptico presente en las terminales nerviosas y astrocitos del VMH, produciéndose por ejemplo una inhibición en la liberación del neurotransmisor. 2- Posteriormente, el 2-AG debería ser recaptado (posiblemente mediante el transportador de anandamida aún no caracterizado) para su degradación intracelular. 3- MAGL se expresa tanto en las terminales como dendritas del VMH, siendo su presencia mayor en estas últimas. Este hecho podría explicar la degradación de 2-AG en ambos perfiles, pero en base a nuestros resultados anatómicos hipotetizamos que la degradación ocurriría principalmente a nivel postsináptico. NT: neurotransmisor, R NT: receptor para el neurotransmisor, TRANSP: posible transportador de anandamida/2-AG.

6. CONCLUSIONES

En el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratón:

- 1- El receptor CB₁ se localiza en el 20% de las terminales sinápticas, sobre todo en las GABAérgicas, así como en las terminales sinápticas glutamatérgicas de origen subcortical y, en menor medida, de origen cortical; siendo la densidad de este receptor similar en las terminales excitadoras e inhibitoras (0,40-0,50 inmunopartículas/ μm).
- 2- El 40% de los astrocitos del núcleo son CB₁ inmunopositivos.
- 3- La enzima NAPE-PLD está presente a nivel presináptico y postsináptico, pero con una distribución preferente en dendritas al ser la mitad de ellas inmunopositivas.
- 4- El 60% de las dendritas del núcleo son FAAH positivas, lo que indica una clara localización de la enzima en perfiles postsinápticos.
- 5- La enzima DAGL- α tiene una franca localización postsináptica en las membranas del 54% de las dendritas y del 44% de las espinas dendríticas.
- 6- La enzima MAGL se distribuye en perfiles presinápticos y postsinápticos mayoritariamente en dendritas, al ser el 84% de ellas inmunopositivas para la enzima.
- 7- La densidad de marcado de FAAH en dendritas (8,6 inmunopartículas/ μm^2) es mucho mayor que la de las otras enzimas estudiadas (1,9-3,9 inmunopartículas/ μm^2), a la vez que la densidad de todas ellas es más homogénea en las terminales sinápticas (3,0-3,7 inmunopartículas/ μm^2).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006) The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci*, 26: 1551-1561.
- Agulhon C, Fiacco TA, McCarthy KD (2010) Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science*, 327: 1250-1254.
- Akesson TR, Mantyh PW, Mantyh CR, Matt DW, Micevych PE (1987) Estrous cyclicity of 125I-cholecystokinin octapeptide binding in the ventromedial hypothalamic nucleus. Evidence for downmodulation by estrogen. *Neuroendocrinology*, 45: 257-262.
- Akesson TR, Micevych PE (1991) Endogenous opioid-immunoreactive neurons of the ventromedial hypothalamic nucleus concentrate estrogen in male and female rats. *J Neurosci Res*, 28: 359-366.
- Altman J, Bayer SA (1986) The development of the rat hypothalamus. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 100: 1-178.
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*, 58: 315-348.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1999) Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can J Physiol Pharmacol*, 77: 699-706.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*, 63: 795-813.
- Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ (2006) Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *Eur J Pharmacol*, 539: 177-183.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 27: 1-4.
- Barrero FJ, Ampuero I, Morales B, Vives F, de Dios Luna Del Castillo J, Hoenicka J, Garcia Yébenes J (2005) Depression in Parkinson's disease is related to a genetic polymorphism of the cannabinoid receptor gene (CNR1). *Pharmacogenomics J*, 5: 135-141.
- Bartholomä A, Nave KA (1994) NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons. *Mech Dev*, 48: 217-228.
- Basavarajappa BS (2007) Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*, 14: 237-246.

- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science*, 295: 2282-2285.
- Bellocchio EE, Hu H, Pohorille A, Chan J, Pickel VM, Edwards RH (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci*, 18: 8648-8659.
- Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, Chaouloff F, Piazza PV, Marsicano G (2010) Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci*, 13: 281-283.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277: 1094-1097.
- Beltramo M, Piomelli D (2000) Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylethanolamide. *Neuroreport*, 11: 1231-1235.
- Bernardinelli Y, Salmon C, Jones EV, Farmer WT, Stellwagen D, Murai KK (2011) Astrocytes display complex and localized calcium responses to single-neuron stimulation in the hippocampus. *J Neurosci*, 31: 8905-8919.
- Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernandez ML, Romero J, Cebeira R, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (1998) Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development*, 125: 3179-3188.
- Berthoud HR (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*, 26: 393-428.
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ, Di Marzo V (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun*, 256: 377-380.
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarranian A, Finazzi-Agro A, Hillard C, Di Marzo V (2001) The uptake by cells of 2-arachidonylethanolamide, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem*, 268: 1982-1989.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*, 163: 463-468.

- Bisogno T (2008) Endogenous cannabinoids: structure and metabolism. *J Neuroendocrinol*, 20: 1-9.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, 14: 1347-1356.
- Blázquez C, Sánchez C, Daza A, Galve-Roperh I, Guzmán M (1999) The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem*, 72: 1759-1768.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*, 312: 637-641.
- Bowers G, Cullinan WE, Herman JP (1998) Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci*, 18: 5938-5947.
- Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF (2002) Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*, 298: 1793-1796.
- Breivogel CS, Sim LJ, Childers SR (1997) Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 282: 1632-1642.
- Brown AJ (2007) Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, 152: 567-575.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, 22: 183-192.
- Caenazzo L, Hoehe MR, Hsieh WT, Berrettini WH, Bonner TI, Gershon ES (1991) HindIII identifies a two allele DNA polymorphism of the human cannabinoid receptor gene (CNR). *Nucleic Acids Res*, 19: 4798.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1994) Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*, 348: 41-79.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-824.

- Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB (1995) Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci*, 15: 6340-6350.
- Chavarria-Siles I, Contreras-Rojas J, Hare E, Walss-Bass C, Quezada P, Dassori A, Contreras S, Medina R, Ramirez M, Salazar R, Raventos H, Escamilla MA (2008) Cannabinoid receptor 1 gene (CNR1) and susceptibility to a quantitative phenotype for hebephrenic schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147: 279-284.
- Chávez AE, Chiu CQ, Castillo PE (2010) TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 13: 1511-1518.
- Chee MJ, Myers MG Jr, Price CJ, Colmers WF (2010) Neuropeptide Y suppresses anorexigenic output from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*, 30: 3380-3390.
- Childers SR (2006) Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. *AAPS J*, 8: E112-E117.
- Coggeshall RE (1964) A study of diencephalic development in the albino rat. *J Comp Neurol*, 122: 241-269.
- Coirini H, Johnson AE, Schumacher M, McEwen BS (1992) Sex differences in the regulation of oxytocin receptors by ovarian steroids in the ventromedial hypothalamus of the rat. *Neuroendocrinology*, 55: 269-275.
- Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL (1998) Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci*, 63: PL113-PL117.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, 247: 470-473.
- Correa F, Mestre L, Molina-Holgado E, Arévalo-Martín A, Docagne F, Romero E, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2005) The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini Rev Med Chem*, 5: 671-675.
- Costa B, Colleoni M (2000) Changes in rat brain energetic metabolism after exposure to anandamide or Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Eur J Pharmacol*, 395: 1-7.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst

- AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, 112: 423-431.
- Cota D, Woods S (2005) The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*, 12: 338-351.
- Crandall JE, Tobet SA, Fischer I, Fox TO (1989) Age-dependent expression of microtubule-associated protein 2 in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Brain Res Bull*, 22: 571-574.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384: 83-87.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, 139: 1405-1415.
- Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V, Di Marzo V (2008) Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience*, 151: 955-968.
- Culhane ES, Carstens E (1988) Medial hypothalamic stimulation suppresses nociceptive spinal dorsal horn neurons but not the tail-flick reflex in the rat. *Brain Res*, 438: 137-144.
- Danise E, Oddi S, Bari M, Maccarrone M (2007) Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts. *Curr Med Chem*, 14: 2702-2715.
- Davis AM, Henion TR, Tobet SA (2002) Gamma-aminobutyric acid B receptors and the development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol*, 449: 270-280.
- Davis AM, Seney ML, Stallings NR, Zhao L, Parker KL, Tobet SA (2004a) Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurobiol*, 60: 424-436.
- Davis AM, Seney ML, Walker HJ, Tobet SA (2004b) Differential colocalization of Islet-1 and estrogen receptor alpha in the murine preoptic area and hypothalamus during development. *Endocrinology*, 145: 360-366.

- de Oliveira Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedroso MF, Da Costa JC, Quilfeldt JA (2006) AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res*, 1075: 60-67.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol*, 141: 765-774.
- De Petrocellis L, Marini P, Matias I, Moriello AS, Starowicz K, Cristino L, Nigam S, Di Marzo V (2007) Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Exp Cell Res*, 313: 2993-3004.
- De Vente J, Hopkins DA, Markerink-Van Ittersum M, Emson PD, Schmidt HHHW, Steinbusch HWM (1998) Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience*, 87: 207-241.
- Dellovade TL, Young M, Ross EP, Henderson R, Caron K, Parker K, Tobet SA (2000) Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J Comp Neurol*, 423: 579-589.
- Dellovade TL, Davis AM, Ferguson C, Sieghart W, Homanics GE, Tobet SA (2001) GABA influences the development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurobiol*, 49: 264-276.
- Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci*, 78: 549-563.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258: 1946-1949.
- Dewey WL (1986). Cannabinoid Pharmacology. *Pharmacol Rev*, 38: 151-178.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz J-C, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372: 686-691.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*, 21: 521-528.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410: 822-825.

- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 771-784.
- Di Marzo V, Matias I (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci*, 8: 585-589.
- Di Marzo V, Petrosino S (2007) Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol*, 18: 129-140.
- Díaz-Laviada I, Ruiz-Llorente L (2005) Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem*, 5: 619-630.
- Díaz-Laviada I (2009) Sistema cannabinoide endógeno: aspectos bioquímicos e implicación fisiológica. En: Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoideos. Coordinadores: Ramos JA, Fernández J, Guzmán M. *Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoideos*, 9-27.
- Dietrich MO, Horvath TL (2010) Neural regulation of food intake and energy balance. *Nature Reviews Neuroscience* (<http://www.nature.com/nrn/posters/feeding>).
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 10819-10824.
- Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D (2004) RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol*, 66: 1260-1264.
- Dufourny L, Warembourg M (2001) Projections from ventrolateral hypothalamic neurons containing progesterone receptors and somatostatin to the midbrain central gray in the female guinea pig. *Exp Brain Res*, 136: 50-59.
- Duysens J, Dom R, Gybels J (1989) Suppression of the hindlimb flexor reflex by stimulation of the medial hypothalamus and thalamus in the rat. *Brain Res*, 499: 131-140.
- Egertová M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR (1998) A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci*, 265: 2081-2085.
- Egertová M, Cravatt BF, Elphick MR (2003) Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*, 119: 481-496.

- Egertová M, Simon GM, Cravatt BF, Elphick MR (2008) Localization of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) expression in mouse brain: A new perspective on N-acylethanolamines as neural signaling molecules. *J Comp Neurol*, 506: 604-615.
- Elezgarai I, Bilbao A, Mateos JM, Azkue JJ, Benítez R, Osorio A, Díez J, Puente N, Doñate-Oliver F, Grandes P (2001) Group II metabotropic glutamate receptors are differentially expressed in the medial nucleus of the trapezoid body in the developing and adult rat. *Neuroscience*, 104: 487-498.
- Emery DE, Moss RL (1984) Lesions confined to the ventromedial hypothalamus decrease the frequency of coital contacts in female rats. *Horm Behav*, 18: 313-329.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 25: 1439-1451.
- Fahrbach SE, Morrell JI, Pfaff DW (1989) Studies of ventromedial hypothalamic afferents in the rat using three methods of HRP application. *Exp Brain Res*, 77: 221-233.
- Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A, Piomelli D (2004) Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 8756-8761.
- Felder Ch C, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie KP, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchel RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*, 48: 443-450.
- Felder Ch C, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*, 393: 231-235.
- Fellin T, Halassa MM, Terunuma M, Succol F, Takano H, Frank M, Moss SJ, Haydon PG (2009) Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 15037-15042.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 24: 722-732.

- Fiacco TA, Agulhon C, Taves SR, Petravicz J, Casper KB, Dong X, Chen J, McCarthy KD (2007) Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron*, 54: 611-626.
- Flanagan-Cato LM, Calizo LH, Daniels D (2001) The synaptic organization of VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behavior. *Horm Behav*, 40: 178-182.
- Fowler CJ, Jacobsson SO (2002) Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide--targets for drug development? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66: 193-200.
- Fremeau RT Jr, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, 31: 247-260.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, 83: 1017-1066.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guijarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D (2011) A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci*, 15: 64-69.
- Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 435: 379-387.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon S, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232: 54-61.
- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, Shen R, Zhang MY, Strassle BW, Lu P, Mark L, Piesla MJ, Deng K, Kouranova EV, Ring RH, Whiteside GT, Bates B, Walsh FS, Williams G, Pangalos MN, Samad TA, Doherty P (2010) Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*, 30: 2017-2024.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*, 86: 1646-1647.

- Gazzerro P, Caruso MG, Notarnicola M, Misciagna G, Guerra V, Laezza C, Bifulco M (2007) Association between cannabinoid type-1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population. *Int J Obes*, 31: 908-912.
- Gérard C, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1990) Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res*, 18: 7142.
- Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J*, 279: 129-134.
- Giaume C, Venance L (1998) Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*, 24: 50-64.
- Gifford AN, Bruneus M, Lin S, Goutopoulos A, Makriyannis A, Volkow ND, Gatley SJ (1999) Potentiation of the action of anandamide on hippocampal slices by the fatty acid amide hydrolase inhibitor, palmitylsulphonyl fluoride (AM 374). *Eur J Pharmacol*, 383: 9-14.
- Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG (2003) Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 4269-4274.
- Glass M, Dragunow M, Faull R (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, 77: 299-318.
- Gordon GR, Iremonger KJ, Kantevari S, Ellis-Davies GC, MacVicar BA, Bains JS (2009) Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses. *Neuron*, 64: 391-403.
- Gray PA, Fu H, Luo P, Zhao Q, Yu J, Ferrari A, Tenzen T, Yuk D-I, Tsung EF, Cai Z, Alberta JA, Cheng L-p, Liu Y, Stenman JM, Valerius MT, Billings N, Kim HA, Greenberg ME, McMahon AP, Rowitch DH, Stiles CD, Ma Q (2004) Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis. *Science*, 306: 2255-2257.
- Grueter BA, Brasnjo G, Malenka RC (2010) Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, 13: 1519-1525.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*, 48: 23-29.

- Guindon J, De Lean A, Beaulieu P (2006) Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain*, 121: 85-93.
- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boschia F, Freund TF (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*, 20: 441-458.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*, 27: 6473-6477.
- Han J, Kesner P, Metna-Laurent M, Duan T, Xu L, Georges F, Koehl M, Abrous DN, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Liu Q, Bai G, Wang W, Xiong L, Ren W, Marsicano G, Zhang X (2012) Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB(1) receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, 148: 1039-1050.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 3662-3665.
- Harlan RE, Shivers BD, Romano GJ, Howells RD, Pfaff DW (1987) Localization of preproenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization. *J Comp Neurol*, 258: 159-184.
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M (2007) Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci*, 27: 1211-1219.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev*, 86: 1009-1031.
- Hegyí Z, Kis G, Holló K, Ledent C, Antal M (2009) Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord. *Eur J Neurosci*, 30: 251-262.
- Heimer L, Nauta WJ (1969) The hypothalamic distribution of the stria terminalis in the rat. *Brain Res*, 13: 284-297.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*, 463: 232-236.

- Herbison AE (1994) Somatostatin-immunoreactive neurons in the hypothalamic ventromedial nucleus possess oestrogen receptors in the male and female rat. *J Neuroendocrinol*, 6: 323-328.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 1932-1936.
- Herkenham M, Lynn A, Johnson M, Melvin L, De Costa B, Rice K (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, 11: 563-583.
- Herzog ED, Muglia LJ (2006) You are when you eat. *Nat Neurosci*, 9: 300-302.
- Higuchi S, Irie K, Mishima S, Araki M, Ohji M, Shirakawa A, Akitake Y, Matsuyama K, Mishima K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M (2010) The cannabinoid 1-receptor silent antagonist O-2050 attenuates preference for high-fat diet and activated astrocytes in mice. *J Pharmacol Sci*, 112: 369-372.
- Hirasawa M, Nishihara M, Takahashi M (1996) Neural activity in the VMH associated with suppression of the circulatory system in rats. *Physiol Behav*, 59: 1017-1023.
- Hirrlinger PG, Scheller A, Braun C, Hirrlinger J, Kirchhoff F (2006) Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. *Glia*, 54: 11-20.
- Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES, Bonner TI (1991) Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol*, 3: 880-885.
- Hof PR, de Vellis J, Nimchinsky EA, Kidd G, Claudio L, Trapp BD (2008) Cellular components of nervous tissue. En: *Fundamental Neuroscience*, 3rd edition. Eds Squire LR, Berg D, Bloom FE, du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC. *Academic Press, Elsevier*, 47-53.
- Hosoi M, Oka T, Abe M, Hori T, Yamamoto H, Mine K, Kubo C (1999) Prostaglandin E(2) has antinociceptive effect through EP(1) receptor in the ventromedial hypothalamus in rats. *Pain*, 83: 221-227.
- Howlett AC (1995) Pharmacology of cannabinoid receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 35: 607-634.
- Howlett AC (1998) The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis*, 5: 405-416.

- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54: 161-202.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, 47: 345-358.
- Hrabovszky E, Halász J, Meelis W, Kruk MR, Liposits Z, Haller J (2005) Neurochemical characterization of hypothalamic neurons involved in attack behavior: glutamatergic dominance and co-expression of thyrotropin-releasing hormone in a subset of glutamatergic neurons. *Neuroscience*, 133: 657-666.
- Hrabovszky E, Wittmann G, Kalló I, Füzesi T, Fekete C, Liposits Z (2012) Distribution of type 1 cannabinoid receptor-expressing neurons in the septal-hypothalamic region of the mouse: colocalization with GABAergic and glutamatergic markers. *J Comp Neurol*, 520: 1005-1020.
- Hsuchou H, He Y, Kastin AJ, Tu H, Markadakis EN, Rogers RC, Fossier PB, Pan W (2009) Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain*, 132: 889-902.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8400-8405
- Hyypä M (1969) Differentiation of the hypothalamic nuclei during ontogenetic development in the rat. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 129: 41-52.
- Idris AI, van't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, Ralston SH (2005) Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med*, 11: 774-779.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunus G (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol*, 118: 2023-2028.
- Jamshidi N, Taylor DA (2001) Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*, 134: 1151-1154.

- Jelsing J, Larsen PJ, Vrang N (2008) Identification of cannabinoid type 1 receptor expressing cocaine amphetamine-regulated transcript neurons in the rat hypothalamus and brainstem using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neuroscience*, 154: 641-652.
- Jin XH, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2007) Discovery and characterization of a Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *J Biol Chem*, 282: 3614-3623.
- Johnson AE, Coirini H, Ball GF, McEwen BS (1989) Anatomical localization of the effects of 17 beta-estradiol on oxytocin receptor binding in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Endocrinology*, 124: 207-211.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*, 10: 331-339.
- Juan-Picó P, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ, Javier Díaz-Molina F, Ripoll C, Rodríguez de Fonseca F, Nadal A (2006) Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*, 39: 155-162.
- Jung KM, Astarita G, Zhu C, Wallace M, Mackie K, Piomelli D (2007) A key role for diacylglycerol lipase- α in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization. *Mol Pharmacol*, 72: 612-621.
- Kamegai J, Wakabayashi I, Kineman RD, Frohman LA (1999) Growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) and growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) mRNA levels during postnatal development in male and female rats. *J Neuroendocrinol*, 11: 299-306.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2001) Sistema nervioso autónomo e hipotálamo. En: Principios de Neurociencia, 4ª edición. *McGraw-Hill Interamericana*, 977-978.
- Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H (2002) Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J Comp Neurol*, 444: 39-62.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*, 1: 683-692.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, 89: 309-380.

- Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem*, 272: 27218-27223.
- Karlsson M, Reue K, Xia YR, Lusic AJ, Langin D, Tornqvist H, Holm C (2001) Exon-intron organization and chromosomal localization of the mouse monoglyceride lipase gene. *Gene*, 272: 11-18
- Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 26: 5628-5637.
- Kauer JA, Gibson HE (2009) Hot flash: TRPV channels in the brain. *Trends Neurosci*, 32: 215-224.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci*, 26: 2991-3001.
- King BM (2006) The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 87: 221-244.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol*, 136: 550-557.
- Kiss J, Csáki A, Halász B (2011) Location of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic ventromedial nucleus studied by autoradiography of retrogradely transported [³H]D-aspartate. *Neuroscience*, 176: 210-224.
- Klein TW, Friedman H, Specter S (1998) Marijuana, immunity and infection. *J Neuroimmunol*, 83: 102-115.
- Kleppisch T, Wolfsgruber W, Feil S, Allmann R, Wotjak CT, Goebbels S, Nave KA, Hofmann F, Feil R (2003) Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci*, 23: 6005-6012.
- Koutcherov Y, Mai JK, Ashwell KW, Paxinos G (2002) Organization of human hypothalamus in fetal development. *J Comp Neurol*, 446: 301-324.

- Labar G, Michaux C (2007) Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem Biodivers*, 4: 1882-1902.
- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ (2007) Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One*, 2: e709.
- Lajtha AL, Maker HS, Clarke DD (1981) Metabolism and transport of carbohydrates and amino acids. En: Basic Neurochemistry. Eds Siegal GJ, Albers RW, Agranoff BW, Katzman R. *Little, Brown*, 329-353.
- Lee J, Di Marzo V, Brotchie JM (2006) A role for vanilloid receptor 1 (TRPV1) and endocannabinoid signalling in the regulation of spontaneous and L-DOPA induced locomotion in normal and reserpine-treated rats. *Neuropharmacology*, 51: 557-565.
- Leedy MG, Hart BL (1985) Female and male sexual responses in female cats with ventromedial hypothalamic lesions. *Behav Neurosci*, 99: 936-941.
- Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA (2004) Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, 141: 253-262.
- Levitt P, Rakic P (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol*, 193: 815-840.
- Ligresti A, Morera E, Van Der Stelt M, Monory K, Lutz B, Ortar G, Di Marzo V (2004) Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem J*, 380: 265-272.
- Little PJ, Compton DR, Johnson MR, Melvin LS, Martin BR (1988) Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 247: 1046-1051.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim H y cols (2008) Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacol*, 54: 1-7.
- Luo X, Ikeda Y, Lala D, Rice D, Wong M, Parker KL (1999) Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for endocrine development and function. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69: 13-18.
- Mackie K (2006) Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obes (Lond)*, 30: S19-S23.

- Mackie K (2008a) Introduction to the Endocannabinoid System. Cell Biology of the Endocannabinoid System. En: The Endocannabinoid System Handbook. Contributors: Brewer HB, Cota D, Cravatt BF, Di Marzo V, Ginsberg HN, Howlett A, Reggio PH, Woods SC. *Beth Israel Medical Center & Scientiae, LLC*, 3-12 & 15-26.
- Mackie K (2008b) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 286: S60-S65.
- Magistretti PJ, Sorg O, Yu N, Martin JL, Pellerin L (1993) Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. *Dev Neurosci*, 15: 306-312.
- Magistretti P (2000) Cellular bases of functional brain imaging: insights from neuron-glia metabolic coupling. *Brain Res*, 886: 108-112.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 48: 655-668.
- Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, McGarry JD, Parker KL (2002) Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*, 143: 607-614.
- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*, 11: 4213-4225.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418: 530-534.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 302: 84-88.
- Martin BR, Mechoulam R, Razdan RK (1999) Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci*, 65: 573-595.
- Matias I, Bisogno T, Di Marzo V (2006) Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obesity*, 30: S7-S12.

- Matias I, Di Marzo V (2007) Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab*, 18: 27-37.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346: 561-564.
- McClellan KM, Parker KL, Tobet S (2006) Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*, 27: 193-209.
- McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA, Barker EL (2004) A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem*, 279: 41991-41997.
- McPartland JM, Matias I, Di Marzo V, Glass M (2006) Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene*, 370: 64-74.
- Mechoulam R, Hanus L, Martin BR (1994) Search for endogenous ligands of the cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 48: 1537-1544.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50: 83-90.
- Meister B (2007) Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 92: 263-271.
- Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3655-3660.
- Mikics E, Dombi T, Barsvári B, Varga B, Ledent C, Freund TF, Haller J (2006) The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. *Behav Pharmacol*, 17: 223-230.
- Millhouse OE (1973) The organization of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res*, 55: 71-87.
- Miyata I, Shiota C, Chaki S, Okuyama S, Inagami T (2001) Localization and characterization of a short isoform of the corticotrophin-releasing factor receptor type 2 alpha (CRF(2)alpha-tr) in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 280: 553-557.

- Moldrich G, Wenger T (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*, 21: 1735-1742.
- Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM, Rothwell NJ (2003) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci*, 23: 6470-6474.
- Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, Düring M, Klugmann M, Wölfel B, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B (2006) The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, 51: 455-466.
- Morishita J, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueno M, Sakamoto H, Maekawa N, Ueda N (2005) Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain. *J Neurochem*, 94: 753-762.
- Morrell JI, Pfaff DW (1982) Characterization of estrogen-concentrating hypothalamic neurons by their axonal projections. *Science*, 217: 1273-1276.
- Muccioli GG, Xu C, Odah E, Cudaback E, Cisneros JA, Lambert DM, Lopez Rodriguez ML, Bajjalieh S, Stella N (2007) Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J Neurosci*, 27: 2883-2889.
- Mukherjee K, Mathur R, Nayar U (2002) Hyperalgesic response in rats fed sucrose from weaning to adulthood: role of VMH. *Pharmacol Biochem Behav*, 73: 601-610.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365: 61-65.
- Nakamura K, Kimura S, Yamazaki M, Kawaguchi A, Inoue K, Sakai T (2001) Immunohistochemical analyses of thyroid-specific enhancer-binding protein in the fetal and adult rat hypothalamus and pituitary glands. *Brain Res Dev Brain Res*, 130: 159-166.
- Narita M, Suzuki M, Kuzumaki N, Miyatake M, Suzuki T (2008) Implication of activated astrocytes in the development of drug dependence: differences between methamphetamine and morphine. *Ann N Y Acad Sci*, 1141: 96-104.
- Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, 57: 883-893.

- Navarrete M, Araque A (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*, 68: 113-126.
- Nielsen KH, Blaustein JD (1990) Many progesterin receptor-containing neurons in the guinea pig ventrolateral hypothalamus contain substance P: immunocytochemical evidence. *Brain Res*, 517: 175-181.
- Nixdorf-Bergweiler BE, Albrecht D, Heinemann U (1994) Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia*, 12: 180-195.
- Norrod AG, Puffenberger RA (2007) Genetic polymorphisms of the endocannabinoid system. *Chem Biodivers*, 4: 1926-1932.
- Nyilas R, Dudok B, Urbán GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I (2008) Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J Neurosci*, 28: 1058-1063.
- Nyíri G, Cserép C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005) CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience*, 136: 811-822.
- Ohata H, Suzuki K, Oki Y, Shibasaki T (2000) Urocortin in the ventromedial hypothalamic nucleus acts as an inhibitor of feeding behavior in rats. *Brain Res*, 861: 1-7.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*, 279: 5298-5305.
- Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N (2007) Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers*, 4: 1842-1857.
- Oudin MJ, Hobbs C, Doherty P (2011) DAGL-dependent endocannabinoid signalling: roles in axonal pathfinding, synaptic plasticity and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 34: 1634-1646.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*, 27: 73-100.
- Pan W, Hsueh H, Xu C, Wu X, Bouret SG, Kastin AJ (2011) Astrocytes modulate distribution and neuronal signaling of leptin in the hypothalamus of obese A^{vy} mice. *J Mol Neurosci*, 43: 478-484.

- Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci*, 4: 803-812.
- Perea G, Araque A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*, 38: 375-382.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, 317: 1083-1086.
- Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*, 74: 129-180.
- Pertwee RG (2000) Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Exp Opin Invest Drugs*, 9: 1553-1571.
- Pertwee RG (2008) Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol*, 13: 147-159.
- Petravicz J, Fiacco TA, McCarthy KD (2008) Loss of IP3 receptor-dependent Ca²⁺ increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *J Neurosci*, 28: 4967-4973.
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie X-Q, Makriyannis A (1999) Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5802-5807.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 4: 873-884.
- Ponce G, Hoenicka J, Rubio G, Ampuero I, Jimenez-Arriero MA, Rodriguez-Jimenez R, Palomo T, Ramos JA (2003) Association between cannabinoid receptor gene (CNR1) and childhood attention deficit/hyperactivity disorder in Spanish male alcoholic patients. *Mol Psychiatry*, 8: 466-467.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci*, 16: 5073-5081.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301: 1020-1024.

- Puente N, Elezgarai I, Lafourcade M, Reguero L, Marsicano G, Georges F, Manzoni OJ, Grandes P (2010) Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PLoS One*, 5: e8869.
- Puente N, Cui Y, Lassalle O, Lafourcade M, Georges F, Venance L, Grandes P, Manzoni OJ (2011) Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci*, 14: 1542-1547.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM (2008) Sistema motor visceral. En: Neurociencia, 3ª edición. *Editorial Médica Panamericana*, 484-486.
- Rakic P, Cameron RS, Komuro H (1994) Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol*, 4: 63-69.
- Ramos JA, Fernández J, Guzmán M (2009) Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoides. *Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides*.
- Reguero L, Puente N, Elezgarai I, Mendizabal-Zubiaga J, Canduela MJ, Buceta I, Ramos A, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Marsicano G, Grandes P (2011) GABAergic and cortical and subcortical glutamatergic axon terminals contain CB1 cannabinoid receptors in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *PLoS One*, 6: e26167.
- Rhodes DL, Liebeskind JC (1978) Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. *Brain Res*, 143: 521-532.
- Ringstedt T, Braisted JE, Brose K, Kidd T, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, O'Leary DD (2000) Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervations patterns in the diencephalon. *J Neurosci*, 20: 4983-4991.
- Roberts JC, Davis JB, Benham CD (2004) [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res*, 995: 176-183.
- Rodríguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci*, 21: 823-833.
- Romano GJ, Mobbs CV, Lauber A, Howells RD, Pfaff DW (1990) Differential regulation of proenkephalin gene expression by estrogen in the ventromedial hypothalamus of male and female rats: implications for the molecular basis of a sexually differentiated behavior. *Brain Res*, 536: 63-68.

- Romero J, Wenger T, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ (1998) Cannabinoid receptor binding did not vary in several hypothalamic nuclei after hypothalamic deafferentation. *Life Sci*, 63: 351-356.
- Rubin BS, Barfield RJ (1983) Induction of estrous behavior in ovariectomized rats by sequential replacement of estrogen and progesterone to the ventromedial hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 37: 218-224.
- Russo P, Strazzullo P, Cappuccio FP, Tregouet DA, Lauria F, Loguercio M, Barba G, Versiero M, Siani A (2007) Genetic variations at the endocannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) are associated with obesity phenotypes in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 2382-2386.
- Saario SM, Savinainen JR, Laitinen JT, Jarvinen T, Niemi R (2004) Monoglyceride lipase-like enzymatic activity is responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes. *Biochem Pharmacol*, 67: 1381-1387.
- Sagredo O, García-Arencibia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J (2007) Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol*, 36: 82-91.
- Sakata-Haga H, Kanemoto M, Maruyama D, Hoshi K, Mogi K, Narita M, Okado N, Ikeda Y, Nogami H, Fukui Y, Kojima I, Takeda J, Hisano S (2001) Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res*, 902: 143-155.
- Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M (2002) Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett*, 329: 13-16.
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzmán M (1998) Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol*, 54: 834-843.
- Sanchez JF, Krause JE, Cortright DN (2001a) The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience*, 107: 373-381.
- Sánchez C, Rueda D, Ségui B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzmán M (2001b) The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol*, 59: 955-959.

- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM (1976) The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol*, 169: 409-442.
- Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, Kuraishi Y (1998) Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport*, 9: 2045-2048.
- Schambra UB, Silver J, Lauder JM (1991) An atlas of the prenatal mouse brain: gestational day 14. *Exp Neurol*, 114: 145-183.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski EN (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol*, 141: 278-287.
- Schwab MH, Bartholomae A, Heimrich B, Feldmeyer D, Druffel-Augustin S, Goebels S, Naya FJ, Zhao S, Frotscher M, Tsai MJ, Nave KA (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci*, 20: 3714-3724.
- Schwenk F, Baron U, Rajewsky K (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, 23: 5080-5081.
- Segal JP, Stallings NR, Lee CE, Zhao L, Socci N, Viale A, Harris TM, Soares MB, Childs G, Elmquist JK, Parker KL, Friedman JM (2005) Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurosci*, 25: 4181-4188.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R (2006) GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci*, 26: 5370-5382.
- Shimada M, Nakamura T (1973) Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. *Exp Neurol*, 41: 163-173.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem*, 270: 3726-3731.
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, 294: 76-95.

- Simon GM, Cravatt BF (2006) Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acylethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem*, 281: 26465-26472.
- Sipe JC, Chiang K, Gerber AL, Beutler E, Cravatt BF (2002) A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8394-8399.
- Sipe JC, Waalen J, Gerber A, Beutler E (2005) Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Int J Obes (Lond)*, 29: 755-759.
- Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D (2008) The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol*, 154: 369-383.
- Sorg O, Magistretti PJ (1991) Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Res*, 563: 227-233.
- Stahel PF, Smith WR, Bruchis J, Rabb CH (2008) Peroxisome proliferator-activated receptors: "key" regulators of neuroinflammation after traumatic brain injury. *PPAR Res*, 2008: 538141-538148.
- Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V (2007) Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther*, 114: 13-33.
- Stefanini M, De Martino C, Zamboni L (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216: 173-174.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388: 773-778.
- Stella N (2004) Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*, 48: 267-277.
- Stella N (2010) Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*, 58: 1017-1030.
- Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM (2005) Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci*, 8: 1356-1363.
- Stühmer T, Puelles L, Ekker M, Rubenstein JL (2002) Expression from a Dlx gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons. *Cereb Cortex*, 12: 75-85.

- Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt BF, de Fonseca FR (2008) Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol*, 509: 400-421.
- Suárez J, Romero-Zerbo SY, Rivera P, Bermúdez-Silva FJ, Pérez J, De Fonseca FR, Fernández-Llebrez P (2010) Endocannabinoid system in the adult rat circumventricular areas: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol*, 518: 3065-3085.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215: 89-97.
- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Miyashita T, Kondo S, Suhara Y, Takayama H, Waku K, Seki C, Baba N, Ishima Y (1999) Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem*, 274: 2794-2801.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*, 45: 405-446.
- Sugiyama N, Kanba S, Arita J (2003) Temporal changes in the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 115: 69-77.
- Sun Y, Bennett A (2007) Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res*, 2007: 23513-23520.
- Thanos PK, Ramalhete RC, Michaelides M, Piyis YK, Wang GJ, Volkow ND (2008) Leptin receptor deficiency is associated with upregulation of cannabinoid 1 receptors in limbic brain regions. *Synapse*, 62: 637-642.
- Thomas EA, Cravatt BF, Danielson PE, Gilula NB, Sutcliffe JG (1997) Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. *J Neurosci Res*, 50: 1047-1052.
- Tobet SA, Fox TO (1989) Sex- and hormone-dependent antigen immunoreactivity in developing rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 382-386.

- Tobet SA, Henderson RG, Whiting PJ, Sieghart W (1999) Special relationship of gamma-aminobutyric acid to the ventromedial nucleus of the hypothalamus during embryonic development. *J Comp Neurol*, 405: 88-98.
- Tornqvist H, Belfrage P (1976) Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J Biol Chem*, 251: 813-819.
- Tran PV, Lee MB, Marín O, Xu B, Jones KR, Reichardt LF, Rubenstein JR, Ingraham HA (2003) Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Mol Cell Neurosci*, 22: 441-453.
- Tsai SY, Tsai MJ (1997) Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocr Rev*, 18: 229-240.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83: 393-411.
- Turcotte JC, Blaustein JD (1999) Projections of the estrogen receptor-immunoreactive ventrolateral hypothalamus to other estrogen receptor-immunoreactive sites in female guinea pig brain. *Neuroendocrinology*, 69: 63-76.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci*, 27: 3663-3676.
- Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M (2011) Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 31: 7700-7714.
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T (1995) Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem*, 270: 23823-23827.
- Ujike H, Morita Y (2004) New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: cannabinoid receptors and schizophrenia. *J Pharmacol Sci*, 96: 376-381.
- Van Der Stelt M, Di Marzo V (2004) Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem*, 271: 1827-1834.

- van der Stelt M, Trevisani M, Vellani V, De Petrocellis L, Schiano Moriello A, Campi B, McNaughton P, Geppetti P, Di Marzo V (2005a) Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca^{2+} influx via TRPV1 channels. *Embo J*, 24: 3026-3037.
- van der Stelt M, Di Marzo V (2005b) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*, 7: 37-50.
- van Eerdenburg FJ, Rakic P (1994) Early neurogenesis in the anterior hypothalamus of the rhesus monkey. *Brain Res Dev Brain Res*, 79: 290-296.
- Van Houten M, Brawer JR (1978) Cytology of neurons of the hypothalamic ventromedial nucleus in the adult male rat. *J Comp Neurol*, 178: 89-116.
- Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol*, 428: 191-212.
- Vandevorode S, Lambert DM (2007) The multiple pathways of endocannabinoid metabolism: a zoom out. *Chem Biodivers*, 4: 1858-1881.
- Varoqui H, Schäfer MK, Zhu H, Weihe E, Erickson JD (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 22: 142-155.
- Volterra A, Bezzi P (2002) Release of transmitters from glial cells. In: The tripartite synapse: glia in synaptic transmission. Eds Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG. *Oxford University Press*, 164-184.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, 6: 626-640.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton J-Y, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron*, 37: 275-286.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N (2002) Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem*, 277: 20869-20876.
- Walter L, Stella N (2003) Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia*, 44: 85-90.

- Wan M, Cravatt BF, Ring HZ, Zhang X, Francke U (1998) Conserved chromosomal location and genomic structure of human and mouse fatty-acid amide hydrolase genes and evaluation of clasper as a candidate neurological mutation. *Genomics*, 54: 408-414.
- Wang X, Day JR, Vasilatos-Younken R (2001) The distribution of neuropeptide Y gene expression in the chicken brain. *Mol Cell Endocrinol*, 174: 129-136.
- Wang J, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Miyatake A, Ueda N (2006a) Functional analysis of the purified anandamide-generating phospholipase D as a member of the metallo-beta-lactamase family. *J Biol Chem*, 281: 12325-12335.
- Wang H, Dey SK, Maccarrone M (2006b) Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr Rev*, 27: 427-448.
- Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF (2006) A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem*, 281: 36569-36578.
- Wettschureck N, van der Stelt M, Tsubokawa H, Krestel H, Moers A, Petrosino S, Schütz G, Di Marzo V, Offermanns S (2006) Forebrain-specific inactivation of Gq/G11 family G proteins results in age-dependent epilepsy and impaired endocannabinoid formation. *Mol Cell Biol*, 26: 5888-5894.
- Whorf RC, Tobet SA (1992) Expression of the Raf-1 protein in rat brain during development and its hormonal regulation in hypothalamus. *J Neurobiol*, 23: 103-119.
- Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, Alekseeva OO, Razdan RK, Mahadevan A, Martin BR (2005) CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br J Pharmacol*, 145: 293-300.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296: 678-682.
- Wittmann G, Deli L, Kalló I, Hrabovszky E, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C (2007) Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol*, 503: 270-279.
- Wu SX, Goebbels S, Nakamura K, Nakamura K, Kometani K, Minato N, Kaneko T, Nave KA, Tamamaki N (2005) Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 17172-17177.

- Yamaguchi H, Zhou C, Lin SC, Durand B, Tsai SY, Tsai MJ (2004) The nuclear orphan receptor COUP-TFI is important for differentiation of oligodendrocytes. *Dev Biol*, 266: 238-251.
- Yee CL, Wang Y, Anderson S, Ekker M, Rubenstein JL (2009) Arcuate nucleus expression of NKX2.1 and DLX and lineages expressing these transcription factors in neuropeptide Y(+), proopiomelanocortin(+), and tyrosine hydroxylase(+) neurons in neonatal and adult mice. *J Comp Neurol*, 517: 37–50.
- Yokosuka M, Okamura H, Hayashi S (1997) Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor- α immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon and the amygdala in the rat. *J Comp Neurol*, 389: 81-93.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M (2006) Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci*, 26: 4740-4751.
- Zerucha T, Stühmer T, Hatch G, Park BK, Long Q, Yu G, Gambarotta A, Schultz JR, Rubenstein JL, Ekker M (2000) A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *J Neurosci*, 20: 709-721.
- Zhou CJ, Kikuyama S, Shibamura M, Hirabayashi T, Nakajo S, Arimura A, Shioda S (2000) Cellular distribution of the splice variants of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC(1)-R) in the rat brain by in situ RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res*, 75: 150-158.
- Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V (2012) Astroglial excitability and gliotransmission: An appraisal of Ca²⁺ as a signaling route. *ASN Neuro*, 4: e00080.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400: 452-457.

ANEXO I

GABAergic and Cortical and Subcortical Glutamatergic Axon Terminals Contain CB₁ Cannabinoid Receptors in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus

Leire Reguero¹, Nagore Puente¹, Izaskun Elezgarai¹, Juan Mendizabal-Zubiaga¹, Miren Josune Canduela¹, Ianire Buceta¹, Almudena Ramos¹, Juan Suárez², Fernando Rodríguez de Fonseca², Giovanni Marsicano³, Pedro Grandes^{1*}

1 Department of Neurosciences, Faculty of Medicine and Dentistry, Basque Country University, Leioa, Spain, **2** Fundación IMABIS, Málaga, Spain, **3** "Endocannabinoids and Neuroadaptation", INSERM U862 NeuroCentre Magendie, Université Bordeaux 2, Bordeaux, France

Abstract

Background: Type-1 cannabinoid receptors (CB₁R) are enriched in the hypothalamus, particularly in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) that participates in homeostatic and behavioral functions including food intake. Although CB₁R activation modulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in the brain, CB₁R contribution to the molecular architecture of the excitatory and inhibitory synaptic terminals in the VMH is not known. Therefore, the aim of this study was to investigate the precise subcellular distribution of CB₁R in the VMH to better understand the modulation exerted by the endocannabinoid system on the complex brain circuitries converging into this nucleus.

Methodology/Principal Findings: Light and electron microscopy techniques were used to analyze CB₁R distribution in the VMH of CB₁R-WT, CB₁R-KO and conditional mutant mice bearing a selective deletion of CB₁R in cortical glutamatergic (Glu-CB₁R-KO) or GABAergic neurons (GABA-CB₁R-KO). At light microscopy, CB₁R immunolabeling was observed in the VMH of CB₁R-WT and Glu-CB₁R-KO animals, being remarkably reduced in GABA-CB₁R-KO mice. In the electron microscope, CB₁R appeared in membranes of both glutamatergic and GABAergic terminals/preterminals. There was no significant difference in the percentage of CB₁R immunopositive profiles and CB₁R density in terminals making asymmetric or symmetric synapses in CB₁R-WT mice. Furthermore, the proportion of CB₁R immunopositive terminals/preterminals in CB₁R-WT and Glu-CB₁R-KO mice was reduced in GABA-CB₁R-KO mutants. CB₁R density was similar in all animal conditions. Finally, the percentage of CB₁R labeled boutons making asymmetric synapses slightly decreased in Glu-CB₁R-KO mutants relative to CB₁R-WT mice, indicating that CB₁R was distributed in cortical and subcortical excitatory synaptic terminals.

Conclusions/Significance: Our anatomical results support the idea that the VMH is a relevant hub candidate in the endocannabinoid-mediated modulation of the excitatory and inhibitory neurotransmission of cortical and subcortical pathways regulating essential hypothalamic functions for the individual's survival such as the feeding behavior.

Citation: Reguero L, Puente N, Elezgarai I, Mendizabal-Zubiaga J, Canduela MJ, et al. (2011) GABAergic and Cortical and Subcortical Glutamatergic Axon Terminals Contain CB₁ Cannabinoid Receptors in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus. PLoS ONE 6(10): e26167. doi:10.1371/journal.pone.0026167

Editor: Laurent Groc, Institute for Interdisciplinary Neuroscience, France

Received: July 1, 2011; **Accepted:** September 21, 2011; **Published:** October 11, 2011

Copyright: © 2011 Reguero et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: L. Reguero is in receipt of a Predoctoral Fellowship from the Basque Country Government (BFI 07.286); I. Buceta is in receipt of a Predoctoral Fellowship from the Basque Country University. Dr. Pedro Grandes' laboratory is supported by The Basque Country Government grant GIC07/70-IT-432-07, by Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-07065) and by Red de Trastornos Adictivos, RETICS, Instituto de Salud Carlos III, MICINN, grant RD07/0001/2001. Dr. Giovanni Marsicano's laboratory is supported by AVENIR/INSERM (with the Fondation Bettencourt-Schueller), by ANR (ANR-06-NEURO-043-01), by European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD), by the EU-FP7 (REPROBESITY, contract number HEALTH-F2-2008-223713) and European Commission Coordination Action ENINET (contract number LSHM-CT-2005-19063). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pedro.grandes@ehu.es

Introduction

The hypothalamus plays a crucial role in regulating energy balance and food intake [1]. The ventromedial nucleus (VMH) is placed in the tuberal region of the hypothalamus and is associated with several homeostatic and behavioral functions, including regulation of appetite, energy balance, sexual behavior, anxiety, thermogenesis, cardiovascular functions and pain [2,3]. Functionally, the dorsomedial VMH participates in the regulation of energy homeostasis, whereas the ventrolateral VMH controls female reproduction [2,4].

While the large majority of VMH neurons expresses abundant vesicular glutamate transporter VGLUT2 mRNA [5–7], only weak GAD65 mRNA and GAD67 mRNA signals are observed in this nucleus [6,7]. The VMH is surrounded by hypothalamic GABAergic neurons [8] and about 12% of the ventrolateral VMH neurons are GABAergic [6].

The VMH has been proposed as a satiety nucleus that provides a strong excitatory input to arcuate neurons, contributing to the activation of anorexigenic neuronal pathways [9,10]. The endocannabinoid system is implicated in endocrine regulation

and energy balance. The derivatives of *Cannabis sativa* are well known to regulate food intake and the endocannabinoid system controls neuronal signaling in hypothalamic networks [11]. Although low levels of cannabinoid receptors are present in the hypothalamic nuclei [12,13], their efficiency is higher than in other brain regions [14]. Moreover, specific cannabinoid receptor binding is found in several hypothalamic areas, including the VMH, which also expresses high levels of CB₁R mRNA [13]. Although the overall CB₁R immunolabeling intensity is much lower in the hypothalamus than in other brain regions, the VMH, in particular, exhibits a moderate CB₁R immunostaining [15].

The levels of the two main endocannabinoids, anandamide and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), in the hypothalamus are higher during fasting and lower following food intake reaching a critical point that favors a motivational state for food intake [11,16–18]. The administration of anandamide into the VMH also stimulates appetite in rats [19]. In contrast, both chronically-treated animals with CB₁R antagonists [11,20,21] and CB₁R null mice [11,20,22] display an anorexic phenotype. Furthermore, activation of presynaptic CB₁R inhibits the excitatory and inhibitory neurotransmission in neuronal circuits involved in eating behaviors [11,18,23–25]. Indeed, *Glu-CB₁R-KO* conditional mice that do not express CB₁R in neurons of cortical origin exhibit a hypophagic phenotype after food deprivation very similar to the full *CB₁R-KO*. On the contrary, *GABA-CB₁R-KO* mutants that lack CB₁R in forebrain GABAergic neurons are hyperphagic under the same experimental conditions [26].

Taken together, it is well established that the endocannabinoid system exerts a neuronal modulation through the activation of presynaptic CB₁R localized on both excitatory and inhibitory pathways in distinct brain networks regulating homeostatic and behavioral functions including food intake. In view of the described observations that both the endocannabinoid system and the VMH play a role in ingestive behaviors, the aim of this study was to analyze the CB₁R contribution to the molecular architecture of the excitatory and inhibitory synaptic terminals in the mouse VMH. For this purpose, preembedding immunocytochemical techniques for light and high resolution electron microscopy were used. Highly specific CB₁R antibodies were applied to the VMH of conditional mutant mice with a selective deletion of CB₁R mainly from cortical glutamatergic (*Glu-CB₁R-KO*) and mainly from forebrain GABAergic neurons (*GABA-CB₁R-KO*) [27,28]. Mutants with the lack of CB₁R in all the cells of the body (*CB₁R-KO* mice) were also examined [29].

Results

Immunolocalization of CB₁R in the VMH

In the light microscope, the CB₁R immunoreactivity was uniformly distributed throughout the entire VMH of *CB₁R-WT* (Fig. 1A) with a somehow similar appearance in the *Glu-CB₁R-KO* mice (Fig. 1B). At higher magnification, the pattern consisted of abundant small immunoreactive dots densely packed within the oval-shaped VMH (Fig. 1A', B'). However, CB₁R staining decreased drastically in the VMH of *GABA-CB₁R-KO* mice (Fig. 1C), particularly in the dorsomedial part (Fig. 1C'), suggestive of the presence of CB₁R in GABAergic profiles. The immunolabeling fully disappeared in the VMH of *CB₁R-KO* mice (Fig. 1D, D').

Then, we analyzed the ultrastructural distribution of CB₁R in the dorsomedial region of the VMH using a preembedding immunogold method for electron microscopy (Fig. 2). CB₁R immunoparticles were typically localized away from the active zones on preterminal or synaptic terminal membranes making

synapses with dendrites or dendritic spines. They showed characteristic features of excitatory (asymmetric synapses with obvious postsynaptic densities, abundant clear and spherical synaptic vesicles) and inhibitory (symmetric synapses with more pleomorphic synaptic vesicles) synapses (Fig. 2A, B). 24.0±2.9% and 28.9±7.5% of the synaptic terminals making asymmetric and symmetric synapses, respectively, were CB₁R immunopositive in the VMH of *CB₁R-WT* mice (Fig. 3A). In this case, CB₁R density was 0.42 immunoparticles/μm membrane in terminals making asymmetric synapses and 0.47 immunoparticles/μm in terminals making symmetric synapses (Fig. 3B). There were no statistically significant differences in these parameters between terminals with asymmetric or symmetric synapses in the *CB₁R-WT* mice.

To define the contribution of cortical glutamatergic and GABAergic synaptic terminals to the intrinsic CB₁R pattern in the VMH, conditional CB₁R mutant mice lacking the receptor either in cortical glutamatergic (*Glu-CB₁R-KO*) or in forebrain GABAergic neurons (*GABA-CB₁R-KO*) were used. CB₁R was still observed in VMH axon terminals making synapses with dendritic and spiny elements of both mutant strains (Fig. 2C–H). In *Glu-CB₁R-KO* mice, CB₁R immunopositive terminals made asymmetric (Fig. 2C, D) and symmetric synapses (Fig. 2E). Also, CB₁R immunonegative asymmetric synaptic terminals were found in the *Glu-CB₁R-KO* mutants (Fig. 2C, E), suggesting the presence of CB₁R in cortically-derived axon terminals. In *GABA-CB₁R-KO* tissue, CB₁R immunoparticles decorated presynaptic membrane profiles forming asymmetric (Fig. 2F, G) but not symmetric synapses (Fig. 2H). The immunolabeling was specific as the CB₁R pattern disappeared in the VMH of *CB₁R-KO* mice (Fig. 2I, J).

The proportion of CB₁R immunopositive synaptic terminals/preterminals in *CB₁R-WT* (20.5%) was maintained in *Glu-CB₁R-KO* mice (20.8%) and reduced in the VMH of *GABA-CB₁R-KO* mutants (12.4%) (Fig. 4A). CB₁R immunoparticles virtually disappeared in the VMH of *CB₁R-KO* mice (Fig. 4A). Furthermore, CB₁R density in WT and both mutant animals was estimated to be rather low (between 0.40–0.50 immunoparticles/μm membrane, differences not statistically significant) (Fig. 4B).

We next semiquantified the CB₁R immunolabeled excitatory axonal boutons to determine the contribution of cortical axons to the pattern of CB₁R in the VMH. For this purpose, only typical excitatory terminals with abundant clear and spherical vesicles, forming asymmetric synapses with thick postsynaptic densities were taken into account. In this case, 21.3±2.5% and 27.2±0.7% of the asymmetric synapses were CB₁R immunopositive in the VMH of *Glu-CB₁R-KO* and *CB₁R-WT* mice, respectively (Fig. 4C). However, this difference was not statistically significant ($\chi^2 = 0.4189$, $p = 0.5175$). Finally, the percentage of CB₁R immunolabeled asymmetric synapses was very low in *CB₁R-KO* mice (Fig. 4C).

Taken together, these observations indicate that CB₁R is localized in GABAergic as well as in cortical and subcortical glutamatergic inputs to the VMH.

Discussion

CB₁R is localized in excitatory and inhibitory presynaptic boutons in the VMH

The main finding of this study was the localization of CB₁R in VMH presynaptic terminals impinging on postsynaptic dendrites and spines of *CB₁R-WT*, *Glu-CB₁R-KO* and *GABA-CB₁R-KO* mice. Furthermore, an extensive analysis of the proportion of immunolabeled profiles identified the contribution of CB₁R to GABAergic and cortical and subcortical glutamatergic inputs to the VMH.

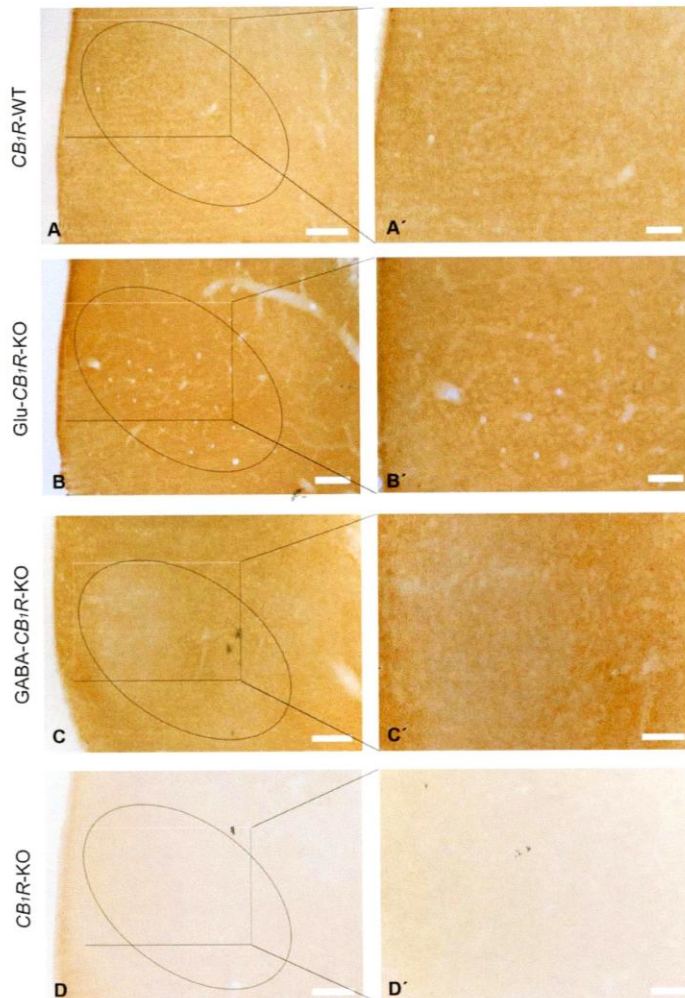


Figure 1. CB₁R immunostaining in the mouse VMH. Preembedding immunoperoxidase method for light microscopy. VMH (oval circle in A-D) shows a moderate punctate CB₁R staining in *CB₁R-WT* (A, A') and *Glu-CB₁R-KO* (B, B') mice. However, the CB₁R immunoreaction product decreases in the VMH of *GABA-CB₁R-KO* mice, particularly in the dorsomedial part (C, C'). The CB₁R pattern disappears in *CB₁R-KO* tissue (D, D'). Framed areas in A, B, C, D are enlarged in A', B', C', D'. Scale bars: 100 μ m (A, B, C, D), 50 μ m (A', B', C', D').
doi:10.1371/journal.pone.0026167.g001

The dense network of synaptic connections constitutes the anatomical basis for the neuroendocrine and vegetative functions regulated by the hypothalamus. The proportion of CB₁R immunolabeled synaptic terminals in the VMH of mice lacking CB₁R in neurons of cortical origin (*Glu-CB₁R-KO*) was identical to WT animals (~20%), indicating that CB₁R probably was in excitatory synaptic terminals of intrinsic hypothalamic neurons. However, although the difference was not statistically significant, the analysis of synaptic terminals forming asymmetric synapses showed a slight decrease of glutamatergic synaptic profiles with CB₁R in *Glu-CB₁R-KO* compared to *CB₁R-WT* mice. Altogether, these results indicate that CB₁R localizes mostly in subcortical

excitatory axon terminals [8,22,30,31] and to a lesser extent in excitatory synaptic boutons of cortical origin [1,8,27,31].

The absence of CB₁R in forebrain GABAergic neurons (*GABA-CB₁R-KO*) caused a reduction of the CB₁R immunolabeled synaptic terminals (12.4%) indicating that CB₁ receptors are also a molecular component of the GABAergic axon boutons in the VMH. For *GABA-CB₁R-KO* mutants, DLX mice lead also to recombination in hypothalamic dopaminergic neurons [32]. However, it is unlikely the presence of CB₁R in dopaminergic synaptic terminals in the VMH of the *GABA-CB₁R-KO* mutants as there is no tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the VMH [32]. Overall, our findings can be interpreted as for the presence of

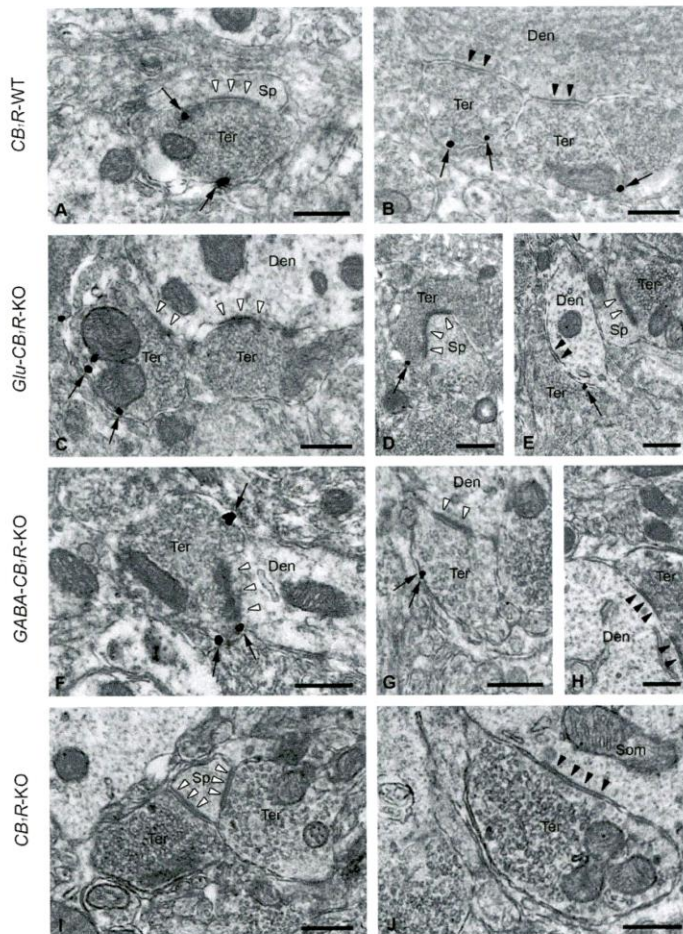


Figure 2. Ultrastructural localization of CB₁R in the mouse VMH. Preembedding immunogold method for electron microscopy. A, B: In *CB₁R*-WT, CB₁R immunoparticles (arrows) are localized on membranes of presynaptic terminals (Ter) making asymmetric (white arrowheads) and symmetric synapses (black arrowheads) with dendritic spines (Sp) or dendrites (Den). C–E: In *Glu-CB₁R*-KO, CB₁R immunoparticles (arrows) localize to asymmetric synaptic terminals (Ter) presumably of excitatory subcortical neurons (observe the thick postsynaptic density marked with white arrowheads in D) as well as in inhibitory terminals (Ter) with symmetric synapses (black arrowheads in E). Notice CB₁R immunonegative axon terminals (Ter) establishing asymmetric synapses (white arrowheads in C, E) with a dendrite (Den) or a spine (Sp). F–H: In *GABA-CB₁R*-KO, CB₁R immunolabeling (arrows) is in excitatory synaptic terminals (Ter) (see asymmetric synapses with white arrowheads in F and G) impinging on dendritic elements (Den). Observe in H a CB₁R immunonegative synaptic terminal (Ter) making a symmetric synapse (black arrowheads) with a dendrite (Den). I, J: CB₁R immunolabeling disappears in *CB₁R*-KO mice indicating the specificity of the CB₁R antibody used in the study. Note CB₁R immunonegative synaptic terminals (Ter) making asymmetric (white arrowheads in I) and symmetric (black arrowheads in J) synapses with a dendritic spine (Sp) and a soma (Som), respectively. Scale bars: 0.4 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0026167.g002

CB₁R in GABAergic presynaptic terminals of both VMH and intrinsic hypothalamic inhibitory pathways.

Functional significance

This investigation has demonstrated that CB₁ receptors in GABAergic and glutamatergic afferents explain the CB₁R pattern in the VMH. The density of CB₁R immunoparticles was rather low in GABAergic and glutamatergic boutons in the VMH

(~0.40–0.50 particles/ μ m) as compared to the density found in other brain regions [33,34], particularly in inhibitory synaptic terminals [35]. However, CB₁R efficiency in the activation of GTP-binding proteins appears to be much higher in the hypothalamus than in other brain regions [14], which may have a functional significance. Physiologically, the identification of CB₁R in glutamatergic and GABAergic synaptic terminals in the VMH could be regarded as a potential neuronal substrate for the

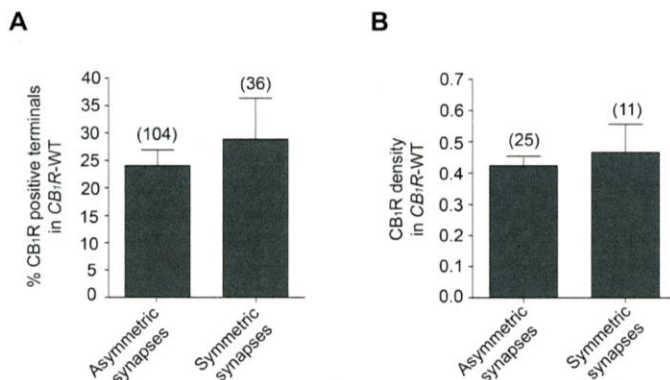


Figure 3. Statistical analysis of CB₁R in terminals forming asymmetric and symmetric synapses in the VMH of CB₁R-WT mice processed by a preembedding immunogold method. A: 24.0 ± 2.9% of synaptic terminals making asymmetric and 28.9 ± 7.5% of terminals with symmetric synapses are CB₁R immunopositive. No statistically significant difference is detected ($\chi^2 = 0.5946$, $p = 0.4406$, analyzed area: 2,376 μm^2). B: CB₁R density after subtraction of background labeling (0.015 ± 0.003 particles/ μm in the VMH of CB₁R-KO) is pretty similar in synaptic terminals making asymmetric or symmetric synapses (0.42 ± 0.03 and 0.47 ± 0.09 immunoparticles/ μm respectively, $p = 0.6553$). doi:10.1371/journal.pone.0026167.g003

effects of cannabinoids on eating behaviors. Actually, Glu-CB₁R-KO conditional mice exhibit a hypophagic behavior after food deprivation very similar to the full CB₁R-KO. On the contrary, GABA-CB₁R-KO mutants are hyperphagic under the same experimental conditions [26].

As a conclusion, the VMH may be a good hub candidate in the endocannabinoid-mediated modulation of the excitatory and inhibitory neurotransmission regulating food intake behaviors. These anatomical data contribute to the understanding of the complex regulation of energy balance by the endocannabinoid system.

Materials and Methods

Ethics Statement

The protocols for animal care and use were approved by the appropriate Committee at the Basque Country University (CEBA/93/2010/GRANDESMORENO). Furthermore, the animal experimental procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 22 July 2003 (2003/65/CE) and current Spanish regulations (Real Decreto 1201/2005, BOE 21–10–2005). Great efforts were made in order to minimize the number and suffering of the animals used.

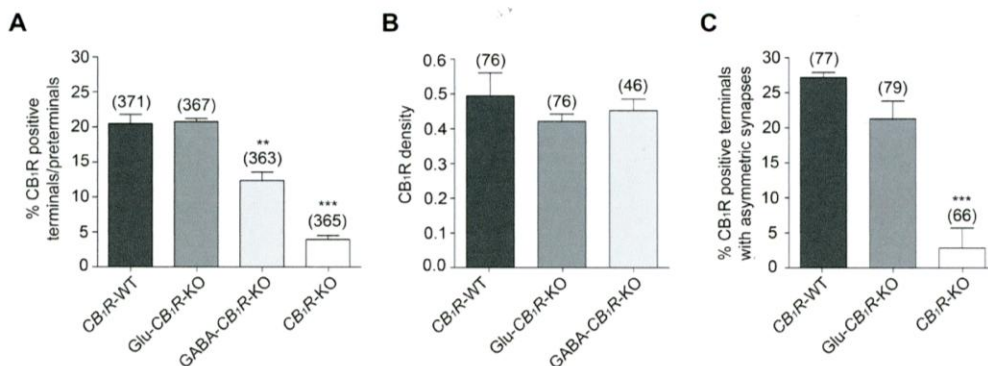


Figure 4. Statistical analysis of CB₁R in the mouse VMH processed by a preembedding immunogold method. A: 20.5 ± 1.3% of the synaptic terminals/preterminals are CB₁R immunopositive in CB₁R-WT mice. Similar proportion is in Glu-CB₁R-KO (20.8 ± 0.5%, $\chi^2 = 0.00024$, $p = 0.9876$), lower in GABA-CB₁R-KO (12.4 ± 1.2%, $\chi^2 = 8.593$, $p = 0.0034$) and virtually disappears in CB₁R-KO mice (3.9 ± 0.6%, $\chi^2 = 48.61$, $p < 0.0001$). A similar area was analyzed for each animal condition (1,467 μm^2 in CB₁R-WT; 1,562 μm^2 in Glu-CB₁R-KO; 1,646 μm^2 in GABA-CB₁R-KO and 1,519 μm^2 in CB₁R-KO mice). B: CB₁R immunoparticle density after subtraction of background labeling (0.015 ± 0.003 particles/ μm in the VMH of CB₁R-KO) is very close in CB₁R-WT (0.49 ± 0.07), Glu-CB₁R-KO (0.42 ± 0.02, $P = 0.7000$) and GABA-CB₁R-KO (0.45 ± 0.03, $P = 0.7000$) mice. C: There is no statistically significant difference between the percentage of CB₁R immunopositive asymmetric synapses in the VMH of CB₁R-WT (27.2 ± 0.7%) and Glu-CB₁R-KO (21.3 ± 2.5%, $\chi^2 = 0.4189$, $p = 0.5175$) mice. This value practically disappears in CB₁R-KO mice (2.9 ± 2.9%, $\chi^2 = 15.47$, $p < 0.0001$). A similar area was analyzed for each animal condition (1,352 μm^2 in CB₁R-WT; 1,547 μm^2 in Glu-CB₁R-KO and 1,274 μm^2 in CB₁R-KO mice). doi:10.1371/journal.pone.0026167.g004

CB₁R mutant lines

Mutant animals were obtained and genotyped as previously described [26,27,29]. **CB₁R-KO mice** were generated and genotyped as described [29]. Conditional CB₁R mutant mice were obtained by crossing the respective Cre-expressing mouse line with *CB1^{fl/fl}* mice [36], using a three-step breeding protocol [27].

Generation of *CB1^{fl/fl}; NEX-Cre* mice (here *Glu-CB₁R-KO*). *CB1^{fl/fl}; NEX-Cre* mice were obtained by crossing *CB1^{fl/fl}* with *NEX-Cre* mice [37,38]. The helix-loop-helix transcription factor NEX is a marker of embryonic neuronal progenitors, which will develop into mature cortical glutamatergic neurons [39], whereas, in the adult brain, NEX is expressed in mature glutamatergic cortical neurons, but not in cortical GABAergic interneurons and to a much lesser extent in subcortical regions [40]. Cre expression under the control of the regulatory sequences of NEX in transgenic mice (*NEX-Cre* mice) as generated by knock-in into the NEX locus, leads to the specific deletion of “floxed” alleles in forebrain neurons [37].

Generation of *CB1^{fl/fl}; Dlx5/6-Cre* mice (here *GABA-CB₁R-KO*). Transgenic mice (*Dlx5/6-Cre*) were produced as previously described [41]. *Dlx5/6-Cre* mice were crossed with *CB1^{fl/fl}* mice to obtain *CB1^{fl/fl}; Dlx5/6-Cre* mice [27]. *Dlx5/Dlx6* genes are homeobox genes that are expressed in differentiating and migrating forebrain GABAergic neurons during embryonic development [42]. Thus, expression of Cre recombinase under the control of the regulatory sequences of *Dlx5/Dlx6* genes is expected to drive recombination of loxP sites in GABAergic neurons [27].

Animal treatment

12 wild-type, *Glu-CB₁R-KO*, *GABA-CB₁R-KO* and *CB₁R-KO* mice (3 of each condition) were used in this study. Mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (80/10 mg/kg body weight) and were transcardially perfused at room temperature (RT, 20–25°C) with phosphate-buffered saline (PBS 0.1M, pH 7.4) for 20 seconds, followed by the fixative solution made up of 4% formaldehyde (freshly depolymerized from paraformaldehyde), 0.2% picric acid and 0.1% glutaraldehyde in phosphate buffer (PB 0.1 M, pH 7.4) for 10–15 minutes. Then, brains were removed from the skull and postfixed in the fixative solution for approximately one week at 4°C. Afterwards, brains were stored at 4°C in 1:10 diluted fixative solution until used.

CB₁R immunocytochemistry for light microscopy

Coronal hypothalamic sections were cut at 50 μm in a vibratome and collected in 0.1 M PB at RT. Sections were preincubated in a blocking solution of 10% bovine serum albumin (BSA), 0.1% sodium azide and 0.5% triton X-100 prepared in Tris-HCl buffered saline (TBS 1X, pH 7.4) for 30 minutes at RT. Then, they were incubated in a primary polyclonal goat anti-CB₁R antibody (2 μg/ml, Frontier Science Co. Ltd, 1-777-12, Shinko-nishi, Ishikari, Hokkaido, Japan) prepared in the blocking solution, on a shaker for 2 days at 4°C. The CB₁R antibody recognizes 31 aminoacids of the C-terminus part (NM007726) of the mouse CB₁R. After several washes in 1% BSA and 0.5% triton X-100 in TBS, tissue sections were incubated in a secondary biotinylated horse anti-goat IgG (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) prepared in the washing solution for 1 hour on a shaker at RT. The VMH sections were washed in the washing solution described above and processed by a conventional avidin-biotin peroxidase complex method (ABC, Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Tissue was incubated in the avidin-biotin complex (1:50) prepared in the washing solution for 1 hour at RT. Then, sections were washed and incubated with

0.05% diaminobenzidine in 0.1 M PB with 0.5% triton-X100 and using 0.01% hydrogen peroxide as a chromogen, for 5 minutes at RT. Finally, tissue was mounted, dehydrated in graded alcohols (50°, 70°, 96°, 100°) to xylol and coverslipped with DPX. Sections were observed and photographed with a light microscope Zeiss Axiophot. Figure compositions were made at 300 dots per inch (dpi). Labeling and minor adjustments in contrast and brightness were made using Adobe Photoshop (CS, Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Preembedding immunogold method for electron microscopy

Coronal hypothalamic vibrosections were cut at 50 μm and collected in 0.1 M PB at RT. Sections were preincubated in a blocking solution of 10% BSA, 0.1% sodium azide and 0.02% saponin in TBS for 30 minutes at RT. Then, they were incubated in a primary polyclonal goat anti-CB₁R antibody (2 μg/ml, Frontier Science Co. Ltd, 1-777-12, Shinko-nishi, Ishikari, Hokkaido, Japan) prepared in the blocking solution but with 0.04% saponin, on a shaker for 2 days at 4°C. After several washes with 1% BSA in TBS, tissue sections were incubated in a secondary 1.4 nm nano-gold anti-goat antibody (1:100, Fab' fragment, Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA) prepared in the same solution as the primary antibody for 3 hours on a shaker at RT. Then, tissue was washed overnight at 4°C and postfixed in 1% glutaraldehyde for 10 minutes. After several washes in double distilled water, gold particles were silver-intensified with a HQ Silver Kit (Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA) for 12 minutes in the dark. Then, tissue was extensively washed in double distilled water and in 0.1 M PB and osmicated in 1% osmium tetroxide for 20 minutes. After washing in 0.1 M PB, sections were dehydrated in graded alcohols (50°, 70°, 96°, 100°) to propylene oxide and embedded in Epon resin 812. 80 nm ultrathin sections were collected on mesh nickel grids, stained with lead citrate for 20 minutes and examined in a PHILIPS EM208S electron microscope. Tissue preparations were photographed by using a digital camera coupled to the electron microscope. Figure compositions were made at 300 dots per inch (dpi). Labeling and minor adjustments in contrast and brightness were made using Adobe Photoshop (CS, Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Specificity of the immunostainings was assessed by incubation of the CB₁R antibody in *CB₁R-KO* VMH tissue in the same conditions as above.

Statistical analysis of CB₁R in the VMH

50-μm-thick hypothalamic sections from each animal condition (n = 3 each) showing good and reproducible silver-intensified gold particles were cut at 80 nm. Image-J (version 1.43 μ, NIH, USA) was used to measure the membrane length. Electron micrographs (18,000–28,000X) were taken from grids (132 μm side) containing silver-intensified gold particles; all of them showed a similar labeling intensity indicating that selected areas were at the same depth. Furthermore, to avoid false negatives, only ultrathin sections in the first 1.5 μm from the surface of the tissue block were examined. Positive labeling was considered if at least one immunoparticle was within approximately 30 nm from the plasmalemma. Metal particles on synaptic membranes were visualized and counted.

Percentages of CB₁R positive profiles and density of immunoparticles were analyzed and displayed as mean ± S.E.M. using a statistical software package (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc, San Diego, USA). Group differences were compared by chi-square test, p < 0.05 (percentages of CB₁R positive profiles) and Mann Whitney test, p < 0.05 (CB₁R density).



Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PG GM LR NP. Performed the experiments: LR NP IE JM-Z MJC IB AR. Analyzed the data: LR

NP PG. Wrote the paper: PG LR NP. Supervised part of the work: JS FRF.

References

- Berthoud HR (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 393–428.
- McClellan KM, Parker KL, Tobet S (2006) Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 27: 193–209.
- Kim KW, Jo YH, Zhao L, Stallings NR, Chua SC, Jr., et al. (2008) Steroidogenic factor 1 regulates expression of the cannabinoid receptor 1 in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 22: 1950–1961.
- Kurrasch DM, Cheung CC, Lee FY, Tran PV, Hata K, et al. (2007) The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. *J Neurosci* 27: 13624–13634.
- Fremeau RT, Jr., Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27: 98–103.
- Hrabovszky E, Halász J, Meelis W, Kruk MR, Liposits Z, et al. (2005) Neurochemical characterization of hypothalamic neurons involved in attack behavior: glutamatergic dominance and co-expression of thyrotropin-releasing hormone in a subset of glutamatergic neurons. *Neuroscience* 133: 657–666.
- Meister B (2007) Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 92: 263–271.
- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11: 4213–4225.
- Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM (2005) Topographic mapping of VMH → arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci* 8: 1356–1363.
- Chee MJ, Myers MG, Jr., Price CJ, Colmers WF (2010) Neuropeptide Y suppresses anorexigenic output from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 30: 3380–3390.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27: 73–100.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, et al. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11: 563–583.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48: 655–668.
- Breviogel GS, Sim LJ, Childers SR (1997) Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 1632–1642.
- Wittmann G, Deli I, Kalló I, Hrabovszky E, Watanabe M, et al. (2007) Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol* 503: 270–279.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol* 136: 550–557.
- Di Marzo V, Matias I (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 8: 585–589.
- Matias I, Di Marzo V (2007) Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* 18: 27–37.
- Jamshidi N, Taylor DA (2001) Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 134: 1151–1154.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, et al. (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410: 822–825.
- Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, et al. (1998) Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci* 63: PL113–117.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, et al. (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112: 423–431.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873–884.
- Marsicano G, Kuner R (2008) Anatomical distribution of receptors, ligands and enzymes in the brain and in the spinal cord: circuitries and neurochemistry. In: Kófalvi A, ed. *Cannabinoids and the brain*. New York: Springer. pp 161–201.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89: 309–380.
- Bellocchio I, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, et al. (2010) Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13: 281–283.
- Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, et al. (2006) The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51: 455–466.
- Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, et al. (2007) Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol* 5: e269.
- Marsicano G, Wojtak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, et al. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418: 530–534.
- Jelsing J, Larsen PJ, Vrang N (2008) Identification of cannabinoid type 1 receptor-expressing cocaine amphetamine-regulated transcript neurons in the rat hypothalamus and brainstem using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neuroscience* 154: 641–652.
- Kiss J, Csáki A, Halász B (2011) Location of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic ventromedial nucleus studied by autoradiography of retrogradely transported [³H]D-aspartate. *Neuroscience* 176: 210–224.
- Yee CL, Wang Y, Anderson S, Ekker M, Rubenstein JL (2009) Arcuate nucleus expression of NKX2.1 and DLX and lineages expressing these transcription factors in neuropeptide Y(+), proopiomelanocortin(+), and tyrosine hydroxylase(+) neurons in neonatal and adult mice. *J Comp Neurol* 517: 37–50.
- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, et al. (2007) Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS ONE* 2: e709.
- Puente N, Elezgarai I, Lafourcade M, Reguero L, Marsicano G, et al. (2010) Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PLoS ONE* 5: e8869.
- Kawamura Y, Fukaya M, Macjima T, Yoshida T, Miura E, et al. (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 26: 2991–3001.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, et al. (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302: 84–88.
- Kleppisch T, Wolfgruber W, Feil S, Allmann R, Wojtak CT, et al. (2003) Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci* 23: 6005–6012.
- Schwab MH, Bartholomae A, Heimrich B, Feldmeyer D, Druffel-Augustin S, et al. (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci* 20: 3714–3724.
- Wu SX, Goebels S, Nakamura K, Nakamura K, Kometani K, et al. (2005) Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17172–17177.
- Bartholomae A, Nave KA (1994) NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons. *Mech Dev* 48: 217–228.
- Zerucha T, Stuhmer T, Hatch G, Park BK, Long Q, et al. (2000) A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *J Neurosci* 20: 709–721.
- Stuhmer T, Puelles L, Ekker M, Rubenstein JL (2002) Expression from a Dlx gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons. *Cereb Cortex* 12: 75–85.



ANEXO II

ESTANCIA PREDOCTORAL EN EL EXTRANJERO

Las técnicas electrofisiológicas se complementan a la perfección con las técnicas anatómicas que he estado desarrollando durante mi Tesis Doctoral, permitiendo aportar un valioso significado funcional a los resultados anatómicos y resultando imprescindible para comprender el papel del sistema endocannabinoide desde un punto de vista global.

Por ello, durante el tercer año de desarrollo de mi trabajo de Tesis Doctoral, en el año 2010, me propuse realizar una estancia de 12 semanas (3 meses) de duración en el laboratorio del Dr. Pablo E. Castillo, *MD/PhD Professor, Dominick Purpura Department of Neuroscience, Kennedy Center, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University*, situado en Nueva York (EEUU), con el principal objetivo del aprendizaje de las técnicas básicas electrofisiológicas y el estudio de los procesos cerebrales de plasticidad sináptica mediados por endocannabinoides.

El laboratorio del Dr. Pablo E. Castillo es reconocido a nivel internacional por su investigación sobre el sistema endocannabinoide y los cambios en la eficacia de las sinapsis, esenciales para el desarrollo neuronal, el aprendizaje y la memoria. Sus investigaciones se centran en elucidar tanto los sucesos moleculares específicos que subyacen a varios tipos de plasticidad sináptica así como las modificaciones exactas de proteínas sinápticas implicadas en estos procesos. Para ello, emplean técnicas electrofisiológicas en secciones hipocampales de ratón.

La financiación correspondiente a esta estancia ha sido posible gracias a la Ayuda para estancias cortas en centros distintos al de aplicación de las becas del Programa de Formación de Investigadores del Gobierno Vasco (Referencia: EC-2010-5-44).

El primer trabajo que desarrollé fue el **montaje desde cero del equipo de electrofisiología** que iba a utilizar posteriormente, bajo la supervisión y ayuda del Dr. Pablo E. Castillo. Esta labor me resultó de mucha utilidad para familiarizarme con los conceptos básicos y diversos instrumentos y aparatos utilizados en las técnicas electrofisiológicas. Además, este aprendizaje me ha permitido posteriormente contribuir junto con la Dra. Nagore Puente al montaje de un equipo de electrofisiología en el laboratorio del Dr. Pedro Grandes, al regreso de mi estancia.

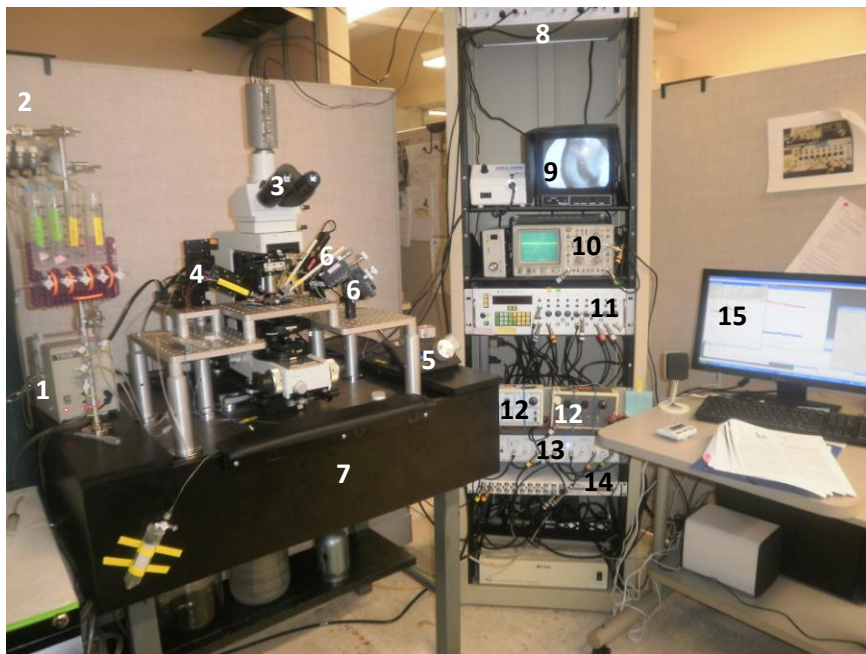


Figura 1. Equipo de electrofisiología del laboratorio del Dr. Pablo E. Castillo. Se muestra una fotografía del equipo de electrofisiología que monté y utilicé para el entrenamiento en las técnicas electrofisiológicas. Los números identifican los principales aparatos o instrumentos que constituyen el equipo de electrofisiología. 1: Bomba de perfusión. 2: Bombonas de nitrógeno y oxígeno (no se observan en la fotografía). 3: Microscopio. 4: Micromanipulador para el electrodo de registro con su unidad de control de movimiento (5). 6: Micromanipuladores manuales para los electrodos de estimulación. 7: Mesa antivibratoria. 8: Aparato de control de la temperatura del líquido de perfusión. 9: Monitor acoplado a la cámara del microscopio. 10: Osciloscopio. 11: Estimulador *Master 8*. 12: Unidades de aislamiento de la estimulación. 13: Amplificador de la señal. 14: Aparato digitalizador (*Digidata*). 15: Ordenador para el control y análisis de los experimentos.

En paralelo a la puesta a punto del equipo, me entrené en el método de **dissección del hipocampo** del cerebro fresco de ratón (tras la anestesia del mismo con isofluorano) y la obtención de secciones hipocampales de 400 μ m al vibratomo, así como en la preparación de electrodos y las soluciones más habituales empleadas en las técnicas electrofisiológicas (solución de *Ringer*, solución de sucrosa, etc.)

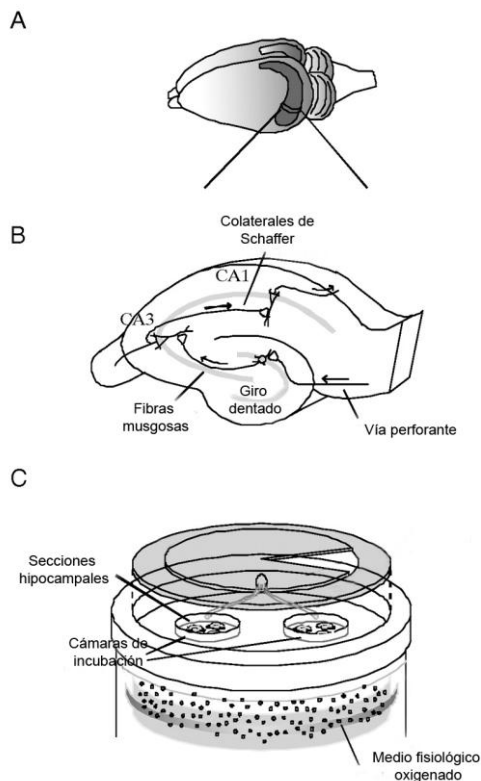


Figura 2. Disección del hipocampo a partir de cerebro de ratón y mantenimiento de las secciones hipocampales en un medio fisiológico oxigenado. La imagen ha sido modificada de <http://jeb.biologists.org/content/209/12/2293/F1.large.jpg>

Posteriormente, aprendí la técnica de **registro de potenciales de campo** o también denominada **registro extracelular**. Los potenciales extracelulares de campo son las fuentes que se generan por la actividad colectiva neuronal, como consecuencia de una activación simultánea que tiene lugar cerca de los contactos sinápticos de muchas neuronas. Aprendí esta técnica colocando los electrodos de estimulación (S1 y S2) y de registro (R) en el estrato radiado de la porción CA1 del hipocampo y aplicando un protocolo para producir el fenómeno de plasticidad sináptica conocido como potenciación a largo plazo o LTP (del inglés *long term potentiation*). En primer lugar,

realizaba un corte entre la región CA1-CA3 del hipocampo y tras la introducción y posicionamiento adecuado de los electrodos en el mismo plano de la sección hipocampal, registraba los potenciales excitadores postsinápticos o fEPSP (del inglés *field excitatory postsynaptic potentials*), ya que el líquido de perfusión contenía picrotoxina (100 μ M), que es un antagonista de los receptores GABA_A. El electrodo de estimulación S2 lo empleaba para realizar la estimulación tetánica mientras que el electrodo S1 lo utilizaba como control.

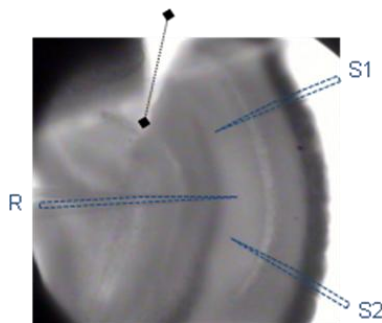


Figura 3. Fotografía que muestra la colocación de los electrodos. Los electrodos de estimulación (S1 y S2) y el electrodo de registro (R) se colocan en el estrato radiado de la región CA1 hipocampal. La línea negra indica el lugar de corte entre la región CA1-CA3 del hipocampo.

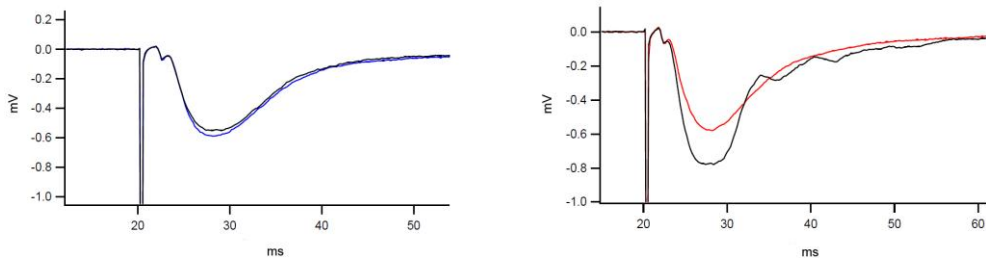


Figura 4. Ejemplo típico de las señales excitadoras registradas. El gráfico de la izquierda muestra el registro típico de una señal excitadora tras la estimulación con el electrodo S1. Se observa que no hay diferencias entre la señal inicial (línea azul) y final (línea negra) del experimento ya que la vía 1 era utilizada como control, siendo el protocolo de estimulación el mismo durante todo el experimento. El gráfico de la derecha muestra el registro correspondiente al electrodo de estimulación S2. En este caso, se puede apreciar que la señal final (línea negra) ha sufrido una potenciación en comparación con la señal inicial (línea roja), como consecuencia del protocolo de tetanización aplicado en la vía 2.

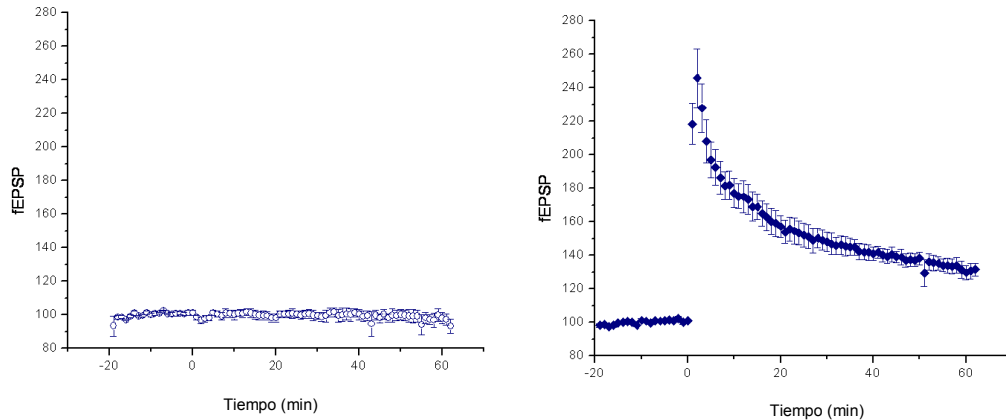


Figura 5. Gráficos que muestran la media de las señales excitadoras registradas en varios experimentos. El gráfico de la izquierda muestra el registro de la vía 1, que se ha utilizado como control, siendo el protocolo de estimulación el mismo durante todo el experimento, por lo que las señales registradas se mantienen estables y sin cambios durante todo el proceso, como era de esperar. El gráfico de la derecha muestra el registro de la vía 2. Se observa la señal base que se mantiene estable durante 20 minutos. Pasado ese tiempo se aplica el protocolo de estimulación tetánica y se observa cómo se produce una potenciación de la señal excitadora. Esta potenciación de la señal va disminuyendo progresivamente hasta alcanzar un valor estable, mayor que la señal inicial y que se mantiene durante largo tiempo (al menos 40 minutos) considerando por tanto que se ha producido un fenómeno de LTP. En este caso concreto se ha producido una potenciación de la señal de un 40% aproximadamente.

Finalmente, aprendí también la técnica de **registro intracelular** o "**patch-clamp**". Esta técnica, a diferencia de la anterior, permite el registro de la señal de una única neurona, a partir de la estimulación de un grupo de fibras neuronales. Una vez colocados los electrodos de estimulación en el lugar adecuado, los principales pasos que se realizan son los siguientes:

- Antes de sumergir el electrodo de registro en el líquido que baña la sección de tejido, es necesario aplicar una pequeña cantidad de presión positiva para evitar la contaminación del electrodo.

- A continuación, se produce la aproximación de forma lenta a la célula que se quiere registrar (a ciegas o bajo control visual con el microscopio) con el micromanipulador. Simultáneamente, se utiliza un pulso cuadrado de corriente (típicamente de 5mV) como pulso prueba para medir la resistencia del medio y servir de guía para la formación del gigasello.
- Una vez que se ha alcanzado la proximidad de la membrana celular, se lleva a cabo un sello de alta resistencia (gigasello) quitando la presión positiva y aplicando inmediatamente y de forma gradual y suave una ligera presión negativa mediante una ligera succión.
- El siguiente paso consiste en la ruptura de la membrana que se encuentra dentro de la punta del electrodo. Para ello, se debe aplicar la succión mínima necesaria para que se produzca esta ruptura.
- Finalmente, si el proceso ha concluido con éxito, se pueden registrar las corrientes de esa única neurona.

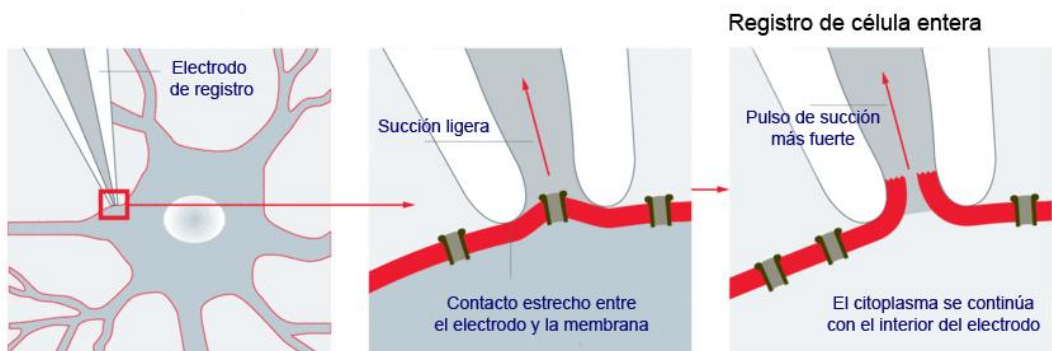


Figura 6. Imagen que muestra los pasos principales de la técnica electrofisiológica de *patch-clamp*. La imagen ha sido adaptada de http://www.leica-microsystems.com/typo3temp/pics/Figure-3b_d327b25916.gif.

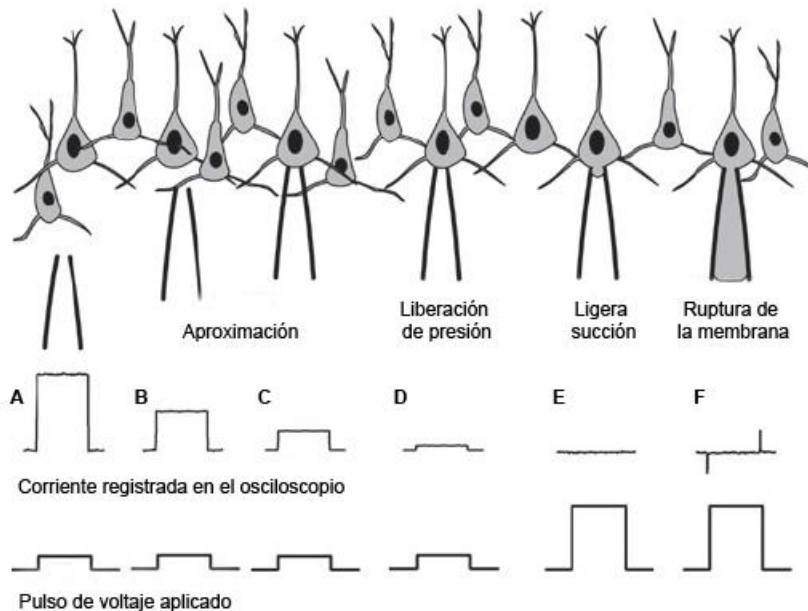


Figura 7. Principales pasos en la formación del gigasello y técnica de *patch-clamp*, mediante el método de *patch-clamp* a ciegas. Se aplica un pequeño paso de voltaje al electrodo para monitorizar los cambios en la resistencia del electrodo midiendo la corriente en un osciloscopio. (A) Se observan cambios en la resistencia del electrodo cuando el electrodo (B) se introduce lentamente en el tejido y (C) entra en contacto con la célula diana. Cuando se observa una disminución continua y regular en la resistencia, (D) se libera la presión positiva y (E) se aplica una ligera succión para formar el gigasello. (F) Finalmente, se aplica la succión necesaria para romper la membrana situada en la punta del electrodo dejando el sello y la célula intactos y obteniéndose así el modo de registro de célula entera. Adaptado de Castañeda-Castellanos y cols., 2006 (*Nat Protoc*, 1: 532-542).

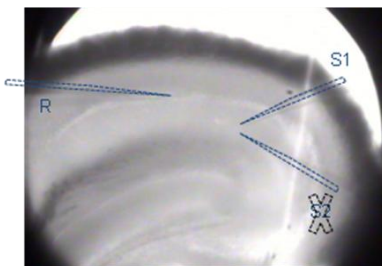


Figura 8. Fotografía que muestra la colocación de los electrodos para la técnica de *patch-clamp*. Los electrodos de estimulación (S1 y S2) se colocan en el estrato radiado de la región CA1 hipocampal. En este caso, el electrodo S1 lo utilizaba para la estimulación mientras que el electrodo S2 lo empleaba como control, sin aplicar ninguna estimulación. El electrodo de registro (R) se coloca en la capa de neuronas piramidales de CA1 para hacer el registro sobre una única neurona.

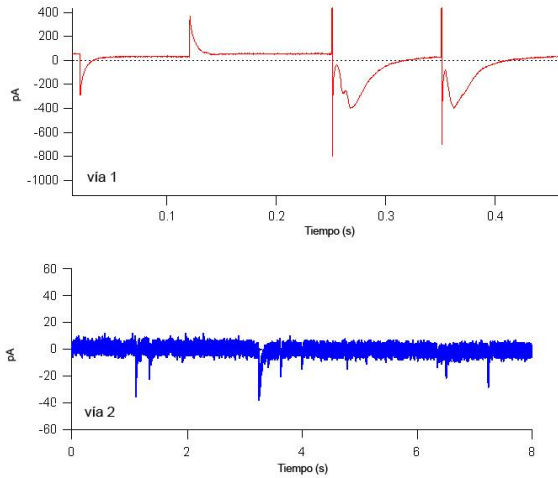


Figura 9. Ejemplo típico de las señales registradas mediante la técnica de *patch-clamp*. El gráfico de arriba (correspondiente a la vía 1 de estimulación) muestra el registro típico de una única neurona tras la ruptura del gigasello. El gráfico de abajo (correspondiente a la vía 2, en la que no se produce estimulación ninguna) permite observar la actividad espontánea de dicha neurona.

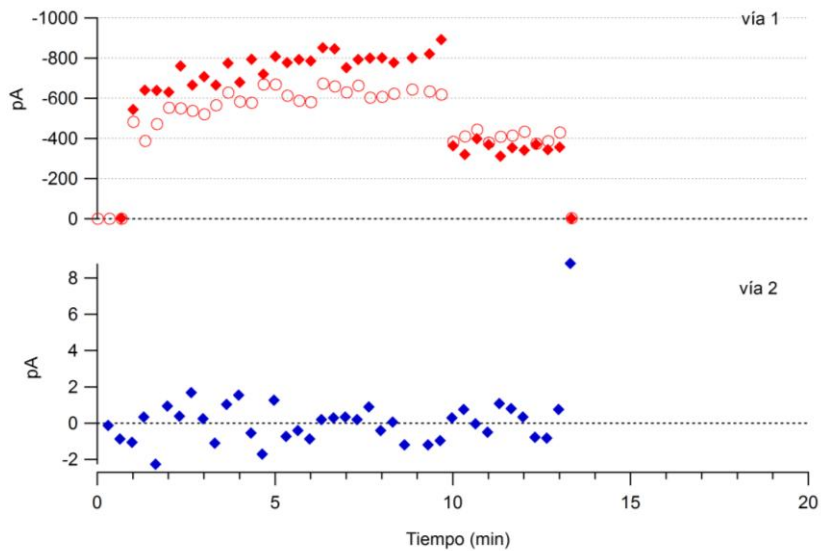


Figura 10. Ejemplo típico de las señales registradas mediante la técnica de *patch-clamp*. El gráfico de arriba muestra el registro de la vía 1. Se puede observar que la señal se mantiene estable en torno a 700pA durante 10 minutos. A continuación, se disminuyó la señal de estimulación registrándose una bajada de la señal hasta los 400pA, manteniéndose también estable durante aproximadamente 4 minutos. Tras este tiempo, la célula murió por lo que no resultó posible continuar con el experimento.

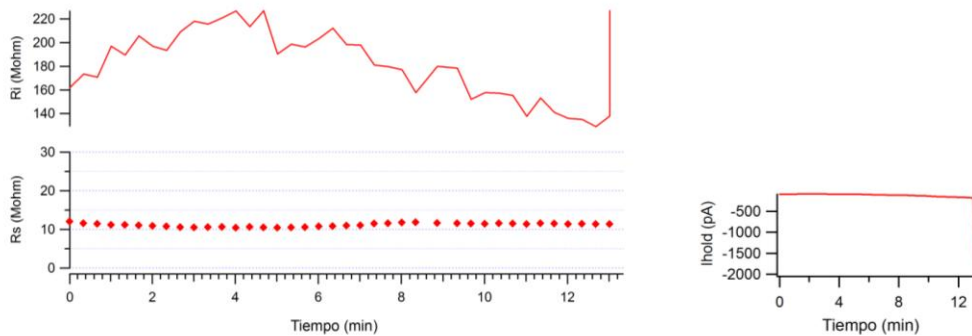


Figura 11. Gráficos adicionales que se muestran en el programa informático empleado. El gráfico inferior de la izquierda muestra la R_s (*series resistance*), que se mantiene estable durante todo el tiempo que dura el experimento en torno a $10M\Omega$, siendo un buen índice ya que valores $<15M\Omega$ se consideran aceptables para las células CA1 hipocampales. El gráfico de la derecha muestra la corriente necesaria (*Ihold*) para mantener la célula en un potencial determinado, y se mantiene estable hasta el minuto 14 aproximadamente, cuando se produce la muerte de la misma.

Por último, aunque todavía me queda mucho camino por recorrer en el mundo de la electrofisiología pero teniendo en cuenta la limitación temporal y la inexistencia de conocimientos previos ni experiencia en estas técnicas, he de reconocer que me siento muy satisfecha del aprendizaje que he podido disfrutar durante esta estancia, por lo que me gustaría finalizar este apartado mostrando mi más sincero agradecimiento al Dr. Pablo E. Castillo y a los integrantes de su laboratorio, no sólo por lo aprendido en cuanto a mi formación investigadora sino por haber contribuido a que esta estancia haya sido también una experiencia inolvidable a nivel personal.

ANEXO III

Durante el desarrollo de mi trabajo de Tesis Doctoral y gracias a las imágenes realizadas en los trabajos de investigación en los que he colaborado, he podido participar en actividades divulgativas, como los concursos de fotografías científicas que se citan a continuación:

- I, II y III Concurso de Microfotografía, organizado por el Servicio General de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina, dependiente de los Servicios Generales de Investigación (SGIKER) de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea en los años 2008, 2009 y 2011.
- Concurso de fotografía, organizado por la Sociedad Española de Neurociencia (SENC) durante el congreso celebrado en Tarragona en 2009.

I CONCURSO DE MICROFOTOGRAFÍA SGIKER 2008

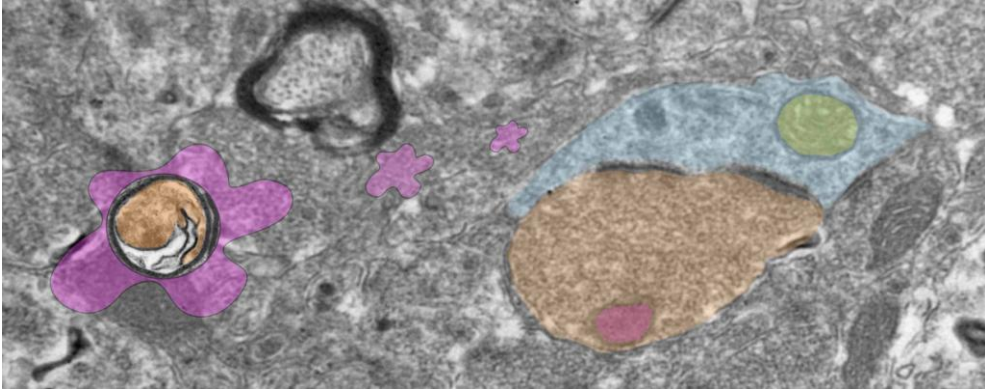
EL GABA TAMBIÉN AMANSA A LAS FIERAS



Técnica: Inmunoperoxidasa para microscopía óptica.

Descripción: Las distintas partes del cerebro se comunican entre sí mediante señales excitadoras (principalmente glutamato) y señales inhibitoras (GABA). En la imagen podemos observar que la distribución de las neuronas GABAérgicas en este corte de cerebro de ratón se asemeja a la cara de un mandril, el más grande de todos los homínidos. Por la dulce expresión de nuestro primo-hermano mandril de momento podemos concluir que no sólo la música amansa a las fieras, el GABA también.

MIENTRAS DORMÍAN

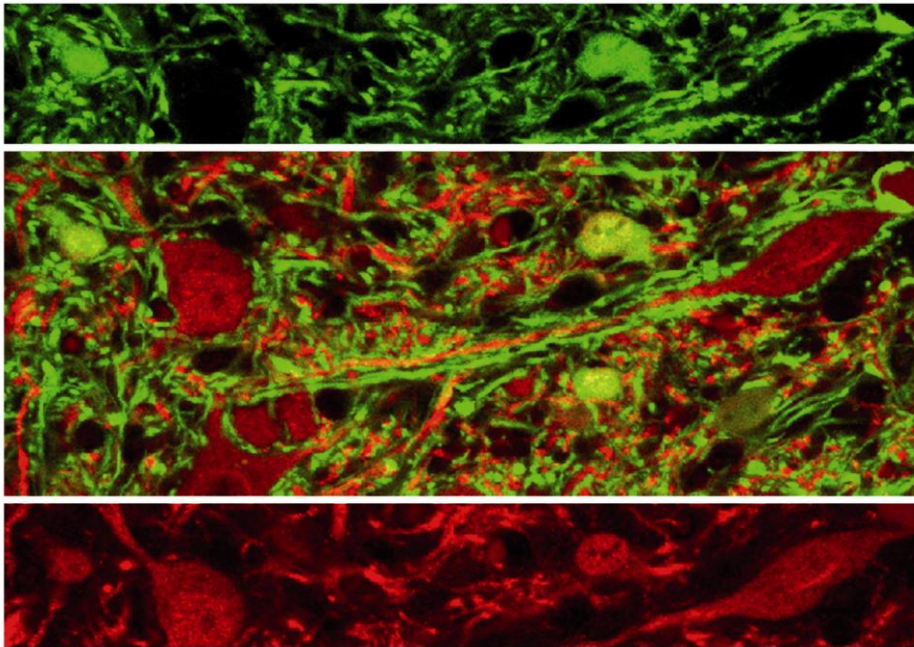


Técnica: Inmuno-oro preinclusión para microscopía electrónica.

Descripción: Hoy en día se sabe que los cannabinoides desempeñan funciones fisiológicas y farmacológicas involucradas en muchos procesos como el dolor, memoria y aprendizaje, modulación del sueño, etc. En esta imagen de cerebro de ratón *knock-out* (KO) para el receptor de cannabinoides CB₁, podemos observar la cara de un niño (terminal naranja) con su gorro de pijama (dendrita azul) plácidamente durmiendo (véanse los ojos cerrados a modo de sinapsis) y soñando con su futuro hermanito, que aún no es más que un embrión de pocas semanas de gestación. Esta tierna estampa fue inmortalizada mientras ambos dormían.

CONCURSO DE FOTOGRAFÍA SENC 2009

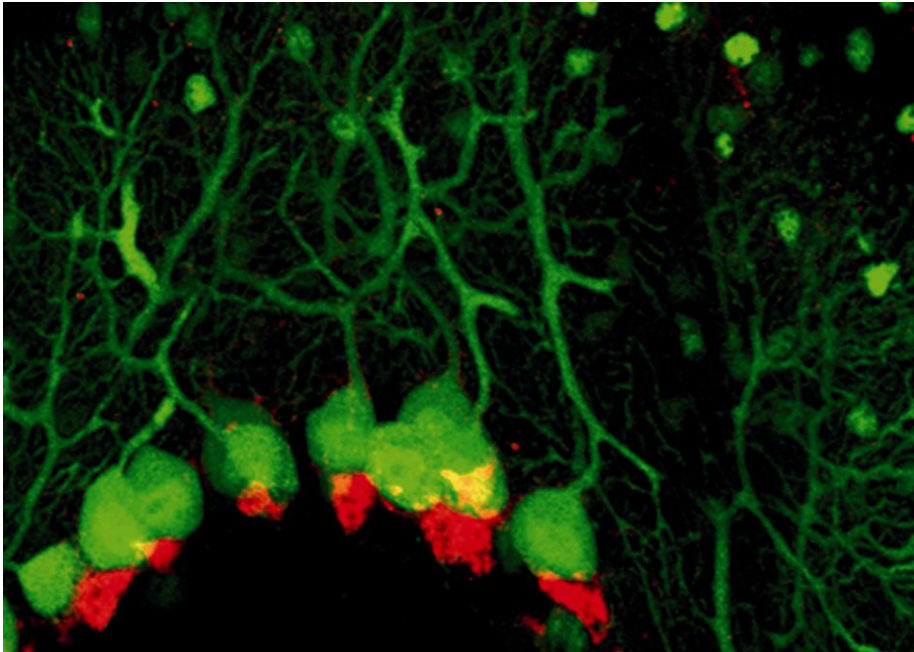
MAPA DE CARRETERAS



Técnica: Microscopía confocal.

Descripción: Núcleo profundo del cerebelo de un ratón transgénico (GAD67-GFP) para la enzima de síntesis del GABA (en verde). En rojo observamos la expresión del receptor metabotrópico de glutamato mGluR5, destacando 3 células que bien podrían representar 3 poblaciones neuronales profundas del cerebelo: fastigio (arriba a la izquierda), interpósito (abajo a la izquierda) y dentado (arriba a la derecha). Sobre la compleja maraña de carreteras secundarias que conectan todos los puntos del cerebelo entre sí y con el resto del cerebro, observamos una gran autopista roja que parte del pueblo dentado y se dirige hacia su destino bordeando la población interpósita. Esta vía permite un desplazamiento más rápido y seguro de la información evitando las interferencias y posibles accidentes debidos al intenso tráfico cerebeloso.

PELEAS DE RENOS

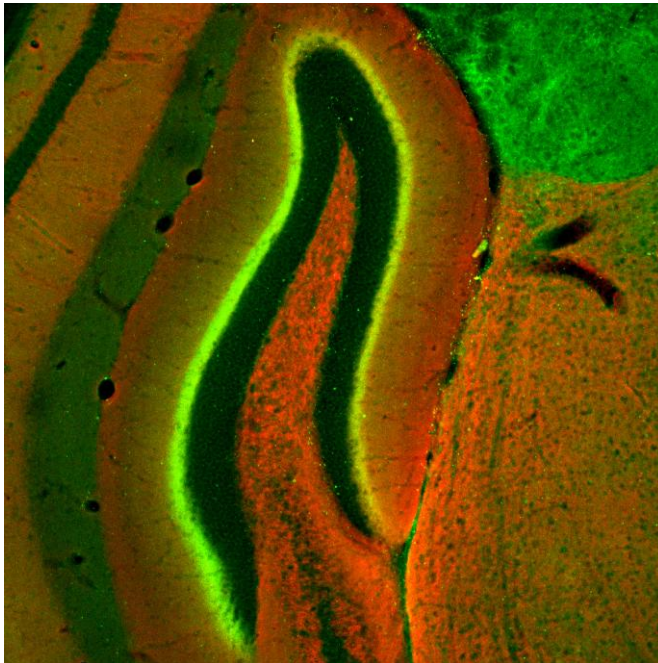


Técnica: Microscopía confocal.

Descripción: Cerebelo de un ratón transgénico (GAD67-GFP) para la enzima de síntesis del GABA. Las neuronas de Purkinje expresan dicha enzima (en verde) y sus somas se asemejan a las cabezas de los renos, extendiendo todas sus ramificaciones dendríticas a modo de cornamenta. En la imagen observamos un grupo de renos machos, fácilmente identificables por la marca rojiza bajo su cabeza debido a la sobreexpresión del receptor de cannabinoides tipo 1 (CB_1) que ocurre durante la época de celo. Esta sobreexpresión desencadena las peleas características en las que los machos chocan sus cornamentas una y otra vez, esparciéndose por la capa molecular fragmentos de cuernos de los animales más débiles. El ganador será el elegido para engendrar la futura descendencia del grupo asegurando la supervivencia de la especie.

II CONCURSO DE MICROFOTOGRAFÍA SGIKER 2009

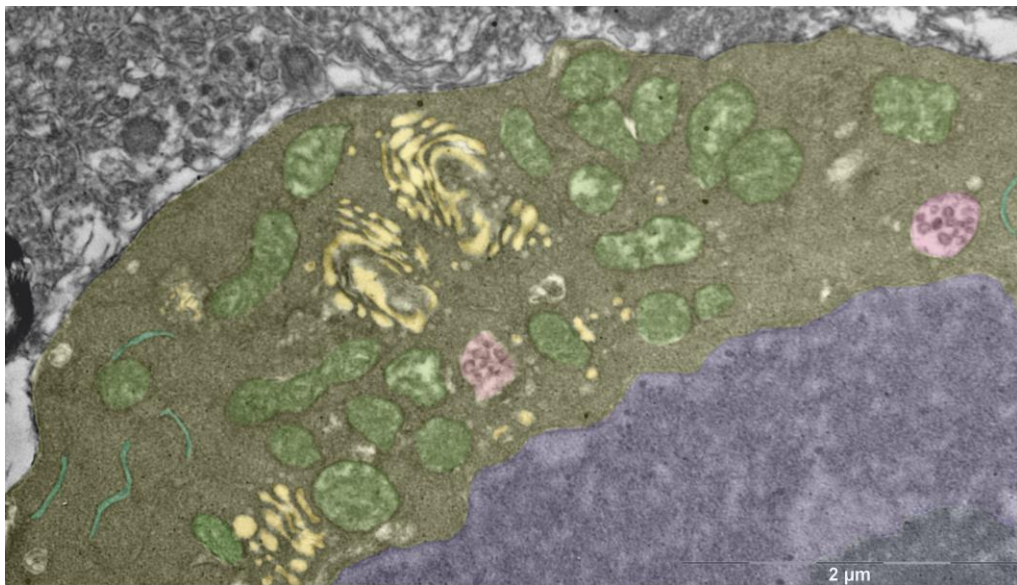
LA LLAMA DE LA MEMORIA



Técnica: Microscopía confocal.

Descripción: Hipocampo de un ratón mutante condicional $GABA-CB_1-KO$, que carece del receptor de cannabinoides CB_1 en las neuronas GABAérgicas. En verde aparece el marcado de este receptor en perfiles excitadores creando una barrera encima del giro dentado del hipocampo que se conoce como la llama de la memoria. Cuando los cannabinoides activan la chispa que enciende esta llama el fuego se extiende rápidamente hacia las regiones CA1 y CA3, quemándose los recuerdos almacenados y provocando una pérdida de memoria transitoria mientras se realizan las labores de extinción y reforestación neuronal.

PLAYA NEURONAL

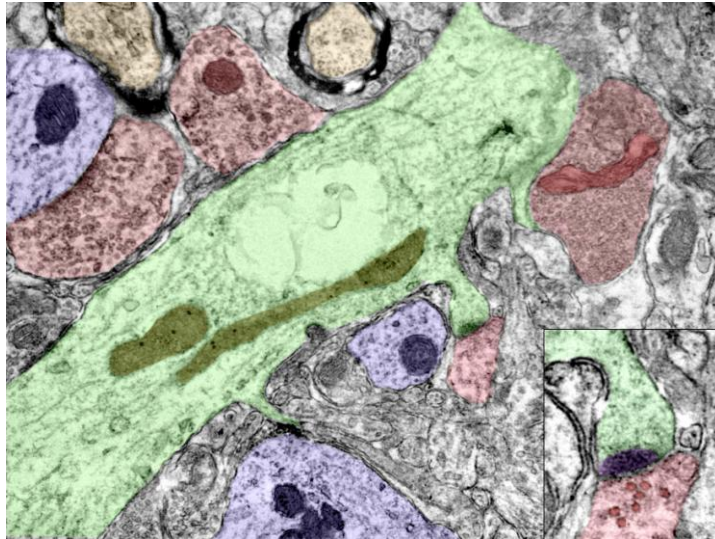


Técnica: Inmuno-oro preinclusión para microscopía electrónica.

Descripción: Soma celular de una neurona de hipotálamo de ratón. En esta vista aérea, observamos gran parte de los elementos que forman parte de la estructura interna de la célula, como si de una playa neuronal se tratara. Podemos ver cómo llega a la orilla la marea nuclear (azul) y en la zona más profunda un coral nucleolar. Sobre la arena citoplasmática (amarilla) habitan los cangrejos multivesiculares (rosas), las alargadas algas endoplasmáticas lisas (verde oscuro) y multitud de palmeras mitocondriales (verde claro) encargadas de suministrar el oxígeno y energía necesaria para la supervivencia celular. Además, en la arena han quedado marcadas las huellas de un gigante golgiano (naranja), evidenciando su paso por este idílico paisaje neuronal.

III CONCURSO DE MICROFOTOGRAFÍA SGIKER 2011

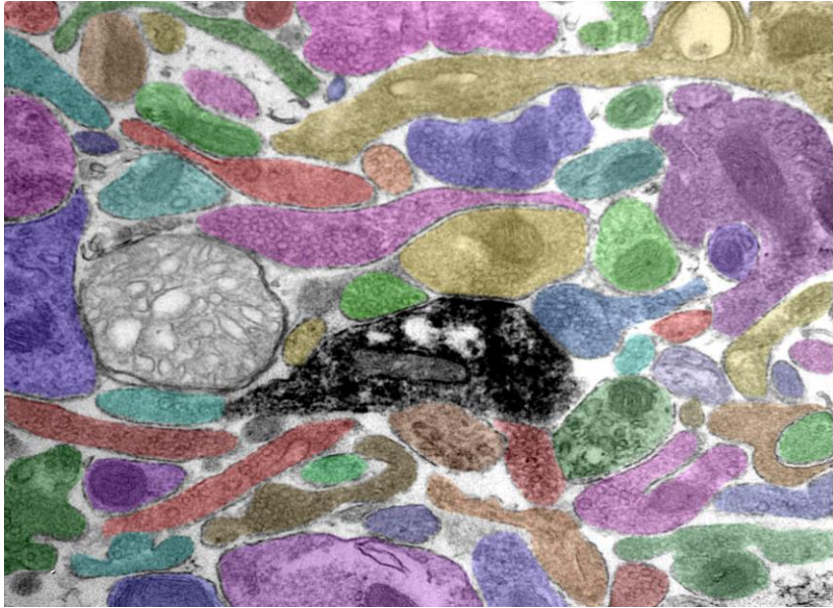
LO ESENCIAL YA NO ES INVISIBLE A LOS OJOS



Técnica: Inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica.

Descripción: Algo así podría decir el principito si conociera las ventajas del microscopio electrónico. Y es que esta técnica nos brinda imágenes fantásticas de elementos que no se pueden ver a simple vista y ni siquiera con el microscopio óptico. Así, gracias a la microscopía electrónica, podemos apreciar esta particular rosa neuronal. En verde observamos parte del tallo o tronco dendrítico, por el que ascienden dos gusanos mitocondriales marrones y del que emergen, al igual que en todas las rosas, las espinas dendríticas. Esta instantánea nos permite ser testigos únicos de cómo la espina del centro (recuadro aumentado a la derecha) establece sinapsis con un pétalo terminal de color rojo, llegando incluso a apreciarse las vesículas sinápticas en dicho terminal y la mayor densidad postsináptica en la espina dendrítica (morado). Decorando el resto de la imagen, observamos pétalos terminales (rojos), dendríticos (azules) y axonales (naranjas) que también participan en la correcta transmisión de la información nerviosa de nuestro particular rosal neuronal.

ARTE NEURONAL



Técnica: Inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía electrónica.

Descripción: Esta imagen bien podría estar expuesta en cualquier museo de arte. Pero en realidad se trata de una fotografía de cerebro de ratón procesado para su observación al microscopio electrónico de transmisión. En el centro se observa una dendrita marcada con diaminobencidina (negro) y rodeándola aparecen multitud de diferentes perfiles neuronales (en su mayoría terminales) pintados para la ocasión con alegres colores. Quién sabe si los resultados derivados de imágenes como éstas lleguen algún día a ser tan valiosos como las más prestigiosas obras de arte.

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**SUBCELLULAR ARCHITECTURE OF
THE ENDOCANNABINOID SYSTEM
IN THE MOUSE VENTROMEDIAL
NUCLEUS OF THE HYPOTHALAMUS**

DOCTORAL THESIS

LEIRE REGUERO ACEBAL

2012

Doctoral Thesis presented by the graduate

LEIRE REGUERO ACEBAL

Supported by a predoctoral fellowship from
the Basque Country Government.
Reference: BFI07.286

THESIS SUPERVISOR

Prof. Dr. PEDRO ROLANDO GRANDES MORENO

Department of Neurosciences
Faculty of Medicine and Dentistry
University of the Basque Country (UPV/EHU)

Leioa, 2012

0. INDEX

1. INTRODUCTION

1.1. The endocannabinoid system	227
1.1.1. Cannabinoid receptors.....	227
1.1.2. Distribution of cannabinoid receptors.....	228
1.1.3. Signaling pathways.....	231
1.1.4. Endocannabinoids.....	232
1.1.5. Localization and pharmacological characteristics of endocannabinoids.....	233
1.1.6. Metabolism of endocannabinoids	234
1.1.6.1. Biosynthesis and degradation of anandamide.....	234
1.1.6.2. Biosynthesis and degradation of 2-AG	235
1.1.6.3. Endocannabinoid transport.....	235
1.1.7. Physiological functions of the endocannabinoid system.....	236
1.1.8. Therapeutic potential of the endocannabinoid system	236
1.2. Hypothalamus	237
1.2.1. General aspects.....	237
1.2.2. Ventromedial hypothalamic nucleus	237
1.2.2.1. Anatomy and cytoarchitecture.....	237
1.2.2.2. VMH formation: neurogenesis and migration	238
1.2.2.3. Connection patterns.....	238
1.2.2.4. Functions	239
1.3. Working hypothesis	240

2. OBJECTIVES

245

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Working plan	249
3.2. Antibodies	250
3.3. Research animals	253

3.4. Immunocytochemical techniques	255
3.5. Tissue processing	256
3.5.1. Transcardially perfusion of the animals.....	256
3.5.2. Avidin-biotin peroxidase method for light microscopy	256
3.5.3. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy	257
3.5.4. Preembedding double labeling of silver-intensified immunogold and immunoperoxidase method for electron microscopy	258
3.5.5. Immunofluorescence method	260
3.6. Statistical analysis	261

4. RESULTS

4.1. Cellular and subcellular architecture of CB₁ receptor in synaptic terminals of the VMH.....	265
4.1.1. Light microscopy	265
4.1.1.1. Expression pattern of CB ₁ in the VMH.....	265
4.1.1.2. Specificity controls for CB ₁	266
4.1.2. Confocal microscopy	266
4.1.3. Electron microscopy.....	267
4.1.3.1. Subcellular distribution of CB ₁ in the VMH	267
4.2. Ultrastructural localization of CB₁ receptor in VMH astroglia	273
4.3. Immunolocalization of synthesizing and degrading enzymes of anandamide in the VMH	277
4.3.1. Light microscopy	277
4.3.1.1. Expression of NAPE-PLD and FAAH in the VMH.....	277
4.3.1.2. Specificity control for NAPE-PLD and FAAH	277
4.3.2. Electron microscopy.....	278
4.3.2.1. Subcellular distribution of NAPE-PLD in the VMH.....	278
4.3.2.2. Subcellular distribution of FAAH in the VMH	280

4.4. Immunolocalization of synthesizing and degrading enzymes of 2-AG in the VMH	282
4.4.1. Light microscopy	282
4.4.1.1. Expression of DAGL- α and MAGL in the VMH.....	282
4.4.1.2. Specificity control for DAGL- α and MAGL	282
4.4.2. Electron microscopy.....	283
4.4.2.1. Subcellular distribution of DAGL- α in the VMH.....	283
4.4.2.2. Subcellular distribution of MAGL in the VMH.....	286
4.5. Comparison between enzymes.....	288
5. DISCUSSION	
5.1. Localization of CB₁ receptor in the VMH	291
5.1.1. Localization of CB ₁ in VMH excitatory and inhibitory synaptic terminals.....	291
5.2. Ultrastructural localization of CB₁ receptor in VMH astrocytes.....	295
5.3. Localization of synthesizing and degrading enzymes of endocannabinoids in the VMH	299
5.3.1. Ultrastructural localization of NAPE-PLD in the VMH.....	299
5.3.2. Ultrastructural localization of FAAH in the VMH	302
5.3.3. Ultrastructural localization of DAGL- α in the VMH	304
5.3.4. Ultrastructural localization of MAGL in the VMH.....	305
5.4. Final diagrams.....	307
6. CONCLUSIONS.....	311
7. LITERATURE CITED	315

1. INTRODUCTION

1.1. THE ENDOCANNABINOID SYSTEM

The endocannabinoid system is a complex endogenous signaling system that participates in multiple metabolic pathways (Cota and Woods, 2005). It is composed of cannabinoid receptors, their endogenous ligands or endocannabinoids and the proteins involved in their synthesis and degradation, as well as the intracellular signaling pathways regulated by endocannabinoids (De Petrocellis et al., 2004).

1.1.1. Cannabinoid receptors

- Classic receptors: CB₁ and CB₂

CB₁ receptor (Matsuda et al., 1990) is highly expressed in the central nervous system. It has 472-473 aminoacids organized in a typical sequence, which is highly conserved in different studied species (Herkenham et al., 1991; Glass et al., 1997). On the other hand, **CB₂ receptor** (Munro et al., 1993) is mainly localized in cells of the immune system.

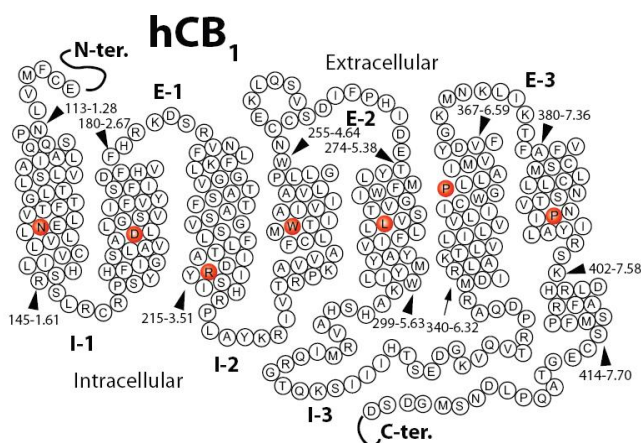


Figure 1. Representation of human CB₁ receptor sequence. Image has been taken from Mackie, 2008.

Both receptors are G protein coupled receptors, characterized by seven transmembrane domains, an extracellular amino domain and an intracellular carboxy domain. They exhibit a global homology of 44%, being of 68% in transmembrane regions.

- **TRPV1 receptor**

Type 1 vanilloid receptor or TRPV1 (Caterina et al., 1997) is a non selective cationic homotetrameric channel, permeable to Na⁺, Ca²⁺ and H⁺. It is activated by temperature (>42°C), pH (<6) and pharmacologically by capsaicin (the pungent ingredient in hot chili peppers). Physiologically, it is activated by endogenous substances like endovanilloids, lipoxygenase metabolites (Starowicz et al., 2007) and the endocannabinoid anandamide. Although it is not activated by other endocannabinoids, some authors consider that TRPV1 may be the ionotropic receptor of the endocannabinoid system.

- **Other possible cannabinoid receptors**

Data from studies on CB₁ and CB₂ receptor knock-out mice suggest that they may be additional cannabinoid receptors (Wilson and Nicoll, 2002; Kawamura et al., 2006). Other putative cannabinoid receptors include the orphan G protein coupled receptor **GPR55** (Baker et al., 2006), the orphan receptor **GPR119** (Brown, 2007) or a vascular endocannabinoid receptor distinct from GPR55, CB₁ or CB₂. Finally, endocannabinoids are also potential ligands for peroxisome proliferator-activated nuclear receptors or **PPAR**.

1.1.2. Distribution of cannabinoid receptors

- **CB₁ receptor**

CB₁ receptor is mainly localized in the central nervous system. It is the most abundant G protein coupled receptor in the brain (Pagotto et al., 2006) and its brain density is very high, similar to that of glutamate or GABA ionic channels (Howlett et al., 2004). Different autoradiographic techniques and immunohistochemical studies have described in detail the distribution of this receptor in the rat brain (Herkenham et al., 1990; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Tsou et al., 1998). The highest density of CB₁ receptor is found in basal ganglia (substantia nigra, globus pallidus, entopeduncular

nucleus and lateral caudate-putamen), molecular layer of cerebellum and some regions of the hippocampus (CA3 region of Ammon horn and molecular layer of dentate gyrus). This receptor shows moderate density in layers I and IV of the cerebral cortex, while a small amount of receptors can be found in the hypothalamus, brain stem and spinal cord.

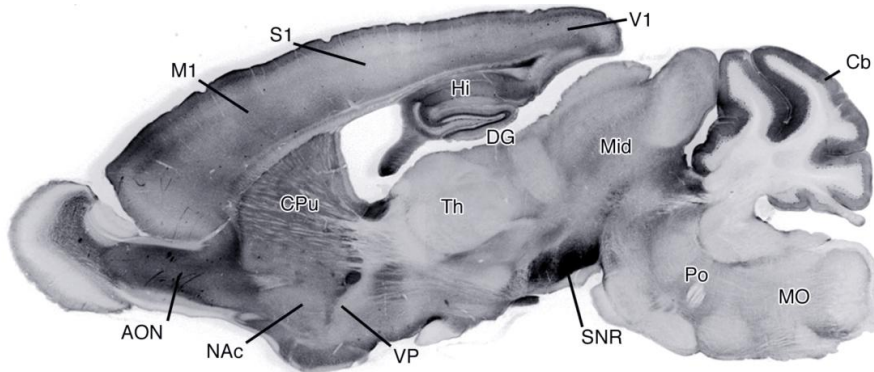


Figure 2. Immunoreactivity distribution for CB₁ receptor in a parasagittal slice of adult mouse brain. AON: anterior olfactory nucleus, Cb: cerebellar cortex, CPU: caudate putamen, DG: dentate gyrus, Hi: hippocampus, M1: primary motor cortex, Mid: midbrain, MO: medulla oblongata, NAc: nucleus accumbens, Po: pons, S1: primary somatosensory cortex, SNR: substantia nigra pars reticulata, Th: thalamus, V1: primary visual cortex, VP: ventral pallidum. Image has been modified from Kano et al., 2009.

In general, CB₁ receptor distribution is highly related to most of pharmacological effects produced by cannabinoids. Thus, its high density in basal ganglia is related to the effects produced by these compounds in the locomotor activity of rodents, producing catalepsy at high doses (Little et al., 1988). CB₁ receptor in hippocampal and cortical areas may explain the effects on learning and memory produced by cannabinoids as well as their anticonvulsant properties. Finally, its low density in the brain stem, which controls respiratory and cardiovascular functions, can explain the low toxicity and absence of lethality of marijuana.

CB₁ receptor is also present in the periphery, like spleen, tonsils, heart, prostate, uterus, ovary and presynaptic sympathetic nervous terminals (Galiegue et al., 1995; Ishac et al., 1996). Other peripheral locations for CB₁ receptor include adipose tissue, liver,

gastrointestinal tract and pancreas (Howlett et al., 2002; Cota and Woods, 2005; Juan-Picó et al., 2006; Pagotto et al., 2006).

Table 1. Human tissues and organs expressing the CB₁ receptor gene (Di Marzo et al., 2004; Pagotto et al., 2006).			
Central nervous system	Genitourinary / reproductive system	Gastrointestinal system	Others
<ul style="list-style-type: none"> · Brain · Spinal cord 	<ul style="list-style-type: none"> · Kidney · Placenta · Prostate · Testis and sperm · Uterus 	<ul style="list-style-type: none"> · Ileum · Liver · Stomach · Pancreas 	<ul style="list-style-type: none"> · Adipose tissue · Lung · Skeletal muscle · Spleen

- **CB₂ receptor**

CB₂ receptor is mainly localized in spleen, tonsils and cells of immune system (Galiegue et al., 1995; Schatz et al., 1997). CB₂ receptor present in these tissues and cells seems to be responsible for the immunosuppressive properties of marijuana (Klein et al., 1998). CB₂ receptor may also be expressed in nervous tissue, particularly after a lesion (Demuth and Molleman, 2006).

- **TRPV1 receptor**

Initially, TRPV1 receptor was identified and cloned in peripheral afferent fibers (Caterina et al., 1997) but there are more and more pieces of evidence of its presence in the brain (Kauer and Gibson, 2009). Immunohistochemical techniques (Sanchez et al., 2001a; Cristino et al., 2006; Puente et al., 2011), in situ hybridization, PCR (Sasamura et al., 1998; Mezey et al., 2000) and autoradiography (Roberts et al., 2004) have shown TRPV1 distribution in the prefrontal cortex, amygdala, hypothalamus, periaqueductal gray, locus coeruleus, cerebellum, hippocampus and dentate gyrus.

1.1.3. Signaling pathways

- CB₁ receptor

CB₁ receptor activation, which is coupled to G_{i/o} protein, produces the inhibition of the adenylyl cyclase reducing cAMP intracellular levels, inhibition of type N and P/Q Ca²⁺ channels and the increase of K⁺ conductivity. The effect over these channels seems to be the basis of the inhibition exerted by cannabinoids on neurotransmitter release. Finally, cannabinoids also activate MAP kinase pathway, which is involved in differentiation and proliferation (Bouaboula et al., 1995). Endocannabinoid-mediated CB₁ receptor activation in nerve terminals inhibits neurotransmission in numerous brain regions, like the striatum, hippocampus, cerebellum, cortex, hypothalamus and accumbens, among others (Kawamura et al., 2006). Ca²⁺ channels inhibition and K⁺ channels stimulation contribute to the inhibition of neuronal excitability and supression of neurotransmitter release (Di Marzo et al., 2004). CB₁ receptor activation inhibits GABA or glutamate release, according to the type of CB₁ receptor expressing neuron, and also inhibits neuropeptide release in nervous terminals that contain the CB₁ receptor (Mackie, 2006).

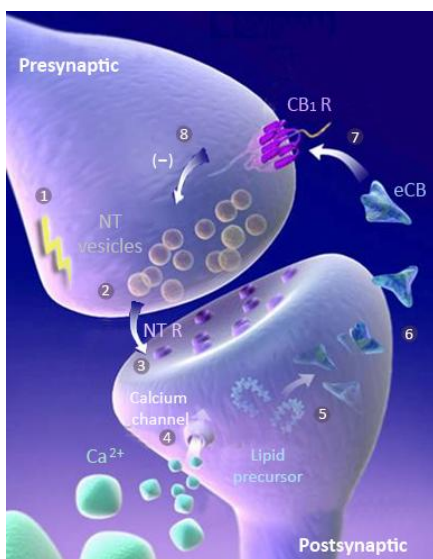


Figure 3. Retrograde signaling mediated by endocannabinoids:

1. Nerve impulse arrival and depolarization of presynaptic terminal.
2. Neurotransmitter (NT) release.
3. Binding of the neurotransmitter to its postsynaptic receptor (NT R).
4. Calcium entrance in the postsynaptic element.
5. Endocannabinoid (eCB) synthesis from lipid precursors.
6. Endocannabinoid diffusion through plasma membrane.
7. Endocannabinoid binding to presynaptic CB₁ receptor (CB₁ R).
8. Inhibition of neurotransmitter release.

Image has been adapted from "Endocannabinoid System Network" (Courtesy of Dr. V. Di Marzo).

- **CB₂ receptor**

CB₂ receptor activation also produces the inhibition of adenylyl cyclase and activation of MAP kinase pathway. However, CB₂ receptor is not able to modify Ca²⁺ and K⁺ channel currents (Felder et al., 1995).

- **Other mechanisms**

Under certain circumstances CB₁ receptors can also couple to G_s and G_{q/11} proteins (Díaz-Laviada and Ruiz-Llorente, 2005; Childers, 2006; Demuth and Molleman, 2006). It has also been shown that cannabinoid ligands induce an increase in the intracellular calcium concentration, mainly through the activation of phospholipase C and inositol trisphosphate (IP₃) receptors of the reticulum (Díaz-Laviada and Ruiz-Llorente, 2005; De Petrocellis et al., 2007). In addition, some endocannabinoids, like anandamide, can bind to TRPV1, which is a non selective cationic channel permeable to Na⁺, Ca²⁺ and H⁺, as described before.

1.1.4. Endocannabinoids

Endocannabinoids are endogenous compounds produced in different organs and tissues that can bind to cannabinoid receptors. Some endocannabinoids can also bind to other receptors, like TRPV1 or PPAR. In general, endocannabinoids are compounds of lipid nature and derivatives of polyunsaturated fatty acids. The most representative endocannabinoids are N-arachidonylethanolamine or **anandamide** (based on the Sanskrit word *ananda* that means “bliss”) (Devane et al., 1992) and **2-arachidonoylglycerol** (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995).

Other recently proposed endocannabinoids include 2-arachidonylglyceryl ether (2-AGE or noladin ether) (Hanus et al., 2001), O-arachidonylethanolamine (virodhamine) (Porter et al., 2002), N-arachidonoyldopamine (NADA) (Huang et al., 2002) and possibly oleamide (Leggett et al., 2004). The physiological relevance of these and other putative

endocannabinoids is currently being investigated (De Petrocellis et al., 2004; Pagotto et al., 2006).

1.1.5. Localization and pharmacological characteristics of endocannabinoids

Anandamide levels in the brain are very low. The highest levels are related to areas also enriched in cannabinoid receptors, such as hippocampus, cortex or striatum (Felder et al., 1996). However, this correlation is not complete, as other brain areas like the thalamus or brain stem have few receptors but high levels of this endocannabinoid (Felder et al., 1996; Bisogno et al., 1999). On the other hand, 2-AG concentrations in the brain are much higher (around 200 times) than anandamide (Stella et al., 1997), although in general there is a good correlation between the two endocannabinoids in the different brain areas analyzed (Bisogno et al., 1999). Moreover, anandamide usually acts as a partial agonist of CB₁ and CB₂ receptors, while 2-AG shows a full agonism for both receptors (Sugiura et al., 1999, 2006).

In addition, endocannabinoid levels vary in response to different stimuli, in distinct developmental stages and in many pathological situations (Di Marzo and Petrosino, 2007), which shows the pathophysiological importance of the endocannabinoid system and allows the intervention over this system with therapeutic objectives.

Finally, the endocannabinoid system seems to influence other physiological systems through interaction with their receptors, intracellular signaling pathways, hormones and neurotransmitters. This way, some biological effects of the endocannabinoid system may occur through a complex interfunctioning with other systems. Some of these related systems include TRPV1 vanilloid receptor, serotonergic 5-HT₃ receptor, NMDA glutamate receptor and nicotinic acetylcholine receptors (Mackie, 2008).

1.1.6. Metabolism of endocannabinoids

1.1.6.1. Biosynthesis and degradation of anandamide

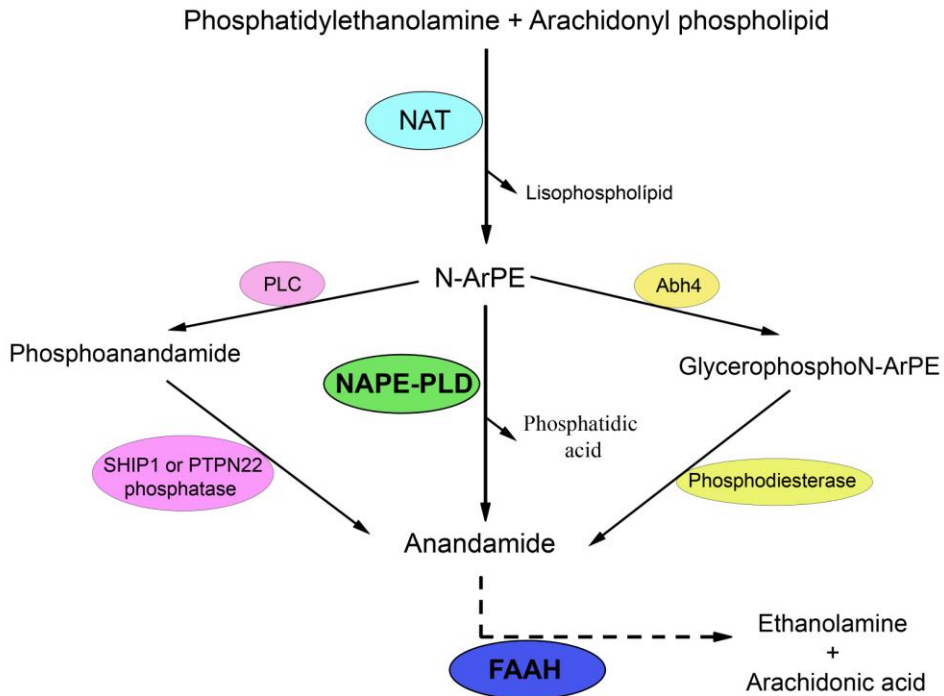


Figure 4. Possible metabolic pathways for the synthesis and degradation of anandamide.

The most accepted anandamide biosynthetic pathway is described below. The first step is the formation of a precursor named N-arachidonylphosphatidylethanolamine (N-ArPE). This reaction is catalyzed by a calcium-dependent N-acyltransferase (NAT). Then N-ArPE is hydrolyzed producing phosphatidic acid and anandamide, reaction that is catalyzed by a phospholipase D called **NAPE-PLD** (Okamoto et al., 2004, 2007; Wang et al., 2006a, Jin et al., 2007). The degradation of anandamide is mediated by a fatty acid amido hydrolase (**FAAH**), which hydrolyzes anandamide into ethanolamine and arachidonic acid. For review, see: Basavarajappa, 2007.

1.1.6.2. Biosynthesis and degradation of 2-AG

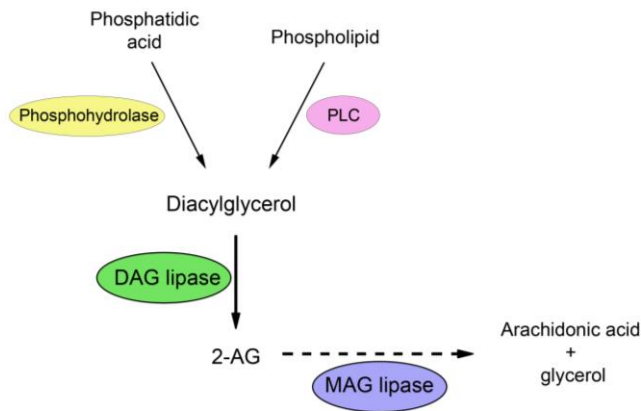


Figure 5. Main synthesizing and degrading pathway for 2-AG. 2-AG is synthesized from diacylglycerol (DAG) through **DAG lipase** enzymes (DAGL- α and DAGL- β) and degraded by a monoacylglycerol lipase (**MAG lipase**). (For review, see: Basavarajappa, 2007 and Oudin et al., 2011).

1.1.6.3. Endocannabinoid transport

At least three models for anandamide reuptake have been proposed. 1) Simple diffusion across the membrane (Glaser et al., 2003). 2) Facilitated transport through a carrier protein (Fegley et al., 2004; Ligresti et al., 2004). This model is based in data showing that anandamide transport is a saturable process (Beltramo et al., 1997), temperature dependent and can be inhibited pharmacologically with inhibitors like AM404 (Beltramo et al., 1997, Piomelli et al., 1999). Recently, it has been reported a variant of the FAAH-1 cytosolic part, named FLAT (FAAH-like anandamide transporter), which lacks amidase activity but binds anandamide facilitating its translocation into cells (Fu et al., 2011). 3) Fast endocytosis after its concentration in lipid rafts (McFarland et al., 2004; Danise et al., 2007). Some studies suggest that anandamide and 2-AG may be transported by the same system (Piomelli et al., 1999; Beltramo and Piomelli, 2000; Bisogno et al., 2001).

1.1.7. Physiological functions of the endocannabinod system

It is believed that the endocannabinoid system participates in a great variety of physiological processes including nociception, motor control, learning and memory, fear and anxiety, appetite, food intake and energy balance (Ameri, 1999; Di Marzo et al., 1998; Pagotto et al., 2006). Other physiological functions may be related to endocrine functions, vascular responses, immune system modulation, neuroprotection and bone turn-over (Correa et al., 2005; Idris et al., 2005; van der Stelt and Di Marzo, 2005; Arenos et al., 2006; de Oliveira et al., 2006; Guindon et al., 2006; Mikics et al., 2006; Wang et al., 2006b).

1.1.8. Therapeutic potential of the endocannabinoid system

The endocannabinoid system seems to play an important role in regulating many physiological processes so the development of pharmacologically active compounds over the different components of this system could be useful for the treatment of numerous pathologies. Endocannabinoid system modulation includes basically its potentiation through specific agonists or inhibitors of endocannabinoid degrading enzymes or anandamide transporter, and endocannabinoid system inhibition through antagonist drugs or inverse agonists. However, the real success of these approaches will depend on controlled and precise clinical assays and the objective valuation of their benefit/risk balance. Endocannabinoid system potentiation seems to be useful for the treatment of post-operative neuropathic pain particularly in patients with neoplastic or spastic disorders, chemotherapy associated nausea and vomiting, multiple sclerosis, Huntington or anorexia in AIDS or terminal cancer patients. On the other hand, endocannabinoid system inhibition may be useful for the treatment of obesity, cardiovascular diseases, type 2 diabetes or drug addiction.

1.2. HYPOTHALAMUS

1.2.1. General aspects

The hypothalamus is localized in the base of the brain, forming the floor and lateral walls of the third ventricle. From its central position in the brain and proximity to the hypophysis, it integrates information coming from anterior encephalic regions, brain stem, spinal cord and different chemosensitive intrinsic neurons. The hypothalamus participates in numerous physiological functions, including the control of blood flow, regulation of energetic metabolism, regulation of reproductive activity and coordination of stress responses. The hypothalamus is made of numerous different nuclei, including the preoptic nuclei, suprachiasmatic, arcuate, ventromedial, dorsomedial, paraventricular, periventricular, supraoptic, lateral and posterior hypothalamic nuclei, which express specific connectivity patterns and functions (Purves et al., 2008).

1.2.2. Ventromedial hypothalamic nucleus

1.2.2.1. Anatomy and cytoarchitecture

The ventromedial hypothalamic nucleus or VMH is located in the medial region of the hypothalamus, near to the base of the diencephalon and next to the third ventricle, above the median eminence and the hypophysis. It is an oval shaped bilateral nucleus and can be divided into various subgroups, named dorsomedial, central and ventromedial subregions, according to their specific projections and cellular types. Therefore, the VMH is considered as a collection of heterogeneous cellular types, some of which have already been identified (for review, see: McClellan et al., 2006).

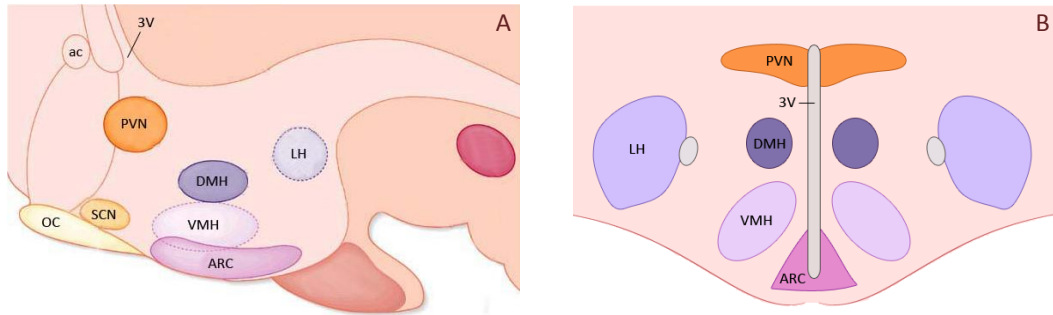


Figure 6. VMH localization in a parasagittal slice (A) and in a coronal slice (B) of rat brain.

3V: third ventricle; ac: anterior commissure; ARC: arcuate nucleus; DMH: dorsomedial nucleus; LH: lateral hypothalamus; OC: optic chiasm; PVN: paraventricular nucleus; SCN: suprachiasmatic nucleus; VMH: ventromedial nucleus. Image A has been modified from Herzog and Muglia, 2006.

1.2.2.2. VMH formation: neurogenesis and migration

VMH neurons are mainly derived from precursors of the proliferative zone surrounding the ventral portion of the third ventricle (Altman and Bayer, 1986). They are originated between embryonic days E10-E15 in mice, E13-E17 in rats and around E30 in primates (Shimada and Nakamura, 1973; Tran et al., 2003; van Eerdenburg and Rakic, 1994). Then, they migrate from the proliferative zone to achieve their final precise position within the nucleus. The VMH can be identified as a nucleus between E16-E17 in mice (Schambra et al., 1991; Tobet et al., 1999), E18-E19 in rats (Coggeshall, 1964; Hyyppä, 1969) and between gestational weeks 9-15 in humans (Koutcherov et al., 2002).

1.2.2.3. Connection patterns

The main afferents to the VMH come from the preoptic area, thalamic and epithalamic areas, amygdala and dorsal mesencephalon, including periaqueductal gray (Fahrbach et al., 1989; Canteras et al., 1994). The most important efferents reach the

amygdala, preoptic area, anterior hypothalamus, bed nucleus of the stria terminalis, periaqueductal gray, zona incerta and peripeduncular nucleus (Saper et al., 1976).

A large number of VMH neurons establish connections with anterior hypothalamus and medial preoptic area, while a small amount of neurons send connections to dorsomedial hypothalamus, paraventricular nucleus and retrochiasmatic area. In addition, VMH makes extrahypothalamic connections with the amygdala, bed nucleus of stria terminalis and periaqueductal gray (McClellan et al., 2006).

The dorsomedial subdivision of the VMH plays an important role in feeding behaviors. Neuropeptide Y positive fibers travel through the VMH dorsomedial and central regions, which are the sites where leptin receptor is located. Although not much is known about events in development that may contribute to obesity in adulthood, the correct placement of specific cell types during the development of the VMH may be an important factor in establishing the correct connections related to feeding behavior and obesity (McClellan et al., 2006).

1.2.2.4. Functions

The VMH has been related to homeostatic and behavioral functions, such as affective and sexual behavior, cardiovascular function, some role in pain pathways and regulation of food intake and energy balance (for review, see: McClellan et al., 2006).

The role attributed to the VMH in the regulation of food intake has been changing over the years according to new experimental researches (for review, see: King, 2006).

1.3. WORKING HYPOTHESIS

As it has been described, the hypothalamus plays an important role in the regulation of food intake and energy balance (Berthoud, 2002), being the dorsomedial region of the VMH, in particular, directly involved in these functions (McClellan et al., 2006). The VMH has been classically considered as a satiety nucleus and it has been described, more recently, that it drives a strong excitatory input to POMC (proopiomelanocortin) arcuate neurons, thus contributing to the activation of anorexigenic neuronal pathways (Sternson et al., 2005).

Derivatives of the plant *Cannabis sativa* can regulate food intake and the endocannabinoid system controls neuronal signaling of hypothalamic pathways (Pagotto et al., 2006). In general, the specific binding and the low expression of cannabinoid receptors in the hypothalamus (Herkenham et al., 1991; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992), is correlated with a lower immunocytochemical intensity for CB₁ (Wittmann et al., 2007), but these receptors show higher efficiency in the hypothalamus than in other brain regions (Breivogel et al., 1997). The VMH in particular has very high levels of CB₁ mRNA (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992) which can be translated into a moderate immunolabeling in this nucleus (Wittmann et al., 2007).

As for endocannabinoids, hypothalamic anandamide and 2-AG levels increase during fasting and decrease after food intake, reaching a critical point that favors a motivational state for food intake (Kirkham et al., 2002; Di Marzo and Matias, 2005; Pagotto et al., 2006; Matias and Di Marzo, 2007). Anandamide administration into the VMH stimulates appetite in rats (Jamshidi and Taylor, 2001), while animals cronicly treated with CB₁ antagonists (Colombo et al., 1998; Di Marzo et al., 2001; Pagotto et al., 2006) and CB₁-KO mice (Di Marzo et al., 2001; Cota et al., 2003; Pagotto et al., 2006) exhibit an anorexigenic phenotype. Presynaptic activation of CB₁ inhibits excitatory and inhibitory neurotransmission in neuronal circuits involved in food intake (Piomelli, 2003; Pagotto et al., 2006; Matias and Di Marzo, 2007; Kano et al., 2009). It has been recently shown, in a study in which our laboratory has taken part, that conditional mutant mice

lacking CB₁ in cortical glutamatergic neurons (Glu-CB₁-KO) exhibit a hypophagic phenotype after fasting very similar to full CB₁-KO. On the contrary, GABA-CB₁-KO mice that lack CB₁ in GABAergic neurons of the prosencephalon show a hyperphagic phenotype in the same experimental conditions (Bellocchio et al., 2010). Therefore, the endocannabinoid system exerts a neuronal modulation through activation of presynaptic CB₁ receptors of both excitatory and inhibitory pathways of different brain networks that regulate homeostatic and behavioral functions, including food intake.

In view of the described observations, our working hypothesis is that the main components of the endocannabinoid system, such as CB₁ receptors and the synthesizing and degrading enzymes for the two principal endocannabinoids, must be present in the neural circuits that converge into the ventromedial nucleus of the hypothalamus.

2. OBJECTIVES

The proposed objectives in this work were:

- 1- Analyze the cellular and subcellular architecture of the CB₁ receptors in the mouse VMH:
 - a. Describe the CB₁ receptor distribution in the VMH of wild-type and conditional mutant mice for this receptor.
 - b. Study the subcellular localization of CB₁ in the mouse VMH.
 - c. Analyze the CB₁ receptor contribution to the excitatory and inhibitory neurotransmission in the dorsomedial region of the mouse VMH.

- 2- Study the subcellular localization of CB₁ in mouse VMH astrocytes.

- 3- Analyze the cellular and subcellular distribution of the main synthesizing and degrading enzymes of endocannabinoids in the mouse VMH:
 - a. Synthesizing and degrading enzymes for anandamide: NAPE-PLD and FAAH.
 - b. Synthesizing and degrading enzymes for 2-AG: DAGL- α and MAGL.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. WORKING PLAN

To achieve the proposed objectives, we have used specific antibodies and the immunocytochemical techniques that are described below. We have also made the corresponding quantification and statistical analysis of the obtained data.

Type of microscopy	Light microscopy	Confocal microscopy	Electron microscopy	
Immunocyto-chemical method	Immuno-peroxidase	Double immuno-fluorescence	Preembedding silver-intensified immunogold	Preembedding double labeling of immunogold and immuno-peroxidase
Antibodies	CB ₁	CB ₁ and vGluT-1	CB ₁	CB ₁ and GFAP
	NAPE-PLD		NAPE-PLD	
	FAAH		FAAH	
	DAGL-α		DAGL-α	
	MAGL		MAGL	
Research animals	CB ₁ -WT Glu-CB ₁ -KO GABA-CB ₁ -KO CB ₁ -KO	CB ₁ -WT Glu-CB ₁ -KO GABA-CB ₁ -KO CB ₁ -KO	CB ₁ -WT Glu-CB ₁ -KO GABA-CB ₁ -KO CB ₁ -KO	GFAP-CB ₁ -WT GFAP-CB ₁ -KO CB ₁ -KO

Table 2. Summary of the techniques, antibodies and animals used.

3.2. ANTIBODIES

Antibody	Commercial source	Host	Concentration
CB ₁	Frontier Science	Goat	2 µg/ml
CB ₁	Kindly provided by Dr. K. Mackie	Rabbit	1:1000
NAPE-PLD	Frontier Science	Guinea-pig	4 µg/ml
FAAH	Cayman Chemical	Rabbit	1:100
DAGL-α	Frontier Science	Rabbit	2 µg/ml
MAGL	Cayman Chemical	Rabbit	1:100
vGluT-1	Millipore	Guinea-pig	1:1000
GFAP	Sigma-Aldrich	Mouse	1:1000

Table 3. Summary of primary antibodies used.

Antibody	Commercial source	Host	Concentration
Nanogold anti-goat	Nanoprobes	Rabbit	1:100
Nanogold anti-rabbit	Nanoprobes	Goat	1:100
Nanogold anti-guinea-pig	Nanoprobes	Goat	1:100
Biotinylated anti-goat	Vector Laboratories	Horse	1:200
Biotinylated anti-rabbit	Vector Laboratories	Goat	1:200
Biotinylated anti-guinea-pig	Jackson ImmunoResearch	Horse	1:200
Biotinylated anti-mouse	Vector Laboratories	Horse	1:200
A488 anti-goat	Molecular Probes	Donkey	1:650
Cy5 anti-guinea-pig	Jackson ImmunoResearch	Donkey	1:650

Table 4. Summary of secondary antibodies used.

Characterization of primary antibodies:

In all cases, we have performed in the same experimental conditions the following controls of specificity: positive control in the hippocampus and negative control by omitting incubation in primary antibody. In addition, the CB₁ antibodies used in this Doctoral Thesis were tested in CB₁-KO mice. No trace of immunolabeling was observed in this CB₁ null tissue, indicating that the antibodies applied were highly specific. Although an exhaustive analysis of the other antibodies is required to be performed in the specific knock-out mice for each protein, the specificity of them was somehow confirmed in previous studies.

- **CB₁** (Frontier Science co. Ltd.): Immunoblot detects a single protein band at 52kDa. This selectively stains nerve terminals and preterminals of particular excitatory and inhibitory neurons (Antibody's data sheet, Frontier Science). References: Yoshida et al., 2006; Uchigashima et al., 2007; Puente et al., 2010.
- **CB₁** (kindly provided by Dr. K. Mackie): The specificity of this antibody (L15) is described in Nyíri et al., 2005. Other references: Han et al., 2012.
- **NAPE-PLD** (Frontier Science co. Ltd.): Immunoblot detects a protein band around 45kDa. This selectively stains wild-type mouse brain, but not NAPE-PLD-KO brain by immunohistochemistry (Antibody's data sheet, Frontier Science). References: Nyilas et al., 2008; Puente et al., 2011.
- **FAAH** (Cayman Chemical Company): The purified enzyme from rat has an estimated molecular mass of 63kDa (Cravatt et al., 1996). This antibody recognized a band of 63kDa on western blot of rat cerebellum, as expected, and it was absent when preincubating with the corresponding immunizing peptide (20µg/ml; Cayman Chemical) (Suárez et al., 2008, 2010).
- **DAGL-α** (Frontier Science co. Ltd.): Immunoblot recognizes a 105 or 120kDa protein band in the hippocampus and cerebellum respectively (Yoshida et al., 2006). Other references: Uchigashima et al., 2007; Puente et al., 2011.

- **MAGL** (Cayman Chemical Company): It recognized the expected bands (35, 37 and 62kDa) (Dinh et al., 2002; Suárez et al., 2008, 2010) and both bands disappeared after adsorption with immunizing peptide (Dinh et al., 2002).
- **vGluT-1** (Millipore): Its specificity is described in the antibody's data sheet (Millipore). This antibody has been tested on tissue sections from the rat central nervous system by immunofluorescence and histochemistry, labeling nerve fibers and terminals. This staining pattern corresponds to the pattern described using other antibodies to vGluT-1 (Bellocchio et al., 1998; Fremeau et al., 2001; Fujiyama et al., 2001; Sakata-Haga et al., 2001; Kaneko et al., 2002; Varoqui et al., 2002). Preabsorption of vGluT-1 antibody with immunogen peptide (Cat. No. AG208, Millipore) eliminates all immunostaining.
- **GFAP** (Sigma-Aldrich): This antibody has been tested for immunocytochemical localization of GFAP in human, pig and rat tissues. In indirect immunofluorescence on alcohol-fixed, paraffin-embedded or frozen sections, this antibody stains astrocytes and Bergmann glia cells, gliomas and other glial cell derived tumors. The antibody specifically localizes GFAP by immunoblot technique. In addition, it does not cross react with vimentin, which is frequently coexpressed in glioma cells and some astrocytes (Antibody's data sheet, Sigma-Aldrich). References: Han et al., 2012.

3.3. RESEARCH ANIMALS

Animal experimental procedures were carried out in accordance with European Communities Council Directives (2003/65/CE and 2010/63/UE) and current Spanish regulations (Real Decreto 1201/2005 and Ley 32/2007). The protocols for animal care and use were approved by the appropriate Committee at the University of the Basque Country (UPV/EHU) (CEBA/93/2010/GRANDESMORENO). Furthermore, great efforts were made in order to minimize the number and suffering of the animals used.

Animals used in this Doctoral Thesis are summarized below and were kindly provided by Dr. Giovanni Marsicano (Neurocentre Magendie, INSERM U862, Bordeaux, France). The generation, genotyped and behavioral characterization of these mice is described in Marsicano et al., 2002 and Monory et al., 2006. The specific generation of GFAP- CB_1 -KO mice is described in Han et al., 2012.

- **CB_1 -WT**: CB_1 wild-type mice have a normal expression of CB_1 receptor.
- **CB_1 -KO**: CB_1 knock-out mice lack CB_1 receptor in all the cells of the body.
- **Glu- CB_1 -KO**: Conditional mutant mice that lack CB_1 receptor in the majority of cortical glutamatergic neurons.
- **GABA- CB_1 -KO**: Conditional mutant mice that lack CB_1 receptor in GABAergic neurons of the prosencephalon.
- **GFAP- CB_1 -KO**: Conditional mutant mice that lack CB_1 receptor specifically in astrocytes. Control animals for these transgenic mice are named GFAP- CB_1 -WT and they have a normal expression of CB_1 receptor.

In general, at least 3 animals of each experimental condition have been used for the different studies.

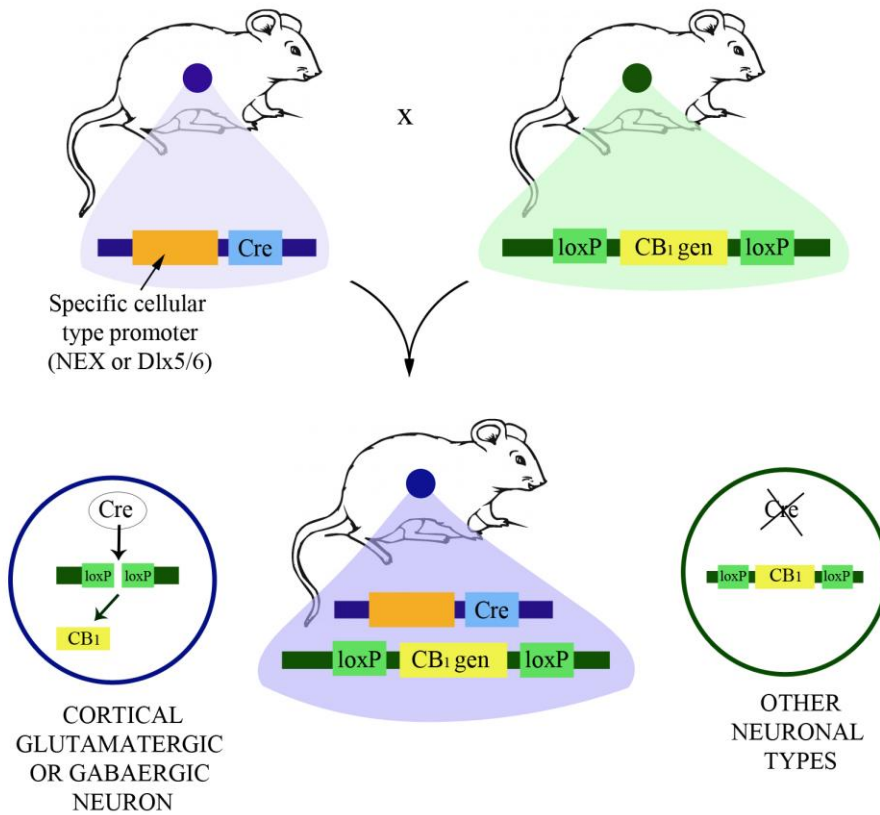


Figure 7. Generation of conditional CB_1 mutant mice. Conditional CB_1 mutant mice were obtained by crossing the respective Cre-expressing mouse line with $CB_1^{f/f}$ mice (Marsicano et al., 2003), using a three-step breeding protocol (Monory et al., 2006).

3.4. IMMUNOCYTOCHEMICAL TECHNIQUES

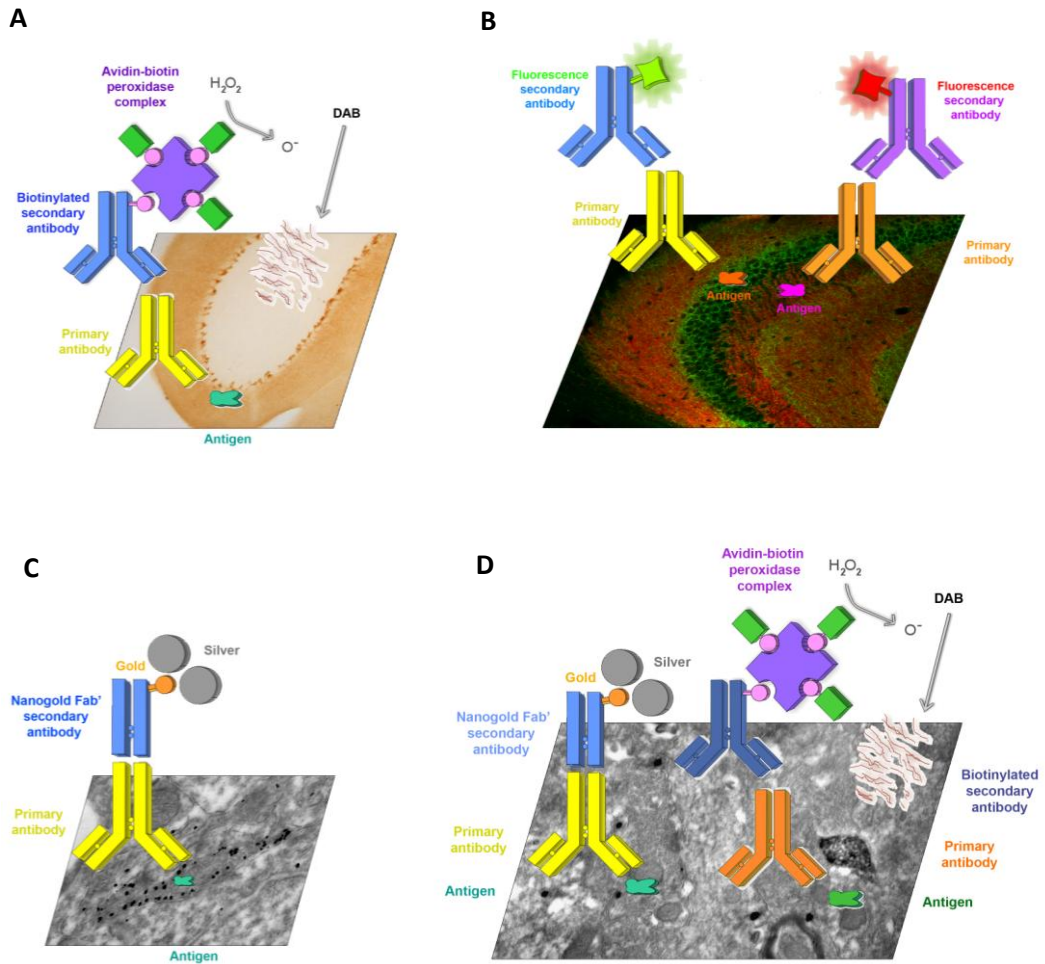


Figure 8. Images showing the main steps of the immunocytochemical techniques used.

- A. Immunoperoxidase method for light microscopy.
- B. Double immunofluorescence method.
- C. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy.
- D. Preembedding double labeling of silver-intensified immunogold and immunoperoxidase method for electron microscopy.

3.5. TISSUE PROCESSING

3.5.1. Transcardially perfusion of the animals

1. Anesthesia of the animals after intraperitoneal injection of ketamine/xilacine (80/10 mg/kg).
 2. Transcardially perfusion with phosphate buffer saline (PBS 1X, pH 7.4) for 20 seconds (s), followed by 250 ml of the fixative solution made up of 4% paraformaldehyde, 0.2% saturated picric acid and 0.1% glutaraldehyde in phosphate buffer (PB) 0.1M (pH 7.4) for 10-15 minutes (min). All solutions were used at room temperature (RT, 20-25°C). To investigate CB₁ in astrocytes the Zamboni's fixative, made up of 2% paraformaldehyde and 15% saturated picric acid in 0.1M PB (pH 7.4) was used (Stefanini et al., 1967).
 3. Brain removal and immersion in pure fixative solution for 1 week at 4°C.
 4. Storage in 1:10 diluted fixative solution and 0.025% sodium azide at 4°C until it was processed.
-

3.5.2. Avidin-biotin peroxidase method for light microscopy

1. Coronal vibrosections of 50µm in PB 0.1M.
 2. Preincubation in a blocking solution of 10% bovine serum albumin (BSA), 0.1% sodium azide and 0.5% triton X-100 prepared in Tris-HCl buffered saline (TBS 1X, pH 7.4) for 30 min at RT.
 3. Incubation in the corresponding primary antibody: CB₁ (2µg/ml, Frontier Science), NAPE-PLD (4µg/ml), FAAH (1:100), DAGL-α (2µg/ml) or MAGL (1:100) prepared in the blocking solution on a shaker for 2 days at 4°C.
 4. Several washes in TBS 1X, 1% BSA and 0.5% triton X-100 for 30 min.
-

5. Incubation in the corresponding biotinylated secondary antibody (1:200) prepared in the washing solution for 1 h on a shaker at RT.
6. Several washes in TBS 1X, 1% BSA and 0.5% triton X-100.
7. Incubation in avidin-biotin complex (1:50) prepared in the washing solution for 1 h at RT.
8. Several washes in TBS 1X, 1% BSA and 0.5% triton X-100. Last washes in 0.1M PB and 0.5% triton X-100.
9. Incubation in 0.05% diaminobenzidine (DAB) and 0.01% hydrogen peroxide prepared in PB 0.1M and 0.5% triton X-100 for 5 min at RT.
10. Several washes in PB 0.1M and 0.5% triton X-100.
11. Mounting the tissue on gelatinized portaobjects.
12. Dehidratation in graded alcohols (50°, 70°, 96°, 100°) for 5 min each.
13. Clearing in xylol (3 times of 5 min).
14. Coverslipping with DPX.
15. Observation with a Zeiss Axiophot light microscope.

3.5.3. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy

1. Coronal vibrosections of 50µm in 0.1M PB.
2. Preincubation in a blocking solution of 10% BSA, 0.1% sodium azide and 0.02% saponin prepared in TBS 1X for 30 min at RT.
3. Incubation in the corresponding primary antibody: CB₁ (2µg/ml, Frontier Science), NAPE-PLD (4µg/ml), FAAH (1:100), DAGL-α (2µg/ml) or MAGL (1:100) prepared in the blocking solution but with 0.004% saponin on a shaker for 2 days at 4°C.
4. Several washes in TBS 1X and 1% BSA for 30 min.
5. Incubation in the corresponding 1.4nm nanogold secondary antibody (1:100) prepared in the same solution as the primary antibody for 3 h on a shaker at RT.

6. Several washes in TBS 1X and 1% BSA overnight on a shaker at 4°C.
 7. Postfixation in 1% glutaraldehyde in TBS 1X for 10 min.
 8. Several washes in double distilled water for 30 min.
 9. Silver-intensification of gold particles with a HQ Silver kit (Nanoprobes) for 12 min in the dark.
 10. Several washes in double distilled water for 30 min.
 11. Several washes in 0.1M PB for 30 min.
 12. Osmication with 1% osmium tetroxide in 0.1M PB for 20 min at RT.
 13. Several washes in 0.1M PB for 30 min.
 14. Dehydration in graded alcohols (50°, 70°, 96° and 100°) for 5 min each and 3 times of 5 min for 100°.
 15. Clearing in propylene oxide 3 times of 5 min each.
 16. Embedding in a mixture of 1:1 propylene oxide and Epon resin 812 overnight on a shaker at RT.
 17. Embedding in Epon resin 812.
 18. Resin polymerization in a heater at 60°C for 2 days.
 19. Cutting 1µm semithin sections in the ultracut.
 20. Collection of 80nm ultrathin sections on mesh niquel grids.
 21. Staining with 2.5% lead citrate for 20 min.
 22. Observation with a Philips EM208S electron microscope.
-

3.5.4. Preembedding double labeling of silver-intensified immunogold and immunoperoxidase method for electron microscopy

1. Coronal vibrosections of 50µm in 0.1M PB.
 2. Preincubation in a blocking solution of 10% BSA, 0.1% sodium azide and 0.02%
-

saponin prepared in TBS 1X for 30 min at RT.

- 3.** Incubation in primary antibodies anti-CB₁ (1:1000, kindly provided by Dr. K. Mackie) and anti-GFAP (1:1000) prepared in the blocking solution but with 0.004% saponin on a shaker for 2 days at 4°C.
 - 4.** Several washes in TBS 1X and 1% BSA for 30 min.
 - 5.** Incubation in the corresponding 1.4nm nanogold secondary antibody (1:100) and the corresponding biotinylated secondary antibody (1:200) prepared in the same solution as the primary antibody for 4 h on a shaker at RT.
 - 6.** Several washes in TBS 1X and 1% BSA for 30 min.
 - 7.** Incubation in avidin-biotin complex (1:50) prepared in the washing solution for 1.5 h at RT.
 - 8.** Several washes in TBS 1X and 1% BSA overnight on a shaker at 4°C.
 - 9.** Postfixation in 1% glutaraldehyde in TBS 1X for 10 min.
 - 10.** Several washes in double distilled water for 30 min.
 - 11.** Silver-intensification of gold particles with a HQ Silver kit (Nanoprobes) for 12 min in the dark.
 - 12.** Several washes in double distilled water for 30 min.
 - 13.** Several washes in 0.1M PB for 30 min.
 - 14.** Incubation in 0.05% DAB and 0.01% hydrogen peroxide prepared in PB 0.1M for 5 min at RT.
 - 15.** Several washes in 0.1M PB for 30 min.
 - 16.** Osmication with 1% osmium tetroxide in 0.1M PB for 20 min at RT.
 - 17.** Several washes in 0.1M PB for 30 min.
 - 18.** Dehydration in graded alcohols (50°, 70°, 96° and 100°) for 5 min each and 3 times of 5 min for 100°.
 - 19.** Clearing in propylene oxide 3 times of 5 min each.
 - 20.** Embedding in a mixture of 1:1 propylene oxide and Epon resin 812 overnight on a shaker at RT.
 - 21.** Embedding in Epon resin 812.
 - 22.** Resin polymerization in a heater at 60°C for 2 days.
-

- 23.** Cutting 1 μ m semithin sections in the ultracut.
 - 24.** Collection of 80nm ultrathin sections on mesh niquel grids.
 - 25.** Staining with 2.5% lead citrate for 20 min.
 - 26.** Observation with a Philips EM208S electron microscope.
-

3.5.5. Immunofluorescence method

- 1.** Coronal vibrosections of 50 μ m in 0.1M PB.
- 2.** Preincubation in a blocking solution of 3% newborn calf serum (NCS), 0.025% sodium azide and 0.5% triton X-100 in PBS 1X for 1 h at RT.
- 3.** Incubation in primary antibodies anti-CB₁ (2 μ g/ml, Frontier Science) and anti-vGluT-1 (1:1000) prepared in the blocking solution on a shaker for 2 days at 4°C.
- 4.** Several washes in PBS 1X and 1.5% NCS for 30 min.
- 5.** Incubation in the corresponding secondary fluorescence antibodies (1:650) prepared in the washing solution for 24 h on a shaker at 4°C.
- 6.** Several washes in PBS 1X and 1.5% NCS for 30 min.
- 7.** Mounting the tissue on gelatinized portaobjects.
- 8.** Mounting with Vectashield and storage at 4°C.
- 9.** Observation with the Olympus fluoview FV500 confocal microscope.

3.6. STATISTICAL ANALYSIS

Electron micrographs (18,000-28,000X) were taken from grids containing silver-intensified gold particles in hypothalamic 80nm ultrathin sections. All of them showed a similar labeling intensity indicating that selected areas were at the same depth. Furthermore, to avoid false negatives, only ultrathin sections in the first 1.5 μ m from the surface of the tissue block were examined.

For subcellular localization of CB₁ and DAGL- α , positive labeling was considered if at least 1 immunoparticle was within approximately 30nm from the plasmalemma. For subcellular localization of NAPE-PLD and MAGL, positive labeling was considered if at least 1 immunoparticle was within approximately 30nm from the plasmalemma or inside the profile. Finally, for subcellular localization of FAAH, due to the intense labeling observed, positive labeling was considered if at least 6 immunoparticles for dendrites or 1 immunoparticle for synaptic terminals were within approximately 30nm from the plasmalemma or inside the profile. Silver-intensified gold particles were visualized and counted, using Image-J software (1.43u version, NIH, USA) to measure membrane length and analyzed area.

Percentages of immunopositive profiles for each protein were analyzed and displayed as mean \pm SEM using a statistical software package (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc, San Diego, USA) and group differences were compared by chi-square test, $p < 0.05$. Density of immunoparticles (immunoparticles/ μ m membrane length for CB₁ and DAGL- α as well as immunoparticles/ μ m² for NAPE-PLD, FAAH, DAGL- α and MAGL) was analyzed and displayed as mean \pm SEM using the same statistical software package described above. Finally, group differences were compared, when it was possible, by Mann Whitney test, $p < 0.05$.

4. RESULTS

4.1. CELLULAR AND SUBCELLULAR ARCHITECTURE OF CB_1 RECEPTOR IN SYNAPTIC TERMINALS OF THE VMH

4.1.1. LIGHT MICROSCOPY

4.1.1.1. Expression pattern of CB_1 in the VMH

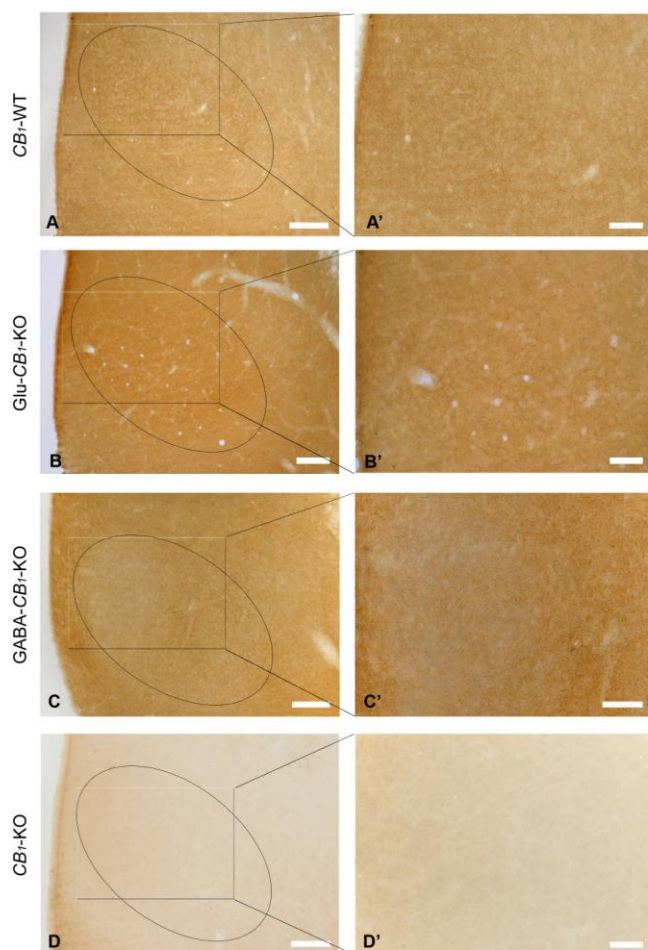


Figure 9. CB_1 immunostaining in mouse VMH. Immunoperoxidase method for light microscopy. VMH (oval shaped circle in A-D) shows a moderate punctate immunostaining in CB_1 -WT (A, A') and Glu- CB_1 -KO (B, B') mice. However, this immunoreactivity decreases in GABA- CB_1 -KO mice, particularly in the VMH dorsomedial region (C, C'). Immunolabeling disappears in CB_1 -KO tissue (D, D'). Framed areas in A-D are enlarged in A'-D'. Scale bars: 100 μ m (A-D), 50 μ m (A'-D').

4.1.1.2. Specificity controls for CB₁



Figure 10. Specificity controls for CB₁ antibody (Frontier Science). Immunoperoxidase method for light microscopy. Note the typical CB₁ immunolabeling in the hippocampus as the positive control (A) and no immunolabeling for CB₁ in hypothalamic sections of *CB₁-KO* (B) or negative control (C). Scale bars: 500µm.

4.1.2. CONFOCAL MICROSCOPY

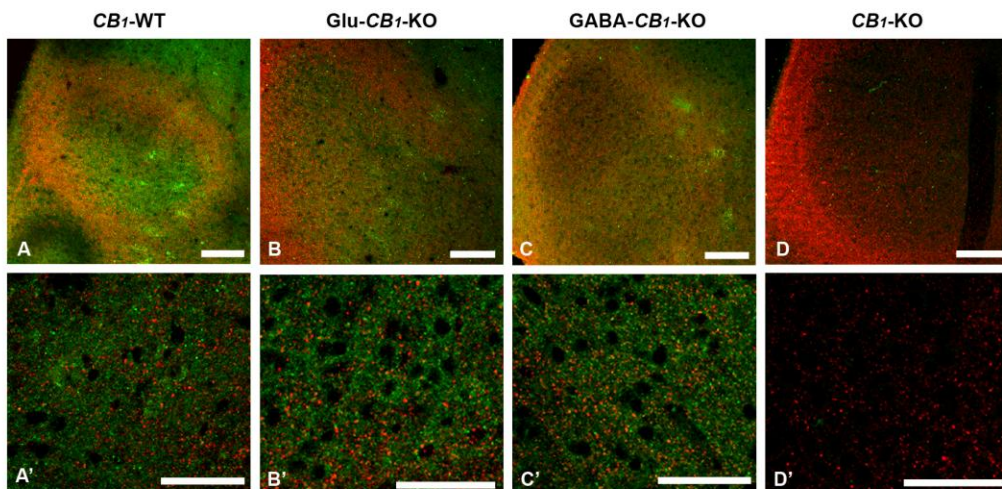


Figure 11. Localization of CB₁ and vGluT-1 in mouse VMH. Immunofluorescence method for confocal microscopy. Immunofluorescence for CB₁ (green) appears homogenously in *CB₁-WT* and *Glu-CB₁-KO*, decreasing in the VMH dorsomedial region of *GABA-CB₁-KO* and fully disappearing in *CB₁-KO* mice. Immunofluorescence for vGluT-1 (red), which identifies cortical glutamatergic fibers surrounding the VMH, is maintained in all animal conditions. Scale bars: 100µm (A-D), 50µm (A'-D').

4.1.3. ELECTRON MICROSCOPY

4.1.3.1. Subcellular distribution of CB₁ in the VMH

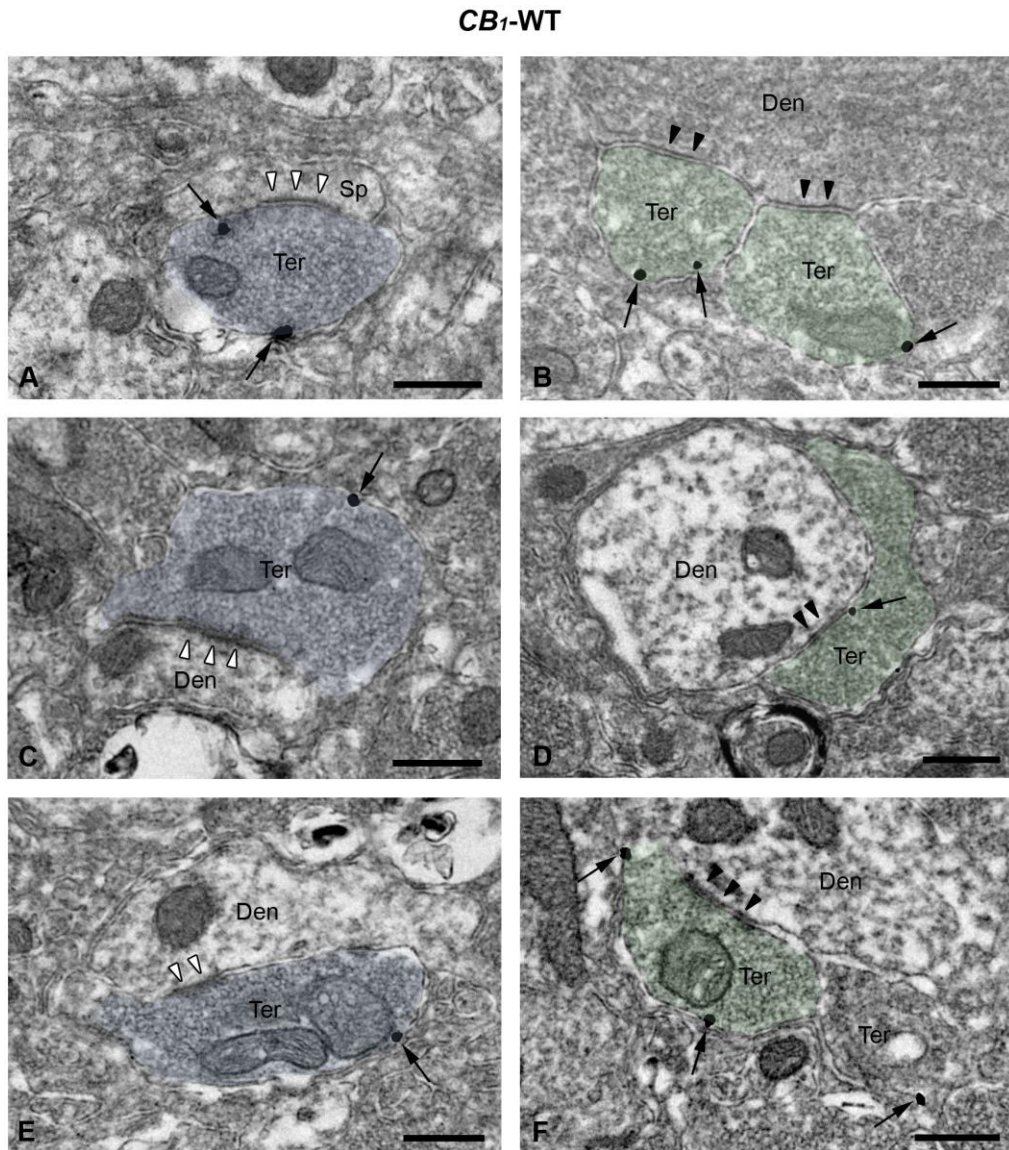


Figure 12. Ultrastructural localization of CB₁ in the VMH of CB₁-WT mice. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy. CB₁ immunoparticles (arrows) are distributed onto the membrane of presynaptic terminals (Ter) that make asymmetric (white arrowheads) or symmetric (black arrowheads) synapses with dendrites (Den) and dendritic spines (Sp). Scale bars: 0.4 μ m.

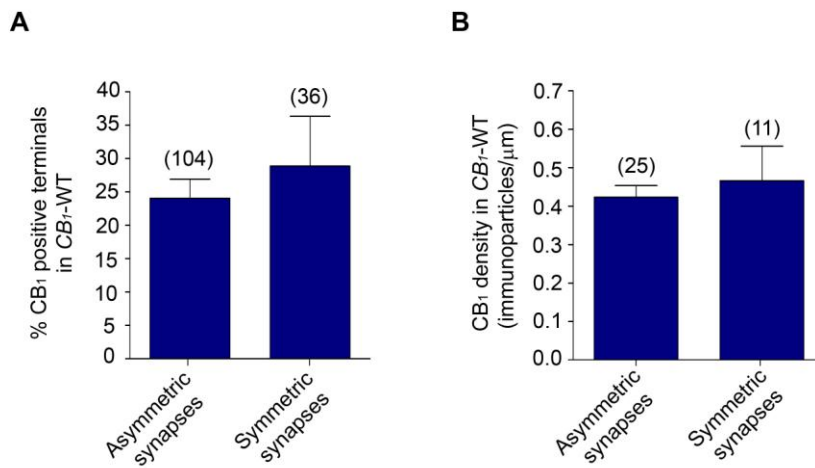


Figure 13. Statistical analysis of CB₁ receptor in terminals making asymmetric and symmetric synapses in the VMH of CB₁-WT mice. **A:** A proportion of terminals with asymmetric (24.0±2.9%) and symmetric (28.9±7.5%) synapses are CB₁ immunopositive, not detecting significant differences between both types of profiles ($\chi^2=0.5946$, $p=0.4406$, total analyzed area: 2,376 μm^2). **B:** CB₁ density after subtraction of background labeling (0.015±0.003 immunoparticles/ μm measured in the VMH of CB₁-KO) is similar in asymmetric and symmetric synaptic terminals (0.42±0.03 and 0.47±0.09 immunoparticles/ μm respectively, $p=0.6553$).

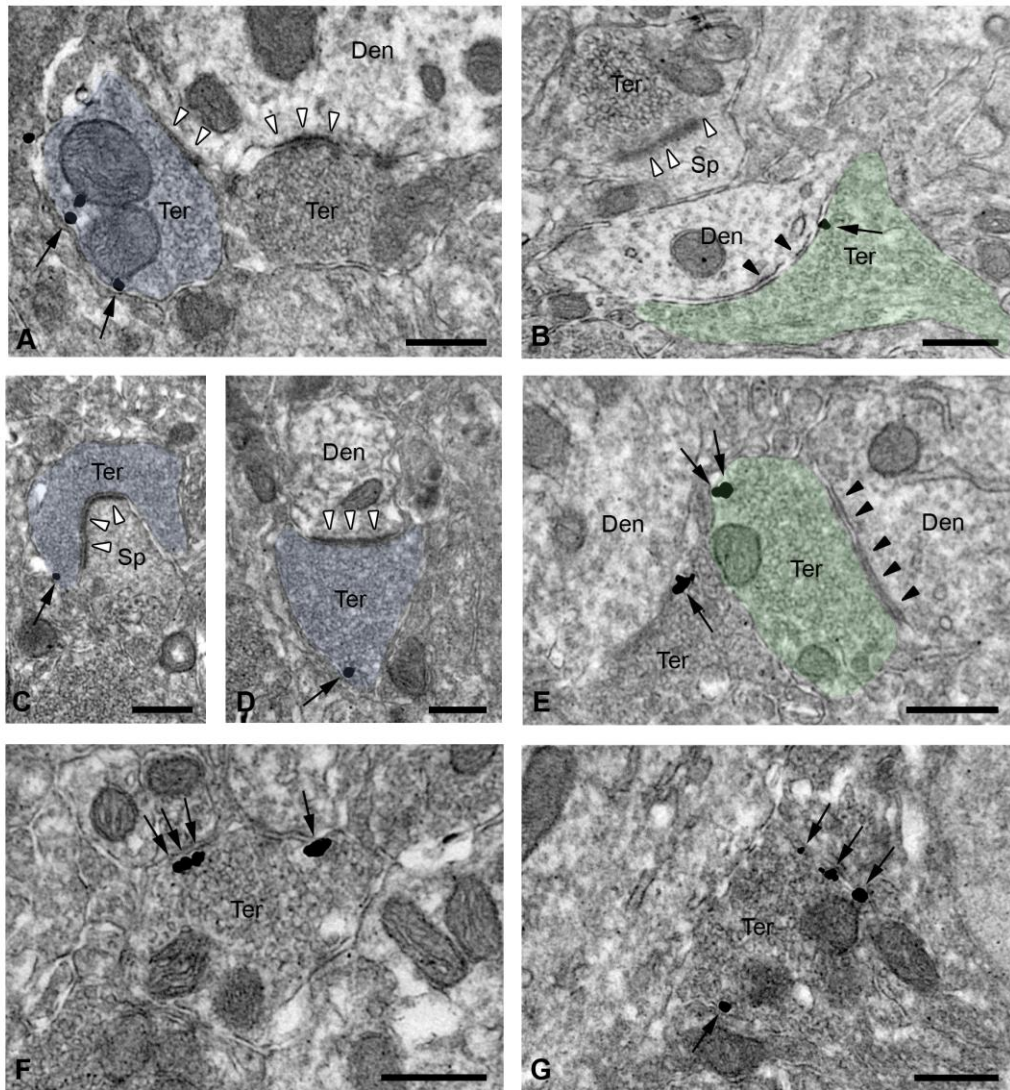
Glu-*CB₁*-KO

Figure 14. Ultrastructural localization of CB_1 in the VMH of Glu- CB_1 -KO mice. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy. CB_1 immunoparticles (arrows) are localized in asymmetric synaptic terminals (Ter) presumably of subcortical excitatory neurons (note the bigger postsynaptic density marked with white arrowheads in C and D) and in inhibitory terminals (Ter) that make inhibitory synapses (black arrowheads in B and E). Note in A and B axon terminals (Ter) CB_1 immunonegative that make asymmetric synapses (white arrowheads) with dendrites (Den) or dendritic spines (Sp). CB_1 immunopositive terminals (Ter) can also be observed (F and G) although the synaptic specialization can not be appreciated in these images. Scale bars: 0.4 μ m.

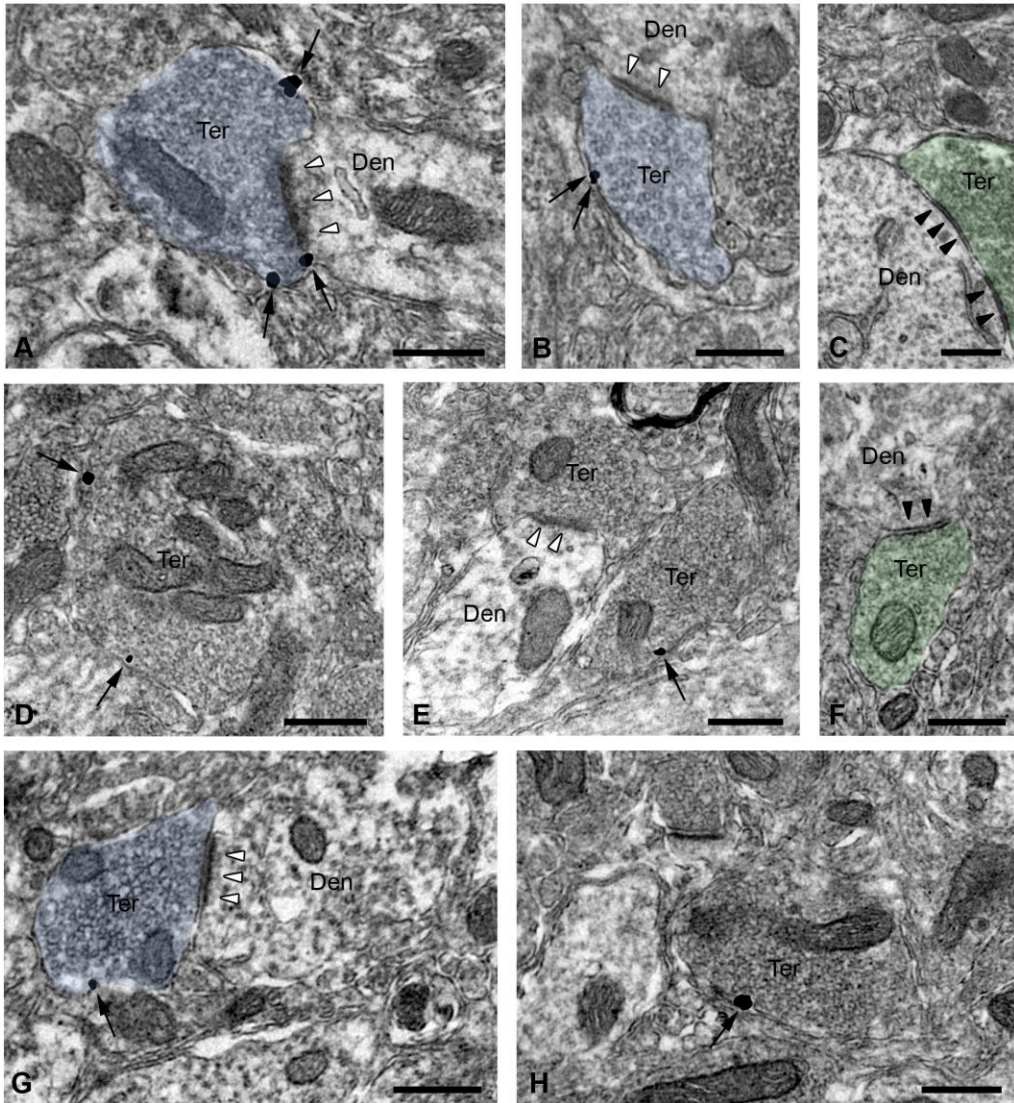
GABA-*CB*₁-KO

Figure 15. Ultrastructural localization of CB_1 in the VMH of GABA- CB_1 -KO mice. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy. Immunolabeling (arrows) appears in excitatory synaptic terminals (Ter) that make asymmetric synapses (white arrowheads in A, B and G) onto dendritic profiles (Den). Observe in C and F CB_1 immunonegative terminales (Ter) making symmetric synapses (black arrowheads) with dendrites (Den). CB_1 immunopositive terminals (Ter) can also be distinguished in D, E and H, although the synaptic specialization can not be appreciated in these images. Scale bars: 0.4 μ m.

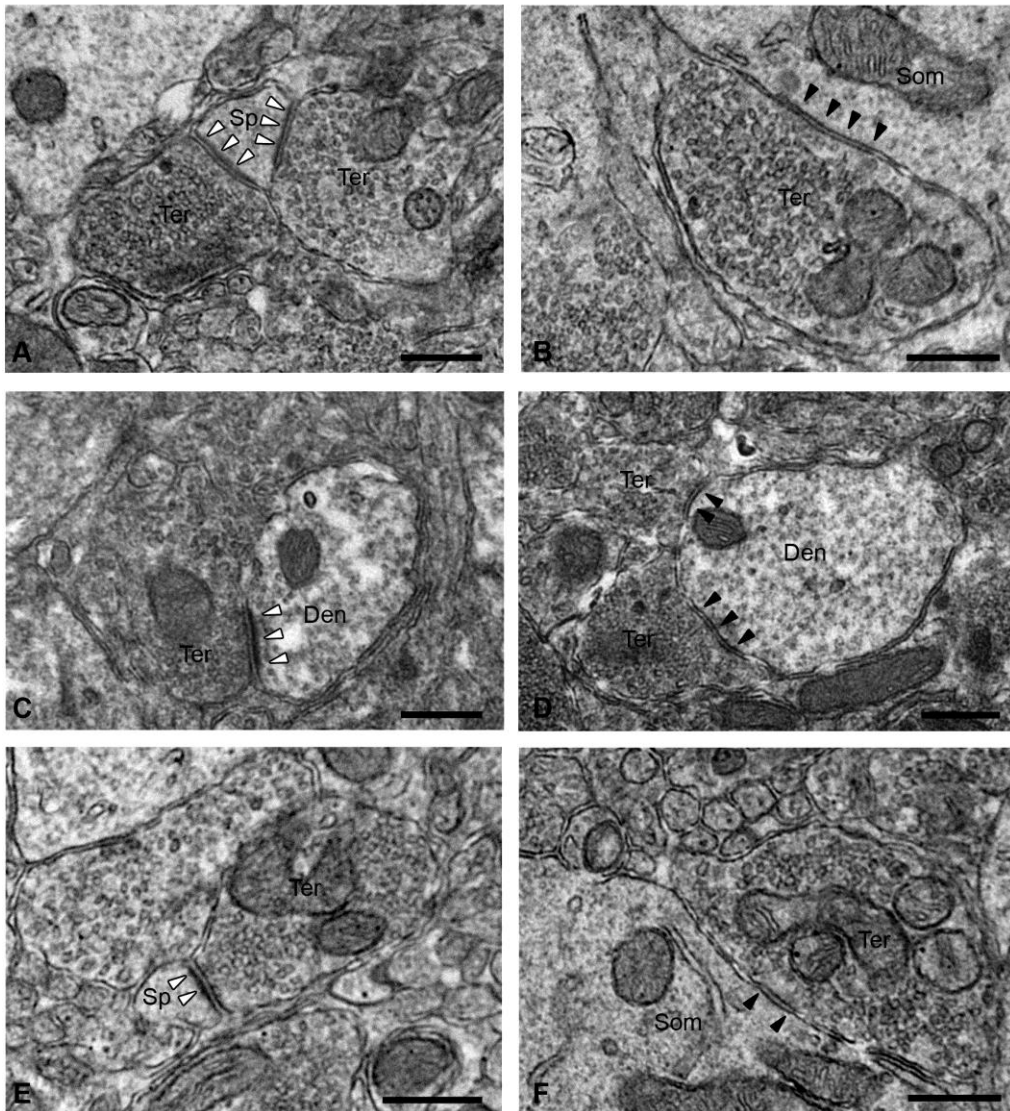
CB₁-KO

Figure 16. Ultrastructural localization of CB₁ in the VMH of CB₁-KO mice. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy. In these animals immunolabeling fully disappears in the same immunocytochemical conditions, indicating the specificity of the antibody used against CB₁. Note immunonegative synaptic terminals (Ter) that make asymmetric synapses (white arrowheads in A, C and E) and symmetric synapses (black arrowheads in B, D and F) with dendritic profiles (Den), spines (Sp) or somata (Som). Scale bars: 0.4 μm.

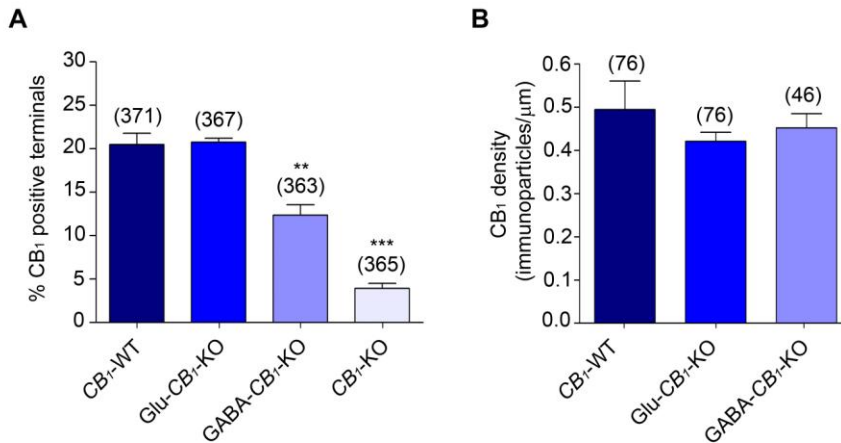


Figure 17. Statistical analysis of CB₁ in VMH synaptic terminals. **A:** Percentages of CB₁ immunopositive terminals in CB₁-WT (20.5±1.3%) is maintained in Glu-CB₁-KO (20.8±0.5%, $\chi^2=0.00024$, $p=0.9876$), decreases in GABA-CB₁-KO (12.4±1.2%, $\chi^2=8.593$, $p=0.0034$) and virtually disappears in CB₁-KO mice (3.9±0.6%, $\chi^2=48.61$, $p<0.0001$). Analyzed area for each condition: 1,467 μm^2 in CB₁-WT, 1,562 μm^2 in Glu-CB₁-KO, 1,646 μm^2 in GABA-CB₁-KO and 1,519 μm^2 in CB₁-KO. **B:** CB₁ density after subtraction of background labeling (0.015±0.003 particles/ μm measured in the VMH of CB₁-KO) is similar in CB₁-WT (0.49±0.07), Glu-CB₁-KO (0.42±0.02, $p=0.7000$) and GABA-CB₁-KO (0.45±0.03, $p=0.7000$) mice.

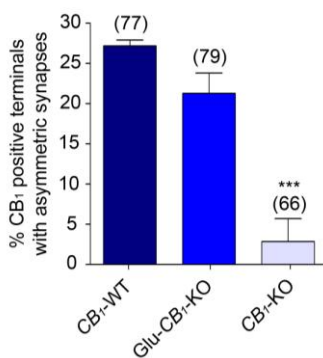


Figure 18. Statistical analysis of CB₁ in VMH asymmetric synaptic terminals. Although a small decrease can be observed, no statistically significant differences can be detected between the percentages of asymmetric CB₁ immunopositive terminals in CB₁-WT (27.2±0.7%) and Glu-CB₁-KO mice (21.3±2.5%, $\chi^2=0.4189$, $p=0.5175$). This value virtually disappears in CB₁-KO mice (2.9±2.9%, $\chi^2=15.47$, $p<0.0001$). Analyzed area for each condition: 1,352 μm^2 in CB₁-WT, 1,547 μm^2 in Glu-CB₁-KO and 1,274 μm^2 in CB₁-KO.

Overall, these results indicate that CB₁ receptors in the VMH are localized in GABAergic synaptic terminals, as well as in glutamatergic terminals mainly of subcortical origin and to a lesser extent of cortical origin.

4.2. ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF CB₁ RECEPTOR IN VMH ASTROGLIA

GFAP-CB₁-WT

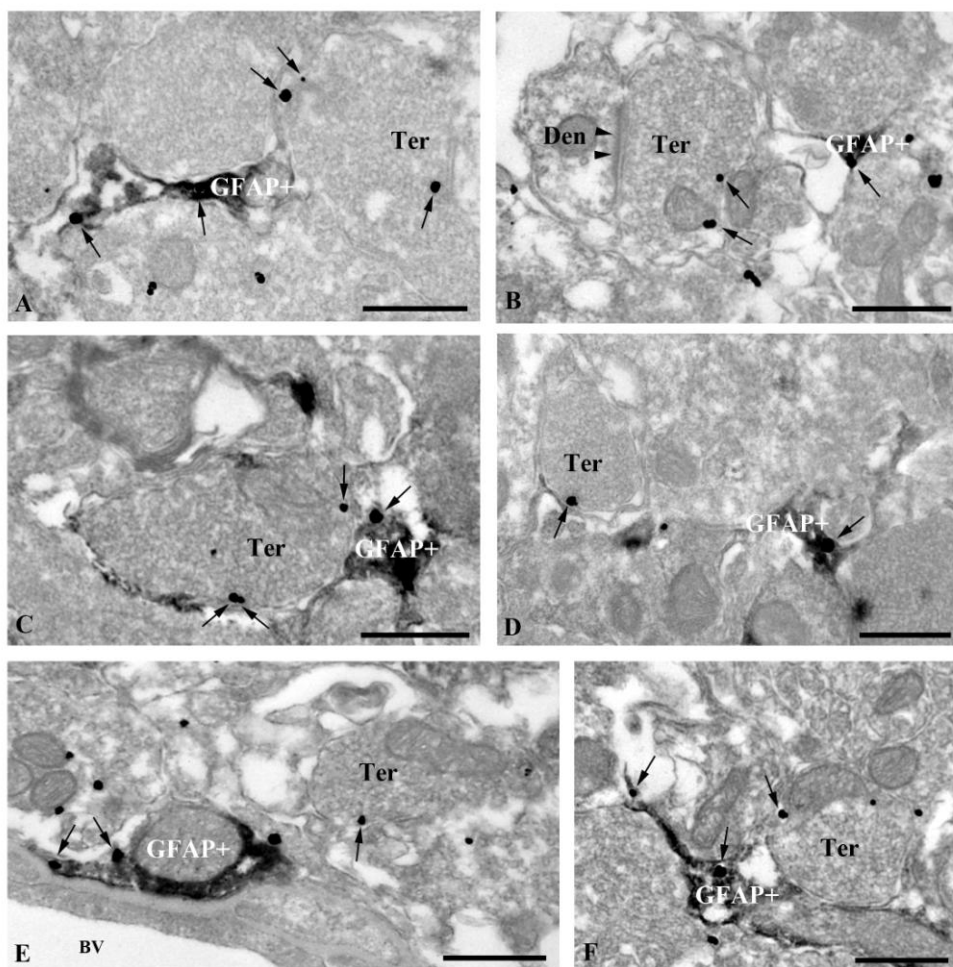


Figure 19. Ultrastructural localization of CB₁ in the VMH of GFAP-CB₁-WT mice. Preembedding double labeling of silver-intensified immunogold and immunoperoxidase method for electron microscopy. CB₁ immunoparticles (arrows) are localized on the membranes of synaptic terminales (Ter) and membranes of GFAP+ profiles (astrocytes marked with DAB). In image B a CB₁ immunopositive astrocyte can be observed next to a CB₁ positive terminal that makes synapse (arrowheads) with a small dendrite (Den). Note in all the images the extension of astrocytic processes filling the neuropil of neuronal profiles. In image E a CB₁ positive perivascular astrocyte GFAP+ can be observed next to a blood vessel (BV). Scale bars: 0.5µm.

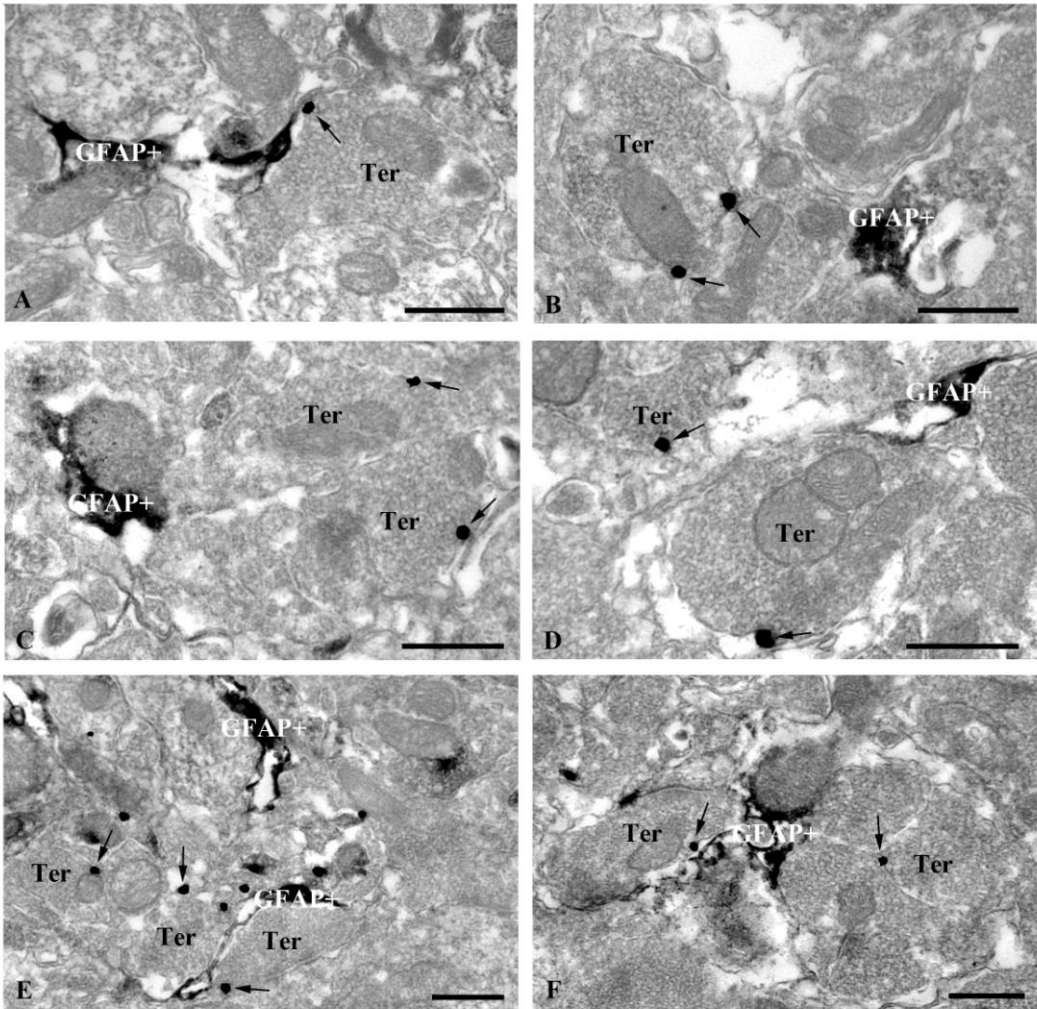
GFAP-*CB₁*-KO

Figure 20. Ultrastructural localization of CB_1 in the VMH of GFAP- CB_1 -KO mice. Preembedding double labeling of silver-intensified immunogold and immunoperoxidase method for electron microscopy. CB_1 immunoparticles (arrows) appear exclusively in membranes of synaptic terminales (Ter), while astrocytic compartments (GFAP+) are devoid of CB_1 receptor, which corresponds to the genotype of these animals. Scale bars: 0.5 μ m.

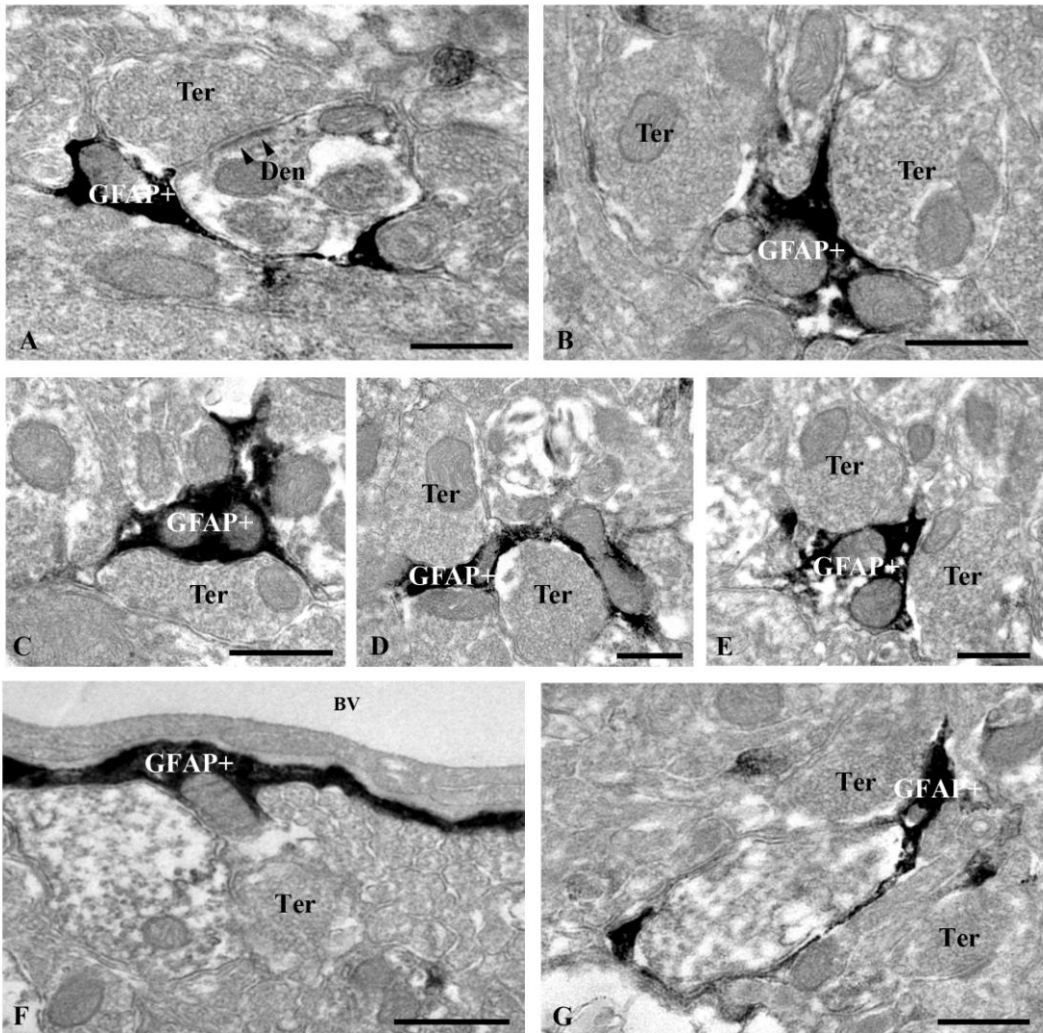
CB₁-KO

Figure 21. Ultrastructural localization of CB₁ in the VMH of *CB₁*-KO mice. Preembedding double labeling of silver-intensified immunogold and immunoperoxidase method for electron microscopy. CB₁ immunolabeling fully disappears in these animals, maintaining the DAB immunodeposit that identifies astrocytes. Images show synaptic terminals (Ter) and astrocytes (GFAP+) immunonegative for CB₁. Note in image A a terminal (Ter) making synapse (arrowheads) with a dendrite (Den) and in image F a perivascular astrocyte (GFAP+) surrounding a blood vessel (BV). Scale bars: 0.5µm.

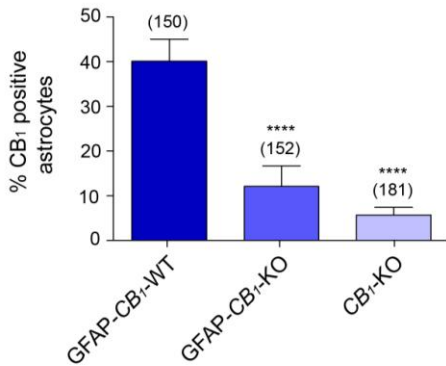


Figure 22. Statistical analysis of CB₁ receptor in VMH astrocytes. In GFAP-CB₁-WT, 40.1±5.0% of astrocytes are CB₁ immunopositive. This percentage drastically decreases to 12.1±4.6% ($\chi^2=30.55$, $p<0.0001$) in GFAP-CB₁-KO and virtually disappears in CB₁-KO mice (5.7±1.7%, $\chi^2=52.80$, $p<0.0001$). Analyzed area for each condition: 1,652 μm^2 in GFAP-CB₁-WT, 1,737 μm^2 in GFAP-CB₁-KO and 2,018 μm^2 in CB₁-KO mice.

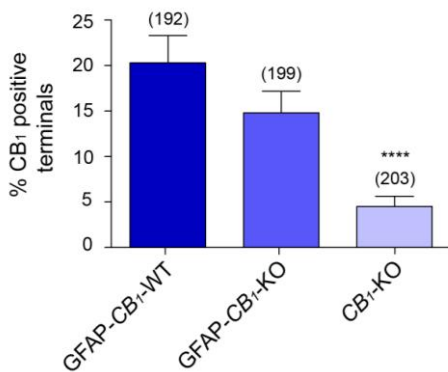


Figure 23. Statistical analysis of CB₁ receptor in VMH synaptic terminals. No statistically significant differences can be detected between the percentage of CB₁ immunopositive terminals observed in GFAP-CB₁-WT (20.3±3.0%) and GFAP-CB₁-KO mice (14.8±2.4%, $\chi^2=1.490$, $p=0.2222$). This value virtually disappears in CB₁-KO mice (4.5±1.1%; $\chi^2=21.50$, $p<0.0001$). Analyzed area for each condition: 936 μm^2 in GFAP-CB₁-WT, 969 μm^2 in GFAP-CB₁-KO and 936 μm^2 in CB₁-KO.

Overall, these results indicate that CB₁ receptor, in addition to its localization in VMH synaptic terminals as previously described, is also widely localized in astrocytes of the dorsomedial region of the VMH.

4.3. IMMUNOLocalIZATION OF SYNTHESIZING AND DEGRADING ENZYMES OF ANANDAMIDE IN THE VMH

4.3.1. LIGHT MICROSCOPY

4.3.1.1. Expression of NAPE-PLD and FAAH in the VMH

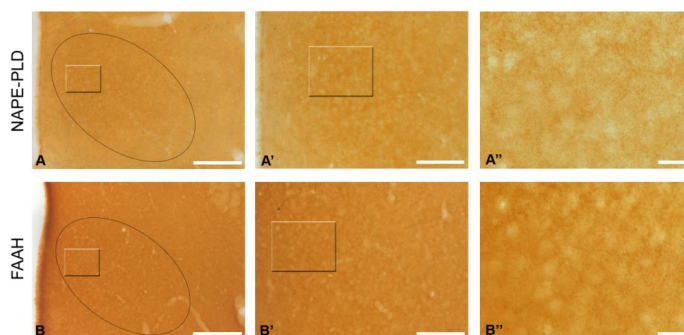


Figure 24. Immunolabeling for NAPE-PLD and FAAH in the VMH. Immunoperoxidase method for light microscopy. VMH (oval shaped circle in A and B) shows a moderate immunolabeling for both enzymes with punctate appearance. Framed areas in A, A' and B, B' are enlarged in A'' and B'' respectively. Scale bars: 200 μ m (A and B), 100 μ m (A' and B'), 20 μ m (A'' and B'').

4.3.1.2. Specificity control for NAPE-PLD and FAAH

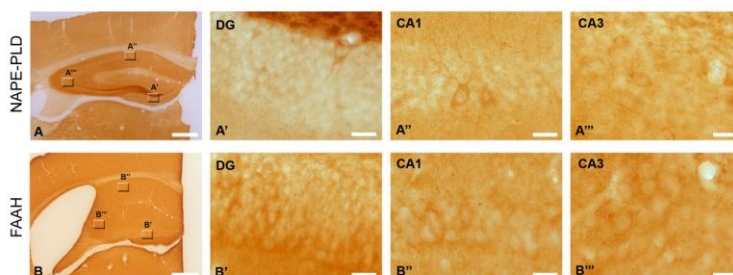


Figure 25. Positive control for NAPE-PLD and FAAH antibodies. Immunoperoxidase method for light microscopy. Note labeling for both enzymes in hippocampal different regions (dentate gyrus or DG, CA1 and CA3). Framed areas in A and B are enlarged in A'-A''' and B'-B''' respectively. Scale bars: 500 μ m (A and B), 20 μ m (A'-A''' and B'-B''').

4.3.2. ELECTRON MICROSCOPY

4.3.2.1. Subcellular distribution of NAPE-PLD in the VMH

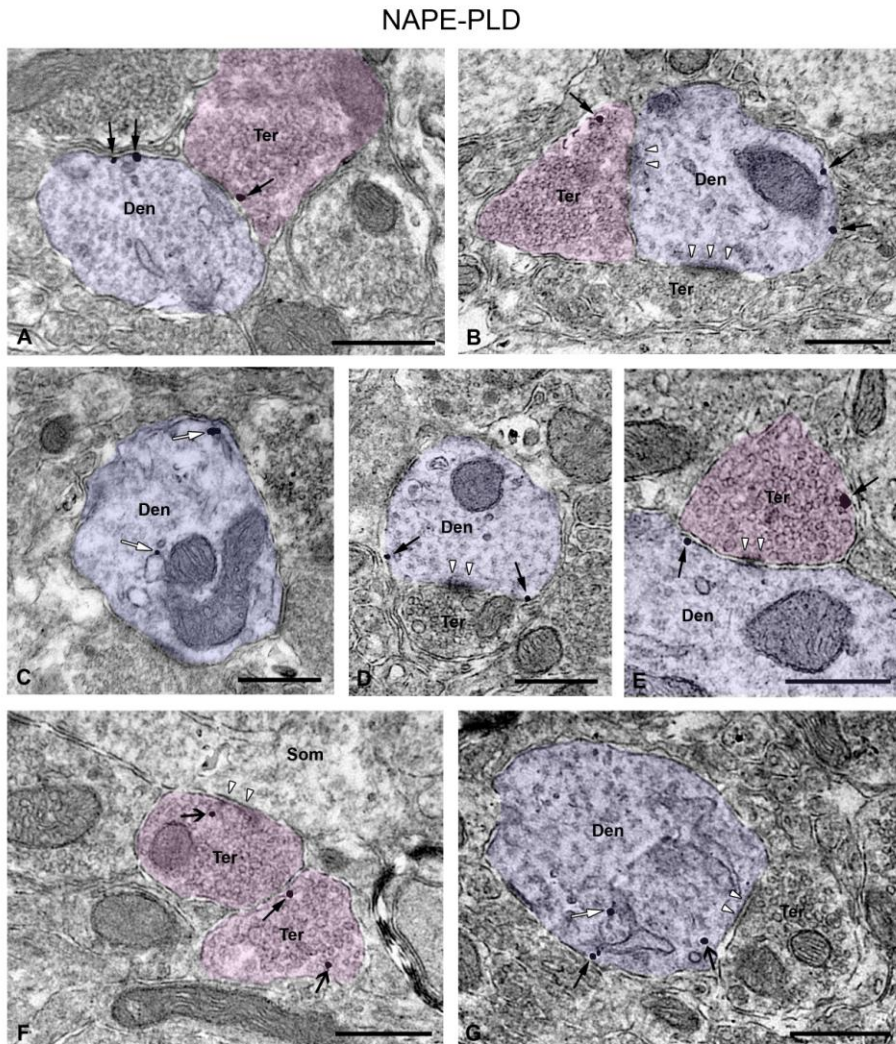


Figure 26. Ultrastructural localization of NAPE-PLD in the VMH. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy. NAPE-PLD immunoparticles appear in postsynaptic and presynaptic profiles associated to the membranes (black close arrows) of dendrites (Den) and synaptic terminals (Ter) respectively, as well as inside those profiles (black open arrows). Note in B and E a terminal making synapse (white arrowheads) with a dendrite, being both profiles NAPE-PLD immunopositive. Sometimes, NAPE-PLD also appears associated to intracellular reservoirs like the smooth endoplasmic reticulum (white close arrows), as it can be appreciated in detail in images C and G. Scale bars: 0.5 μ m.

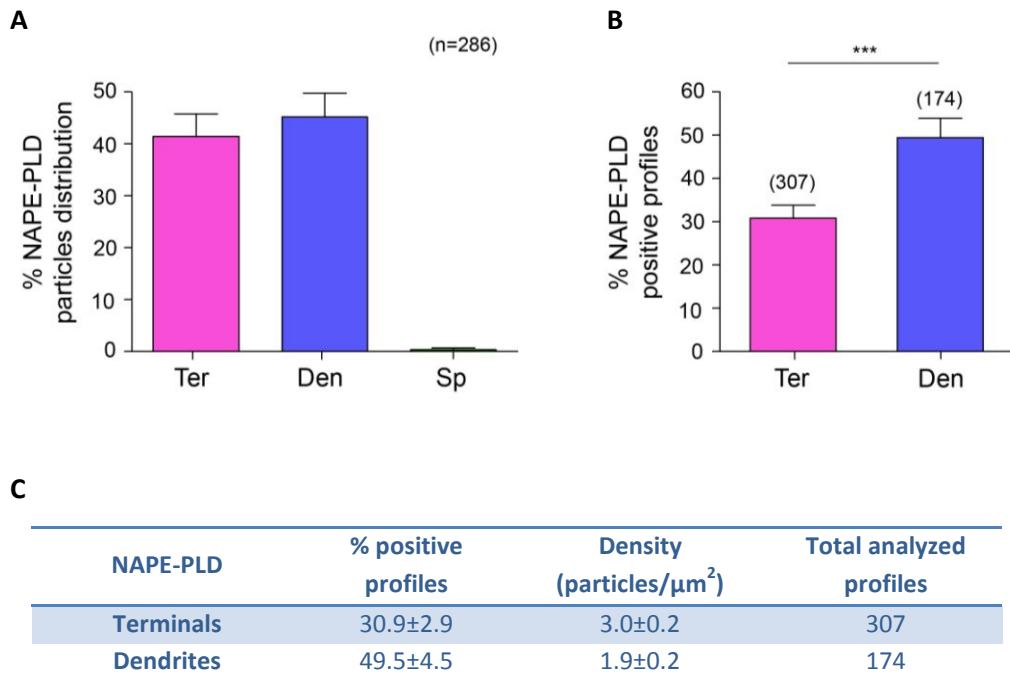


Figure 27. Statistical analysis of NAPE-PLD in the VMH. A: The percentage of particles distribution of NAPE-PLD shows that $41.5 \pm 4.3\%$ of immunoparticles are localized in synaptic terminals, $45.2 \pm 4.6\%$ in dendrites and $0.4 \pm 0.4\%$ in spines. Total analyzed particles: 286. **B and C:** The percentage of immunopositive dendrites ($49.5 \pm 4.5\%$) is significantly higher than the percentage of positive terminals ($30.9 \pm 2.9\%$, $\chi^2=13.71$, $p=0.0002$). Immunolabeling density for NAPE-PLD is 3.0 ± 0.2 particles/ μm^2 in synaptic terminals and 1.9 ± 0.2 particles/ μm^2 in dendrites. Total analyzed area: $998 \mu\text{m}^2$.

4.3.2.2. Subcellular distribution of FAAH in the VMH

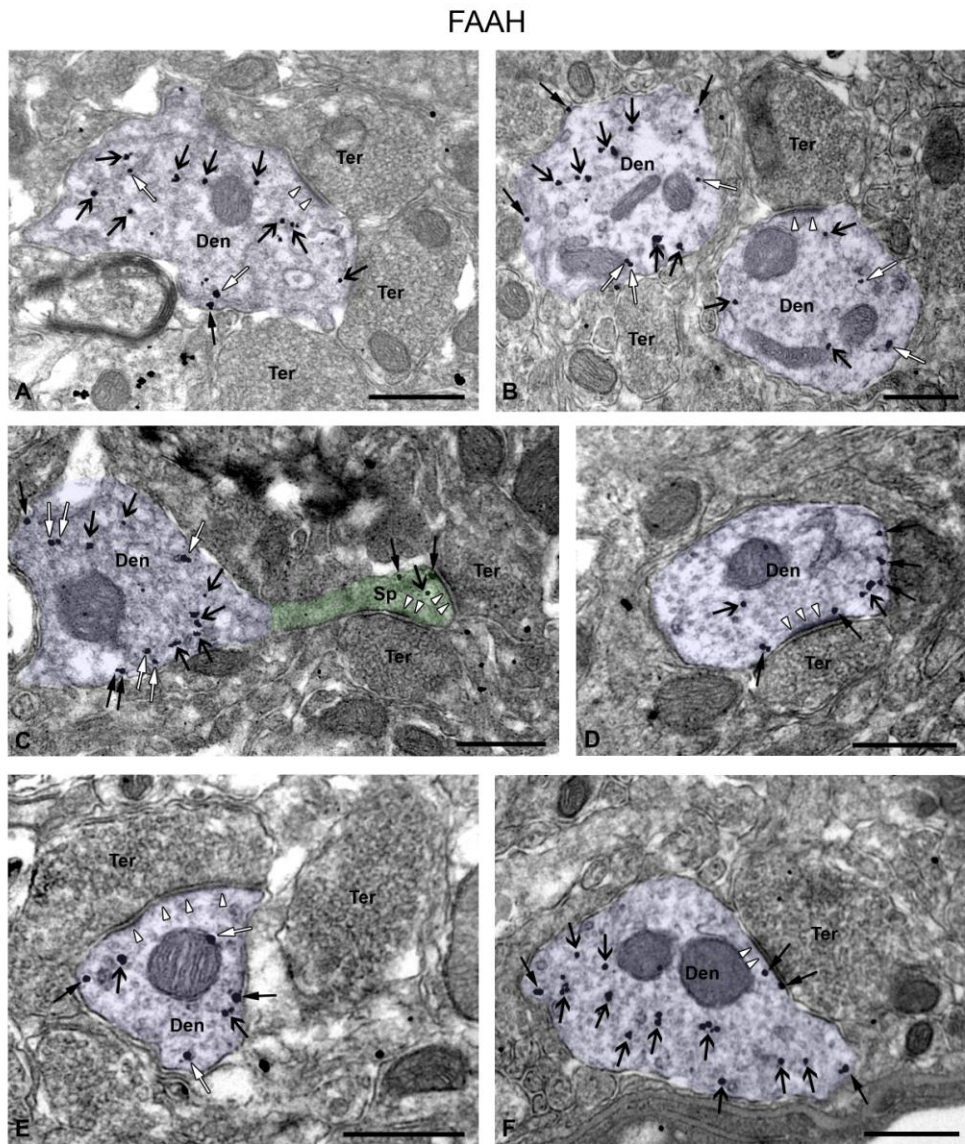


Figure 28. Ultrastructural localization of FAAH in the VMH. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy. FAAH immunoparticles (black open arrows) are localized postsynaptically inside dendrites (Den) that receive synapses (white arrowheads) from synaptic terminals (Ter). Sometimes, immunoparticles are associated to dendrite membranes (black close arrows) or to intracellular membranes like the endoplasmic reticulum or the external membrane of the mitochondria (white close arrows). Note in image C a spine (Sp) with immunoparticles emerging from a clearly immunopositive dendrite. Scale bars: 0.5µm.

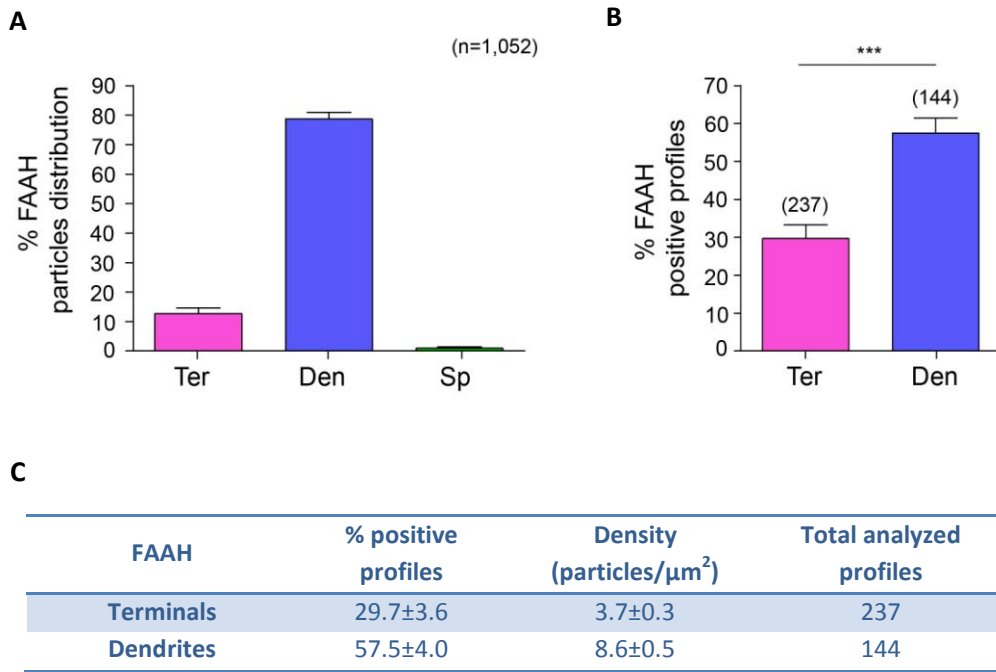


Figure 29. Statistical analysis of FAAH in the VMH. A: The percentage of distribution of FAAH immunoparticles shows that the great majority of immunoparticles (78.6 ± 2.3%) are localized in dendritic profiles, while only 12.6 ± 2.0% and 0.9 ± 0.5% appear in synaptic terminals or spines respectively. Total analyzed particles: 1,052. **B and C:** The percentage of immunopositive dendrites (57.5 ± 4.0%) is significantly higher than the percentage of positive terminals (29.7 ± 3.6%, $\chi^2=26.25$, $p<0.0001$). FAAH immunopositive dendrites show a high labeling density of 8.6 ± 0.5 particles/ μm^2 , while the density for synaptic terminals is 3.7 ± 0.3 particles/ μm^2 . Total analyzed area: 702 μm^2 .

4.4. IMMUNOLocalIZATION OF SYNTHESIZING AND DEGRADING ENZYMES OF 2-AG IN THE VMH

4.4.1. LIGHT MICROSCOPY

4.4.1.1. Expression of DAGL- α and MAGL in the VMH

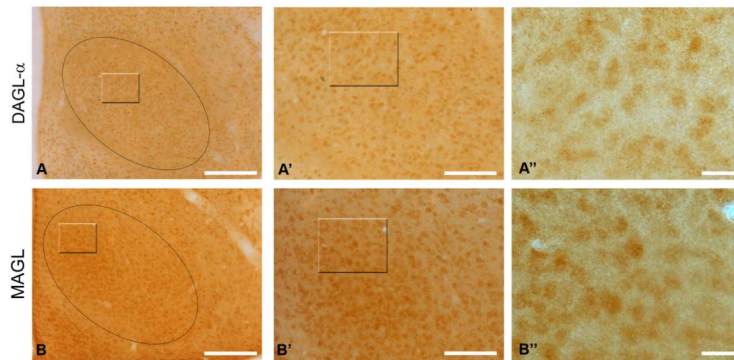


Figure 30. Immunolabeling for DAGL- α and MAGL in the VMH. Immunoperoxidase method for light microscopy. VMH (oval shaped circle in A and B) shows a moderate punctuate labeling and diffuse labeling in VMH cells for both enzymes. Framed areas in A, A' and B, B' are enlarged in A'' and B'' respectively. Scale bars: 200 μ m (A and B), 100 μ m (A' and B'), 20 μ m (A'' and B'').

4.4.1.2. Specificity control for DAGL- α and MAGL

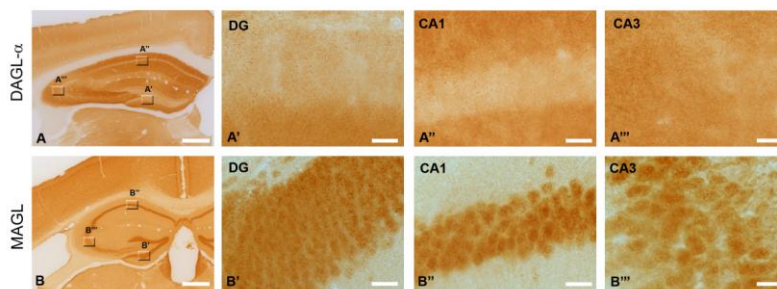


Figure 31. Positive control for DAGL- α and MAGL. Immunoperoxidase method for light microscopy. Note labeling for both enzymes in hippocampal different regions (dentate gyrus or DG, CA1 and CA3). Framed areas in A and B are enlarged in A'-A''' and B'-B''' respectively. Scale bars: 500 μ m (A and B), 20 μ m (A'-A''' and B'-B''').

4.4.2. ELECTRON MICROSCOPY

4.4.2.1. Subcellular distribution of DAGL- α in the VMH

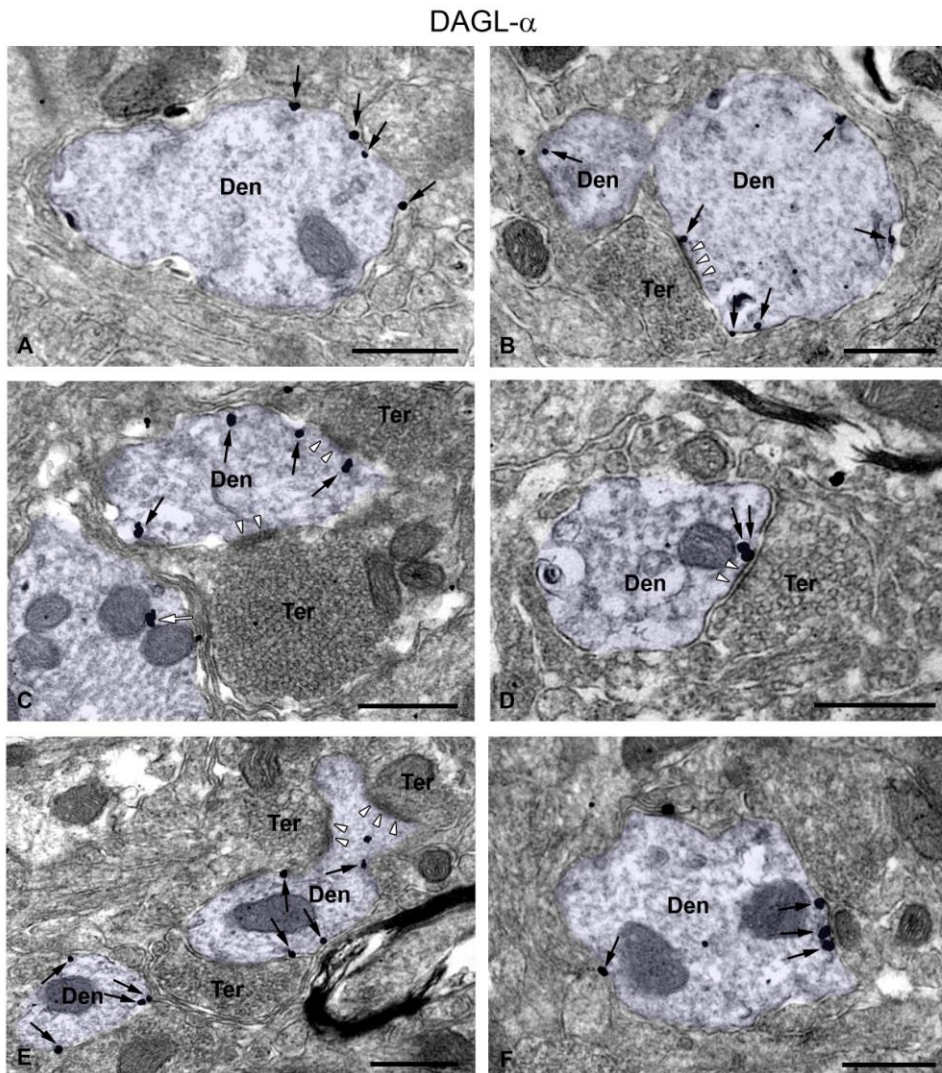


Figure 32. Ultrastructural localization of DAGL- α in the VMH. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy. Immunoparticles (black close arrows) are localized on the membrane of dendrites (Den) that receive synaptic contacts (white arrowheads) from immunonegative synaptic terminals (Ter). Note in image B, an excitatory terminal making synapse with a DAGL- α immunopositive dendrite. Image D shows a terminal making an inhibitory (symmetric) synapse with an immunopositive dendrite. Scale bars: 0.5 μ m.

DAGL- α

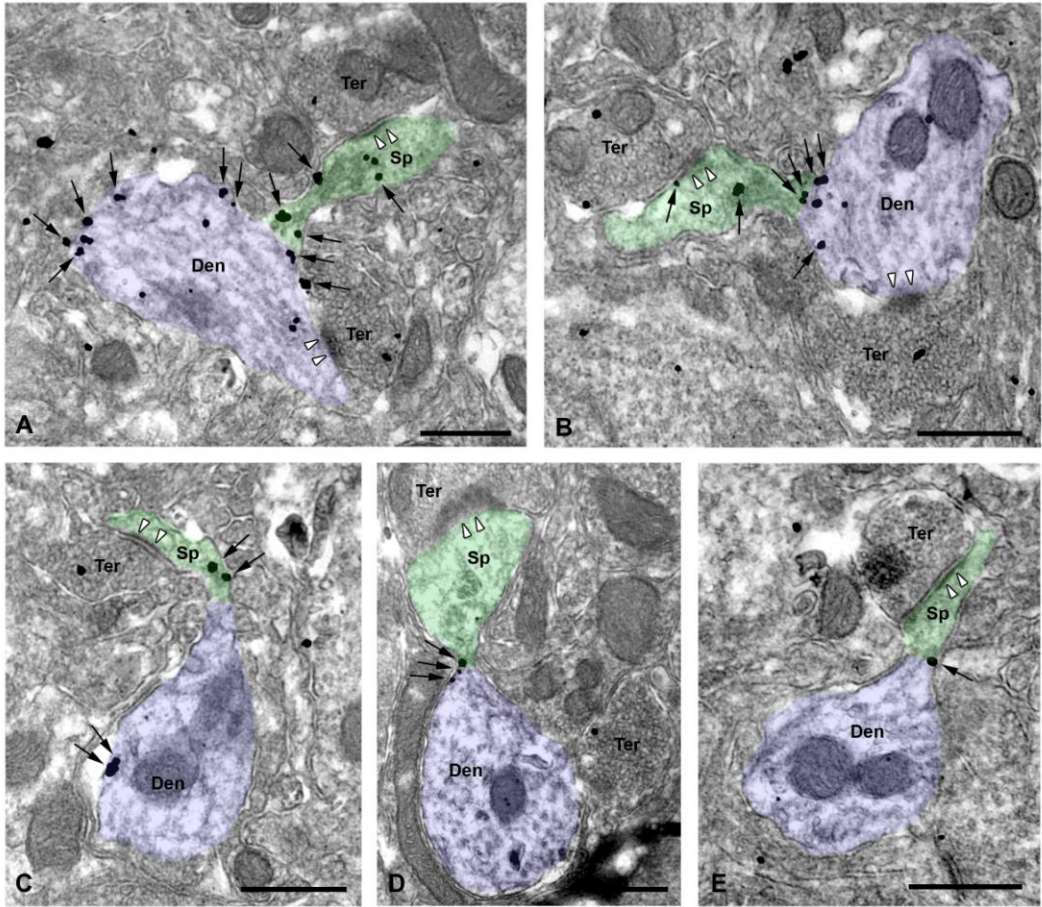


Figure 33. Ultrastructural localization of DAGL- α in the VMH. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy (continuation). These images show in detail the distribution of DAGL- α immunoparticles (black close arrows) in dendritic spines (Sp), particularly in the spine neck. Note how spines emerge from their corresponding dendrites (Den) that elongate to receive the synaptic contact (white arrowheads) from the corresponding synaptic terminal (Ter). Scale bars: 0.5 μ m.

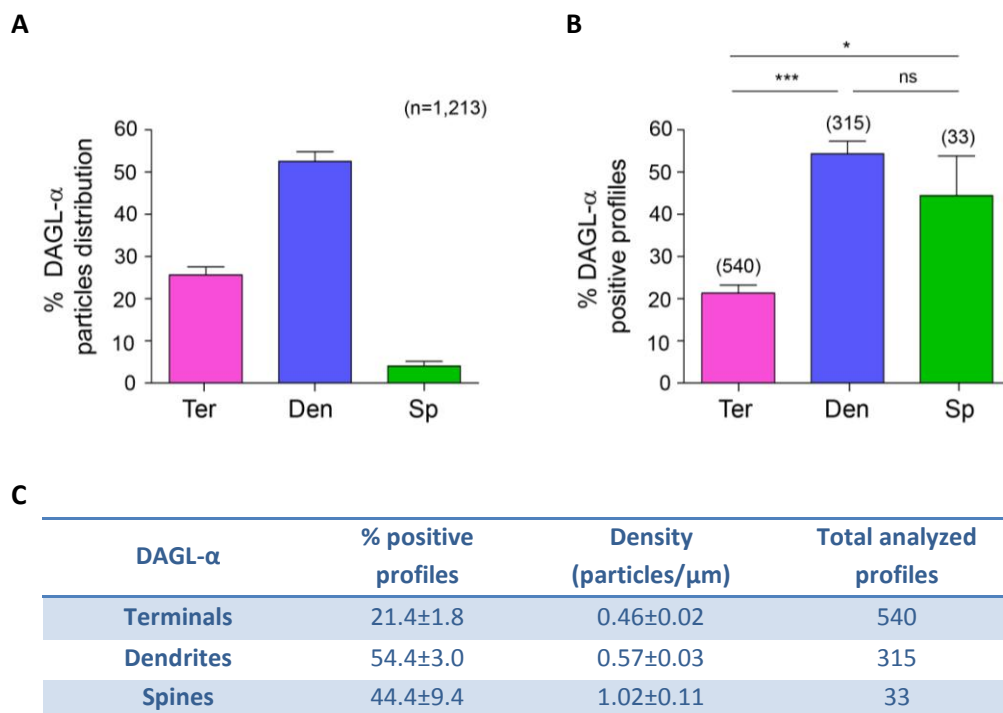


Figure 34. Statistical analysis of DAGL- α in the VMH. **A:** 52.6 \pm 2.3% of immunoparticles are present in dendrites, 25.7 \pm 1.9% in synaptic terminals and 4.1 \pm 1.1% in dendritic spines. Total analyzed particles: 1,213. **B and C:** 54.4 \pm 3.0% of dendrites and 44.4 \pm 9.4% of spines are DAGL- α immunopositive ($\chi^2=2.220$, $p=0.1363$), not being statistically significant differences. These percentages are significantly higher than the percentage of immunopositive terminals (21.4 \pm 1.8%; $\chi^2=88.14$, $p<0.0001$ for dendrites and $\chi^2=5.572$, $p=0.018$ for spines). The labeling density is 0.46 \pm 0.02 particles/ μm , 0.57 \pm 0.03 particles/ μm and 1.02 \pm 0.11 particles/ μm in terminals, dendrites and spines, respectively. Total analyzed area: 1,889 μm^2 .

4.4.2.2. Subcellular distribution of MAGL in the VMH

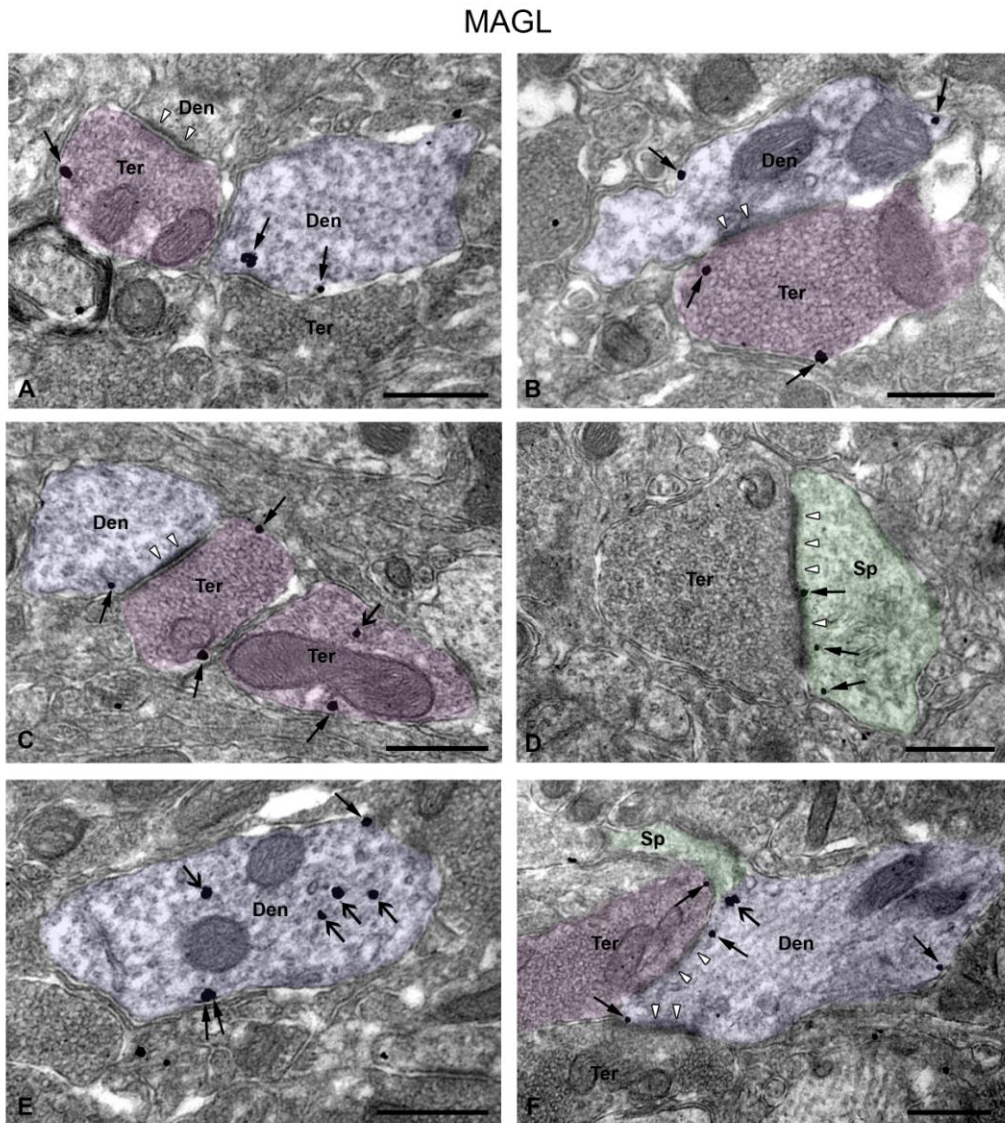


Figure 35. Ultrastructural localization of MAGL in the VMH. Preembedding silver-intensified immunogold method for electron microscopy. Immunoparticles are distributed in the membranes (black close arrows) of synaptic terminals (Ter) and dendrites (Den) as well as inside those profiles (black open arrows). In image B and C a terminal making synapse (white arrowheads) with a dendrite can be observed, both of which are immunopositive for MAGL. Note in image D a MAGL positive dendritic spine (Sp) with its characteristic spine apparatus. Image F shows a spine emerging from a MAGL positive dendrite, being the immunoparticles near the spine neck. Scale bars: 0.5µm.

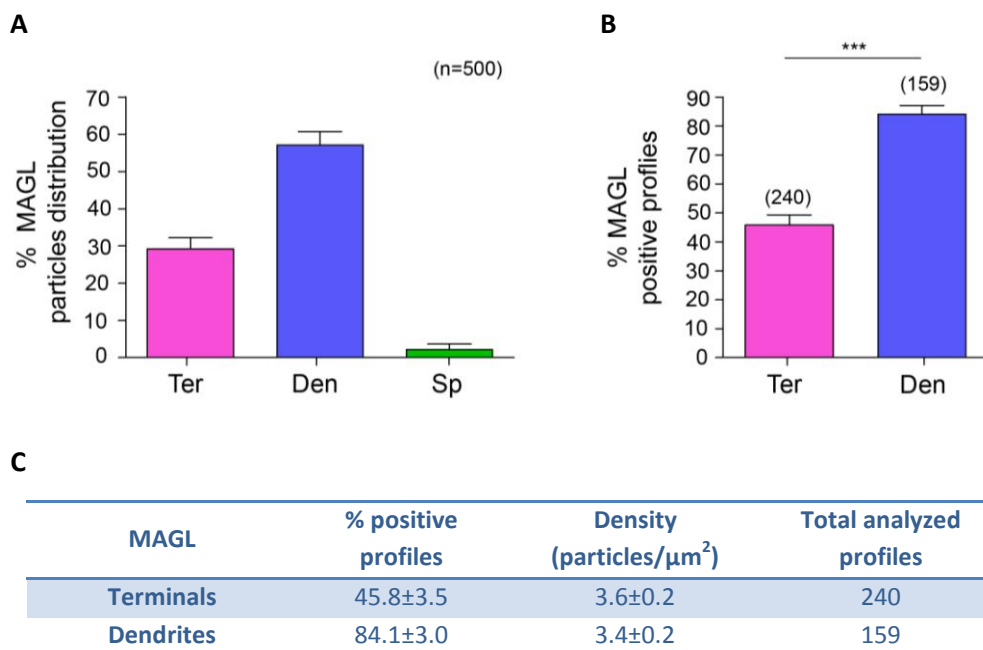


Figure 36. Statistical analysis of MAGL in the VMH. A: The percentage of immunoparticles present in dendrites is $57.1 \pm 3.6\%$, being of $29.2 \pm 3.0\%$ in synaptic terminals and $2.2 \pm 1.4\%$ in dendritic spines. Total analyzed particles: 500. **B and C:** The proportion of MAGL immunopositive profiles is significantly higher in dendrites ($84.1 \pm 3.0\%$) than in synaptic terminals ($45.8 \pm 3.5\%$, $\chi^2=53.17$, $p < 0.0001$), showing a similar labeling density in both compartments (3.4 ± 0.2 particles/ μm^2 and 3.6 ± 0.2 particles/ μm^2 respectively). Total analyzed area: $698 \mu\text{m}^2$.

4.5. COMPARISON BETWEEN ENZYMES

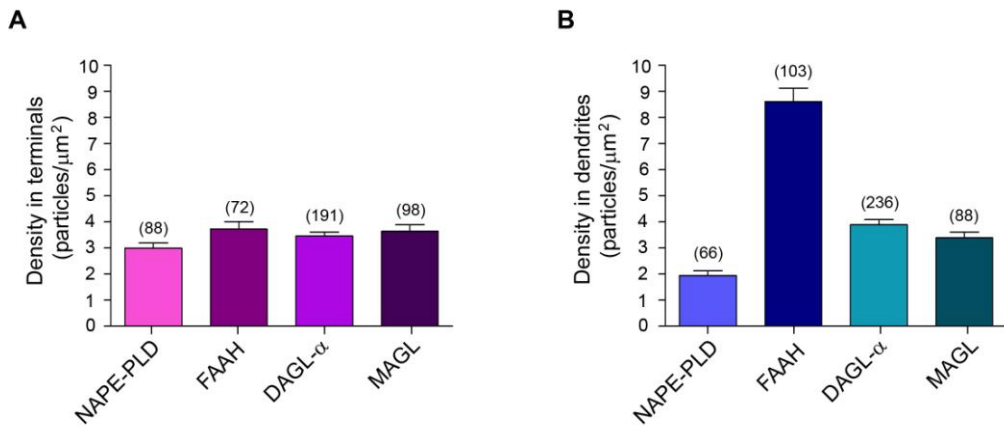


Figure 37. Comparison of density for the different enzymes in VMH terminals or dendrites. Immunolabeling density (immunoparticles/μm²) in synaptic terminals is 3.0±0.2 for NAPE-PLD, 3.7±0.3 for FAAH, 3.5±0.1 for DAGL-α and 3.6±0.2 for MAGL. In dendritic profiles, these values are 1.9±0.2 for NAPE-PLD, 8.6±0.5 for FAAH, 3.9±0.2 for DAGL-α and 3.4±0.2 for MAGL. Total analyzed area: 998μm², 702μm², 1,889μm² and 698μm² for NAPE-PLD, FAAH, DAGL-α and MAGL respectively.

ENZYME	TERMINALS		DENDRITES	
	% particles in membrane	% particles inside	% particles in membrane	% particles inside
NAPE-PLD	19.55 ± 2.7	28.8 ± 3.6	22.1 ± 3.9	29.55 ± 4.1
FAAH	4.8 ± 1.0	9.0 ± 1.7	12.7 ± 1.6	73.5 ± 2.2
DAGL-α	17.1 ± 1.7	15.6 ± 1.6	34.9 ± 2.5	32.4 ± 2.2
MAGL	17.1 ± 2.1	17.3 ± 3.3	20.7 ± 2.3	44.9 ± 3.8

Table 5. Summarizing table of the percentages of immunoparticles distribution in the membrane or inside the terminals or dendrites for the different enzymes. Percentages have been calculated among the total number of particles found exclusively in synaptic terminals and dendrites for each enzyme.

5. DISCUSSION

5.1. LOCALIZATION OF CB₁ RECEPTOR IN THE VMH

5.1.1. Localization of CB₁ in VMH excitatory and inhibitory synaptic terminals

The main finding of this part of my Doctoral Thesis has been the demonstration of CB₁ localization in axon terminals that make synapse with dendrites and dendritic spines in the VMH of *CB₁-WT*, *Glu-CB₁-KO* and *GABA-CB₁-KO* mice. The analysis of the proportion of immunolabeled profiles from GABAergic and subcortical and cortical glutamatergic afferents has helped to define in detail CB₁ contribution to the molecular architecture of inhibitory and excitatory synaptic terminals of different origins that converge into the VMH.

The large majority of VMH neurons express vGluT-2 mRNA and generally they do not contain GAD65 or GAD67 mRNA (Hrabovszky et al., 2005, 2012; Meister, 2007). These data suggest that the VMH exerts a net excitatory effect on its cerebral targets. On the other hand, synaptic transmission of VMH efferent projections may be controlled by CB₁, as the VMH expresses very high levels of CB₁ mRNA (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Marsicano and Lutz, 1999; Cota et al., 2003; Jelsing et al., 2008; Hrabovszky et al., 2012), although the immunoreactivity intensity observed for this receptor only reaches intermediate levels (Wittmann et al., 2007). On the contrary, hypothalamic deafferentation seems to have no obvious consequences in specific CB₁ binding in the hypothalamus, which suggests that hypothalamic CB₁ comes from intrinsic neurons (Romero et al., 1998).

In this Doctoral Thesis we have observed that the proportion of CB₁ immunopositive synaptic terminals in the VMH of mice lacking CB₁ in cortical glutamatergic neurons (*Glu-CB₁-KO*) is identical to *CB₁-WT* (around 20%). These results indicate that CB₁ receptor is probably in excitatory synaptic terminals of hypothalamic intrinsic neurons. However, we observe a slight decrease (~22%, although it is not

statistically significant) of excitatory synaptic terminals with obvious asymmetric synapses and positive for CB₁. Overall, these results indicate that CB₁ is mainly localized in excitatory axon terminals of subcortical origin and, to a lesser extent, in excitatory synaptic boutons of cortical origin.

On the other hand, we observe that the lack of CB₁ in forebrain GABAergic neurons (GABA-CB₁-KO) produces a decrease in synaptic terminals immunopositive for this receptor (12.4%). These results indicate that CB₁ receptors are also a molecular component of VMH GABAergic axonal boutons. Overall, our findings can be interpreted as for the presence of CB₁ in GABAergic presynaptic terminals of both VMH and intrinsic hypothalamic inhibitory pathways.

To sum up and based on previous studies about glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the VMH (Kiss et al., 2011), studies of GAD65 or GAD67 mRNA expression (Bowers et al., 1998; Hrabovszky et al., 2005, 2012; Meister, 2007), CB₁ mRNA expression (Marsicano and Lutz 1999; Cota et al., 2003; Jelsing et al., 2008; Hrabovszky et al., 2012) and others (Berthoud, 2002; McClellan et al., 2006) we hypothesize a possible diagram explaining the pattern observed for CB₁ protein in the VMH (Fig. 38).

Functional significance

Our investigation has demonstrated that CB₁ receptors in GABAergic and glutamatergic terminals that converge into the VMH explain the CB₁ pattern observed in this nucleus. CB₁ density in the VMH, compared to that found in other brain regions (Lafourcade et al., 2007; Puente et al., 2010), was rather low both in GABAergic and glutamatergic boutons (0.40-0.50 particles/μm), particularly in inhibitory synaptic terminals (Kawamura et al., 2006). However, CB₁ efficiency in the activation of GTP proteins appears to be much higher in the hypothalamus than in other brain regions (Breivogel et al., 1997), which may have a functional significance. Physiologically, the identification of CB₁ receptors in GABAergic and glutamatergic synaptic terminals in the

VMH could be regarded as a potential neuronal substrate for the effects exerted by exogenous and endogenous cannabinoids on feeding behaviors.

Actually, mice lacking CB₁ receptor exhibit an anorexigenic phenotype, which is also observed in wild-type animals after the administration of a CB₁ antagonist. On the other hand, leptin, which is an anorexigenic molecule, reduces anandamide and 2-AG levels in the hypothalamus (Di Marzo et al., 2001), while the lack of leptin receptors, which are very abundant in the VMH, produces an increase of CB₁ in limbic structures (Thanos et al., 2008). In addition, Glu-CB₁-KO mice exhibit a hypophagic phenotype after fasting, very similar to that observed in CB₁-KO mice. On the contrary, GABA-CB₁-KO mice are hyperphagic under the same experimental conditions (Bellocchio et al., 2010). Based on these observations, it seems plausible that hypophagic mice after fasting (CB₁-KO and Glu-CB₁-KO) may have a greater activation (or minor inhibition) of anorexigenic hypothalamic nuclei, such as the VMH and the paraventricular nucleus. On the other hand, mutant mice that are hyperphagic after fasting (GABA-CB₁-KO) may have an increase in the activity of orexigenic hypothalamic nuclei, like neuropeptide Y containing neurons in the arcuate nucleus and orexin containing neurons in the lateral hypothalamus.

As a conclusion, the ventromedial nucleus of the hypothalamus may be a hub candidate in the endocannabinoid mediated regulation of feeding behaviors, through the modulation of inhibitory and excitatory neurotransmission mediated by the activation of CB₁ receptors distributed in GABAergic and glutamatergic synaptic terminals respectively. We believe that our anatomical results contribute to a better understanding of the complex regulation of energy balance by the endocannabinoid system.

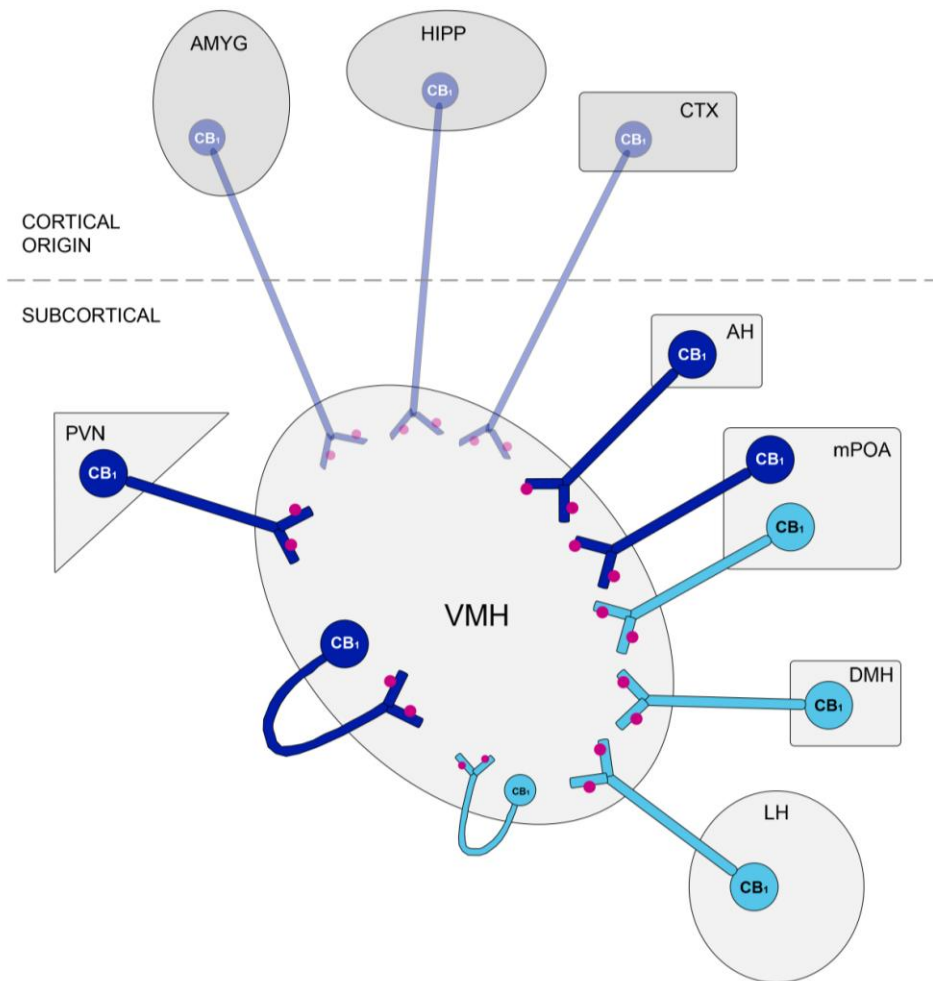


Figure 38. CB₁ distribution scheme in excitatory and inhibitory synaptic terminals identified in this Doctoral Thesis and its possible correlation with cortical and subcortical afferents than express CB₁ mRNA and converge into the VMH. Excitatory (glutamatergic, in dark blue) and inhibitory (GABAergic, in light blue) afferents that reach the VMH represent neuronal populations that express CB₁ mRNA. Cortical glutamatergic afferents are colored in faint blue to indicate their minor contribution to the CB₁ pattern observed in the VMH. CB₁ receptor is shown as small pink circles in both excitatory and inhibitory axon terminals that converge into the VMH. AH: anterior hypothalamus, Amyg: amygdala, ARC: arcuate, CTX: cortex, DMH: dorsomedial nucleus of the hypothalamus, HIPP: hippocampus, LH: lateral hypothalamus, mPOA: medial preoptic area, PVN: paraventricular nucleus, VMH: ventromedial nucleus of the hypothalamus.

5.2. ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF CB₁ RECEPTOR IN VMH ASTROCYTES

This part of my Doctoral Thesis constitutes the first ultrastructural evidence of CB₁ localization in hypothalamic astrocytes, by using high resolution immunocytochemical techniques for electron microscopy in the VMH of wild-type mice and CB₁ specific knock-out in GFAP positive cells (GFAP-CB₁-KO). In this study, we have shown that around 40% of VMH GFAP positive astrocytes are CB₁ immunopositive in wild-type mice, disappearing the labeling in CB₁-KO mice that lack this receptor in neuronal and glial compartments. It is worth mentioning, as no one has ever done it before, that this labeling is specific because it is not observed in the VMH of GFAP-CB₁-KO mice, which lack CB₁ specifically in astrocytes, while the percentage of CB₁ immunopositive synaptic terminals in these animals is not modified compared to wild-type mice.

Glial cells constitute the most abundant cellular population in the central nervous system. These cells are able to communicate with each other and with neurons in a dynamic and cooperative way (Zorec et al., 2012). On the other hand, glia also expresses a large variety of ion channels, transport systems and neurotransmitter receptors (Hof et al., 2008).

From all the glial cellular types, astrocytes are excellent players in processing brain information (Volterra and Meldolesi, 2005), through the communication established with neurons in both directions (Araque et al., 2001; Volterra and Bezzi, 2002; Haydon and Carmignoto, 2006), due to the intricate morphological interactions between neurons and astrocytes. For example, a unique astrocyte is connected with hundreds of dendrites (Halassa et al., 2007), around a hundred synapses (Bushong et al., 2002) and is coupled to other astrocytes through gap junctions (Giaume and Venance, 1998). In the hippocampus, one single neuron goes through the territory of several astrocytes (~5 astrocytes/8000µm²) (Nixdorf-Bergweiler et al., 1994), so neuronal stimulation produces calcium responses in a group of astrocytes (Bernardinelli et al., 2011).

Thus, astrocytes exhibit an intracellular calcium increase after the release of the excitatory neurotransmitter glutamate from synaptic terminals (Cornell-Bell et al., 1990; Porter and McCarthy, 1996; Perea and Araque, 2005), producing gliotransmitters release that modulate neuronal excitability and synaptic transmission (Araque et al., 1999; Beattie et al., 2002; Volterra and Bezzi, 2002; Perea and Araque, 2007) acting through glutamate NMDA (Parri et al., 2001) and AMPA receptors (Fiacco and McCarthy, 2004), as well as through inhibitory synapses (Kang et al., 1998). They also modulate heterosynaptic depression (Serrano et al., 2006), glutamate presynaptic release (Jourdain et al., 2007) and long term potentiation (Henneberger et al., 2010). Neuron-glia signaling regulates hypothalamic synaptic strength (Gordon et al., 2009) and modulates the activity of cortical neuronal networks *in vivo* (Fellin et al., 2009).

The demonstration of cannabinoid receptors presence in astroglia has not been an easy task and is even full of controversy (Stella, 2004, 2010), as some studies have not observed cannabinoid effects in astrocytes; while others have localized CB₁ in glial cells cultures (Molina-Holgado et al., 2003; Walter and Stella, 2003; Stella, 2004). In brain tissue, CB₁ receptor has been identified in astrocytes of caudate-putamen (Rodriguez et al., 2001), cingulate cortex, medial forebrain bundle, amygdala and laminae I and II of the spinal cord (Moldrich and Wenger 2000; Salio et al., 2002). In the spinal cord, almost half of astrocytes GFAP immunoreactive show immunolabeling for CB₁ in laminae I and II of the spinal dorsal horn (Hegyí et al., 2009).

From a functional point of view, endocannabinoids, through CB₁ receptors, promote astroglial differentiation (Aguado et al., 2006) and mediate neuron-astrocyte communication (Navarrete and Araque, 2008) potentiating synaptic transmission (Navarrete and Araque, 2010). It has also been described that astrocytes can contribute, at least in part, to the development of the rewarding effects of drug abuse in the nucleus accumbens and cingulate cortex (Narita et al., 2008). In addition, CB₁ activation increases the oxidative rate of glucose and ketogenesis in astrocytes, two phenomena involved in energy supply to the brain (Sánchez et al., 1998; Blázquez et al., 1999). Since perivascular astrocytes are localized between blood vessels and neurons regulating the energy supply

to neighbouring neurons (Magistretti, 2000; Voutsinos-Porche et al., 2003), CB₁ receptors in astrocytic feet probably regulate energy supply from blood to neurons (Stella, 2004, 2010). In agreement with this hypothesis, it has been shown that THC increases energetic metabolism in rat brain (Costa and Colleoni, 2000).

On the other hand, astrocytes are able to produce anandamide and other acylethanolamines and to inactivate endocannabinoids through its uptake and subsequently hydrolysis (Di Marzo et al., 1994; Beltramo et al., 1997; Rodriguez et al., 2001; Piomelli et al., 1999; Walter et al., 2002), suggesting the existence of a functional endocannabinoid signaling system in these cells. For example, THC increases sphingomyelin hydrolysis, a response that is not sensitive to pertussis toxin, which suggests that these receptors might also act through a G_{i/o} protein independent mechanism (Sánchez et al., 2001b).

Our laboratory has collaborated in the last months with the group of Dr. Xia Zhang from the University of Ottawa (Canada) and the group of Dr. Giovanni Marsicano from the University of Bordeaux (France), together with other seven laboratories of four countries from three continents, in the study of the crucial role that activation of CB₁ located in astrocytes (but not the one distributed in neurons) from hippocampal CA1 region has in the operative memory impairment that occurs *in vivo* due to an acute exposition to exogenous cannabinoids (Han et al., 2012).

Regarding to the functional implication that CB₁ receptors may have in hypothalamic VMH astrocytes, it is yet unknown. However, due to the prominent role of the VMH in feeding behavior, it is assumably the participation of astroglial CB₁ in these behaviors. A well known effect of cannabis consume is an orexigenic state through the activation of CB₁ cannabinoid receptors. However, the grade of complexity is much higher, as low or moderate doses of CB₁ receptor agonists produce hyperphagia, while higher doses produce hypophagia in research animals (Wiley et al., 2005; Pagotto et al., 2006). These effects of CB₁ receptor activation are due to the expression of the receptor in brain regions that control food intake, where they modulate synaptic transmission between neurons. By using genetic, pharmacological and anatomical techniques, we

observe that exogenous and endogenous cannabinoids exert a dual action on stimulated food intake (Bellocchio et al., 2010). The results of this study, in which our laboratory has also participated, show that CB₁ receptor activation by low doses (1mg/kg) of the exogenous agonist THC produces hyperphagia through the inhibition of excitatory glutamatergic synaptic transmission in cortical telencephalic neurons; while high doses of THC (2.5mg/kg) causes hypophagia by inhibition of inhibitory local synaptic transmission due to the activation of CB₁ receptors located in inhibitory GABAergic nervous terminals of the ventral striatum involved in the control of food intake (Bellocchio et al., 2010).

Therefore, the described effects in food intake in rodents depend on the presence of CB₁ receptors in nervous terminals. On the other hand, it has been described that obesity induces functional leptin receptors in hypothalamic astrocytes (Hsueh et al., 2009) and that astrocytes modulate leptin distribution and neuronal signaling in the hypothalamus of obese A^{vy} mice (Pan et al., 2011). Finally, it has been shown by the conditioned place preference test that intake of a high-fat diet during 2 weeks induces a preference towards this diet, as well as an increase in hypothalamic GFAP expression. In addition, CB₁ cannabinoid receptor antagonist O-2050 decreases this preference towards high-fat diet and also decreases GFAP expression in the hypothalamus, which suggests that intake of a high-fat diet induces the development of the preference for that diet mediated by CB₁ receptors in hypothalamic astrocytes (Higuchi et al., 2010).

5.3. LOCALIZATION OF SYNTHESIZING AND DEGRADING ENZYMES OF ENDOCANNABINOIDS IN THE VMH

5.3.1. Ultrastructural localization of NAPE-PLD in the VMH

Although the increasing interest aroused by the investigation of the endocannabinoid system, there are only very few studies in the literature about the ultrastructural localization of NAPE-PLD (Nyilas et al., 2008; Puente et al., 2011). This part of my Doctoral Thesis constitutes the first evidence of the subcellular distribution of this enzyme in the VMH, therefore contributing to increase the available data on this matter. Our results show that the localization of NAPE-PLD immunoparticles in the dorsomedial region of the VMH is both postsynaptic and presynaptic, being the percentage of immunopositive dendrites significantly higher than in terminals.

There is certain controversy about NAPE-PLD localization in different brain regions, as some studies describe the enzyme at a presynaptic localization (Egertová et al., 2008; Nyilas et al., 2008), while others show a postsynaptic localization in some specific neuronal populations (Cristino et al., 2008; Puente et al., 2011). It has been postulated that NAPE-PLD expression in encephalic regions that also express FAAH and CB₁ (basal ganglia, hippocampus, cerebral cortex, olfactory bulb and cerebellum) may explain that anandamide generated by NAPE-PLD would act as a classic endocannabinoid in these regions. On the contrary, the different pattern expression for NAPE-PLD and CB₁ in other brain regions, such as thalamus, suggests other functions for the products of NAPE-PLD (Morishita et al., 2005). For example, anandamide can exert its biological actions through the activation of TRPV1 receptors in several brain regions (van der Stelt and Di Marzo, 2004), as it is described below.

NAPE-PLD expression in the brain and other organs increases with age (Morishita et al., 2005). In mice, the highest brain levels of NAPE-PLD mRNA are present in granule cells of the dentate gyrus, followed by hippocampal CA3 pyramidal neurons. Moderate-low levels can be found in layers II-III of the neocortex, layer II of piriform cortex, olfactory bulb, granule and Purkinje cells in the cerebellum and thalamic and hypothalamic nuclei, being evident VMH labeled cells (Egertová et al., 2008; Nyilas et al., 2008).

Regarding to the immunocytochemical localization of NAPE-PLD, the dentate gyrus and other hippocampal regions, as well as thalamic nuclei, neocortex, piriform cortex, amygdala and hypothalamus contain this enzyme. Although this immunoreactivity is not evident in neuronal somata, it seems to be localized in labeled fibers that surround immunonegative cell bodies and dendrites (Egertová et al., 2008). The ultrastructural study in the hippocampus supports the presynaptic localization of this enzyme in excitatory axon terminals of mossy fibers and Schaffer collaterals, particularly associated to intracellular membrane compartments like smooth endoplasmic reticulum cisternae or axon calcium stores (Nyilas et al., 2008).

Overall, the presynaptic distribution of NAPE-PLD in axons (Egertová et al., 2008; Nyilas et al., 2008) suggests that anandamide and other related N-acylethanolamines may be synthesized in presynaptic elements and act as anterograde messengers (Kano et al., 2009); it has been even speculated about the possibility that these N-acylethanolamines may act through yet uncharacterized receptors for N-acylethanolamines that mediate new forms of synaptic plasticity (Nyilas et al., 2008).

However, as we have mentioned before, there are other studies that suggest the localization of NAPE-PLD at a postsynaptic level. For example, in the hippocampus, NAPE-PLD immunoreactivity has also been described in the cytoplasm and proximal portions of apical dendrites of CA3 pyramidal neurons, observing a high percentage of colocalization between NAPE-PLD and TRPV1 (Cristino et al., 2008).

Our laboratory has described by electron microscopy that NAPE-PLD immunoparticles in the bed nucleus of the stria terminalis (which is part of the extended

amygdala and participates in functions related to stress and reward) are localized in the smooth endoplasmic reticulum of dendrites and in membranes of dendritic profiles and spines, with a preferential perisynaptic distribution (Puente et al., 2011). From a functional point of view, we observe in this nucleus that postsynaptic activation of metabotropic glutamate receptor 5 acts over NAPE-PLD that synthesizes anandamide, which acting over postsynaptic TRPV1 receptors, induces a long term synaptic depression or LTD (Puente et al., 2011). Similarly, postsynaptic activation of TRPV1 by anandamide produces the internalization of postsynaptic AMPA receptors inducing a long term suppression of excitatory synaptic transmission of the medial entorhinal-dentate (perforant) pathway that is independent of CB₁ receptor activation (Chávez et al., 2010). Therefore, the postsynaptic localization of NAPE-PLD explains the synthesis of anandamide in this compartment, from which it can act retrogradely as other endocannabinoids to activate presynaptic CB₁ receptors or postsynaptically through TRPV1 receptor, modulating this way synaptic transmission. This combined situation has been observed in medium spiny neurons of the indirect pathway in the nucleus accumbens, where the activation of metabotropic glutamate receptor 5 determines the production of endocannabinoids, probably anandamide, that activates simultaneously presynaptic CB₁ receptors producing an LTD (eCB-LTD) and postsynaptic TRPV1 channels causing an LTD due to the AMPA receptors endocytosis and that is not dependent of CB₁ activation (Grueter et al., 2010).

Therefore, in view of the previous studies and the results obtained in this Doctoral Thesis, the presynaptic and postsynaptic localization of NAPE-PLD lets us suggest that anandamide and/or other N-acyl ethanolamines may act as anterograde and/or retrograde messengers in the VMH. Anyway, electrophysiological studies are needed to complement the anatomical results obtained here, to try to know the role that anandamide plays in all these processes of synaptic signaling and to understand the mechanisms by which anandamide administration into the VMH stimulates appetite (Jamshidi and Taylor, 2001).

5.3.2. Ultrastructural localization of FAAH in the VMH

Our results about FAAH distribution show that it is an enzyme with a clear postsynaptic localization, appearing in somatodendritic and dendritic spines in VMH neurons. In addition, FAAH shows a high labeling density, notably higher than the rest of the analyzed enzymes. In general, our results agree with previous studies that describe the postsynaptic localization of FAAH in the hippocampus, cerebellum and amygdala (Gulyas et al., 2004; Cristino et al., 2008). In the hippocampus, FAAH is specifically localized in the soma and dendrites of principal neurons but not in GABAergic interneurons (Gulyas et al., 2004). Likewise, our results also suggest the localization of FAAH in neurons of excitatory nature, because VMH neurons are mainly glutamatergic, as they express high levels of vGluT-2 mRNA and do not express GAD65 or GAD67 mRNA (Hrabovsky et al., 2005, 2012; Meister, 2007). The absence of FAAH in GABAergic interneurons may guide the identification of the precise function of this enzyme in different forms of synaptic plasticity (Gulyas et al., 2004). This way, our laboratory has shown that FAAH inhibition is able to trigger, by increasing anandamide tone, a long term depression of excitatory synaptic transmission in neurons of the bed nucleus of the stria terminalis after the application of a sub-threshold stimulation protocol that can not induce LTD by itself (Puente et al., 2011).

Ultrastructural studies made in the hippocampus and cerebellum indicated that FAAH localization is mainly postsynaptic, in intracellular membrane organelles such as smooth endoplasmic reticulum cisternae or the outer membrane of mitochondria (Gulyas et al., 2004). We have also observed this localization in the VMH, as several immunoparticles localized inside dendritic profiles appear related to the external membrane of the mitochondria and other intracellular membranes, sometimes identified as smooth endoplasmic reticulum.

On the other hand, we also observe a small percentage of immunoparticles present in synaptic terminals in the VMH, which agrees with that shown in the cerebellum, where

FAAH is distributed in the soma and dendrites of Purkinje cells and in a small subpopulation of axon terminals (Gulyas et al., 2004).

Immunofluorescence studies have shown the colocalization of FAAH and TRPV1 in the soma and apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons and in the soma of Purkinje neurons in the cerebellum (Cristino et al., 2008). These results suggest that FAAH is positioned to degrade endovanilloids, mainly anandamide and N-acylethanolamines, near its site of action, this is, in TRPV1 positive profiles that present an intracellular binding site, and that FAAH activity is close related to the local regulation of TRPV1 (Cristino et al., 2008). In fact, our results in the extended amygdala support this hypothesis, because as we have mentioned before, the application of a sub-threshold stimulation protocol in the presence of FAAH inhibition produces an excitatory LTD due to the increase of anandamide levels that activate postsynaptic TRPV1 channels (Puentes et al., 2011).

The presence of FAAH has also been shown in brain regions immunopositive for CB₁, such as hippocampus, cerebellum or neocortex, where they exert a complementary subcellular distribution pattern, finding neuronal somata and dendrites FAAH immunoreactive surrounded by CB₁ immunopositive terminals of axon fibers (Egertová et al., 1998, 2003). The enzymatic activity of FAAH in the rat brain is high in the hippocampus and cortex, and lower in the brain stem and hypothalamus (Thomas et al., 1997, Egertová et al., 1998; Morishita et al., 2005). This may be important, as it has been suggested that FAAH activity in hippocampal pyramidal cells may be a key factor in the spatial and temporal dynamic of cannabinoid signaling (Egertová et al., 2003).

To sum up, in view of the discussed above, the subcellular localization of CB₁ in synaptic terminals and the preferential distribution of FAAH in dendritic profiles suggest that it may be in the VMH, like in other brain regions, a complementary distribution of CB₁ and FAAH. It is necessary to develop anatomical strategies of colocalization to verify this hypothesis, with electrophysiological studies, to investigate the functional significance of this compartmentalization of the endocannabinoid signaling in the ventromedial nucleus of the hypothalamus.

5.3.3. Ultrastructural localization of DAGL- α in the VMH

DAGL- α and DAGL- β are responsible for 2-AG biosynthesis, being DAGL- α predominant in the central nervous system while DAGL- β is more relevant in the liver (Gao et al., 2010). In this part of my Doctoral Thesis, we have described the subcellular localization of DAGL- α mainly in postsynaptic dendritic profiles in the dorsomedial region of the VMH. In general, these results agree with previous studies that describe the postsynaptic distribution of DAGL- α in somatodendritic compartments and mainly in dendritic spines of Purkinje neurons in the cerebellum, medium spiny neurons in the striatum, neurons in the prefrontal cortex, hippocampal pyramidal neurons, granular cells in the dentate gyrus and neurons in the bed nucleus of the stria terminalis (Katona et al., 2006; Yoshida et al., 2006; Lafourcade et al., 2007; Uchigashima et al., 2007, 2011; Puente et al., 2011).

Our statistical analysis shows that most DAGL- α immunoparticles (54.0%) are present in dendrites, being lower (3.6%) in dendritic spines. This fact can be explained due to the small number of spines ($n=33$) found in the VMH compared to the rest of analyzed dendritic and terminal profiles ($n=855$). In fact, the posterior analysis of percentages of immunopositive profiles shows that around 54% of dendrites and 44% of dendritic spines are immunopositive for DAGL- α .

DAGL- α localization in spines is very precise (in the spine neck, spine head or both) and varies among different neuronal types (for review, see: Kano et al., 2009). In our study in the VMH, from a total number of 33 identified spines, 13 were DAGL- α immunopositive, from which 6 presented immunoparticles in the neck and 7 in the spine head. These results in a small number of spines indicate a more homogenous distribution tendency than in other brain regions.

The density of DAGL- α in the VMH was estimated to be 0.57 particles/ μm in dendrites and 1.02 particles/ μm in spines. This density is higher than the one described in dendrites and spines (0.24 and 0.30 particles/ μm respectively) in the granular cells of the dentate gyrus (Uchigashima et al., 2011). However, DAGL- α density is much higher in

Purkinje cells, being 3.46 particles/ μm in proximal dendrites, 13.68 particles/ μm in spiny branchlets and 5.47 particles/ μm in spines (Yoshida et al., 2006). Therefore, DAGL- α labeling density varies among different subcellular compartments and neuronal types. This distinct and fine localization of DAGL- α in different neuronal types suggests that the specificity and efficiency of the retrograde suppression mediated by endocannabinoids depends not only on the expression levels of CB₁ in the presynaptic elements, but also on the distance between the postsynaptic site of 2-AG production and presynaptic CB₁ (Yoshida et al., 2006).

In the hypothalamus, the levels of the two main endocannabinoids, anandamide and 2-AG, increase after fasting and decrease after food intake (Kirkham et al., 2002; Di Marzo and Matias, 2005; Pagotto et al., 2006; Matias and Di Marzo, 2007). Therefore, regarding to 2-AG, the presence of the synthesizing enzyme must be upregulated or downregulated depending on the state of hunger or satiety of the animal, which must be synchronized at the same time with the corresponding levels of the degradation enzyme MAGL. Therefore, the precise subsynaptic localization of DAGL- α shown here is a key player that determines available 2-AG levels to reach presynaptic CB₁ receptors distributed in excitatory or inhibitory synapses in the VMH (Reguero et al., 2011), thus facilitating food intake after fasting if a low level of 2-AG acts over CB₁ in excitatory terminals, or reducing food intake if higher levels of 2-AG act over CB₁ in inhibitory terminals (Bellocchio et al., 2010).

5.3.4. Ultrastructural localization of MAGL in the VMH

mRNA for MAGL is widely expressed in brain tissue, showing the highest levels in neocortex, hippocampal CA3 region, anterior thalamus and granular layer of the cerebellum, and low levels in the hypothalamus and brain stem (Dinh et al., 2002).

Regarding to the protein, MAGL immunoreactivity is distributed throughout the neuropil of hippocampus, amygdala and cerebellar cortex, as a dense punctate labeling,

which suggests its presence in axon terminals (Dinh et al., 2002, Gulyas et al., 2004). This was confirmed by electron microscopy, showing the presence of MAGL in axon terminals making asymmetric and symmetric synapses with somata and dendrites of principal neurons and interneurons (Gulyas et al., 2004). Presynaptic localization of MAGL suggests that MAGL activity determines the basal endocannabinoid tone and finishes endocannabinoid retrograde signaling (Hashimoto et al., 2007; Kano et al., 2009). Recently, it has been described MAGL localization in astrocytes and inhibitory terminals of the inner third molecular layer of the dentate gyrus, being distributed in the cytoplasm and membrane structures (Uchigashima et al., 2011), which agrees with previous studies (Dinh et al., 2002; Blankman et al., 2007).

In spite of the described evidences in the literature, our results from this Doctoral Thesis indicate that although there is a proportion of MAGL immunoparticles present in synaptic terminals, most of them are distributed postsynaptically in VMH dendrites. In addition, the percentage of MAGL positive dendrites is almost double the percentage of immunolabeled terminals, which demonstrates the preferential postsynaptic distribution of MAGL in this nucleus. The presence of the degrading enzyme in the VMH will have to be regulated to modulate 2-AG levels depending on the appetite state of the animal, which must be synchronized with the levels of its corresponding synthesis enzyme DAGL- α . Therefore, the predominant postsynaptic localization of MAGL shown in our study will contribute to maintain 2-AG levels available to reach presynaptic CB₁ receptors distributed in excitatory or inhibitory synapses of the VMH (Reguero et al., 2011) and thus modulating the increase or decrease of appetite depending on the 2-AG levels available to activate CB₁ receptors in excitatory or inhibitory synapses (Bellocchio et al., 2010).

5.4. FINAL DIAGRAMS

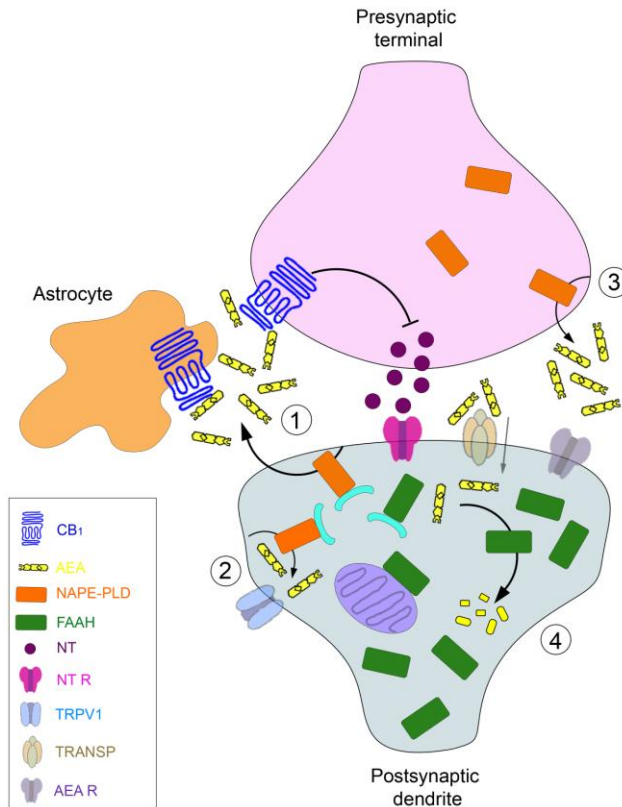


Figure 39. Image showing possible explanations for the observed results about the ultrastructural distribution of CB₁ and the synthesizing and degrading enzymes for anandamide in the VMH. **1-** The most plausible explanation based on our anatomical results consists that the predominant presence of NAPE-PLD at the postsynaptic level may produce in dendrites the synthesis of anandamide, which may act as a retrograde messenger activating presynaptic CB₁ receptors located in synaptic terminals and astrocytes of the VMH, producing for example the inhibition of neurotransmitter release. **2-** In addition, anandamide synthesized in dendrites may activate TRPV1 receptor located at the postsynaptic level in the VMH (own results not shown). **3-** On the other hand, presynaptic NAPE-PLD may explain anandamide synthesis in synaptic terminals that may act as an anterograde messenger activating possible uncharacterized receptors for N-acylethanolamines and mediating new forms of synaptic plasticity. **4-** Finally, anandamide may return to the dendritic profile (possibly by a yet uncharacterized transporter), where the most expression of FAAH is observed, producing its intracellular degradation and signaling termination. AEA: anandamide, NT: neurotransmitter, NT R: neurotransmitter receptor, AEA R: possible receptor for anandamide or other N-acylethanolamines, TRANSP: possible anandamide transporter.

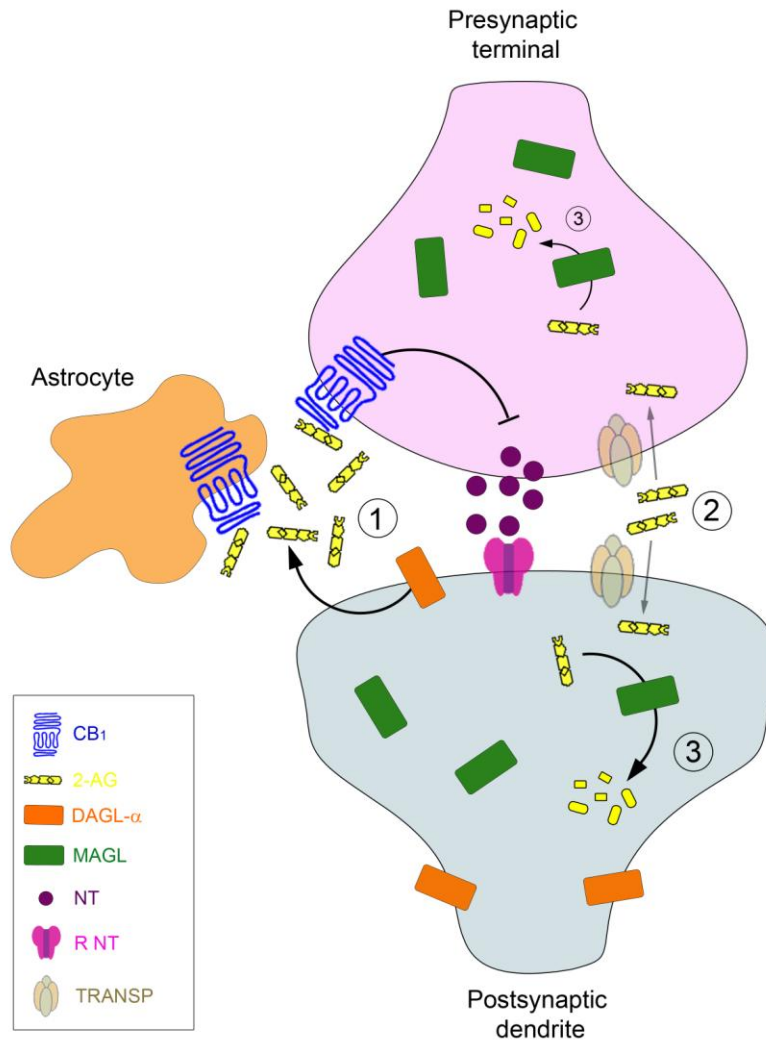


Figure 40. Image showing possible explanations for the observed results about the ultrastructural distribution of CB_1 and the synthesizing and degrading enzymes for 2-AG in the VMH. 1- The preferential distribution of DAGL- α in dendrites may explain 2-AG synthesis at a postsynaptic level, which may act as a retrograde messenger activating presynaptic CB_1 receptors located in synaptic terminals and astrocytes of the VMH, producing for example the inhibition of the neurotransmitter release. 2- Afterwards, 2-AG may be transported (possibly through the yet uncharacterized anandamide transporter) for its intracellular degradation. 3- MAGL is expressed both in terminals and dendrites in the VMH, showing a preferential presence in the latter. This may explain 2-AG degradation in both profiles, but based on our anatomical results, we hypothesize that 2-AG degradation may mainly occur at the postsynaptic level. NT: neurotransmitter, NT R: neurotransmitter receptor, TRANSP: possible anandamide/2-AG transporter.

6. CONCLUSIONS

In the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus:

- 1- CB₁ receptors were localized in 20% of synaptic terminals, mainly GABAergic and glutamatergic mostly of subcortical origin and to a lesser extent of cortical origin. Furthermore, both excitatory and inhibitory axon boutons showed a similar labeling density (0.40-0.50 immunoparticles/ μm).
- 2- 40% of astrocytes were CB₁ immunopositive.
- 3- NAPE-PLD was localized presynaptically and postsynaptically, but showed a preferential distribution in dendrites (50% were immunopositive).
- 4- 60% of the dendrites were FAAH immunopositive, indicating a clear postsynaptic localization of this enzyme.
- 5- DAGL- α showed a postsynaptic localization in membranes of the 54% and 44% of the dendrites and dendritic spines, respectively.
- 6- MAGL enzyme was distributed in presynaptic and postsynaptic profiles, mostly in dendrites (84% were immunolabeled).
- 7- The density of FAAH labeling in dendrites (8.6 immunoparticles/ μm^2) was much higher than any other enzyme studied (1.9-3.9 immunoparticles/ μm^2). Furthermore, the density of all the enzymes was more homogeneous in synaptic terminals (3.0-3.7 immunoparticles/ μm^2).

7. LITERATURE CITED

- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006) The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci*, 26: 1551-1561.
- Altman J, Bayer SA (1986) The development of the rat hypothalamus. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 100: 1-178.
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*, 58: 315-348.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1999) Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can J Physiol Pharmacol*, 77: 699-706.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*, 63: 795-813.
- Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ (2006) Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *Eur J Pharmacol*, 539: 177-183.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 27: 1-4.
- Basavarajappa BS (2007) Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*, 14: 237-246.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science*, 295: 2282-2285.
- Bellocchio EE, Hu H, Pohorille A, Chan J, Pickel VM, Edwards RH (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci*, 18: 8648-8659.
- Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, Chaouloff F, Piazza PV, Marsicano G (2010) Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci*, 13: 281-283.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277: 1094-1097.
- Beltramo M, Piomelli D (2000) Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Neuroreport*, 11: 1231-1235.

- Bernardinelli Y, Salmon C, Jones EV, Farmer WT, Stellwagen D, Murai KK (2011) Astrocytes display complex and localized calcium responses to single-neuron stimulation in the hippocampus. *J Neurosci*, 31: 8905-8919.
- Berthoud HR (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*, 26: 393-428.
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ, Di Marzo V (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun*, 256: 377-380.
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agro A, Hillard C, Di Marzo V (2001) The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem*, 268: 1982-1989.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, 14: 1347-1356.
- Blázquez C, Sánchez C, Daza A, Galve-Roperh I, Guzmán M (1999) The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem*, 72: 1759-1768.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*, 312: 637-641.
- Bowers G, Cullinan WE, Herman JP (1998) Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci*, 18: 5938-5947.
- Breivogel CS, Sim LJ, Childers SR (1997) Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 282: 1632-1642.
- Brown AJ (2007) Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, 152: 567-575.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, 22: 183-192.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1994) Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*, 348: 41-79.

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-824.
- Chávez AE, Chiu CQ, Castillo PE (2010) TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 13: 1511-1518.
- Childers SR (2006) Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. *AAPS J*, 8: E112-E117.
- Coggeshall RE (1964) A study of diencephalic development in the albino rat. *J Comp Neurol*, 122: 241-269.
- Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL (1998) Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci*, 63: PL113-PL117.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, 247: 470-473.
- Correa F, Mestre L, Molina-Holgado E, Arévalo-Martín A, Docagne F, Romero E, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2005) The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini Rev Med Chem*, 5: 671-675.
- Costa B, Colleoni M (2000) Changes in rat brain energetic metabolism after exposure to anandamide or Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Eur J Pharmacol*, 395: 1-7.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, 112: 423-431.
- Cota D, Woods S (2005) The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*, 12: 338-351.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384: 83-87.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient

- receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, 139: 1405-1415.
- Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V, Di Marzo V (2008) Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience*, 151: 955-968.
- Danise E, Oddi S, Bari M, Maccarrone M (2007) Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts. *Curr Med Chem*, 14: 2702-2715.
- de Oliveira Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedroso MF, Da Costa JC, Quilfeldt JA (2006) AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res*, 1075: 60-67.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol*, 141: 765-774.
- De Petrocellis L, Marini P, Matias I, Moriello AS, Starowicz K, Cristino L, Nigam S, Di Marzo V (2007) Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Exp Cell Res*, 313: 2993-3004.
- Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci*, 78: 549-563.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258: 1946-1949.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz J-C, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372: 686-691.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*, 21: 521-528.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410: 822-825.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 771-784.

- Di Marzo V, Matias I (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci*, 8: 585-589.
- Di Marzo V, Petrosino S (2007) Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol*, 18: 129-140.
- Díaz-Laviada I, Ruiz-Llorente L (2005) Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem*, 5: 619-630.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 10819-10824.
- Egertová M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR (1998) A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci*, 265: 2081-2085.
- Egertová M, Cravatt BF, Elphick MR (2003) Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*, 119: 481-496.
- Egertová M, Simon GM, Cravatt BF, Elphick MR (2008) Localization of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) expression in mouse brain: A new perspective on N-acylethanolamines as neural signaling molecules. *J Comp Neurol*, 506: 604-615.
- Fahrbach SE, Morrell JI, Pfaff DW (1989) Studies of ventromedial hypothalamic afferents in the rat using three methods of HRP application. *Exp Brain Res*, 77: 221-233.
- Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A, Piomelli D (2004) Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 8756-8761.
- Felder Ch C, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie KP, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchel RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*, 48: 443-450.
- Felder Ch C, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*, 393: 231-235.

- Fellin T, Halassa MM, Terunuma M, Succol F, Takano H, Frank M, Moss SJ, Haydon PG (2009) Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 15037-15042.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 24: 722-732.
- Fremeau RT Jr, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, 31: 247-260.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guijarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D (2011) A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci*, 15: 64-69.
- Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 435: 379-387.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carriere D, Carayon S, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232: 54-61.
- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, Shen R, Zhang MY, Strassle BW, Lu P, Mark L, Piesla MJ, Deng K, Kouranova EV, Ring RH, Whiteside GT, Bates B, Walsh FS, Williams G, Pangalos MN, Samad TA, Doherty P (2010) Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*, 30: 2017-2024.
- Giaume C, Venance L (1998) Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*, 24: 50-64.
- Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG (2003) Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 4269-4274.
- Glass M, Dragunow M, Faull R (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, 77: 299-318.

- Gordon GR, Iremonger KJ, Kantevari S, Ellis-Davies GC, MacVicar BA, Bains JS (2009) Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses. *Neuron*, 64: 391-403.
- Grueter BA, Brasnjo G, Malenka RC (2010) Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, 13: 1519-1525.
- Guindon J, De Lean A, Beaulieu P (2006) Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain*, 121: 85-93.
- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*, 20: 441-458.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*, 27: 6473-6477.
- Han J, Kesner P, Metna-Laurent M, Duan T, Xu L, Georges F, Koehl M, Abrous DN, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Liu Q, Bai G, Wang W, Xiong L, Ren W, Marsicano G, Zhang X (2012) Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB(1) receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, 148: 1039-1050.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 3662-3665.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M (2007) Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci*, 27: 1211-1219.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev*, 86: 1009-1031.
- Hegyí Z, Kis G, Holló K, Ledent C, Antal M (2009) Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord. *Eur J Neurosci*, 30: 251-262.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*, 463: 232-236.

- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 1932-1936.
- Herkenham M, Lynn A, Johnson M, Melvin L, De Costa B, Rice K (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, 11: 563-583.
- Herzog ED, Muglia LJ (2006) You are when you eat. *Nat Neurosci*, 9: 300-302.
- Higuchi S, Irie K, Mishima S, Araki M, Ohji M, Shirakawa A, Akitake Y, Matsuyama K, Mishima K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M (2010) The cannabinoid 1-receptor silent antagonist O-2050 attenuates preference for high-fat diet and activated astrocytes in mice. *J Pharmacol Sci*, 112: 369-372.
- Hof PR, de Vellis J, Nimchinsky EA, Kidd G, Claudio L, Trapp BD (2008) Cellular components of nervous tissue. In: *Fundamental Neuroscience*, 3rd edition. Eds Squire LR, Berg D, Bloom FE, du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC. *Academic Press, Elsevier*, 47-53.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54: 161-202.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, 47: 345-358.
- Hrabovszky E, Halász J, Meelis W, Kruk MR, Liposits Z, Haller J (2005) Neurochemical characterization of hypothalamic neurons involved in attack behavior: glutamatergic dominance and co-expression of thyrotropin-releasing hormone in a subset of glutamatergic neurons. *Neuroscience*, 133: 657-666.
- Hrabovszky E, Wittmann G, Kalló I, Füzesi T, Fekete C, Liposits Z (2012) Distribution of type 1 cannabinoid receptor-expressing neurons in the septal-hypothalamic region of the mouse: colocalization with GABAergic and glutamatergic markers. *J Comp Neurol*, 520: 1005-1020.
- Hsuchou H, He Y, Kastin AJ, Tu H, Markadakis EN, Rogers RC, Fossier PB, Pan W (2009) Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain*, 132: 889-902.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V

- (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8400-8405
- Hyypä M (1969) Differentiation of the hypothalamic nuclei during ontogenetic development in the rat. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 129: 41-52.
- Idris AI, van't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, Ralston SH (2005) Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med*, 11: 774-779.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunus G (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol*, 118: 2023-2028.
- Jamshidi N, Taylor DA (2001) Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*, 134: 1151-1154.
- Jelsing J, Larsen PJ, Vrang N (2008) Identification of cannabinoid type 1 receptor expressing cocaine amphetamine-regulated transcript neurons in the rat hypothalamus and brainstem using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neuroscience*, 154: 641-652.
- Jin XH, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2007) Discovery and characterization of a Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *J Biol Chem*, 282: 3614-3623.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*, 10: 331-339.
- Juan-Picó P, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ, Javier Díaz-Molina F, Ripoll C, Rodríguez de Fonseca F, Nadal A (2006) Cannabinoid receptors regulate Ca²⁺ signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*, 39: 155-162.
- Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H (2002) Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J Comp Neurol*, 444: 39-62.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*, 1: 683-692.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, 89: 309-380.

- Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 26: 5628-5637.
- Kauer JA, Gibson HE (2009) Hot flash: TRPV channels in the brain. *Trends Neurosci*, 32: 215-224.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci*, 26: 2991-3001.
- King BM (2006) The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 87:221-244.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol*, 136: 550-557.
- Kiss J, Csáki A, Halász B (2011) Location of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic ventromedial nucleus studied by autoradiography of retrogradely transported [³H]D-aspartate. *Neuroscience*, 176: 210-224.
- Klein TW, Friedman H, Specter S (1998) Marijuana, immunity and infection. *J Neuroimmunol*, 83: 102-115.
- Koutcherov Y, Mai JK, Ashwell KW, Paxinos G (2002) Organization of human hypothalamus in fetal development. *J Comp Neurol*, 446: 301-324.
- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ (2007) Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One*, 2: e709.
- Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA (2004) Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, 141: 253-262.
- Ligresti A, Morera E, Van Der Stelt M, Monory K, Lutz B, Ortar G, Di Marzo V (2004) Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem J*, 380: 265-272.

- Little PJ, Compton DR, Johnson MR, Melvin LS, Martin BR (1988) Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 247: 1046-1051.
- Mackie K (2006) Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obes (Lond)*, 30: S19-S23.
- Mackie K (2008) Introduction to the Endocannabinoid System. Cell Biology of the Endocannabinoid System. In: The Endocannabinoid System Handbook. Contributors: Brewer HB, Cota D, Cravatt BF, Di Marzo V, Ginsberg HN, Howlett A, Reggio PH, Woods SC. *Beth Israel Medical Center & Scientiae, LLC*, 3-12 & 15-26.
- Magistretti P (2000) Cellular bases of functional brain imaging: insights from neuron-glia metabolic coupling. *Brain Res*, 886: 108-112.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 48: 655-668.
- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*, 11: 4213-4225.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418: 530-534.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 302: 84-88.
- Matias I, Di Marzo V (2007) Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab*, 18: 27-37.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346: 561-564.
- McClellan KM, Parker KL, Tobet S (2006) Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*, 27: 193-209.

- McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA, Barker EL (2004) A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem*, 279: 41991-41997.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50: 83-90.
- Meister B (2007) Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 92: 263-271.
- Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3655-3660.
- Mikics E, Dombi T, Barsvári B, Varga B, Ledent C, Freund TF, Haller J (2006) The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. *Behav Pharmacol*, 17: 223-230.
- Moldrich G, Wenger T (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*, 21: 1735-1742.
- Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM, Rothwell NJ (2003) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci*, 23: 6470-6474.
- Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, During M, Klugmann M, Wölfel B, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B (2006) The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, 51: 455-466.
- Morishita J, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueno M, Sakamoto H, Maekawa N, Ueda N (2005) Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain. *J Neurochem*, 94: 753-762.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365: 61-65.

- Narita M, Suzuki M, Kuzumaki N, Miyatake M, Suzuki T (2008) Implication of activated astrocytes in the development of drug dependence: differences between methamphetamine and morphine. *Ann N Y Acad Sci*, 1141: 96-104.
- Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, 57: 883-893.
- Navarrete M, Araque A (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*, 68: 113-126.
- Nixdorf-Bergweiler BE, Albrecht D, Heinemann U (1994) Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia*, 12: 180-195.
- Nyilas R, Dudok B, Urbán GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I (2008) Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J Neurosci*, 28: 1058-1063.
- Nyíri G, Cserép C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005) CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience*, 136: 811-822.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*, 279: 5298-5305.
- Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N (2007) Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers*, 4: 1842-1857.
- Oudin MJ, Hobbs C, Doherty P (2011) DAGL-dependent endocannabinoid signalling: roles in axonal pathfinding, synaptic plasticity and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 34: 1634-1646.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*, 27: 73-100.
- Pan W, Hsueh H, Xu C, Wu X, Bouret SG, Kastin AJ (2011) Astrocytes modulate distribution and neuronal signaling of leptin in the hypothalamus of obese A^{vy} mice. *J Mol Neurosci*, 43: 478-484.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci*, 4: 803-812.

- Perea G, Araque A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*, 38: 375-382.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, 317: 1083-1086.
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie X-Q, Makriyannis A (1999) Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5802-5807.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 4: 873-884.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci*, 16: 5073-5081.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301: 1020-1024.
- Puente N, Elezgarai I, Lafourcade M, Reguero L, Marsicano G, Georges F, Manzoni OJ, Grandes P (2010) Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PLoS One*, 5: e8869.
- Puente N, Cui Y, Lassalle O, Lafourcade M, Georges F, Venance L, Grandes P, Manzoni OJ (2011) Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci*, 14: 1542-1547.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM (2008). Sistema motor visceral. In: Neurociencia, 3ª edición. *Editorial Médica Panamericana*, 484-486.
- Reguero L, Puente N, Elezgarai I, Mendizabal-Zubiaga J, Canduela MJ, Buceta I, Ramos A, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Marsicano G, Grandes P (2011) GABAergic and cortical and subcortical glutamatergic axon terminals contain CB1 cannabinoid receptors in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *PLoS One*, 6: e26167.
- Roberts JC, Davis JB, Benham CD (2004) [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res*, 995: 176-183.

- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci*, 21: 823-833.
- Romero J, Wenger T, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ (1998) Cannabinoid receptor binding did not vary in several hypothalamic nuclei after hypothalamic deafferentation. *Life Sci*, 63: 351-356.
- Sakata-Haga H, Kanemoto M, Maruyama D, Hoshi K, Mogi K, Narita M, Okado N, Ikeda Y, Nogami H, Fukui Y, Kojima I, Takeda J, Hisano S (2001) Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res*, 902: 143-155.
- Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M (2002) Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett*, 329: 13-16.
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzmán M (1998) Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol*, 54: 834-843.
- Sanchez JF, Krause JE, Cortright DN (2001a) The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience*, 107: 373-381.
- Sánchez C, Rueda D, Ségui B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzmán M (2001b) The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol*, 59: 955-959.
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM (1976) The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol*, 169: 409-442.
- Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, Kuraishi Y (1998) Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport*, 9: 2045-2048.
- Schambra UB, Silver J, Lauder JM (1991) An atlas of the prenatal mouse brain: gestational day 14. *Exp Neurol*, 114: 145-183.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski EN (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol*, 141: 278-287.

- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R (2006) GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci*, 26: 5370-5382.
- Shimada M, Nakamura T (1973) Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. *Exp Neurol*, 41: 163-173.
- Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V (2007) Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther*, 114: 13-33.
- Stefanini M, De Martino C, Zamboni L (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216: 173-174.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388: 773-778.
- Stella N (2004) Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*, 48: 267-277.
- Stella N (2010) Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*, 58: 1017-1030.
- Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM (2005) Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci*, 8: 1356-1363.
- Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt BF, de Fonseca FR (2008) Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol*, 509: 400-421.
- Suárez J, Romero-Zerbo SY, Rivera P, Bermúdez-Silva FJ, Pérez J, De Fonseca FR, Fernández-Llebrez P (2010) Endocannabinoid system in the adult rat circumventricular areas: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol*, 518: 3065-3085.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215: 89-97.
- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Miyashita T, Kondo S, Suhara Y, Takayama H, Waku K, Seki C, Baba N, Ishima Y (1999) Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem*, 274: 2794-2801.

- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*, 45: 405-446.
- Thanos PK, Ramalhete RC, Michaelides M, Piyis YK, Wang GJ, Volkow ND (2008) Leptin receptor deficiency is associated with upregulation of cannabinoid 1 receptors in limbic brain regions. *Synapse*, 62: 637-642.
- Thomas EA, Cravatt BF, Danielson PE, Gilula NB, Sutcliffe JG (1997) Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. *J Neurosci Res*, 50: 1047-1052.
- Tobet SA, Henderson RG, Whiting PJ, Sieghart W (1999) Special relationship of gamma-aminobutyric acid to the ventromedial nucleus of the hypothalamus during embryonic development. *J Comp Neurol*, 405: 88-98.
- Tran PV, Lee MB, Marín O, Xu B, Jones KR, Reichardt LF, Rubenstein JR, Ingraham HA (2003) Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Mol Cell Neurosci*, 22: 441-453.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83: 393-411.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci*, 27: 3663-3676.
- Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M (2011) Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 31: 7700-7714.
- Van Der Stelt M, Di Marzo V (2004) Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem*, 271: 1827-1834.
- van der Stelt M, Di Marzo V (2005) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*, 7: 37-50.
- van Eerdenburg FJ, Rakic P (1994) Early neurogenesis in the anterior hypothalamus of the rhesus monkey. *Brain Res Dev Brain Res*, 79: 290-296.

- Varoqui H, Schäfer MK, Zhu H, Weihe E, Erickson JD (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 22: 142-155.
- Volterra A, Bezzi P (2002) Release of transmitters from glial cells. In: The tripartite synapse: glia in synaptic transmission. Eds Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG. *Oxford University Press*, 164-184.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, 6: 626-640.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton J-Y, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron*, 37: 275-286.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N (2002) Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem*, 277: 20869-20876.
- Walter L, Stella N (2003) Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia*, 44: 85-90.
- Wang J, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Miyatake A, Ueda N (2006a) Functional analysis of the purified anandamide-generating phospholipase D as a member of the metallo-beta-lactamase family. *J Biol Chem*, 281: 12325-12335.
- Wang H, Dey SK, Maccarrone M (2006b) Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr Rev*, 27: 427-448.
- Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, Alekseeva OO, Razdan RK, Mahadevan A, Martin BR (2005) CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br J Pharmacol*, 145: 293-300.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296: 678-682.
- Wittmann G, Deli L, Kalló I, Hrabovszky E, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C (2007) Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol*, 503: 270-279.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M (2006) Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close

proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci*, 26: 4740-4751.

Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V (2012) Astroglial excitability and gliotransmission: An appraisal of Ca²⁺ as a signaling route. *ASN Neuro*, 4: e00080.

