



VNIVERSITAT
D^{NI} VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**DAÑO INFLAMATORIO Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. EFECTO DE
POLIFENOLES Y CANNABINOIDES.**

Escrita y presentada por:

Diana Marcela Aguirre Rueda

Dirigida por:

Dra. Soraya Vallés Martí

Valencia, 2014



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Dra. Soraya Vallés Martí, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que **Dña. Diana Marcela Aguirre Rueda**, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

“DAÑO INFLAMATORIO Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. EFECTO DE POLIFENOLES Y CANNABINOIDES”.

para la obtención del título de Doctor. Y para que conste a los efectos oportunos, firma la presente certificación.

Valencia, de 2014

Dra. Soraya Vallés Martí

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento es para mis amados padres, JORGE E HILDA, quienes me han dado la confianza de seguir adelante en el camino de la vida, siempre con el ánimo de ser la mejor en lo que me encuentre haciendo y quienes han hecho de mi sueño una realidad. GRACIAS, los amo con todo mi ser. A mi hermano ALEJADRO, quien es un gran ejemplo para mí. Mi sobrina PAULA, que ya va siguiendo nuestros pasos. Y al resto de toda mi familia, que siempre han estado pendiente de mi aún en la distancia.

Una persona muy especial, JAVIER GÓMEZ, quien fuera mi primer tutor y la persona que me motivara a seguir por el maravilloso mundo de la investigación. GRACIAS CAMPEÓN.

A mi tutora, SORAYA, gracias por acogerme con mi propuesta de trabajo y tu complementarla, a estar dispuesta a pesar de todo a enseñarme todo lo necesario para sacar adelante esta investigación. A todas aquellas personas que hicieron algún día parte en mi formación, como de quienes están actualmente, gracias chicas: SOL y FÁTIMA, son fantásticas. Igualmente a JOSE VILA, por los momentos de alegría y por la ayuda incondicional, gracias por acogerme y estar dispuesto a ayudarme y sacar adelante este trabajo.

Y gracias a todos mis amigos tanto de Colombia como de aquí, por los momentos buenos y ayudarme a pasar los malos, no ha sido nada fácil,

pero dijeron que si quieres luchar por lo que realmente quieres debes esforzarte hasta alcanzarlo, y ese es mi resultado, haber sacado adelante este trabajo y seguir creciendo profesionalmente y académicamente. ¡Y vamos por más!

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Células neurales del Sistema Nervioso Central (SNC)	1
1.2. Células neuronales o neuronas	2
1.3. Células gliales	3
1.4. Enfermedad de Alzheimer (EA).....	7
1.5. El péptido A β y su síntesis	11
1.6. La inflamación inducida en la EA	15
1.7. Estrés oxidativo inducido en la EA	17
1.8. Tratamientos para la Enfermedad de Alzheimer	19
1.9. Los cannabinoides	30
2.1. Hipótesis.....	45
2.2. Objetivos	46
III. MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1. Animales de experimentación	49
3.2. Cultivo primario de astrocitos	49
3.2.1. Reactivos y materiales.....	50
3.2.2. Procedimiento	50
3.3. Estudio de pureza del cultivo primario: inmunofluorescencia indirecta.....	51
3.3.1. Fundamento.....	52
3.3.2. Reactivos y materiales.....	52
3.3.3. Procedimiento	53
3.4. Estudio de observación morfológica del cultivo primario: inmunofluorescencia directa	54
3.4.1. Fundamento.....	55

3.4.2. Reactivos y materiales.....	55
3.4.3. Procedimiento	55
3.5. Preparación de sustancias.....	56
3.5.1. Preparación del péptido A β	56
3.5.2. Preparación de polifenoles: Genisteína y estradiol	56
3.5.3. Preparación del cannabinoide WIN 55, 212-2	57
3.6. Diseño experimental y tratamientos en cultivos primarios de astrocitos	57
3.7. Estudio de viabilidad celular: ensayo MTT	58
3.7.1. Fundamento del ensayo MTT	59
3.7.2. Reactivos y materiales.....	60
3.7.3. Procedimiento	60
3.8. Extracción y determinación de proteínas totales: Método Lowry61	
3.8.1. Fundamento para la extracción de proteínas totales (1)	61
3.8.2. Reactivos y materiales.....	62
3.8.3. Procedimiento	62
3.8.4. Fundamento para la determinación de proteínas totales (2).....	63
3.8.5. Reactivos y materiales.....	64
3.8.6. Procedimiento	64
3.8.7. Cálculos.....	65
3.9. Determinación de expresión proteica de marcadores pro y anti- inflamatorios: Técnicas electroforéticas de determinación de proteína en geles desnaturizantes de proliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunodetección (WESTERN-BLOT).	65
3.9.1. Fundamento.....	65
3.9.2. Preparación de los geles	66
3.9.3. Reactivos y materiales.....	67
3.9.4. Procedimiento	68

3.9.5. Electroforesis en gel desnaturalizante (SDS-PAGE)	68
3.9.6. Reactivos y materiales.....	69
3.9.7. Procedimiento	70
3.9.8. Transferencia.....	71
3.9.10. Reactivos y materiales.....	72
3.9.11. Procedimiento	72
3.9.12. Bloqueo y lavado de proteínas	74
3.9.13. Reactivos y materiales.....	74
3.9.14. Procedimiento	75
3.9.15. Detección de proteínas	76
3.9.16. Preparación e incubación de anticuerpos	77
3.9.17. Reactivos y materiales.....	78
3.9.18. Procedimiento	79
3.9.19. Análisis cuantitativo de proteínas.....	80
3.9.20. Reactivos y materiales.....	80
3.9.21. Procedimiento	80
3.9.22. Cálculos.....	81
3.10. Determinación de citoquinas pro-inflamatorias: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	82
3.10.1. Fundamento.....	82
3.10.2. Reactivos y materiales.....	83
3.10.2.1. Rat TNF- α ELISA Kit.....	83
3.10.2.2. Rat IL-1 β ELISA Kit.....	84
3.10.3. Procedimiento	84
3.10.4. Cálculos.....	85
3.11. Determinación de marcadores de estrés oxidativo	86
3.12. Determinación de GSH en cultivo primario de astrocitos.....	86
3.12.1. Fundamento.....	86

3.12.2. Reactivos y materiales.....	87
3.12.3. Procedimiento	87
3.12.4. Cálculos.....	88
3.13. Determinación de GSSG en cultivo primario de astrocitos.....	88
3.13.1. Fundamento	88
3.13.2. Reactivos y materiales.....	88
3.13.3. Procedimiento	89
3.13.3.1. Derivatización	89
3.14. Técnica cromatográfica	90
3.14.1. Fase móvil	90
3.14.2. Fase estacionaria	90
3.15. Detección.....	91
3.16. Cálculos.....	91
3.17. Métodos estadísticos	91
IV. RESULTADOS.....	93
4.1 Citotoxicidad celular del péptido A β	93
4.2 Efectos del péptido A β en cultivo primario de astrocitos	93
Polifenoles.....	97
4.3 Viabilidad celular	97
4.4 Citoquinas pro-inflamatorias. Efecto de los polifenoles	99
4.5 Proteínas pro- y anti- inflamatorias. Efecto de los polifenoles ..	102
4.6 Estrés oxidativo: Cociente GSSG/GSH. Efecto de los polifenoles	106
Cannabinoides	110
4.7 Viabilidad celular	110
4.8 Receptores cannabinoides	113
4.9 Citoquinas pro-inflamatorias. Efecto de los cannabinoides	116

4.10 Proteínas pro- y anti- inflamatorias. Efecto de los cannabinoides	119
4.11 Estrés oxidativo: SOD Cu/Zn, como proteína antioxidante. Efecto de los cannabinoides	123
4.12 Ventajas y limitaciones del estudio	125
V. DISCUSIÓN.....	127
5.1. Efectos del péptido $A\beta_{1-42}$ sobre la viabilidad celular y la morfología de astrocitos en cultivo primario	127
5.2. Moléculas inflamatorias inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos.....	129
5.3. Moléculas de estrés oxidativo inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos	134
5.4. Efectos de polifenoles sobre la viabilidad celular de astrocitos en cultivo primario	138
5.5. Efecto de polifenoles sobre moléculas inflamatorias y estrés oxidativo inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos	139
5.6. Efectos de cannabinoides sobre la viabilidad celular de astrocitos en cultivo primario	144
5.7. Efecto de cannabinoides sobre moléculas inflamatorias y estrés oxidativo inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos	146
VI. CONCLUSIONES	151
Efectos sobre la viabilidad celular y la morfología de astrocitos en cultivo primario	151
Moléculas inflamatorias inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos. Efectos de polifenoles y cannabinoides	151
Moléculas de estrés oxidativo inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos. Efectos de polifenoles y cannabinoides	152
VII. BIBLIOGRAFÍA	153

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesamiento del A β por vía no amiloidogénica y amiloidogénica.....	13
Figura 2. Esquema representativo de A) una neurona normal, B) neurona con ovillos neurofibrilares y C) Microfotografía representativa de ovillos neurofibrilares (flechas) marcados con un anticuerpo específico anti-PHF1, barra de escala 62.5 μ m (LaFerla y Oddo, 2005).....	14
Figura 3. Citoquinas liberadas por astrocitos y microglía asociadas a las placas del péptido β amiloide.....	15
Figura 4. Estructura química de Δ 9-THC.	31
Figura 5. Estructura de los receptores CB1 y CB2.....	33
Figura 6. Detección de proteínas por quimioluminiscencia.	77
Figura 7. Procedimiento de análisis de resultados.	81
Figura 8. Preparación de la curva estándar.....	84
Figura 9. Microfotografía de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (A); 5 μ M A β 1-42 (B). El primer panel corresponde a la tinción de mitocondrias con Mito Tracker Green (verde), el segundo panel a la tinción de los núcleos marcados con Hoechst (azul) y el tercer panel a la superposición de ambos. Barra de escala 8 μ m.....	95
Figura 10. Microfotografía de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (A); 5 μ M A β 1-42 (B). El primer panel corresponde a la tinción de los núcleos marcados con Hoechst (azul) y el segundo a la tinción con yoduro de propidio (rojo). Barra de escala 8 μ m.....	96

Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E2+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* p \leq 0,05) y vs A β (# p \leq 0,05). 98

Figura 12. Niveles de IL-1 β en cultivo primario de astrocitos incubados con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E2+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* p \leq 0,05) y vs A β (# p \leq 0,05). 100

Figura 13. Niveles de TNF- α en cultivo primario de astrocitos incubados con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2 nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E2+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂ que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* p \leq 0,05) y vs A β (# p \leq 0,05). 101

Figura 14. Expresión proteica de COX-2 en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E2+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂ que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* p \leq 0,05) y vs A β (# p \leq 0,05). 103

Figura 15. Expresión proteica de iNOS en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E2+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$). 104

Figura 16. Expresión proteica de PPAR- γ en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E2+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$). 105

Figura 17. Valores de GSH en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E2+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$). 107

Figura 18. Valores de GSSG en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E2+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$). 108

Figura 19. Cociente GSSG/GSH en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E2+A β). Tanto genisteina como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* p \leq 0,05) y vs A β (# p \leq 0,05). 109

Figura 20. Porcentaje de viabilidad de astrocitos en cultivo primario en condiciones control (control, C) y tras la adición de diferentes concentraciones de WIN 55, 212-2 (1, 2, 5, 10 y 20 μ M). Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* p \leq 0,05). 111

Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* p \leq 0,05) y vs A β (# p \leq 0,05). 112

Figura 22. Expresión proteica de CB1 en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* p \leq 0,05) y vs A β (# p \leq 0,05). 114

Figura 23. Expresión proteica de CB2 en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más.

Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$)..... 115

Figura 24. Niveles de IL-1 β en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M Win 55, 212-2 y 10 μ M Win 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$)..... 117

Figura 25. Niveles de TNF- α en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$)..... 118

Figura 26. Expresión proteica de COX-2 en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$)..... 120

Figura 27. Expresión proteica de iNOS en cultivo primario de astrocitos tratados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes.

Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).
 121

Figura 28. Expresión proteica de PPAR- γ en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$). 122

Figura 29. Expresión proteica de Cu/Zn SOD en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$). 124

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la FDA, EMA y AEMPS para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.....	21
Tabla 2. Clasificación de los polifenoles según su estructura química	25
Tabla 3. Protocolo y grupos experimentales	58
Tabla 4. Composición de los geles separador y concentrador (2 geles).	67
Tabla 5. Composición del tampón de electroforesis. Disolver en 1 L de agua, no ajustar pH.....	71
Tabla 6. Composición del tampón de transferencia. Disolver en 1 L de agua, no ajustar pH.....	73
Tabla 7. Composición de la solución madre para el tampón de lavado. Disolver en 1 L de agua, ajustar pH 7.6. Para preparar 1 L de TBS-T (TSB-Tween-20), añadir TBS al 1x (100 ml), completar con agua bidestilada (900 ml) y añadir 1 ml de Tween-20 y mezclar bien	75

ABREVIATURAS

A β ₁₋₄₂: Amilide beta fragmento 1-42

A β ₄₀₋₁: Amilide beta fragmento 40-1

ACEA: Araquidonil-2-cloroetilamida

ACPA: Araquidonil-ciclopropilamida

ADN: Ácido desoxirribunucleico

ADNc: Ácido desoxirribunucleico complementario

ADAMs: Familia de proteínas adamalisina

AEA: N-araquidonil-etanolamina

AIF: Factor inductor de apoptosis

AM356: Metanandamida

APP: Proteína precursora del amiloide

ATP: Adenosin tri-fosfato

ARA-S: N-araquidonil-L-senina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

APS: Amonio persulfato

ApoE3: Alipoproteína E3

BHE: Barrera hemato-encefálica

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BSA: Albúmina de suero bovino

CBD: Cannabidiol

CBN: Cannabinol

CB1: Receptor cannabinoide tipo 1

CB2: Receptor cannabinoide tipo 2

CDNB: Cloro-2,4-dinitrobenceno

CK: Cretaina quinasa

CO₂: Dióxido de carbono

COX-2: Ciclooxygenasa tipo 2

DMEM: Medio de cultivo celular

DMSO: Dimetil sulfóxido

EAAT 1-3: Transportador de aminoácidos excitatorios 1-3

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ER- α : Receptor estrogénico tipo alfa

ER- β : Receptor estrogénico tipo beta

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GDND: Factor neurotrófico derivado de la glía

GFAP: Proteína ácida fibrilar glilar

GLUT1: Transportador de glucosa tipo 1

GS: Glutamina sintasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GSSG/GSH: Cociente glutación oxidado/glutación reducido

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HRP: Peroxidasa de rábano

IL-1 β : Interleuquina 1 tipo beta

IL-6: Interleuquina 6

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

KDa: Kilodaltons

KOH: Hidróxido de potasio

LAT1: Transportador de aminoácidos neutros

MDA: Malonil-dialdehído

MIP-2: Proteína inflamatoria de macrófagos tipo 2

MOPS: Propersulfónico

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-2,S-difenil tetrazolio

NADA: N-araquidonil-dopamina

NEM: N-etilmaleimida

NMDA: Receptores N-metil-D-aspartato

NF κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

ON: Óxido nítrico

O₂: Oxígeno

PBS: Tampón fosfato salino

PCA: Ácido perclórico

PSEN1: Presenilina tipo 1

PSEN2: Presenilina tipo 2

PPAR- γ : Receptor tipo gamma activado por el proliferador de peroxisomas

SBF: Suero bovino fetal

SDS: Dodecilsulfato sódico

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD Cu/Zn: Superóxido dismutasa cobre/zinc

TAU: Proteína microtubular

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TBS-T: Tampón de lavado

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TGF- β : Factor de crecimiento transformante tipo beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral tipo alfa

Tris-HCL: Hidrocloruro de tris

TRPV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1

Δ 9-THC: Delta 9-tetrahidrocannabinol

2-AG: 2-araquidonil-glicerol

α -tubulina: Tubulina tipo alfa

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Células neurales del Sistema Nervioso Central (SNC)

Las células neurales que forman el sistema nervioso central son las **células neuronales o neuronas** y las **células gliales**, entre las que se distinguen **astrocitos, microglía y oligodendroglía** (Kander et al., 2000).

La función de astrocitos y microglía es la de intervenir en la regulación de las funciones metabólicas del tejido nervioso mediante el mantenimiento de los niveles de oxígeno (O₂) y demás nutrientes (Chen y Swanson, 2003). La función de la oligodendroglía se basa en la producción de mielina (Ramón y Cajal, 1913; del Río-Hortega, 1928; Bradford, 1988; Ndubaku y de Bellard, 2008). La relación existente entre células neuronales y gliales conlleva al mantenimiento de la homeostasis cerebral. En este sentido la expresión de ciertos receptores de membrana en las neuronas controla la activación de las células gliales (Hoek et al., 2000).

Además de sus efectos sobre el metabolismo neuronal, las células gliales también participan en los procesos inflamatorios del SNC ayudándole a recuperarse de agresiones exógenas mediante liberación de mediadores solubles antiinflamatorios, cambios en la concentración iónica del medio y liberación de moléculas de adhesión celular. (Rothsteins et al., 1996; Obrenovitch y Urenjak., 1997; Tanaka et al., 1997; Rossi et al., 2000; Bal-Price y Brown., 2001; Rao et al., 2001).

Cuando este proceso se cronifica, se incrementa la liberación de sustancias pro-inflamatorias por la glía (Marchand et al., 2005; Cuenca-López et al., 2010; Halaris., 2013; Kumar et al., 2013; Ramesh et al., 2013). En este caso las neuronas activas tienen un efecto supresor sobre la activación de la glía, previniendo y limitando el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Tsacopoulos y Magistretti., 1996; Fields y Stevens-Graham., 2002; Nedergaard et al., 2002; Auld y Robitaille., 2003; Newman., 2003; Zonta et al., 2003).

1.2. Células neuronales o neuronas

Las neuronas son células altamente diferenciadas que presentan unas características morfológicas comunes: un cuerpo denominado soma; una o varias prolongaciones cortas denominadas dendritas; y una prolongación larga denominada axón (Paniagua et al., 2002). Una vez alcanzada la diferenciación neuronal, pierden su capacidad de división (Cayre et al., 2002).

Aunque la función principal de las neuronas, como parte integrante del sistema nervioso, consiste en recibir señales desde receptores sensoriales, conducirlas y transmitirlas como impulsos nerviosos bien a otras neuronas o bien a órganos efectores (Paniagua et al., 2002), también se ha descrito su participación en la regulación de la respuesta inmunitaria innata mediante la liberación de factores neurotróficos y neurotóxicos (Lee et al., 1992; Neumann y Wekerle 1998; Wei y Jonakait, 1999).

1.3. Células gliales

Las células gliales constituyen una población heterogénea de células no neuronales compuesta por 3 tipos: astrocitos, oligodendroglía y microglía.

Los astrocitos son las células no neuronales más numerosas. Poseen forma estrellada con numerosas prolongaciones citoplásmicas largas y estrechas. Cuando se activan, aumentan mucho de tamaño, y modifican su forma, presentando prolongaciones más gruesas, aumentando el número de mitocondrias, lisosomas y la actividad del retículo endoplasmático (Agulhon et al., 2008; Guillamón-Vivancos et al., 2013). Estos cambios se traducen en un incremento de la actividad fagocitaria (Yamaguchi, H y cols., 1998; Tuppo y Arias., 2005; Yamamoto et al., 2013). Proporcionan al cerebro un soporte a nivel estructural, trófico y metabólico (Chen y Swanson, 2003). Diversos estudios señalan la presencia de receptores que pueden responder a neurotransmisores como glutamato (Lee et al., 2010; Zhou et al., 2010), ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Fraser et al., 1994; Lee et al., 2011) y acetilcolina (Van Der Zee et al., 1993) cuya activación interviene en la regulación de la excitabilidad neuronal además de participar en el proceso de la transmisión y almacenamiento de la información sináptica (Perea y Araque, 2007). De igual forma, su interacción con las neuronas también interviene en la regulación de la respuesta inmune (Lee et al., 1992; Neumann y Wekerle 1998; Wei y Jonakait, 1999).

Los astrocitos ayudan a establecer y mantener la barrera hematoencefálica (BHE), por medio de las interacciones con las células endoteliales, regulando la expresión y la función de distintos transportadores endoteliales como el transportador de glucosa 1 (GLUT1), el transportador de aminoácidos neutros (LAT1) y el transportador de aminoácidos excitatorios 1-3 (EAAT 1-3) (Abbott et al., 2006).

En mamíferos, incluido el ser humano, se generan nuevas células en el sistema nervioso central (Temple y Alvarez-Buylla., 1999; Gage., 2000; Temple., 2001; Rakic., 2002). La neurogénesis adulta ocurre en dos zonas específicas del cerebro, el hipocampo y la zona subventricular (Temple y Alvarez-Buylla., 1999; Gage., 2000; Temple., 2001; Rakic P., 2002). Fuera de estas zonas la proliferación solo afecta a las células gliales, pero no a las neuronas (Gage., 2000; Horner et al., 2000; Magavi et al., 2000; Kornack y Rakic., 2001; Rakic., 2002). Contrariamente a lo que cabe esperar, células proliferativas aisladas de varias regiones del cerebro adulto, incluyendo regiones no neurogénicas, pueden aumentar las neuronas (Reynolds y Weiss., 1992; Lois y Alvarez-Buylla., 1993; Suhonen et al., 1996; Palmer et al., 1997; Shihabuddin., 1997; Kehl et al., 1997; Palmer et al., 1999; Kondo y Raff., 2000; Shihabuddin et al., 2000). Estos resultados indican que el destino de las células madre del sistema nervioso puede estar influenciado por las condiciones del medio. Astrocitos de hipocampo poseen un papel activo en la regulación de la neurogénesis mediante liberación de factores neurotróficos como factor de crecimiento neural, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas-3, 4 y 5 y

específicamente factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (Song et al., 2002) puesto que participan en el destino final de las células madre. Este efecto es inesperado puesto que el desarrollo neuronal ocurre con anterioridad al de los astrocitos. Por otra parte se ha demostrado la existencia de astrocitos (GFAP positivos) con características de las células madre que pueden generar precursores neuronales (Azizi y Krynska., 2013). En conjunto, estos estudios apoyan la hipótesis de que los astrocitos, más allá de su papel de soporte a las neuronas, poseen un papel importante en la regulación de la neurogénesis y los procesos sinápticos, incluida la transmisión sináptica (Parpura et al., 2012; Dodla et al., 2010; Guillamón-Vivancos et al., 2013).

Como respuesta a ciertas patologías del SNC: trauma, isquemia, tumores o enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos se activan dando lugar a un proceso denominado “gliosis reactiva” o “astrogliosis”. En procesos que cursan con daño neural, los astrocitos producen una serie de mediadores químicos como glutamato, aspartato, adenosin tri-fosfato (ATP), óxido nítrico (NO), proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2), factor de necrosis tumoral – alfa (TNF- α) e interleuquina-1 beta (IL-1 β), cuya función es incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Ballabh et al., 2004). Este proceso es fundamental para establecer los límites en las áreas dañadas y poder así recuperar la actividad neuronal por medio de la eliminación de cuerpos apoptóticos y tóxicos como el A β ₁₋₄₂ (Gasque et al., 2000; Barnum, 2002; Wyss-Coray y Mucke, 2002). Además, en procesos de daño neural, se ha demostrado un incremento del número de astrocitos caracterizado por la

sobreexpresión de algunas proteínas del filamento intermedio como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la vimentina (Eddleston y Mucke, 1993). Este incremento de la expresión está relacionado con patologías degenerativas (Giaume., 2009).

Los oligodendrocitos, son las células encargadas de producir y mantener la mielina en el SNC (Ramón y Cajal, 1913; del Río-Hortega, 1928; Bradford, 1988; Ndubaku y de Bellard, 2008) son las principales células de la sustancia blanca que constituye el 50% del volumen total del cerebro en humanos. Este tipo de célula es más pequeña que los astrocitos y posee menos prolongaciones. Expresan receptores de glutamato y presentan baja resistencia a procesos de estrés oxidativo, lo cual les hace más susceptibles a procesos de apoptosis y necrosis (Matute et al., 2007). El daño de estas células conlleva a la lesión o muerte en desórdenes desmielinizantes y neurodegenerativos como la esclerosis múltiple (McDonald et al., 2001; Compston y Coles., 2008; Losy., 2013). Para la diferenciación y supervivencia de los oligodendrocitos mielinizantes se requiere del contacto axón-oligodendrocitos adecuado y la liberación de factores tróficos por neuronas y astrocitos (Barres et al., 1992; Gard et al., 1995; Fernández et al., 2000).

El tercer tipo de célula glial corresponde a la microglía y constituye el 12% de las células del SNC (del Río-Hortega, 1932). Son las células inmunes efectoras o macrófagos del SNC y entre sus funciones destacan la fagocitosis, la presentación del antígeno y la producción y liberación tanto de factores neurotóxicos (TNF- α , IL- β , IL-6 y especies reactivas de oxígeno) como neurotróficos (BDNF,

GDNF) (Gehrmann et al., 1995; Rock et al., 2004). La microglía muestra plasticidad en su morfología y apariencia, especialmente durante una lesión o enfermedad (Davoust et al., 2008).

1.4. Enfermedad de Alzheimer (EA)

Es una enfermedad neurodegenerativa que se presenta con mayor frecuencia en los ancianos. Afecta alrededor de 37 millones de personas en todo el mundo y se espera que avance esta cifra estimándose un incremento del 100% en países desarrollados para el año 2040 (Ferri et al., 2005). Se aprecia también un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad más en mujeres que en hombres (Andersen et al., 1999; Di Carlo et al., 2002; Henderson., 2013).

Los primeros síntomas que se producen en la enfermedad de Alzheimer comprenden la pérdida paulatina de la memoria, desórdenes del lenguaje, cambios de humor y/o comportamiento y desorientación espacio-temporal. Con el deterioro cognitivo y motor, la enfermedad progresa hasta alcanzar la incapacidad total de las funciones corporales (Selkoe, 1997). Desde el punto de vista inmunohistoquímico, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares en diversas áreas del cerebro, responsables de la pérdida neuronal, el deterioro de las conexiones sinápticas y la gliosis reactiva causando la inflamación característica de esta enfermedad (Giulian, 1999; Wyss-Coray y Mucke, 2002). Los cambios neuropatológicos se presentan con mayor intensidad en el hipocampo, la corteza entorrinal, la corteza cerebral y estructuras subcorticales (Arnold et al., 1991).

La aparición de la enfermedad de Alzheimer puede ser de comienzo temprano o tardío. La de comienzo temprano, también denominado Alzheimer familiar, aparece con anterioridad a los 65 años, tiene una prevalencia baja, tan solo del 5%, y se relaciona con el patrón de herencia autosómico dominante. La variante de la enfermedad de Alzheimer tardía, está relacionada con el envejecimiento y factores de riesgo como obesidad, diabetes, medio ambiente y alimentación (Munoz y Feldman, 2000; Nussbaum y Ellis, 2003; Lindsay et al., 2002; Blennow et al., 2006) aparece con posterioridad a los 65 años y presenta una prevalencia mayor. Independientemente de su origen, ambas variantes producen cambios en la actividad de presenilina 1 (PSEN1) (Sherrington et al., 1995), presenilina 2 (PSEN2) (Levy-Lahad et al., 1995), y de la proteína precursora del amiloide (APP) (Goate y et al., 1991; Mullan et al., 1992). Además, los enfermos de Alzheimer familiar presentan polimorfismos específicos de la apolipoproteína E (Williamson et al., 2009). Como resultado de estas mutaciones, se producen cambios en el metabolismo celular que conducen al mal procesamiento de la APP y como consecuencia se produce un incremento de la producción del péptido beta amiloide $A\beta_{1-42}$, y $A\beta_{1-40}$, precursores de las placas neuríticas presentes en la enfermedad de Alzheimer (Scheuner et al., 1996).

Aunque la tasa de muerte celular es bien tolerada e incluso necesaria en el sistema nervioso durante el desarrollo (Baehrecke., 2002), una tasa elevada de muerte celular en el sistema nervioso adulto es signo de presencia de enfermedad neurodegenerativa. La muerte celular, se puede desencadenar por diversas causas como,

pérdida en su correcta función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de sustancias tóxicas o por falta de nutrientes. Dentro del proceso de muerte celular que transcurre por mecanismos fisiológicos regulados, están la apoptosis (muerte celular programada) y muerte celular por autofagia, por otra parte, un tercer proceso de muerte celular es la necrosis, siendo un proceso irreversible y sin control alguno (Camins et al., 2008; Degterev y Yuan., 2008).

La apoptosis, se propone como el principal mecanismo de muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer, puesto que existe evidencia de la implicación de la apoptosis en esta patología neurodegenerativa, ya que este proceso de caracteriza morfológicamente por condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y del núcleo de la célula asociada a los depósitos de amiloide y ovillos neurofibrilares (Lassmann y cols., 1995), formación de cuerpos apoptóticos (Kerr, 2002; Lockshin y Zakeri, 2004) y activación de caspasas (Cribbs et al., 2004) en neuronas que contienen ovillos neurofibrilares (Su et al., 1994). También se ha descrito que mutaciones en las presenilinas, hacen que las neuronas sean más vulnerables frente a la apoptosis inducida por ausencia de factores tróficos o por factores de estrés (Guo et al., 1997). Este proceso se puede iniciar por agentes apoptóticos, cuando se activa receptores de muerte en la membrana pertenecientes a la super familia del receptor de TNF (TNFR) que se denomina vía extrínseca (Ashkenazi y Dixit., 1998; Danial y Korsmeyer., 2004). Además, estímulos apoptóticos (estrés celular, tóxicos, radiaciones, agentes oxidantes, entre otros) pueden activan una segunda vía que se conoce la vía mitocondrial o intrínseca que se encuentra regulada por

proteínas de la familia Bcl-2, donde la mitocondria libera citocromo C y AIF (factor inductor de apoptosis, siglas en inglés) formando así el complejo apoptosoma y activación de caspasas (Bras et al., 2005). Ambas vías se han relacionado a patológicas neurodegenerativas (Haass, 1999; Harada y Sugimoto, 1999; Zhang y cols, 2000). Así mismo, la actividad autofágica se encuentra ligada a enfermedades relacionadas con el envejecimiento y en particular en la enfermedad de Alzheimer (Lockshin y Zakeri, 2004). Se ha propuesto un mecanismo que indica que la presencia continua de vesículas autofágicas en las células, se puede transformar en una fuente interna de A β , pues que estas vesículas pueden contener APP y secretasas que contribuyen a los depósitos de A β en esta patología (Yu et al., 2005). Existe evidencia que sugiere una relación entre autofagia y apoptosis, señalando que las posibles alteraciones en autofagia pueden inducir muerte apoptótica en neuronas afectadas en la enfermedad de Alzheimer (Brunk y Terman, 2002; Tolkovsky et al., 2002), cuando se inhibe la vía de las caspasas (propias de apoptosis), la autofagia se convierte en una vía alternativa de muerte celular (Camins et al., 2008).

Existen varias condiciones de neurodegeneración que inducen y conllevan a la muerte celular, de los cuales se encuentran: la cascada A β , relación con el colesterol, hiperfosforilación de TAU, el estrés oxidativo, la inflamación, procesos de excitotoxicidad y ciclo celular, afectando rutas de señalización implicadas en la muerte celular y progresión del daño. Para este estudio, las condiciones seleccionadas han sido la cascada A β , el estrés oxidativo y la inflamación.

1.5. El péptido A β y su síntesis

El A β tiene su origen en la proteólisis secuencial de la APP (Kang et al., 1987) por el complejo enzimático de las α -, β - y γ -secretasas (Figura 1). La α -secretasa pertenece a la familia de proteínas adamalisina o ADAMs (desintegrinas y metaloproteinasas) que incluyen entre otras la convertasa del factor α de necrosis tumoral (Asai et al., 2003). La β -secretasa es una aspartil proteasa asociadas a membrana, que actúa en el sitio β de la proteína APP (Farzan et al., 2000; Vassar, 2004). La γ -secretasa posee actividad catalítica modulada por los genes PSEN 1 y PSEN 2 (Kimberly et al., 2003).

Una vez se ha sintetizado en el retículo endoplasmático rugoso, la APP pasa al aparato de Golgi, se glicosila y se empaqueta en vesículas de transporte atravesando el citoplasma para finalmente insertarse en la membrana celular y ser procesada por acción del complejo enzimático α -, β - y γ - secretasas, siguiendo dos rutas (LaFerla et al., 2007). La primera ruta, denominada no amiloidogénica, es la ruta predominante del procesamiento de APP y excluye la generación del péptido β -amiloide (Selkoe, 1991). Durante esta ruta la α -secretasa realiza un corte en la proteína APP entre los aminoácidos 687 y 688 correspondientes a los residuos 16 y 17 del péptido A β , generando la secreción del dominio N-terminal, que es una forma truncada de la proteína APP, denominada APP soluble α (sAPP α) (Allinson et al., 2003) que está implicada en la sinaptogénesis (Morimoto et al., 1998) y tiene además una gran importancia en la formación y consolidación de la memoria (Huber et al., 1993; Meziane et al., 1998) así como en el almacenamiento de la

misma (Roch et al.,1994). Por otro lado, el fragmento C-terminal resultante de 83 aminoácidos, denominado C83 ó α -CTF, permanece anclado en la membrana para, seguidamente, ser procesado por la enzima γ - secretasa, cortando entre los aminoácidos 712, 714 ó 715, correspondientes a los residuos 40, 42 ó 43 del péptido A β , generando un pequeño péptido denominado p3 (Haass et al., 1993) y un fragmento intracelular de APP denominado AICD (APP Intracellular Cytoplasmic Domain) ó γ -CTF (Haass et al.,1993) En esta ruta, la acción de la α -secretasa previene la formación del péptido amiloide A β ₁₋₄₂, con lo que se impide la formación de depósitos.

La segunda ruta es la amiloidogénica, durante la cual se genera el péptido A β y de nuevo necesita la acción secuencial de dos proteasas (Haass, 2004). El primer corte es debido a la β -secretasa en el extremo N-terminal de la secuencia del péptido A β , entre los aminoácidos 671 y 672, promoviendo la liberación del fragmento APP soluble β (sAPP β) y la generación de un fragmento C-terminal, anclado en la membrana, de 99 aminoácidos denominado C99 ó β -CTF (Vassar, 2001). Por último, el procesamiento de C99 por el complejo γ -secretasa da lugar al péptido A β y al fragmento γ -CTF (Gandy, 2005). Esta ruta amiloidogénica genera principalmente una especie de 40 aminoácidos denominado A β 40 y una especie de 42 aminoácidos denominado A β 42. De las dos especies, aproximadamente el 90% corresponde a la A β 40 y, a pesar de que ambas especies son neurotóxicas e insolubles, el péptido A β 42 se agrega con mayor facilidad y, por lo tanto, es más proclive a la formación de las placas amiloides (Iwatsubo et al., 1994). Estas placas, que se pueden observar en pacientes con la enfermedad de

Alzheimer, están implicadas en desencadenar una cascada de procesos que conducen a la muerte neuronal masiva (Giulian, 1999).

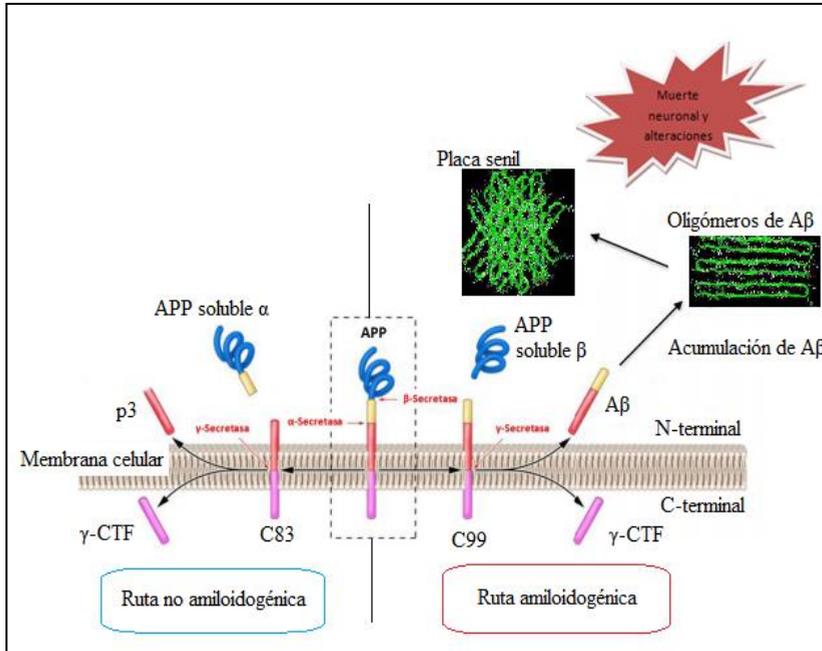


Figura 1. Procesamiento del Aβ por vía no amiloidogénica y amiloidogénica.

Se han descrito dos mecanismos implicados en la muerte neuronal por los depósitos del péptido $A\beta_{1-42}$, la hiperfosforilación de la proteína TAU y la reacción inflamatoria local. La proteína TAU es una proteína microtubular del citoesqueleto neuronal cuya hiperfosforilación provoca su precipitación formando los “ovillos neurofibrilares” (Figura 2) (LaFerla y Oddo, 2005). El $A\beta_{1-42}$ también se puede acumular en el interior de la neurona en forma monomérica para agregarse y convertirse en forma oligomérica lo cual también permiten la hiperfosforilación de la TAU, provocando la pérdida funcional de la mitocondria, y desencadenando la disfunción sináptica

y homeostasis del calcio (Ca^{2+}) (LaFerla et al., 2007). La reacción inflamatoria local implica la participación de los astrocitos y la microglía con la producción y acumulo masivo de citoquinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (Mrak y Griffin., 2005), proceso inflamatorio que puede conducir a alteraciones de la neurotransmisión con pérdida de la sinapsis y muerte neuronal (Wyss-Coray y Muckie, 2002) (Figura 3).

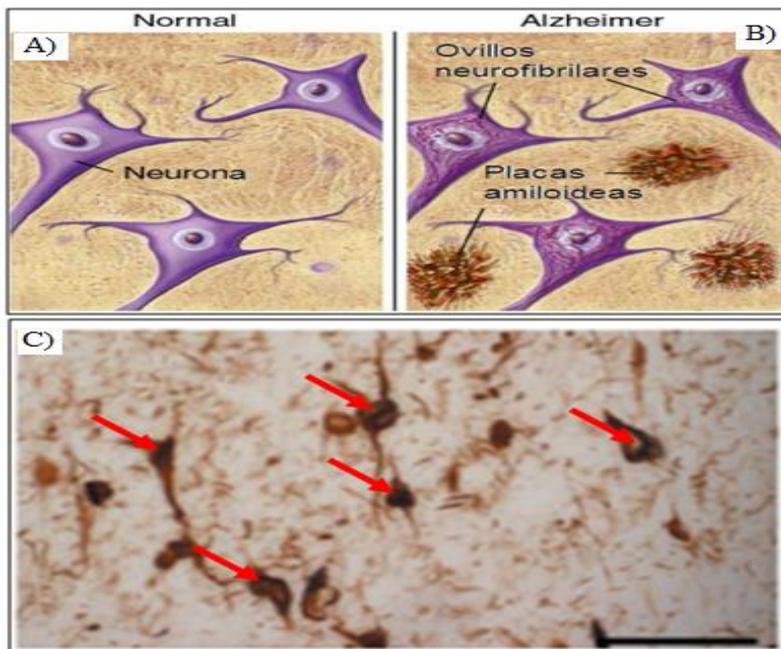


Figura 2. Esquema representativo de A) una neurona normal, B) neurona con ovillos neurofibrilares y C) Microfotografía representativa de ovillos neurofibrilares (flechas) marcados con un anticuerpo específico anti-PHF1, barra de escala 62.5µm (LaFerla y Oddo, 2005).

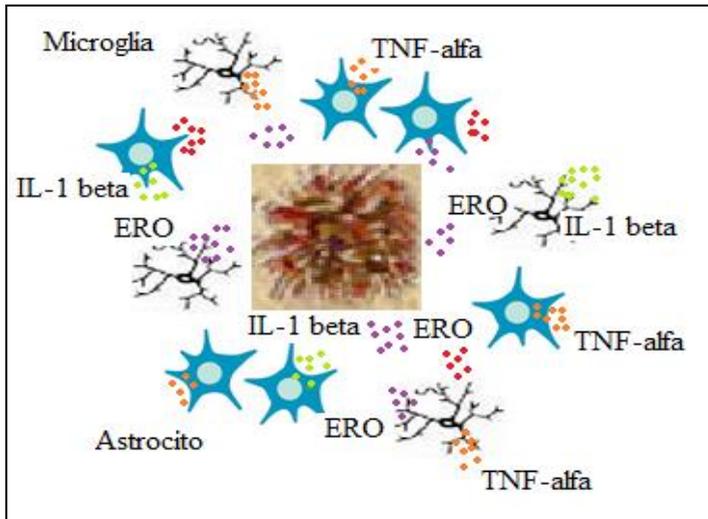


Figura 3. Citoquinas liberadas por astrocitos y microglía asociadas a las placas del péptido β amiloide.

Posiblemente ambos mecanismos actúen simultáneamente por lo que la destrucción neuronal sea debida tanto a la hiperfosforilación de la TAU como a la inflamación inducida por el péptido A β (LaFerla y Oddo, 2005; LaFerla et al., 2007).

1.6. La inflamación inducida en la EA

Diversos estudios neuropatológicos y de diagnóstico por imagen indican que la acumulación del péptido A β_{1-42} es el inductor del proceso inflamatorio y de la activación de las células gliales, procesos que anteceden al daño neuronal presente en la enfermedad de Alzheimer (Eikelenboom y van Gool., 2004; Zhu, X et al., 2004). En una primera fase, la inflamación produce sustancias proinflamatorias que participan en la protección del tejido ya que limitan la supervivencia y la proliferación de agentes tóxicos (Allan y Rothwell.,

2001; Allan y Rothwell., 2003) y por tanto limitan el daño neuronal. Si la reacción no se detiene, en una segunda fase, la respuesta inflamatoria prolongada y exacerbada está mediada por citocinas pro-inflamatorias citotóxicas que contribuyen a la neurodegeneración presente en esta patología (Strohmeier y Rogers, 2001). Estudios epidemiológicos y en modelos experimentales de Alzheimer (Griffin y Mrak., 2002; Sala et al., 2003) se demuestra un incremento de sustancias pro-inflamatorias en cerebro (IL-1 β , el Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β) y COX-2 (Luterman et al., 2000) que promueven el progreso de la enfermedad mientras que el tratamiento con anti-inflamatorios puede disminuir el proceso neurodegenerativo que afecta a estos pacientes (Rogers et al., 1993; McGeer et al., 1996; Dzenko et al., 1997; Hull et al., 1999; Zhang et al., 2013). Estos resultados permiten concluir que la causa del daño neuronal no es la acumulación del A β sino la respuesta inflamatoria que, si bien en un estadio temprano tiene efectos neuroprotectores, su avance hacia la cronicidad posee efectos neurodegenerativos (Wyss-Coray y cols., 2002). En esta segunda fase, las células gliales que rodean las placas amiloides se sobreactivan por exposición al péptido A β_{1-42} induciendo la producción y liberación de moléculas pro-inflamatorias (Hanisch., 2002; Liu y Hong., 2003). Estas moléculas potencian la progresión del daño al aumentar la sensibilidad de las neuronas a los radicales libres (Combs et al., 2001).

En conclusión, el proceso inflamatorio juega un papel destacado en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. En una primera fase la inflamación es beneficiosa porque limita el daño inducido por el tóxico A β_{1-42} . En una segunda fase la respuesta

inflamatoria aumentaría el estrés oxidativo contribuyendo a la neurodegeneración presente en la enfermedad.

1.7. Estrés oxidativo inducido en la EA

Cuando se pierde el equilibrio óxido-reducción se llega a un estado de estrés oxidativo, caracterizado por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ion superóxido (O_2^-), hidroxilo ($OH\bullet$) y óxido nítrico ($NO\bullet$) entre otros) que no puede ser compensado por los sistemas de defensa antioxidante, lo cual conlleva a causar daño y muerte celular. Las consecuencias de este desequilibrio pueden ser leves o crónicas. A nivel agudo, los sistemas antioxidantes pueden restablecer el equilibrio, pero a nivel crónico se producen alteraciones en el metabolismo celular a través de la rotura de moléculas de ADN (Mecocci et al., 1994; Iida et al., 2002), del aumento de calcio intracelular (Yamamoto et al., 2007; Abeti y Duchen., 2012), daño en los transportadores de membrana celular (Martínez et al., 2003; Abeti y Duchen., 2012) y del daño a proteínas y/o peroxidación de lípidos (Jiménez-Jiménez et al., 2006). El que estas alteraciones sean o no reversibles depende del estado oxidativo, de la edad y estado nutricional del individuo y de factores genéticos (Halliwell y Gutteridge., 1999; Jayasena et al., 2013; Zhang et al., 2013; Novo et al., 2013). Este desequilibrio es característico de muchas enfermedades neurodegenerativas (Harman., 1986; Halliwell y Gutteridge., 1999; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013; Costacou et al., 2013) incluida la enfermedad de Alzheimer (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013).

La presencia de moléculas pro-inflamatorias inducidas por $A\beta_{1-42}$ en la enfermedad de Alzheimer estimula la producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres por las células gliales (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Sutherland et al., 2013; Phillips et al., 2013; Gubandru et al., 2013) responsables de la disfunción mitocondrial (Wallace., 2000; Lesnefsky et al., 2001; Chen et al., 2003; Abeti y Duchen., 2012) y de la reducción de los niveles de glutatión (GSH) (Abeti y Duchen., 2012; Johnson et al., 2012).

Los mecanismos más importantes mediante los que el estrés oxidativo produce el daño y muerte celular son, la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y la oxidación de ADN (Halliwell y Gutteridge., 1992; Halliwell., 1992; Reiter., 1995; Jiménez-Jiménez et al., 1996; Jiménez-Jiménez et al., 2006).

En modelos animales de estudio de la enfermedad de Alzheimer, la peroxidación lipídica precede a la formación de las placas amiloides (Pratico et al., 2001). En humanos, la mayoría de estudios demuestran que marcadores de peroxidación lipídica como las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúico (TBARS) y malonil-dialdehído (MDA) (Palmer y Burns., 1994; Lovell et al., 1995; Marcus et al., 1998; Karelson et al., 2001; Dei et al., 2002; Yu et al., 2003; Subbarao et al., 2009), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Sayre et al., 1997; Markesbery y Lovel., 1998; Gotz et al., 2002) y algunos isoprostanos (Pratico et al., 1998) se encuentran aumentados en los pacientes de Alzheimer, especialmente en el córtex temporal e hipocampo. En cultivos celulares, algunos de estos productos son capaces de modificar la estructura de la apolipoproteína E3 (apoE3) y

alterar su metabolismo (Montine et al., 1996). En estos pacientes también se ha descrito la acumulación de proteínas oxidadas (Carney et al 1994), aumentos significativos de marcadores biológicos como el contenido de proteínas carbonilo fenilhidracina -reactiva, actividad de la glutamina sintetasa (GS) y creatina quinasa (CK) (Hensley et al., 1995), carbonil-reductasa (Balcz et al., 2001) y productos finales de glicación de proteínas (Shuvaev et al., 2001) capaces de aumentar la peroxidación lipídica (Gasic-Milenkovic et al., 2003). Diversas áreas del cerebro también presentan daño en el ADN por aumento de oxidación, que se ha correlacionado con los estadios iniciales de la enfermedad (Lyras et al., 1997; Gabbitta et al., 1998; Nunomura et al., 2001; Iida et al., 2002). Aumenta la expresión de genes ERCC-80 y 89 relacionados con la actividad reparadora del ADN (Love et al., 1999), lo cual puede ser una respuesta al daño oxidativo (Hermon et al., 1998).

En conjunto estos resultados indican que el estrés oxidativo posee un papel fundamental en el desarrollo y evolución de la enfermedad de Alzheimer.

1.8. Tratamientos para la Enfermedad de Alzheimer

Tanto el estrés oxidativo como la inflamación son mecanismos desencadenantes de la patología de esta enfermedad por lo que tanto su estudio como sus posibles interacciones, pueden contribuir al desarrollo de nuevas terapias farmacológicas en el tratamiento del Alzheimer. Desde el punto de vista no farmacológico, diversas estrategias se han considerado beneficiosas en cuanto a la mejora del bienestar y calidad de vida de los pacientes (Olazarán et

al., 2004; Guetin et al., 2009; Ramesh et al., 2010; Fang., 2011; de Sant'Anna y Morat., 2013). Maniobras como la musicoterapia, fisioterapia, psicomotricidad, cuidados básicos, terapia ocupacional, laboraterapia, terapia con animales y la psicoestimulación cognitiva se consideran herramientas muy útiles encaminadas a ejercitar y reforzar capacidades cognitivas que todavía preserva el paciente de Alzheimer sin pretender recuperar las que ya se han perdido (Olazarán et al., 2004; Guetin et al., 2009; de Sant'Anna y Morat., 2013).

En la actualidad, no existe una cura para la enfermedad de Alzheimer. La terapéutica farmacológica se dirige a retrasar y controlar sus síntomas para mejorar el bienestar y calidad de vida del paciente. La tabla 1 recoge los distintos tratamientos farmacológicos utilizados en la actualidad y aprobados por la FDA (U.S Food and Drug Administration, U.S Department of Health and Human Services, www.fda.gov), que se ha hecho extensiva a los países de nuestro entorno (Agencia Europea de Medicamentos, EMA, www.ema.europa.eu) incluido el nuestro (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS, www.aemps.gob.es).

Debido a los efectos secundarios que presentan estos medicamentos, desde hace varios años se vienen desarrollado líneas de investigación para el estudio de los diferentes efectos (neuroprotectores, antioxidantes y antiinflamatorios) de compuestos naturales basados en la acción de fitonutrientes sobre diferentes vías de señalización asociadas a la inflamación y al estrés oxidativo.

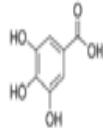
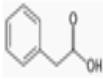
MEDICAMENTO	PRINCIPIO ACTIVO	INDICACIONES	EFECTOS SECUNDARIOS	REFERENCIA
Namenda ® (Memantina)	Antagonista del N-metil-D-aspartato (NMDA)	Tratamiento de síntomas de grado moderado a severo	Mareo, cefaleas, estreñimiento, confusión	Savić y Mimica (2013) Sinfonani et al (2012)
Razadyne ® (Galantamina)	Inhibidor de colinesterasa	Tratamiento de síntomas de grado leve a moderado	Náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso, pérdida de apetito	Francis et al (2010) Corbo et al (2013)
Exelon ® (Rivastigmina)	Inhibidor de colinesterasa	Tratamiento de síntomas de grado leve a moderado	Náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso, pérdida de apetito, debilidad muscular	Buks et al (2009) Lee y Sevigny (2011)
Aricept ® (Donepezilo)	Inhibidor de colinesterasa	Tratamiento de síntomas de grado leve a moderado	Náuseas, vómitos, diarrea	Arnes et al (2008) López-Pousa et al (2007) Yatabe et al (2013)

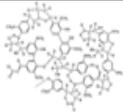
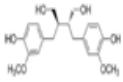
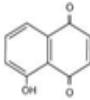
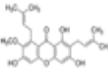
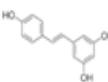
Tabla 1. Medicamentos aprobados por la FDA, EMA y AEMPS para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Los polifenoles son compuestos heterogéneos de origen vegetal cuya característica principal es la presencia de dos o más anillos fenólicos en su estructura (Asensi et al., 2011). Se sintetizan bien por la vía del ácido shikímico (Romeo et al., 2000) o bien por la vía del ácido acético (Harbone., 1989).

La tabla 2 recoge la clasificación de los polifenoles según su estructura química (Harbone., 1989). La presencia y disposición de

grupos hidroxilo y metilo les confiere propiedades químicas diferentes (Quideau et al., 2011). Los polifenoles forman conjugados con uno o más residuos de azúcar, ácido carboxílico, aminas, lípidos e incluso con otros fenoles (Ferrer Pastor., 2008).

NOMBRE	ESTRUCTURA	FIGURA	EJEMPLOS	FUENTES
Fenoles simples	C ₆		Catecol Guayacol Floroglucinol	Aceite de argán, aceites esenciales del té, tomillo (revisado de internet)
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁		Ácido gálico Ácido cafeico Ácido ferúlico	Castañas (Do Carmo Barbosa Mendes De Vasconcelos et al., 2007) Vino tinto (Burns et al., 2000)
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂		Auxina (fitohormonas)	Principalmente en frutas (Wightman et al., 1982)
Fenil- propanoides	C ₆ -C ₃			

	Ligninas (C ₆ -C ₃) ₂		Organismos del reino Plantae	Frutos secos, semillas de lino (Peñalvo et al., 2005)
	Lignanós (C ₆ -C ₃) _n		Secoisolariciresinol Matairesinol Lariciresinol	
Nafto- quinonas	C ₆ -C ₄		Vitamina K	Hortalizas de hoja verde (col, espinaca, hojas de nabos, acelgas, hojas de mostaza, perejil, lechuga Verduras (brócoli, coliflor y repollo) (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board., 2001) (Sarubin y Thomson., 2007)
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆		Mangostin	Mangostán (Walker, 2007)Mango (Sulaiman y Ooi, 2012)
Estilbenos y antra- quinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆		Resveratrol	Vino tinto (Vitrac et al., 2005)Cacahuete (Chukwumah et al., 2007)
Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆			

	Flavonoles		Kaempferol Quercetina Miricetina Cisteína	Kale, Cebolla, Ginseng (Justesen et al, 1998; Manach et al, 2004)
	Flavonas		Apigenina Luteolina Diosmetina	Perejil, apio, Capsicum (Justesen et al, 1998; Manach et al., 2004)
	Flavanonas		Naringenina Hesperidina	Cítricos (Justesen et al, 1998; Manach et al., 2004)
	Isoflavonas		Genisteína Daidzein Gliciteína	Soja, miso, Tofu, Tempeh (Manach et al., 2004)
	Antocianidinas		Malvidina Cianidina Pelargonidina	Cereza, Ruibarbo, Fresa (Manach et al., 2004)

Tabla 2. Clasificación de los polifenoles según su estructura química

La fuente principal de polifenoles se encuentra en: uvas/vino, aceite de oliva, soja, nueces, granadas, bayas, té, chocolate/cacao, entre otras frutas y verduras. Los niveles de polifenoles varían dependiendo de la especie, de la variedad y de la calidad de los cultivos (Bravo., 1998; Scalbert y Williamson., 2000).

En los alimentos, los polifenoles se encuentran principalmente en su forma glicosilada. Su biodisponibilidad depende del grado de

absorción y eliminación que vienen determinados por su estructura química. La absorción se realiza en el intestino delgado y se relaciona con el grado de glicosilación (Day et al., 2000), acilación (poco importante) y esterificación (Nemeth et al., 2003; D'Archivio et al., 2010) alcanzado. Ácido gálico e isoflavonas son los que presentan un mayor índice de absorción (Manach et al., 2004). Una vez absorbidos, forma conjugados por metilación, sulfatación, glucuronización o combinación entre ellos (Piskula y Terao., 1998; Spenser et al., 1999, Erlund et al., 1999; Watson y Oliveira., 1999) para facilitar su eliminación. Los polifenoles que no fueron absorbidos llegan al colon donde son metabolizados por la flora bacteriana que contiene esterasas y se absorben por la circulación enterohepática. La eliminación se realiza por vía urinaria y biliar. La cantidad total de metabolitos eliminados pueden correlacionarse con la máxima concentración en plasma. Las concentraciones en orina alrededor de 0,5-6% para algunas catequinas del té, 2-10% para catequinas del vino y hasta un 30% para epicatequina del cacao (Muñoz Jáuregui., 2013).

Además de sus efectos beneficiosos debidos a sus propiedades antioxidantes (Dai y Mumper., 2010), también se han descrito efectos beneficiosos cardiovasculares (Broskova y cols., 2012; Simonyi et al., 2005, Leacour y Lamont., 2011), metabólicos (Williamson., 2013), anticancerígenos (Baliga y Katiyar., 2006; Asensi et al., 2011; McCormack y McFadden., 2012); y anti-inflamatorios (Hoensch y Oertel., 2012). Estas propiedades confieren a los polifenoles un alto potencial terapéutico en el tratamiento de diversas patologías incluida la enfermedad de Alzheimer (Ramassamy., 2006; Simonyi et al., 2010; Choi et al, 2012). Se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in*

vivo que los polifenoles tienen actividad anti-inflamatoria (Santangelo et al., 2007) mediante la modulación de la expresión de genes pro-inflamatorios como la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la óxido nítrico sintasa y varias citoquinas, actuando principalmente por la vía de NFκB y la proteína quinasa activada por mitógenos (Xie et al., 1993; Ahmed et al., 2002; Capirolla et al., 2012; Khan et al., 2006; Santangelo et al., 2007). En estudios con un modelo transgénico para la enfermedad de Alzheimer, el tratamiento con polifenoles reducía de manera significativa la microgliosis y los depósitos del Aβ₁₋₄₂, y mejoraba el comportamiento. Ambos parámetros correlacionan con la disminución de los niveles de NFκB (Rojanathammanee et al., 2013). También pueden modular las vías de señalización de muerte celular programada, al inhibir significativamente la activación de la caspasa-3 y modular las proteínas quinasas activadas por mitógenos conocidos por jugar un papel importante en la apoptosis neuronal (Bastianetto et al., 2011). Cerebros de pacientes de Alzheimer presentan valores elevados de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β y TNF-α responsables de la activación microglial (Mrak y Griffin., 2005) y del incremento del estrés oxidativo (Jayasena et al., 2013). Además, varios genes inflamatorios se asocian con un mayor riesgo de padecer esta patología.

Se ha relacionado la reducción de niveles de estrógenos y enzimas antioxidantes con aumento de estrés oxidativo sobre la incidencia de la enfermedad de Alzheimer (Grimm A et al., 2012), siendo mayor en mujeres que en hombres (Andersen K et al., 1999; Di Carlo et al., 2002; Henderson., 2013), lo cual apoyan la idea de que compuestos estrogénicos ya sea estradiol endógeno o fitoestrógenos como la genisteína pueden aumentar la expresión de enzimas

antioxidantes, que conduce a la disminución de estrés oxidativo y protección contra la toxicidad del péptido β -amiloide (Viña et al., 2007).

En los años 90, varios estudios divulgaron, que la terapia de reemplazo con estrógenos, podía reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en las mujeres posmenopáusicas (Ohkura et al., 1994; Asthana et al., 1999; Shaywitz et al., 2003; Canderelli et al., 2007; Valen-Sendstad et al., 2010). El estrógeno regula varios sistemas de neurotransmisores, incluyendo los sistemas colinérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos, que tienen cambios degenerativos en los pacientes con Alzheimer (Craig y Murphy., 2009). También, los estrógenos como el estradiol, puede ejercer varios efectos neuroprotectores en el cerebro, incluyendo inhibición de la formación de $A\beta_{1-42}$ (Yue et al., 2005; Morinaga et al., 2007; Morinaga et al., 2011) y acelerar la degradación de $A\beta_{1-42}$ (Merlo y Sortino., 2012), la hiperfosforilación de TAU (Álvarez-de-la-Rosa et al., 2005), disminución de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, daño celular y protección de las neuronas contra las moléculas inflamatorias, inducidas por la reacción crónica inflamatoria (Simpkins et al., 2009). Sin embargo, se demostraron unos efectos proliferativos con la administración continua de estrógenos, que podrían incrementar el riesgo de ciertos tipos de tumores sensibles a determinadas hormonas, (Mulnard et al., 2000) como el cáncer de mama y de endometrio, lo cual comprometió la aplicación de la terapia de reemplazo y puso en peligro la aplicación clínica de los estrógenos (Chlebowski et al., 2010). Actualmente, continúa el uso de estrógenos (naturales, semi-sintéticos y sintéticos), solo o en

combinación con otros tratamientos en relación a la patología, ya que son compuestos con importantes aplicaciones terapéuticas por sus diversos efectos y sitios de acción. Su administración puede ser por vía intramuscular, transdérmica, crema, óvulos, entre otros. Sin embargo, estos compuestos siguen presentando efectos adversos a corto y largo plazo como náusea, vómito, jaqueca, retención de líquidos, trombo-embolismo venoso, embolia pulmonar y en mujeres en edad fértil puede producir infertilidad, puesto que dependiendo de la estructura química, propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, el efecto tejido-específico y la interacción con otras moléculas independientes del receptor específico de estrógenos, genera respuestas en otros tejidos diferentes a los reproductivos (Jaimez Melgoza., 2013). Los efectos adversos de las terapias de reemplazo hormonal sobre la incidencia de la cognición y la demencia con el apoyo del estudio “Women's Health Initiative Memory Study” advirtió sobre la aplicación de las terapias de reemplazo hormonal en la enfermedad de Alzheimer (Espeland et al., 2004; Shumaker et al., 2004).

Debido a lo anteriormente expuesto, la búsqueda de sustitutos estrogénicos eficaces y seguros se convirtió en una cuestión práctica y se planteó el uso de fitoestrógenos. Estrógenos procedentes de plantas, tales como la genisteína, principal polifenol de la soja, se convirtieron en posibles alternativas a los estrógenos, ya que tiene efectos farmacológicos no hormonales (Bang et al., 2004). La genisteína concretamente tiene la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos humanos (Setchell., 2001), siendo su mayor afinidad por ER- β que por el ER- α (Kuiper., 1998). En estudios con cultivos

celulares pre-tratados con genisteína, se inhibe el efecto neurotóxico inducido por $A\beta_{1-42}$, al disminuir los niveles de estrés oxidativo (Vallés et al., 2008) aumentando la expresión de enzimas antioxidantes (Viña et al., 2007) y los niveles de glutatión (Ma et al., 2010; Gamba et al., 2011; Ding et al., 2011). Esto se traduce en una disminución de estrés oxidativo y protección contra la toxicidad del péptido $A\beta_{1-42}$. Estudios *in vitro* realizado por Dang et al (2003) demostraron que la genisteína actuaba como agonista de receptores PPAR- γ . Estudios previos realizados por Vallés et al., corroboró la activación de estos receptores en astrocitos pre-tratados con genisteína y estradiol (Vallés et al., 2010).

El tratamiento con terapia anti-inflamatoria posee efectos beneficiosos en estos pacientes (Johnston et al., 2011) por lo que el tratamiento con polifenoles, podría producir efectos beneficiosos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

1.9. Los cannabinoides

Los cannabinoides son compuestos orgánicos de estructura carboxílica con 21 átomos de C. Pertenecen al grupo de los terpenofenoles y son los responsables de los efectos farmacológicos de la planta de cannabis. Suelen presentar una estructura química compuesta por tres anillos de los cuales el central suele ser un tetrahidropirano (Figura 4).

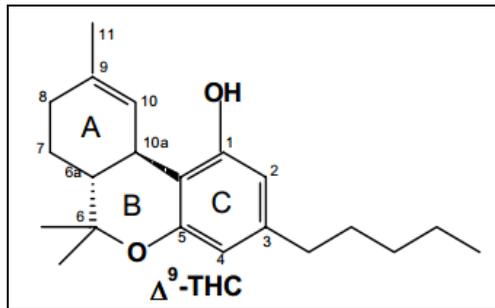


Figura 4. Estructura química de Δ^9 -THC.

Los cannabinoides se clasifican en: **1. Fitocannabinoides:** cannabinoides procedentes de la planta del cannabis, los cuales se encuentran mayoritariamente: Δ^9 -THC, cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN), entre otros (Gaoni y Mechoulam, 1964; Zuardi et al., 1982; Condie et al., 1996). **2. Endocannabinoides:** cannabinoides naturales en el cuerpo humano, como son: N-araquidonil-etanolamida (AEA) y 2- araquidonil-glicerol (2-AG), entre otros (Mechoulam et al., 1996; Mechoulam et al., 1995; Hanus., 2009). **3. Cannabinoides sintéticos:** cannabinoides con estructura química diferente o similar al del Δ^9 -THC con afinidad a los receptores cannabinoides (Pertwee., 1997; Pertwee., 1999; Tramèr et al., 2001; Hanus et al., 1999).

El cannabinoide más activo es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC). Fue aislado en los años 60 de la *Cannabis sativa* y es el responsable de sus acciones psicoactivas (Gaoni y Mechoulam, 1964). Se metaboliza en el hígado por oxidación a 11-hidroxi- Δ^9 -THC (11-OH- Δ^9 -THC), metabolito mucho más activo capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Huestis et al., 1996). Los demás

cannabinoides presentes en la planta son menos activos pero pueden interactuar con el Δ^9 -THC modificando su potencia psicoactiva. Producen sus efectos a través de la unión con receptores específicos (CB) ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y en diversos tejidos (Devane et al., 1988).

La administración por vía oral alcanza niveles plasmáticos bajos ya que la biodisponibilidad de los cannabinoides se ve reducida por la acidez de los jugos gástricos, metabolismo hepático e intestinal y por el acceso a la circulación enterohepática (Garret, Gouyette y Roseboom, 1978; Agurell et al., 1986). Para evitar este efecto de primer paso, se utiliza la vía inhalatoria (Wilson et al., 2002) y la rectal (ElSohly., 2003). Se distribuyen en plasma unido un 60% a proteínas plasmáticas (Widman et al., 1974). Por su alta lipofilia, el 70% se almacena en tejidos y el resto se metaboliza principalmente en hígado (Burstein et al., 1994). Los productos resultantes del metabolismo de los cannabinoides son eliminados en forma de ácidos libres o conjugados con ácido glucurónico (Agurell et al., 1986) por heces (68%) y orina (12%).

Los cannabinoides ejercen su acción mediante el acoplamiento con receptores específicos de membrana. Se han clonado dos tipos de receptores, CB1 y CB2 (Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Comparten un 44% de homología de secuencia y ambos poseen un dominio amino-terminal extracelular, un dominio carboxi-terminal intracelular y siete dominios transmembrana (Figura 5).

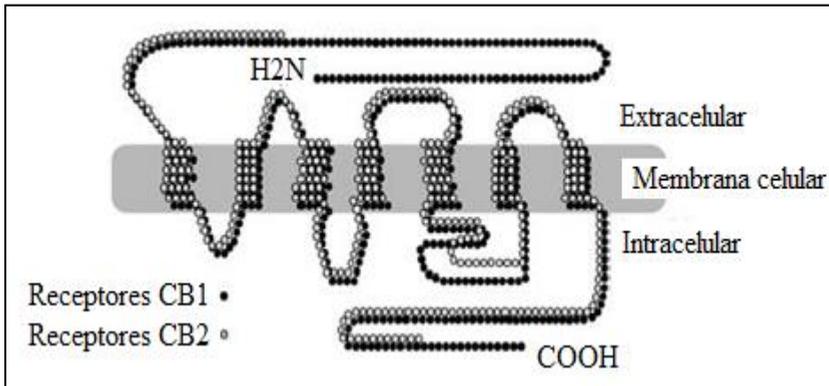


Figura 5. Estructura de los receptores CB1 y CB2.

Los receptores CB1 se expresan en el sistema nervioso central (Herkenham et al., 1991; Matsuda et al., 1993), mientras que los receptores CB2 se localizan fundamentalmente en bazo, amígdalas y en distintas células del sistema inmunitario (Galiegue et al., 1995; Schatz et al., 1997). Se han postulado otros posibles receptores cannabinoides, GPR55 (Ryberg et al., 2007), abnormal-cannabidiol (Mo et al., 2004), TPRV1 (Cristino et al., 2006) y PPARs (Stienstra et al., 2007) cuya activación mediaría efectos específicos sobre la transmisión sináptica, el sistema vascular y el sistema inmune.

El receptor CB1 se caracterizó en cerebro de rata por métodos radiométricos (Devane et al., 1988). Este receptor se clonó en 1990 a partir de ADN complementario (ADNc) de corteza cerebral de cerebro de rata (Matsuda et al., 1990). En 1991 se caracterizó en el ser humano en el tronco cerebral (Gerard et al., 1991).

El receptor CB1, se expresa fundamentalmente en neuronas de cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico de mamíferos, donde se le atribuye una papel importante en la modulación de la liberación de distintos neurotransmisores. También se ha demostrado su expresión en células inmunes, glándulas adrenal y pituitaria, corazón, pulmón y partes del tracto gastrointestinal, urinario y reproductivo (Howlett et al., 2002), adipocitos (Cota et al., 2003), hígado (Osei-Hyiaman et al., 2005) y células parietales de estómago (Pazos et al., 2008).

Los efectos de los cannabinoides sobre el sistema nervioso central están vinculados a la distribución de los receptores CB1. Estudios autorradiográficos e inmunohistoquímicos en cerebro de rata (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998) indican una mayor densidad de receptores en áreas vinculadas con la actividad motora (ganglios basales), la capacidad cognitiva (hipocampo) y la coordinación motora (cerebelo).

En humanos esta distribución se mantiene, con la diferencia de que el receptor CB1 tiene mayor expresión en la corteza límbica que en las regiones motoras y sensoriales, lo que supone que el receptor CB1 tiene un papel importante en el procesamiento de información motivacional y cognitiva (Glass et al., 1997).

La expresión de este receptor es principalmente de tipo presináptica en los axones y terminales nerviosos, donde puede funcionar como mediador en la inhibición y la liberación de

neurotransmisores, también se puede expresar en las dendritas y soma de neuronas (Howlett et al., 2002).

Los niveles de expresión de este receptor en las células gliales son inferiores, aunque también están presentes en los astrocitos (Stella, 2004), los oligodendrocitos (Molina-Holgado y cols., 2002) y progenitores neurales (Aguado et al., 2005). Sólo se describe la expresión de este receptor en microglía en estudios *in vitro* (Cabral et al., 2001; Facchinetti et al., 2003; Carrier et al., 2004). La activación de los receptores CB1 se relaciona con sus efectos anticonvulsivos (Citraro et al., 2013) y euforizantes (Huestis et al., 2001). En 1993 este receptor se clonó en muestras humanas (Munro y cols., 1993) y posteriormente en ratón (Shire et al., 1996) y rata (Griffin et al., 2000; Brown et al., 2002).

El receptor CB2, se expresa principalmente en las células del sistema inmune y hematopoyético. Los niveles más altos de ARN mensajero (ARNm) del receptor CB2 se encuentran en linfocitos B, monocitos, neutrófilos, linfocitos T8 y T4 (Galiegue y cols., 1995). Además se ha descrito su presencia en cerebelo, concretamente en las células granulares y de Purkinje (Skaper et al., 1996); en progenitores neurales (Palazuelos et al., 2006) y en el sistema nervioso periférico, en neuronas sensoriales (Ross et al., 2001) y en neuronas del tallo cerebral, donde podría modular la emesis (Van Sickle et al., 2005). Es posible que este receptor aumente su distribución en procesos patológicos relacionados con procesos inflamatorios como Alzheimer y esclerosis múltiple (Wotherspoon et al., 2005; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006). En cultivos celulares, el CB2 también se expresa

en astrocitos (Sheng et al., 2005), oligodendrocitos (Molina-Holgado et al., 2002) y microglía (Stella, 2004; Cabral y Marciano-Cabral, 2005). En un cerebro sano se identifica el CB2 en la microglía perivascular (Núñez et al., 2004) mientras que en procesos inflamatorios del SNC su expresión es significativamente superior (Benito et al., 2003; Maresz et al., 2005; Núñez et al., 2008).

El descubrimiento de los receptores cannabinoides, dio lugar a la búsqueda de ligandos endógenos denominados endocannabinoides. (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995). Son compuestos endógenos capaces de ser sintetizados y liberados según “demanda”, en respuesta a estímulos psicológicos o patológicos (Felder et al., 1996; Schmid et al., 1997; Walter et al., 2003; Pertwee., 2004). Posteriormente son recaptados y degradados por enzimas en el interior de la célula (Pacher et al., 2006; Sugiura et al., 2006). Son derivados del ácido araquidónico y los más relevantes son la N-araquidonil-etanolamida (AEA) y el 2-Araquidonil glicerol (2-AG). De menor importancia son: 2-araquidonilglicerol éter (Noladin éter), O-araquidonil etanolamina (Virodamina), N-araquidonil-dopamina (NADA) y N-araquidonil-L-serina (ARA-S).

Como hemos comentado anteriormente, los fitocannabinoides son productos naturales derivados de la *Cannabis sativa* y el cannabinoide más activo es el THC. Desde el aislamiento y caracterización de los cannabinoides naturales, se han desarrollado análogos sintéticos que carezcan de los efectos psicoactivos indeseables y que mantengan las características farmacológicas de interés. Actúan como agonistas de los receptores cannabinoides y su

desarrollo ha sido de gran utilidad para el conocimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares de los cannabinoides. Destacan los derivados de los fitocannabinoides que mantienen la estructura de dibenzopirano y son ligandos para ambos receptores (CB₁ y CB₂) (Palmer et al., 2002; Pacher et al., 2006). Nabilona (Cesamet®) y dronabinol (Marinol®) se usan para controlar las náuseas y vómitos producidos por la quimioterapia (Ben Amar, 2006) y para prevenir la pérdida de peso en pacientes con SIDA (Beal et al., 1995). El ácido ajulémico es un potente anti-inflamatorio y analgésico, sin efectos psicoactivos o sobre el comportamiento (Vann et al., 2007).

Otro grupo de fármacos sintéticos lo constituyen los eicosanoides, compuestos derivados de la estructura de los endocannabinoides pero más estables enzimáticamente (Hollett et al., 2002; Wiley et al., 1998; Parkkari et al., 2006; Di Marzo et al., 2001; Di Marzo et al., 2002; Appendino et al., 2006). Entre ellos, los agonistas selectivos de CB₁ como la metanandamida (AM356), araquidonil-2 cloroetilamida (ACEA), araquidonil ciclopropilamida (ACPA) podrían tener aplicaciones en el tratamiento de la inflamación. Diversos agonistas híbridos CB₁/TPRV₁, O-1861 y arvanil (Di Marzo et al., 2001; Di Marzo y cols., 2002), y CB₂/TPRV₁, PhAR (Appendino et al., 2006) se están estudiando por sus acciones neuroconductuales.

El tercer grupo lo forman los aminoalquilindoles, análogos derivados de la pravadolina, que mimetizaban los efectos farmacológicos de los cannabinoides. (Bell et al., 1991; D'Ambra et

al., 1992). El principal representante es el **WIN 55, 212-2**, el cual es un agonista para ambos receptores (CB1 y CB2) (Palmer et al., 2002). También existen agonistas específicos para CB2 como JWH-015, L-768242, AM124, GW405833 y GW842166X, que poseen efectos beneficiosos en modelos experimentales de inflamación y analgesia *in vitro* e *in vivo* (Howlett et al., 2002; Nackley et al., 2003).

Debido a la amplia distribución de los receptores cannabinoides, sus efectos están ampliamente distribuidos tanto a nivel del sistema nervioso como sobre otros aparatos y sistemas.

A nivel neuropsiquiátrico, la administración de cannabinoides produce euforia, relajación, aumento de la sociabilidad y potenciación de las percepciones sensoriales y creativas. Otros efectos que también se presentan son la alteración en la percepción del tiempo, alucinaciones, psicosis, despersonalización, fragmentación del pensamiento y ansiedad. Estos últimos efectos se presentan principalmente por el consumo de altas dosis de cannabinoides (Ashton., 1999). La vía de administración no altera estos efectos, pero sí su aparición, intensidad y duración (Perez-Reyes., 1982).

Sobre la memoria, los cannabinoides alteran la memoria a corto plazo (Dewey., 1986; Kirby et al., 1995) y este efecto se ha relacionado por la alta concentración de receptores CB1 en el hipocampo, pero este efecto pueden ser reversible (Reibaud et al., 1999; Marsiciano., 2002).

La actividad motora se ve afectada por los cannabinoides, ya que son inhibidores de la transmisión y de la coordinación a través de

su acción sobre los ganglios basales y el cerebelo donde hay una gran cantidad de receptores CB1 (Pertwee y Wickens., 1991; Ramaekers et al., 2004).

Otro efecto de la administración de cannabinoides, es la hiperfagia vinculado con la cantidad de receptores CB1 en los núcleos paraventricular y ventromedial del hipotálamo, áreas cerebrales implicadas en la regulación del apetito (Cuerda et al., 1998; Williams y Kirkham., 1999; Fernández-Ruiz et al., 2000; Di Marzo et al., 2001; Rodríguez de Fonseca et al., 2001; Gomez et al., 2002). En un estudio con ratas neonatas tratadas con el antagonista de receptores CB1 (SR141716A) se produjo la inhibición de la ingesta, pero la administración de THC revirtió este efecto (Fride et al., 2001). Así mismo se ha identificado receptores CB1 en el núcleo del tracto solitario en el sistema nervioso central que se localiza en el tronco cerebral el cual se encuentra implicado con la regulación de la emesis. Estudios con modelos experimentales con animales se demuestra que la administración de cannabinoides inhibe el vómito por acción de los receptores CB1 en el tronco cerebral (1995; Parker et al; Van Sickle et al., 2001; Parker et al., 2003; Kwiatkowska et al., 2004).

Uno de los efectos mejor caracterizados de la administración de cannabinoides es la analgesia, el cual está mediado por los receptores CB1 en el sistema nervioso central y ambos receptores (CB1 y CB2) en el sistema nervioso periférico. En la medula espinal el sistema cannabinoide interactúa con el sistema opioide en la modulación de la percepción del dolor (Pertwee., 2001). Así mismo la administración de cannabinoides ha mostrado efecto anti-inflamatorio y analgésico en modelos de inflamación aguda en ratas por la

reducción de las concentraciones de prostaglandinas E₂, la ciclooxigenasa, de óxido nítrico y producción de radicales libres durante el proceso inflamatorio (Pertwee., 1999).

La administración de cannabinoides presenta efectos neuroprotectores al inhibir la entrada en Ca²⁺ por la sobreactivación de receptores NMDA en modelos animales de neurotoxicidad (Ramos Atance y Fernández Ruiz., 2000).

Así mismo la administración de cannabinoides interactúa con los sistemas dopaminérgico y opioide reforzando los mecanismos de recompensa que se vinculan con el núcleo accumbens (Vlachou y Panagis., 2013).

A nivel cardiovascular, la administración de cannabinoides, produce taquicardia y aumentar el volumen cardiaco de expulsión y demanda de oxígeno. Puede incrementar la frecuencia cardiaca y el flujo sanguíneo (Hollister., 1986). También causa vasodilatación dependiente del endotelio sobre arterias aisladas. Protege contra el daño generado por altas concentraciones de glucosa, inflamación o diabetes tipo 2 en modelos animales. El estudios *in vivo* el tratamiento de cannabinoides en corazón aislado protege contra el daño de isquemia-reperfusión y contra la miocardiopatía asociada con la diabetes. En la sangre, influye en la supervivencia y muerte de células blancas, migración y agregación plaquetaria. Todos estos resultados parecen apoyar la idea de los efectos beneficiosos con el tratamiento de cannabinoides sobre eventos y enfermedades cardiovasculares, pero es necesario seguir investigando sobre esta hipótesis y establecer los mecanismos de acción (Stanley et al., 2013).

A nivel ocular, la administración de cannabinoides, produce la disminución de la presión intraocular, la conoce de la presencia de receptores CB1 en la cámara anterior del ojo, retina y epitelio corneal (Nucci et al., 2008; Pinar-Sueiro et al., 2011).

Sobre el sistema reproductor en humanos, sobre la fertilidad masculina, la inducción de ginecomastia (Aliapoulios y Harmon., 1972), disminución de los niveles de testosterona (Kolodny et al., 1974, disminución de la espermatogénesis y la motilidad (oligospermia) (Kolodny et al., 1974; Hembree et al., 1978; Hong et al., 1982), disminución de la hormona luteinizante (Kolodny et al., 1974; Cone et al., 1986; Vescovi et al., 1992), inducción de anomalías en el esperma (Issidorides., 1978), bloqueo de la reacción del acrosoma (Whan et al., 2006). Sobre la fertilidad femenina, inducción de anomalías en el feto y parto prematuro (Persaud y Ellington., 1967; Fried et al., 1984; Hatch y Bracken., 1986; Day et al., 1991; Sherwood et al., 1999), interrupción del ciclo menstrual (Bauman., 1980), inhibición de la secreción de prolactina (Bauman., 1980; Mendelson et al., 1985), mayor dificultad en el parto (Groenlandia et al., 1982; 1983), supresión o aumento de los niveles de hormona luteinizante en etapa específica menstrual (Mendelson y Mello., 1984; Mendelson et al., 1986), restricción del crecimiento fetal intrauterino (Qazi et al., 1985; Frank et al., 1990) y baja inducción en la tasa de recuperación de los ovocitos en el tratamiento de fertilización *in vitro* (Klonoff - Cohen et al., 2006).

Algunos estudios *in vitro* sobre la proliferación celular muestran que altas dosis de cannabinoides pueden inhibir la síntesis de ADN, ARN y proteínas y pueden modificar el ciclo celular (Ramos y

Fernández., 2000). También ha mostrado efectos antineoplásicos en modelos animales de tumores cerebrales (gliomas) y cutáneos en ratas (Massi et al., 2004; Galve-Roperh et al., 2000).

La expresión y distribución de CB1 es particularmente alta en cerebro (neuronas y células gliales) mientras que CB2 es principalmente en las células microgliales, las células inmunes del cerebro (Howlett et al., 2002; Stella., 2004; Walter y Stella., 2004; Stella., 2010).

Se han propuesto los cannabinoides como tratamiento preventivo para la enfermedad de Alzheimer (Ramírez et al., 2005; Campbell y Gowran., 2007) por sus efectos neuroprotectores (Mechoulam et al., 2002; van der Stelt et al., 2002) y anti-inflamatorios (Walter y Stella., 2004; Klein., 2005; Correa et al., 2009). En cultivos celulares de microglía, estos compuestos son capaces de disminuir la liberación de citoquinas y óxido nítrico inducida por A β (Ramírez et al., 2005; Ehrhart et al., 2005; Esposito et al., 2007).

Estudios *in vitro*, muestran los efectos neuroprotectores de los cannabinoides frente al péptido A β reduciendo los niveles de estrés oxidativo, inhibiendo la apoptosis (Iuvone et al., 2004) y la hiperfosforilación de TAU (Esposito et al., 2006).

En ensayos *in vivo*, el tratamiento con el cannabinoide sintético WIN 55, 212-2, impidió el deterioro cognitivo, la activación glial y la pérdida neuronal en ratas tratadas con el péptido A β

(Ramírez et al., 2005; Martín-Moreno et al., 2011). Además disminuye los niveles de COX-2 y TNF- α (Martín-Moreno et al., 2012).

Datos preclínicos sugieren el uso de medicamentos a base de cannabinoides para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Dronabidol, una solución a base de aceite de Δ 9-THC, es un antiemético y estimulador del apetito en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Volicer et al., 1997), mientras que Δ 9-THC también reduce la agitación que es común en los pacientes con enfermedad de Alzheimer severa (Walther et al., 2006). En el año 2003 se concede la patente en EEUU para el uso de cannabinoides como antioxidantes y neuroprotectores (U.S Department of Health and Human Services, www.fda.gov). A pesar de estos resultados prometedores, el uso de medicamentos a base de cannabinoides para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer está a la espera de resultados de ensayos clínicos rigurosos (Krishnan et al., 2004). La utilidad terapéutica de los cannabinoides es un área relativamente nueva de investigación en la interacción entre la inflamación y el estrés oxidativo que tiene mucho futuro para el desarrollo de tratamientos eficaces para la enfermedad de Alzheimer.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La enfermedad de Alzheimer es una patología neurodegenerativa que cursa con un aumento de la concentración del péptido tóxico A β cuyo acumulo forma placas neuríticas y ovillos neurofibrilares, responsables de la pérdida neuronal, deterioro de las conexiones sinápticas y gliosis reactiva (respuesta inflamatoria), características más relevantes de esta enfermedad (Giulian, 1999; Wyss-Coray y Mucke, 2002; Mruk y Griffin., 2005). El estado de estrés oxidativo también juega un papel crucial en la fisiopatología del Alzheimer. Se han observado un incremento de marcadores de daño oxidativo como oxidación de proteínas, lípidos, ADN e incluso de ARN (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013). Una gran cantidad de evidencias indican que el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno, un déficit en las defensas antioxidantes, así como la disminución en la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN, la proteólisis, y la pérdida de regulación del sistema inmune, son factores que contribuyen al aumento de estrés oxidativo y llevan al daño cerebral progresivo.

En conjunto estos resultados indican que la inflamación y el estrés oxidativo poseen un papel fundamental en el desarrollo y evolución de la enfermedad de Alzheimer.

Los astrocitos, como células inmunológicas del cerebro, pueden poseer gran importancia como diana terapéutica en respuesta a un proceso inflamatorio (Fuller et al., 2009; de Oliveira et al., 2010;

Furman et al., 2012) y de estrés oxidativo (Zhu et al., 2007; Agostinho et al., 2010).

Puesto que los polifenoles (Chong et al., 2001; Baker et al., 2004; Iwase et al., 2006; Hoensch y Oertel., 2012) y los cannabinoides (Klein et al., 2000; Molina-Holgado et al., 2003; Conti et al., 2002; Malfait et al., 2000; Li et al., 2001) ejercen un efecto anti-inflamatorio y mejoran el estado oxidativo (Iuvone et al., 2004; Dai y Mumper., 2010), nuestra hipótesis de trabajo es que puedan proteger de la inflamación y estrés oxidativo inducida por el péptido $A\beta_{1-42}$ en la enfermedad de Alzheimer.

2.2. Objetivos

Para estudiar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Estudio de los marcadores implicados en la neuro-inflamación y estrés oxidativo inducido por el péptido $A\beta$ en astrocitos.

2.- Efecto de los polifenoles (Estradiol y Genisteína) en la respuesta inflamatoria y estrés oxidativo inducido por $A\beta_{1-42}$ en astrocitos.

3.- Efecto del agonista cannabinoide WIN 55, 212-2 en la respuesta inflamatoria y estrés oxidativo inducido por $A\beta_{1-42}$ en astrocitos.

Para ello se determinaran en cultivos primarios de astrocitos, marcadores pro-inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , COX-2 e iNOS), de

estrés oxidativo (GSSG/GSH), marcador anti-inflamatorio (PPAR- γ) y anti-oxidante (SOD Cu/Zn) inducidos por el péptido A β ₁₋₄₂ y los efectos de polifenoles y cannabinoides sobre estos marcadores.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación

Los animales de experimentación empleados para el desarrollo de los ensayos *in vivo*, fueron ratas hembras de raza *Sprawley dawley*, criadas y mantenidas en condiciones higiénicas, de climatización, de humedad y con ciclos de luz/oscuridad (12/12 h), en el animalario de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de Valencia.

Las ratas hembras fueron alimentadas con dieta sólida estándar y agua *ad libitum*. Se expusieron al macho, y tras confirmar la gestación (presencia de espermatozoides en el flujo vaginal), las hembras gestantes de 21 días se sacrificaron para extraer los cerebros de los fetos y así realizar el protocolo de cultivo primario de astrocitos (Vallés et al., 2010).

Los requisitos de estabulación cumplen la normativa internacional vigente de experimentación animal (Dirección de la CEE 86/609, OJ L358.1, 12 de Diciembre de 1987 y Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud, NIH. Publ. No. 85-23, 1985) y los experimentos han sido aprobados por el comité ético de nuestra institución.

3.2. Cultivo primario de astrocitos

El cultivo primario de astrocitos se realiza a partir de muestras de corteza cerebral de fetos de 21 días, siguiendo el método de McCarthy y De Vellis (1980) con algunas modificaciones (Vallés et al., 2010). Todo el procedimiento se realiza en condiciones estériles.

3.2.1. Reactivos y materiales

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- Suero bovino fetal (SBF) inactivado 30 min a 60°C
- Fungizona al 1%
- Antibióticos al 1% (penicilina 100 U/m y estreptomicina 100 ng/ml)
- L-glutamina al 1%
- Hepes 10mM
- Puntas de pipeta estériles (Fisherbrand, Fisher scientific, Madrid, España)
- Pipetas y micropipetas (GILSON, Francia)
- Campana de flujo laminar vertical (Telstar AV-30-70)
- Vórtex TopMix FB15024 (Fisher Scientific)
- Malla de 90 μm para eliminar capilares sanguíneos y agregados celulares
- Placas y frascos para cultivos celulares (BIOFIL, Biotestdiagnosticos, S.L, Valencia, España)
- Estufa de cultivos CO_2/O_2 (5%/95%) (SANYO CO_2 Incubator MCO-19AIC (UV))

Todos los reactivos para el medio de cultivo proceden de Gibco Invitrogen Corporation, Barcelona, España.

3.2.2. Procedimiento

- Decapitar los fetos para extraer los cerebros
- Separar los hemisferios cerebrales de los fetos

- Separar la corteza cerebral y colocarla en medio de cultivo Dulbecco's
- Disgregar la corteza por aspiración con una pipeta de 10 ml (12 veces)
- Poner la suspensión 1 minuto en el vórtex a máxima velocidad (rompe las neuronas)
- Pasar la suspensión por una malla de 90 μm (elimina capilares sanguíneos y agregados celulares)
- Resuspender en medio de cultivo completo (20 ml/cerebro) con 20% de suero bovino fetal y sedimentar en placas y frascos de cultivo para posteriores ensayos
- Incubar a 37°C en estufa húmeda de CO₂/O₂ (5%/95%)
- Cambiar el medio de cultivo completo a los 4 días con 20% de SBF. Al siguiente cambio de medio completo se reduce el SBF al 10%.
- Cambiar el medio de cultivo cada 4 días hasta su utilización

3.3. Estudio de pureza del cultivo primario: inmunofluorescencia indirecta

La pureza del cultivo de astrocitos se determina por inmunofluorescencia indirecta (Sáez et al., 1991). Todo el procedimiento se realiza a temperatura ambiente, excepto las incubaciones con los anticuerpos que se realizan a 37°C. El cultivo primario de astrocitos se sedimenta en placas de cultivo para inmunofluorescencia (100 μl). El grado de pureza del cultivo depende de la cantidad de anticuerpo marcado anti-proteína glial fibrilar ácida (marcador de astrocitos) visto al microscopio de fluorescencia. El

cultivo se considera viable cuando alcanza una pureza mínima del 85%.

3.3.1. Fundamento

La inmunofluorescencia aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse con alta especificidad a una molécula. Se diferencia de otras técnicas en que es una molécula fluorescente la que se une al anticuerpo específico. El anticuerpo marcado se hace reaccionar contra un preparado biológico y luego se expone la muestra tratada a una fuente de luz de onda corta (ultravioleta o azul) seleccionada por medio de un monocromador. La luz de onda corta genera un fenómeno de fluorescencia en la molécula marcada que a su vez emite luz a una longitud de onda más larga (verde, amarillo o naranja), esta luz emitida puede ser cuantificada con facilidad por fotometría o, en el caso de tratarse de preparados histológicos, puede ser observada por medio de un microscopio de fluorescencia. En el caso de la utilización de la inmunofluorescencia como método de tinción para microscopía óptica, el fluorescente revela la localización a nivel celular o subcelular de la molécula diana. Las muestras siempre deben estar en un medio favorable para la unión de los anticuerpos, en general se utiliza tampón fosfato salino (PBS) como medio de reacción. Existen dos técnicas, primaria o directa que utiliza un anticuerpo y secundaria o indirecta que utiliza dos anticuerpos.

3.3.2. Reactivos y materiales

- Tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS)

- Formaldehido
- Albúmina de suero bovina (BSA)
- Tritón X-100
- Nonidet P-40
- Anticuerpos primarios: anti-proteína glial fibrilar ácida (marcador de astrocitos) y anticuerpo anti-proteína asociada a microtúbulos 2 (marcador neuronal)
- Anticuerpo secundario (IgG peroxidasa de rábano vinculado) anti-ratón marcado con Rodamina (alícuota 1, obteniendo marcaje rojo fluorescente) para unirse al anticuerpo anti-proteína asociada a microtúbulos 2 y anticuerpo secundario (IgG peroxidasa de rábano vinculado) anti-ratón marcado con Fluoresceína (alícuota 2, obteniendo marcaje verde fluorescente) para unirse al anticuerpo anti-proteína glial fibrilar ácida
- Puntas de pipetas estériles (Fisherbrand, Fisher scientific, Madrid, España)
- Micropipetas (GILSON, Francia)
- Microscopio Confocal Espectral Leica TCS SP2 (Leica Microsystems)

Todos los reactivos para la inmunofluorescencia se han obtenido de Sigma-Aldrich, Madrid, España.

3.3.3. Procedimiento

- En placas de cultivo para inmunofluorescencia, lavar las células con PBS y fijar los astrocitos con 3.7% de formaldehido en PBS durante 10 minutos

- Lavar con PBS durante 10 minutos, neutralizar durante 10 minutos con 50 nM glicina en PBS y permeabilizar durante 10 minutos con 0.25% con Triton X-100 en PBS.
- Bloquear con 3% de BSA en PBS durante 10 minutos
- Incubar los anticuerpos primarios diluidos en PBS-BSA al 1 o 3% de 1 -3 horas a temperatura ambiente o 37°C (estufa húmeda de CO₂/O₂ (5%/95%))
- Lavar con 0.1% Nonidet en PBS 2-3 veces (10 min cada lavado)
- Incubar los anticuerpos secundarios marcados con los fluoróforos diluidos en PBS-BSA al 1 o 3% de 1 -3 horas a temperatura ambiente (estufa húmeda y oscuridad)
- Lavar con PBS 2-3 veces (10 min cada lavado)
- Observar al microscopio de fluorescencia

3.4. Estudio de observación morfológica del cultivo primario: inmunofluorescencia directa

Una vez determinada la pureza del cultivo de astrocitos, se observó la morfología de astrocitos incubados con el péptido A β ₁₋₄₂, con tinción en núcleos y mitocondrias. Se observa por inmunofluorescencia directa. Todo el procedimiento se realiza a temperatura ambiente, excepto la fijación de las células que se realiza a -20°C. El cultivo primario de astrocitos se sedimenta en placas de cultivo para inmunofluorescencia (100 μ l). Para observar los núcleos se utiliza tinción de cromatina (Hoechst 33348), las mitocondrias con tinción de Mito Tracker Green (MTG) y muerte celular con tinción de yoduro de propidio.

3.4.1. Fundamento

El fundamento es el mismo que el descrito en el apartado anterior. La diferencia con la inmunofluorescencia indirecta es que en este caso se emplean dos anticuerpos.

3.4.2. Reactivos y materiales

- Tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS)
- Etanol
- Tinción de cromatina (Hoechst 3348) (1mg/ml en DMSO)
- Tinción de mitocondrias (Mito Tracker Green MTG)
- Tinción de yoduro de propidio (1mg/ml en PBS)
- Puntas de pipetas estériles (Fisherbrand, Fisher scientific, Madrid, España)
- Micropipetas (GILSON, Francia)
- Microscopio Confocal Espectral Leica TCS SP2 (Leica Microsystems)

Todos los reactivos para la inmunofluorescencia se han obtenido de Sigma-Aldrich, Madrid, España.

3.4.3. Procedimiento

- En placas de cultivo para inmunofluorescencia, lavar las células con PBS y fijar los astrocitos con 70% de etanol en PBS durante 1 hora a -20°C
- Lavar con PBS durante 10 minutos y añadir 1mL de PBS
- Añadir 5 µl de solución de tinción de cromatina, 5 µl de solución de tinción de mitocondria y 5 µl de solución de yoduro

de propidio e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y oscuridad

- Lavar con PBS y observar al microscopio de fluorescencia

3.5. Preparación de sustancias

Una vez determinada la pureza del cultivo, se procede a preparar los compuestos que se añaden tanto a las placas como frascos de cultivos para los diferentes diseños experimentales y posteriores ensayos.

3.5.1. Preparación del péptido A β

Se ha utilizado la proteína β amiloide fragmento 1-42 de Sigma-Aldrich (Madrid, España). La preparación se realiza según el protocolo descrito anteriormente (Vallés et al., 2008, 2010). En resumen, el péptido A β se disuelve en 15 μ l de DMSO y se diluye con agua bidestilada estéril hasta alcanzar la concentración de 100 μ M. Esta dilución se deja reposar durante 24 horas a temperatura de 37°C para favorecer la formación de oligómeros y por tanto su toxicidad (Vallés et al., 2008)

3.5.2. Preparación de polifenoles: Genisteína y estradiol

Se han utilizado la genisteína y el β -estradiol de Sigma-Aldrich (Madrid, España). La preparación se realiza según el protocolo descrito anteriormente. (Vallés et al., 2008, 2010). Tanto la genisteína como el β -estradiol se disuelven en 10 μ l de DMSO y se diluyen con agua bidestilada estéril hasta alcanzar la concentración de 100 μ M.

3.5.3. Preparación del cannabinoide WIN 55, 212-2

Se ha utilizado el agonista sintético cannabinoide WIN 55, 212-2 de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El Win se disuelve en 10 μ l de DMSO y se diluye con agua bidestilada estéril hasta alcanzar la concentración de 100 μ M.

3.6. Diseño experimental y tratamientos en cultivos primarios de astrocitos

En experimentos previos se ha determinado que 5 μ M es la mínima concentración a la que el péptido presenta toxicidad para los astrocitos en cultivo primario (Vallés et al., 2008, 2010), por lo que será la concentración utilizada en nuestros experimentos. Para determinar la viabilidad de los astrocitos en cultivo primario tratados con WIN 55, 212-2, se incubaron las células en presencia del péptido A β ₁₋₄₂ (5 μ M) en ausencia (control) y en presencia de diferentes concentraciones de WIN 55, 212-2 (1, 2, 5, 10 y 20 μ M) durante 24 horas y posteriormente se realizó el ensayo MTT. Puesto que la fracción del péptido A β ₁₋₄₀ generada por la ruta no amiloidogénica de procesamiento de APP está presente en el cerebro sano, el grupo control se realiza incubando los astrocitos en presencia de este péptido.

La tabla 3 recoge los protocolos y grupos experimentales para el estudio del efecto anti-inflamatorio de polifenoles y cannabinoides sobre la inflamación inducida por A β ₁₋₄₂ *in vitro*. Tras el periodo de incubación establecido se determinaran las proteínas pro- y anti-inflamatorias (electroforesis) y las citoquinas inflamatorias (ELISA).

GRUPO	TRATAMIENTO	TIEMPO INCUBACIÓN
Control (C)	5 μ M de A β ₄₀₋₁	24 horas
A β ₁₋₄₂ (A β)	5 μ M de A β ₁₋₄₂	24 horas
Genisteína (G) + A β ₁₋₄₂ (G+A β)	0.5 μ M de Genisteína + 5 μ M de A β ₁₋₄₂	24 horas + 24 horas = 48 horas
Estradiol (E ₂) + A β ₁₋₄₂ (E ₂ +A β)	0.2 nM de Estradiol + 5 μ M de A β ₁₋₄₂	24 horas + 24 horas = 48 horas
WIN 55, 212-2 (Win)	10 μ M de WIN 55, 212-2	24 horas
WIN 55, 212-2 + A β ₁₋₄₂ (Win+A β)	10 μ M de WIN 55, 212-2 + 5 μ M de A β ₁₋₄₂	24 horas + 24 horas = 48 horas

Tabla 3. Protocolo y grupos experimentales

3.7. Estudio de viabilidad celular: ensayo MTT

La citotoxicidad de los polifenoles se ha realizado en estudios previos en nuestro laboratorio (Vallés et al., 2008, 2010).

La determinación de la citotoxicidad y viabilidad del agonista cannabinoide WIN 55, 212-2 sobre el cultivo de astrocitos, se utiliza el ensayo del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT). El cultivo primario de astrocitos se sedimentó en placas de cultivo de 96 pocillos (100 μ l) y se someten a tratamiento con el

péptido A β_{40-1} en ausencia (control) y en presencia de Win (1, 2, 5, 10 y 20 μM) durante 24 horas. Los experimentos se realizan por duplicado. Tras el tratamiento se hizo el ensayo de MTT. La mínima concentración a la que se producen diferencias significativas de viabilidad celular con el control fue de 10 μM , que será la concentración de Win aplicada en los siguientes experimentos.

Para determinar el efecto de conjunto de Win y A β_{1-42} sobre la viabilidad celular, en un segundo grupo de experimentos, se incubaron los astrocitos en presencia de 5 μM de A β_{40-1} (control); en presencia de 5 μM de A β_{1-42} (inflamación); en presencia de Win (10 μM); y en presencia de WIN 55, 212-2 (10 μM) y de A β_{1-42} (5 μM). Los tres primeros grupos se incubaron durante 24 h y el último grupo durante 48 horas (24 h con Win y otras 24 h con Win+A β). Los experimentos se realizaron por duplicado. Tras el tratamiento se hizo el ensayo de MTT.

3.7.1. Fundamento del ensayo MTT

Las sales de tetrazolio (MTT) son especialmente útiles para ensayos de cuantificación de células viables porque la conversión de las sales de tetrazolio (amarillo y soluble) a cristales de formazan (púrpura e insoluble) sólo se puede producir por la actuación de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas.

A pesar de que el método MTT posee limitaciones debidas al estado fisiológico de las células y a la varianza de la actividad deshidrogenasa mitocondrial en diferentes tipos de células, es un

método útil para la determinación de crecimiento celular y toxicidad (Denizot y Lang., 1986; Carmichael et al., 1987).

3.7.2. Reactivos y materiales

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) libre de rojo fenol
- Solución MTT
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Puntas de pipetas estériles (Fisherbrand, Fisher scientific, Madrid, España)
- Micropipetas (GILSON, Francia)
- Campana de flujo laminar vertical (Telstar AV-30-70)
- Espectrofotómetro (Spectra Max PLUS 384)

Todos los reactivos para el ensayo del kit Cell Growth Determination Kit MTT Based de Sigma-Aldrich, Madrid, España.

3.7.3. Procedimiento

- Extraer el medio de cultivo completo y cambiar por medio de cultivo libre de rojo fenol (DMEM), 100 μ l
- Añadir 10 μ L de solución MTT (concentración final 0.2 mg/ml) a cada uno de los pocillos con su respectivo tratamiento e incubar durante 4 horas a 37°C en estufa húmeda de CO₂/O₂ (5%/95%)
- Retirar el medio de cultivo libre de rojo fenol con solución MTT y añadir 100 μ l de disolvente MTT o DMSO

- Realizar la lectura por espectrofotometría con absorbancia a $\lambda=560$ nm
- Calcular la viabilidad celular en función de los valores de las absorbancias. Los valores se expresan como porcentajes, los valores de las muestras control (100% de células viables)

3.8. Extracción y determinación de proteínas totales: Método Lowry

Previo a la realización del western blot, se determina la cantidad de proteínas totales de la muestra mediante la extracción (1) y cuantificación (2) por el método de Lowry (1951).

3.8.1. Fundamento para la extracción de proteínas totales (1)

La extracción de proteínas comienza con la lisis. Los métodos más utilizados se basan esencialmente en la homogenización de los tejidos y la destrucción de los límites celulares por medio de procedimientos físicos y/o químicos, obteniéndose un extracto crudo. Los objetivos a lograr en esta etapa son maximizar la liberación de las proteínas de interés, evitando la degradación térmica o las alteraciones secundarias por oxidación, proteólisis, etc. Se ha desarrollado una amplia gama de técnicas de lisis celular por a) métodos físicos mecánicos: agitación con abrasivos, homogeneización a alta presión o extrusión por presión; b) métodos físicos no mecánicos: shock osmótico, ciclos de congelación descongelación, sonicación o secado; c) métodos químicos: tratamiento con álcali, solventes, detergentes, ácidos o sustancias caotrópicas. Tras la lisis se separan y purifican los componentes celulares por centrifugación.

3.8.2. Reactivos y materiales

- Tampón de lisis (83 ml de Tris-clorhídrico [76, 5mM] pH = 6,8, 2 g de dodecilsulfato sódico (SDS) y 10 ml de glicerol)
- Inhibidor de proteasas
- Ortovanadato
- Azul de bromofenol
- 2-β-mercaptoetanol
- Rascador de células
- Puntas de pipetas estériles (Fisherbrand, Fisher scientific, Madrid, España)
- Micropipetas (GILSON, Francia)
- Tubos eppendorf
- Sonicador (B-Braun LABSONIC L, B.Braun Biotech Internatioanl)
- Calentador de bloque para tubos (BioCote, Stuart, SBH200D/3)
- Congelador (Nevera Marca LG)

3.8.3. Procedimiento

- Colocar los frascos de cultivo en frío
- Calcular el volumen final de tampón de lisis para los frascos de cultivo (500 µl para cada frasco de cultivo) y añadir
- Desprender las células con rascador, extraer el contenido del frasco de cultivos, verter en un tubo eppendorf y poner en frío.
- Sonicar el contenido del tubo eppendorf durante 10 segundos

- Calentar la muestra a 90°C durante 10 minutos
- Centrifugar la muestra a 10000 g durante 10 minutos
- Extraer el sobrenadante de la muestra, verter en tubos eppendorf nuevos y poner en frío. Extraer 10 µl de la muestra y verter en nuevo tubo eppendorf para la posterior cuantificación de proteínas.
- Añadir al sobrenadante 2 µl de azul de bromofenol al 1% de concentración final y 2 µl de 2-β-mercaptoetanol al 0.5 % de concentración final y mezclar.
- Congelar la muestra. Cuando se necesite, calentar la muestra a 90°C durante 5 minutos.

3.8.4. Fundamento para la determinación de proteínas totales (2)

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta, cuando se quiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática, para el diagnóstico de enfermedades, así como para otros muchos propósitos. La cantidad de proteínas en la muestra analizada puede estimarse por diversos métodos.

Los ensayos colorimétricos (Bradford, Lowry y BCA) implican la adición de sustancias químicas capaces de reaccionar con determinados residuos aminoacídicos. El resultado de estas reacciones es el cambio de color en la solución que se cuantifica por medida de absorbancia. Para determinar la concentración de proteínas totales de la muestra, la absorbancia se interpola a una curva de calibración construida utilizando una proteína estándar (BSA) de concentración

conocida. En nuestros experimentos hemos utilizado el método de Lowry.

3.8.5. Reactivos y materiales

- Tubos para laboratorio transparentes
- Albúmina de suero bovina (BSA)
- Agua bidestilada estéril
- Puntas de pipetas estériles (Fisherbrand, Fisher scientific, Madrid, España)
- Micropipetas (GILSON, Francia)
- Reactivo de Lowry
- Reactivo de Folin
- Espectrofotómetro (Spectra Max PLUS 384)

3.8.6. Procedimiento

- Añadir 1 ml de agua bidestilada estéril al tubo rotulado transparente (muestra y BSA)
- Añadir los 10 μ l separados anteriormente de la extracción de proteínas
- Añadir 1 ml de reactivo Lowry a cada tubo y esperar durante 20 minutos
- Añadir 500 μ l de reactivo de Folin a cada tubo y esperar durante 30 minutos en oscuridad
- Medir por espectrofotometría a $\lambda=660$ nm.

3.8.7. Cálculos

Para calcular la cantidad de proteína extraída de la muestra se realizan los siguientes cálculos. El valor que nos da el espectrofotómetro de la muestra y se divide por el valor estándar del BSA, y nos da la cantidad de proteína en la muestra en mg/ml.

Para cargar 20 μg de proteína de la muestra a emplear en técnica electroforética de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida e inmunodetección, se divide 20 entre la cantidad de proteína en la muestra en mg/ml y nos da la cantidad de μl a cargar en el pocillo.

3.9. Determinación de expresión proteica de marcadores pro y anti-inflamatorios: Técnicas electroforéticas de determinación de proteína en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunodetección (WESTERN-BLOT).

La realización del Western-blot consta de varios pasos: preparación de geles, electroforesis en gel desnaturizante, transferencia, bloqueo y lavado de proteínas, detección de proteínas y análisis cuantitativo de proteínas.

3.9.1. Fundamento

El western-blot es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad. La muestra se transfiere a una membrana adsorbente (nitrocelulosa o de fluoruro

de polivinilideno, PVDF) para detectar la proteína de interés con anticuerpos específicos. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o por fluorescencia. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en la muestra y analizar su cantidad relativa respecto a proteínas control (Towbin et al., 1979; Renart et al., 1979).

3.9.2. Preparación de los geles

Se usaron geles de 0.75mm de grosor con porcentajes de acrilamida del 8 y 12.5% (en gel separador) según el peso molecular (kDa) de los fragmentos de proteínas a resolver. A mayor peso molecular de la proteína de interés, menor porcentaje del gel separador, y viceversa. El gel concentrador se prepara al 4%. La tabla 4 recoge la composición de ambos geles.

Reactivos	Separador		Concentrador	
	8 % (µl)	12.5 % (µl)	4% (µl)	
Agua bidestilada	4665.6	4010	Agua bidestilada	1962
Tris-HCl 1.5.M pH 8.8	2000	2000	Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	750
Acilamida 40%	1166.4	1823	Acilamida 40%	218
SDS 10 %	80	80	SDS 10 %	30
Amonio Persulfato (APS)	80	80	Amonio Persulfato (APS)	38
TEMED	8	8	TEMED	4

Tabla 4. Composición de los geles separador y concentrador (2 geles).

3.9.3. Reactivos y materiales

- Agua bidestilada
- Tris-HCl
- Acilamida
- SDS
- Amonio persulfato (APS)
- TEMED
- Cristales para geles (0.75 mm) (Bio-Rad)
- Fijadores para cristales (Bio-Rad)
- Peines para cristales de 0.75 mm (Bio-Rad)

- Vasos de precipitado (80ml)
- Puntas de pipeta (Fisherbrand, Fisher scientific, Madrid, España)
- Micropipetas (GILSON, Francia)

3.9.4. Procedimiento

- Limpiar cuidadosamente los cristales y fijarlos de la parte inferior y laterales
- Hacer la prueba del agua, añadiendo 1 ml de agua bidestilada entre los cristales para asegurarse de que no se sale y están bien fijos los cristales.
- Añadir las cantidades indicadas de la tabla 6 para la preparación de 2 geles separadores en vaso de precipitado, teniendo en cuenta de añadir por último el TEMED y mezclar bien.
- Verter con micropipeta rápidamente la mezcla anterior entre los cristales, hasta 2/3 del cristal.
- Dejar 1-2 horas para la gelificación completa.
- Preparar la mezcla del gel concentrador, en vaso de precipitados, teniendo en cuenta las cantidades indicadas en la tabla 6 y añadiendo por último el TEMED
- Verter la solución anterior y colocar los peines en la parte superior del gel, dejar 1-3 hora para la gelificación completa.

3.9.5. Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE)

Las proteínas de la muestra serán separadas mediante una electroforesis en gel en función de uno o varios de estos

criterios: punto isoeléctrico, peso molecular y carga eléctrica. La naturaleza de la separación depende del tratamiento de la muestra y de la naturaleza del gel.

La electroforesis en gel más frecuente, conocida como SDS-PAGE, hace uso de gel de poliacrilamida y de tampón con dodecilsulfato (SDS). En esta técnica las proteínas sufren un tratamiento por agentes reductores que provocan la pérdida de las estructuras secundaria y terciaria (por ejemplo, reduciendo los puentes disulfuro (S-S) a grupos tiol (SH + SH) y mantiene los polipéptidos en este estado desnaturalizado. De este modo, la estructura tridimensional de las proteínas no influye en la electroforesis, y pueden separarse únicamente en función del tamaño.

3.9.6. Reactivos y materiales

- Balanza de precisión (Denver Instrument MXX-601)
- Vaso de precipitado (1 L)
- Tris
- Glicina
- SDS
- Agua bidestilada
- Placa de agitación (P-Selecta Agimatic-S)
- Agitadores magnéticos (Corning Stirrer PC-353. P-Selecta Agilux)
- Cubeta de electroforesis (Bio-Rad)
- Soporte para geles de electroforesis (Bio-Rad)
- Puntas de pipeta (Fisherbrand, Fisher scientific, Madrid, España)

- Micropipetas (GILSON, Francia)
- Marcador de peso molecular
- Calentador de bloque para tubos (BioCote, Stuart, SBH200D/3)
- Muestras a cargar en el gel (20 µg de proteína)
- Fuente de corriente eléctrica (Biometra, Standard Power Pack P25)

3.9.7. Procedimiento

- Una vez hechos los geles, quitar los peines de cada uno con mucho cuidado para mantener los carriles de los pocillos
- Preparar el tampón de electroforesis añadiendo las cantidades indicadas de la tabla 5, mezclar bien en placa de agitación y posteriormente llevar a 0.5x
- Colocar los geles en el soporte para geles de electroforesis y llenar la cubeta con tampón de electroforesis (0.5x) en el interior y exterior de los geles
- Descongelar las muestras calentando a 90°C durante 5 minutos
- Cargar el marcador de peso molecular y las muestras en los pocillos, cambiando las puntas de pipeta cada vez que se añade una muestra
- Conectar la cubeta de electroforesis a fuente de corriente eléctrica (90 – 150 V), y mantener hasta que las muestras alcanza la parte inferior del gel. Retirar la corriente eléctrica y sacar el soporte con los geles

Reactivos	Tampón de electroforesis (10x) (g)
Tris 0.25 M	30
Glicina 2 M	144
SDS 1 %	10

Tabla 5. Composición del tampón de electroforesis. Disolver en 1 L de agua, no ajustar pH

Composición del tampón de electroforesis. Disolver en 1 L de agua, no ajustar pH

3.9.8. Transferencia

Una vez separadas las muestras en el gel, las muestras se transfieren a una membrana de nitrocelulosa para la detección de proteínas. En método se basa en aplicar una corriente eléctrica para transferir las proteínas desde el gel a la membrana. Para ello, se apilan en el orden descrito los siguientes elementos (del polo negativo o cátodo al positivo o ánodo): esponja, papeles de filtro empapados en tampón de transferencia, gel, membrana, papeles de filtro empapados en tampón de transferencia y esponja. Este montaje, llamado coloquialmente *sandwich*, se dispone en el sistema de transferencia y se aplica una corriente eléctrica, de magnitud acorde a los materiales empleados. Las proteínas del gel se desplazan hacia el polo positivo y quedan atrapadas por la membrana.

3.9.10. Reactivos y materiales

- Balanza de precisión (Denver Instrument MXX-601)
- Vaso de precipitados (1 L)
- Tris
- Glicina
- Metanol
- Agua bidestilada
- Placa de agitación (P-Selecta Agimatic-S)
- Agitadores magnéticos (Corning Stirrer PC-353. P-Selecta Agilux)
- Cubeta de transferencia (Bio-Rad)
- Puntas de pipeta (Fisherbrand, Fisher scientific, Madrid, España)
- Micropipetas (GILSON, Francia)
- Papel de filtro para western-blot (Thermoscientific)
- Membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Science)
- Almohadillas de esponjas
- Unidad de transferencia (Bio-Rad)
- Fuente de corriente eléctrica (Biometra, Standard Power Pack P25)

3.9.11. Procedimiento

- Preparar el tampón de transferencia añadiendo las cantidades indicadas de la tabla 6, mezclar bien en placa de agitación

- Cortar la membrana de nitrocelulosa a la medida del gel (aprox. 8.5 x 5.5 cm), cortar 2 papeles de filtro del mismo tamaño
- Despegar el gel de los cristales
- Colocar todos los componentes en la unidad de transferencia, de la siguiente manera:
Negro/almohadilla de esponja/papel de filtro/gel/membrana de nitrocelulosa/papel de filtro/almohadilla de esponja/blanco
- Cerrar la unidad de transferencia y colocar en la cubeta de transferencia
- Llenar la cubeta con el tampón de transferencia
- Conectar la cubeta a la fuente de corriente eléctrica (100 V) durante 1 hora a 4°C, para ello se ubica la cubeta dentro de otra cubeta de hielo
- Sacar la unidad de transferencia

Reactivos	Tampón de transferencia (g)
Tris 25 mM	3.03
Glicina 192 mM	14.4
Metanol 20% v/v	100

Tabla 6. Composición del tampón de transferencia. Disolver en 1 L de agua, no ajustar pH

Composición del tampón de transferencia. Disolver en 1 L de agua, no ajustar pH

3.9.12. Bloqueo y lavado de proteínas

Puesto que la membrana escogida necesita poder unirse proteínas de forma inespecífica, es preciso bloquear los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia. En caso contrario, el anticuerpo (de naturaleza proteica) empleado en la detección puede unirse a ellos, dificultando la distinción del complejo antígeno-antígeno que se forma con la proteína que se busca.

Para el bloqueo se incubaba la membrana con leche en polvo al 5% y Tween-20. Las proteínas en solución se unirán a todos aquellos lugares de unión de la membrana que no estén ya ocupados por las proteínas transferidas desde el gel. De este modo, el anticuerpo sólo podrá unirse a su antígeno específico, reduciendo así el ruido de fondo y los falsos positivos. El lavado se realiza incubando con tampón de lavado (TBS-T, Tabla 7) durante 10 minutos en agitación. Esta operación se repite tres veces consecutivas.

3.9.13. Reactivos y materiales

- Tris
- Na Cl
- Agua bidestilada
- Tween-20
- Leche en polvo desnatada
- Vaso de precipitado (1 L)
- Balancín de agitación (BioCote, Stuart, SSL4)

Reactivos	TBS (10x) (g)
Tris	24.2
Na Cl	80

Tabla 7. Composición de la solución madre para el tampón de lavado. Disolver en 1 L de agua, ajustar pH 7.6. Para preparar 1 L de TBS-T (TSB-Tween-20), añadir TBS al 1x (100 ml), completar con agua bidestilada (900 ml) y añadir 1 ml de Tween-20 y mezclar bien

Composición de la solución madre para el tampón de lavado. Disolver en 1 L de agua, ajustar pH 7.6. Para preparar 1 L de TBS-T (TSB-Tween-20), añadir TBS al 1x (100 ml), completar con agua bidestilada (900 ml) y añadir 1 ml de Tween-20 y mezclar bien

3.9.14. Procedimiento

- Preparar leche al 5% en TBS-T
- Colocar la membrana en un recipiente y llenar con la mezcla anterior (aprox. 20 ml)
- Colocar el recipiente en la balanza de agitación constante de 30 minutos a 1 hora
- Lavar la membrana con TBS-T 3 veces durante 10 minutos cada lavado, para eliminar el exceso de leche.

3.9.15. Detección de proteínas

En la detección se comprueba la presencia en la membrana de una determinada proteína. Para ello se emplea un anticuerpo específico contra ella unido a enzima que, en presencia de su sustrato, catalice una reacción colorimétrica. De esta forma, se hace patente la unión con el antígeno, la proteína, así como su localización. La detección se realiza en dos pasos, la unión del anticuerpo primario y la del anticuerpo secundario.

Tras el bloqueo y lavado, la membrana se incuba en agitación constante con una disolución de anticuerpo primario (1:200 o 1:500 o 1:1000). Durante 12 h. Tras lavar la membrana para eliminar el anticuerpo primario que no se ha unido, se incuba con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa del rábano (HRP). Varios de estos anticuerpos se unirán a cada anticuerpo primario, amplificando la señal. La peroxidasa, cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. Si se coloca una película fotográfica sobre la membrana, la exposición a la luz que se desprende en la reacción permite detectar la actividad enzimática (Figura 6).

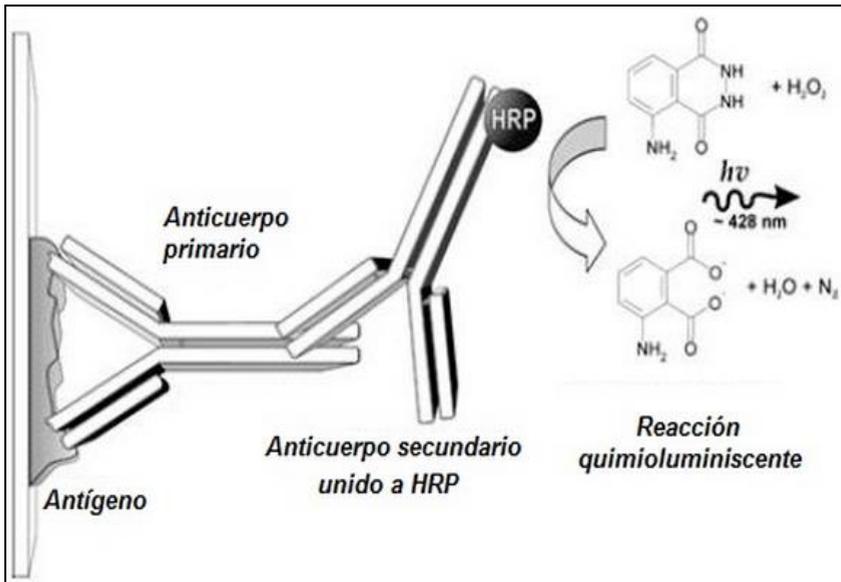


Figura 6. Detección de proteínas por quimioluminiscencia.

3.9.16. Preparación e incubación de anticuerpos

Se pueden emplear tanto anticuerpos primarios monoclonales como policlonales. El primer paso en la producción de ambos anticuerpos, es la inyección de un antígeno en un animal para provocar una respuesta inmune, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente a partir del suero del animal, comúnmente ratón, conejo o cabra y son finalmente purificados y probados. Los anticuerpos policlonales reconocen múltiples epítopos del antígeno, mientras que los monoclonales reconocen un único epítipo de la proteína. Para la síntesis del anticuerpo monoclonal, las células que se sintetizan anticuerpo se aíslan del bazo del animal y se fusionan con células del mieloma. Los hibridomas resultantes secretan anticuerpos al medio de cultivo, el cual se analizan y se determina la afinidad del

antígeno. Los hibridomas más estables se seleccionan y pueden ser cultivados indefinidamente.

La especie animal del anticuerpo primario dicta la elección del anticuerpo secundario. Si el anticuerpo primario es de conejo, el anticuerpo secundario debe ser anti-conejo, es decir, debe ser producido en otra especie animal distinta al conejo. Para anticuerpos monoclonales se debe considerar la clase de inmunoglobulina (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE).

Tanto el anticuerpo primario como secundario se diluyen en tampón de bloqueo (TBS-T). El fabricante puede recomendar una cantidad inicial, pero a menudo la concentración óptima del anticuerpo debe determinarse empíricamente. La afinidad del anticuerpo, la cantidad de proteína en la muestra y la sensibilidad del sistema de detección afecta la cantidad del anticuerpo a emplear.

3.9.17. Reactivos y materiales

- Leche desnatada al 2% en TBS-T
- Anticuerpo primario y secundario
- TBS-T

Según dilución (1:200 o 1:500 o 1:1000) y el volumen final que se quiere preparar de anticuerpo se realiza el respectivo cálculo. Si se quiere preparar un anticuerpo con disolución 1:200, la proporción es, por cada 200 µl de leche desnatada al 2% en TBS-T se añade 1 µl del anticuerpo.

Se ha utilizado como anticuerpo primario para determinar marcadores antiinflamatorios, el anticuerpo monoclonal anti-receptores activados por proliferadores de peroxisomas (anti-PPAR γ) (1:250). Para la determinación de marcadores proinflamatorios se han utilizado los anticuerpos monoclonales anti-ciclooxigenasa 2 (anti-COX-2) (1:250) y anti-inducible óxido nítrico sintasa (anti-iNOS) (1:200). Para la determinación de marcadores antioxidantes se han utilizado el anticuerpo monoclonal anti-SOD Cu/Zn (anti-SOD Cu/Zn) (1:1000) y anti-inducible óxido nítrico sintasa (anti-iNOS) (1:200). Como control de la carga de proteínas se ha utilizado el anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (anti- α -tubulina) (1: 1000). El anticuerpo secundario ha sido producido en cabra anti-IgG de ratón, H y L, cadena específico conjugado de peroxidasa (HRP). Todos los anticuerpos de han obtenido de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

3.9.18. Procedimiento

- Preparar el anticuerpo primario monoclonal de la proteína que se desea visualizar, diluido según las indicaciones del fabricante
- Añadir el anticuerpo primario preparado (aprox. 15 ml) en el recipiente donde se encuentra la membrana e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (cámara fría) en balanza de agitación constante
- Lavar la membrana con TBS-T, 3 lavados de 10 minutos cada lavado
- Preparar el anticuerpo secundario, diluido según las indicaciones del fabricante

- Añadir el anticuerpo secundario preparado (aprox. 15 ml) en el recipiente donde se encuentra la membrana e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en balanza de agitación constante
- Lavar la membrana con TBS-T, 3 lavados de 10 minutos cada lavado

3.9.19. Análisis cuantitativo de proteínas

Tras el lavado, se procede a la detección por quimioluminiscencia. La luz emitida es captada por una cámara CCD que toma una imagen digital del Western blot. Se analiza la imagen por densitometría para evaluar la cantidad relativa de mancha y cuantificar el resultado en términos de densidad óptica mediante el software ImageQuant 5.2. (Figura 2).

3.9.20. Reactivos y materiales

- Placa de revelado
- Kit ECL Western Blotting Substrate (Thermoscientific)
- Sistema captador de imágenes ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science)
- Software de cuantificación ImageQuant 5.2 (GE Healthcare Life Science)

3.9.21. Procedimiento

- Colocar la membrana en la placa de revelado
- Añadir 1 ml de solución luminiscente por membrana (ECL Western Blotting Substrate (Peroxide Solution/Luminol

Enhancer Solution, proporción 1:1) y dejar durante 1-5 minutos y cubrir

- Colocar la placa dentro del sistema captador de imágenes y revelar
- Analizar la imagen (bandas) y cuantificar por densitometría (ImageQuant 5.2) seleccionando la banda específica de la proteína de interés

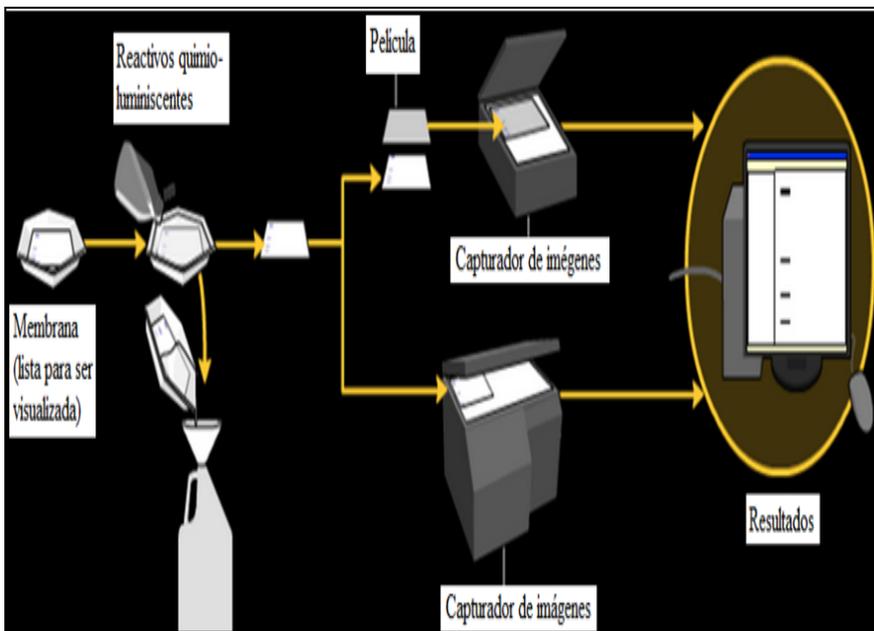


Figura 7. Procedimiento de análisis de resultados.

3.9.22. Cálculos

Una vez obtenido los valores densitométricos de las bandas, se divide el valor de la proteína específica por su respectiva proteína control (α -tubulina).

3.10. Determinación de citoquinas pro-inflamatorias: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

3.10.1. Fundamento

El inmunoensayo se utiliza para la detección de antígenos en una muestra. Se basa en el uso de anticuerpos marcados con un enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte inmunoabsorbente, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada lo que facilita su revelado mediante la adición de un sustrato específico que al actuar el enzima producirá un color observable y cuantificable mediante espectrofotometría o colorimetría. Existen varios tipos de ELISAS: directo, indirecto y sándwich. En el método directo o no competitivo las muestras problema se incuban con un anticuerpo marcado mientras que en el indirecto o competitivo, el sistema de detección emplea dos anticuerpos uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario por lo que es más sensible.

En el de tipo sándwich, el antígeno se unirá unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Cualquiera de los métodos utilizados necesita de controles positivos y negativos.

El ensayo consta de cuatro fases. En la primera, el complejo antígeno-anticuerpo se conjuga con un enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina). Este complejo se une, en una segunda fase a los pocillos de la placa de cultivo formando capas de inmuno-complejos que serán detectados por métodos directos, indirecto o tipo sándwich (tercera fase). Tras un periodo de incubación, la reacción se detiene y el ensayo acaba con el revelado de la reacción enzimática por espectrofotometría.

En nuestros experimentos hemos utilizado ELISA indirecto comerciales para la detección de TNF- α y de IL-1 β (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, USA).

3.10.2. Reactivos y materiales

3.10.2.1. Rat TNF- α ELISA Kit

- Placa de 96 pocillos pre-recubierto con anti-rata-TNF- α
- Liofilizado recombinante estándar de rata-TNF- α
- Diluyente estándar
- Tampón de pre-tratamiento
- Reactivo de anticuerpo biotilado
- Reactivo de estreptavidina-HRP
- Solución de sustrato TMB
- Tampón de lavado
- Solución de finalización
- Cubre de placa adhesiva
- Muestras

3.10.2.2. Rat IL-1 β ELISA Kit

- Placa de 96 pocillos pre-recubierto con anti-rata- IL-1 β
- Liofilizado recombinante estándar de rata- IL-1 β
- Diluyente estándar
- Tampón de pre-tratamiento
- Reactivo de anticuerpo biotilado
- Reactivo de estreptavidina-HRP
- Solución de sustrato TMB
- Tampón de lavado
- Solución de finalización
- Cubre de placa adhesiva
- Muestras

Los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

3.10.3. Procedimiento

- Preparar las diluciones para la curva estándar (Figura 8) siguiendo las indicaciones del fabricante.

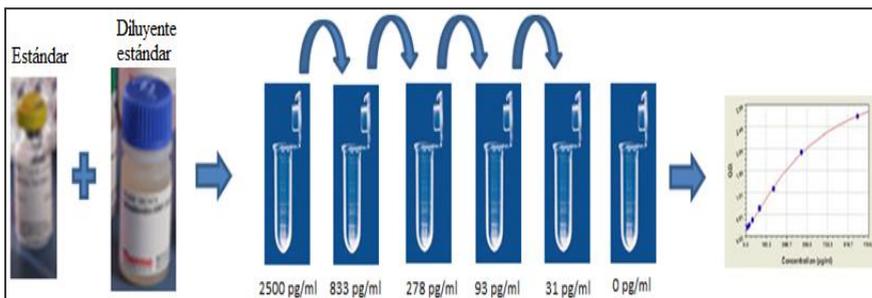


Figura 8. Preparación de la curva estándar.

- Añadir 50 μl de tampón de pre-tratamiento a cada uno de los pocillos a emplear
- Añadir 50 μl de las diluciones estándar y de las muestras en los pocillos por duplicado, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Lavar 3 veces los pocillos con tampón de lavado (1x)
- Añadir 50 μl del reactivo de anticuerpo biotilado a cada uno de los pocillos, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora
- Lavar 3 veces los pocillos con tampón de lavado (1x)
- Añadir 100 μl del reactivo de estreptavidina-HRP a cada uno de los pocillo, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos
- Lavar 3 veces los pocillos con tampón de lavado (1x)
- Añadir 100 μl de la solución de sustrato TMB a cada uno de los pocillo, guardar en oscuridad la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos
- Finalizar la reacción añadiendo 100 μl de la solución de finalización a cada uno de los pocillos
- Medir la absorbancia en espectrofotómetro a $\lambda=450\text{ nm}$

3.10.4. Cálculos

Los resultados se calcularán interpolando la absorbancia de las muestras en una recta patrón construida a partir de los valores de la curva estándar, o bien sustituyendo los valores de absorbancia en la ecuación de la recta patrón.

3.11. Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Para valorar la capacidad de producción de estrés oxidativo, se han determinado los valores de GSSG por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); GSH por método enzimático (Asensi y cols., 1994). El cociente GSSG/GSH es un buen indicador de estrés oxidativo de tejidos en distintas condiciones fisiopatológicas.

Además, se ha determinado la expresión proteica de SOD Cu/Zn como marcador antioxidante para valorar la capacidad antioxidante del tratamiento con cannabinoides. La determinación se ha realizado mediante la técnica de inmunodetección (Western-blot) descrita anteriormente. Se ha utilizado el anticuerpo monoclonal anti-SOD Cu/Zn (anti- SOD Cu/Zn) (1:1000) como anticuerpo primario y el anticuerpo secundario ha sido producido en cabra anti-IgG de ratón, H y L, cadena específico conjugado de peroxidasa (HRP).

3.12. Determinación de GSH en cultivo primario de astrocitos

3.12.1. Fundamento

Se ha seguido el método descrito por Brigelius y cols. (1983), modificado posteriormente por Asensi y cols. (1994). Se basa en el seguimiento espectrofotométrico de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobenzenu. Esta reacción está catalizada por la glutatión S-transferasa. El aducto formado (2,4-dinitrofenil-S-glutatión) presenta un máximo de absorción a 340 nm. El sobrenadante libre de proteínas se utilizó para la determinación del GSH.

3.12.2. Reactivos y materiales

- Tampón fosfato sódico 0.5 M, ácido etilen diamino tetracético (EDTA) 1mM, pH 7.
- Ácido tricloroacético (TCA) al 19 %, EDTA 1.25 mM.
- Cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) 10 mM, disuelto en etanol al 100 %.
- Glutación-S-Transferasa. Se prepara una solución de 500 U/ml en tampón fosfato sódico 0.1M, EDTA 1 mM, pH 7.4. Esta solución se dializa durante 6 horas en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada 2 horas. Una vez preparada la solución se conserva a -20°C hasta su utilización.
- Espectrofotómetro (Spectra Max PLUS 384)

Todos los reactivos para el ensayo obtenidos de Sigma-Aldrich, Madrid, España.

3.12.3. Procedimiento

- En una microcubeta añadir: 825 μ l de fosfato potásico 0.5 M, EDTA 1 mM, pH 7, 25 μ l del sobrenadante de la muestra y 10 μ l de la solución de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.
- Medir por espectrofotometría a 340 nm y se registra hasta que se obtenga una línea de base estable.

- Una vez obtenida la línea de base estable, la reacción se dispara con 10 μl de la solución de glutatión S-transferasa y se registra la variación de la absorbancia a 340 nm hasta el final de la reacción.

3.12.4. Cálculos

Para calcular la concentración de GSH se utilizó el coeficiente de absorción molar del 2,4-dinitrofenil-S-glutatión a 340 nm ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.13. Determinación de GSSG en cultivo primario de astrocitos

3.13.1. Fundamento

Para la determinación de GSSG, se ha seguido el método descrito por Asensi y cols. (1994). Se basa en la separación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa de los dinitrobenzeno derivados y posterior detección a 365 nm. Para evitar la autooxidación del glutatión reducido (GSH) se bloquean los grupos tiólicos con N-etilmaleimida (NEM). El sobrenadante libre de proteínas se utilizó para la determinación del GSSG.

3.13.2. Reactivos y materiales

- Ácido perclórico (PCA) 12 %, BPDS 2 mM, NEM 40 mM.
- Ácido perclórico (PCA) 6 %, BPDS 1 mM, NEM 20 mM.

- γ -glutamylglutamato 1 mM en PCA 0.3 %. Es el patrón interno y debe estar calibrada previamente respecto a concentraciones conocidas de GSSG.
- KOH 3 M, ácido 3-(N-morfolino) propensulfónico (MOPS) 0.3 M.
- 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno al 1 % en etanol absoluto.
- Eluyente A: Es una solución de metanol al 80 %.
- Eluyente B: Es una solución de acetato sódico 0.5 M en metanol al 64%. Se parte de una solución acético/acetato que se prepara de la siguiente forma: se pesan 272 g de acetato sódico trihidratado y se añaden 122 ml. de agua y 372 ml. de ácido acético glacial. Se agita hasta completa disolución. El eluyente B está formado por un 80 % del eluyente A y un 20 % de la solución acético/acetato.

3.13.3. Procedimiento

3.13.3.1. Derivatización

- A 0.2 ml del sobrenadante, añadir 20 μ l de la solución de γ -glutamylglutamato, posteriormente añadir 5 μ l del indicador universal y llevar a pH 8-9 con KOH 3M MOPS 0.3M.
- Centrifugar a 15.000 g durante 5 minutos y 4°C.
- Tomar 25 μ l del sobrenadante y se pasan a un tubo pequeño de vidrio que contiene 50 μ l de la solución de

fluorodinitrobenceno al 1 % en etanol e incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

- Una vez finalizada la incubación, se deseca a vacío hasta 70 miliTorr. Llegado a este punto las muestras son estables a -20 °C durante varias semanas. Antes de inyectar en el cromatógrafo el precipitado resuspender en 50 µl de eluyente A.

3.14. Técnica cromatográfica

3.14.1. Fase móvil

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 ml/minuto. La elución del GSSG se realiza en gradiente: la fase móvil se mantiene durante unos 5 minutos a un 80% del eluyente A y 20% del eluyente B. Posteriormente se lleva linealmente a 1% de A y 99% de B durante unos 15 minutos. En estas condiciones se mantiene durante unos 5-10 minutos, hasta que se eluya el último compuesto (el GSSG). Posteriormente se recupera la columna a las condiciones iniciales durante unos 15 minutos.

3.14.2. Fase estacionaria

Se utiliza una columna Spherisorb aminada. Las dimensiones de la columna son de 20 x 0.46 cm. El tamaño de partícula de relleno es de 5 µm.

3.15. Detección

La detección de los dinitrofenil derivados se realiza en el ultravioleta visible a 365 nm.

3.16. Cálculos.

El cálculo de la concentración de glutatión oxidado en la muestra biológica se realizó en función de la calibración de soluciones conocidas de glutatión oxidado respecto al patrón interno, (γ -glutamil glutamato).

3.17. Métodos estadísticos

Todos los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Para el análisis estadístico se ha utilizado el programa Graph Pad Prism 5. La comparación entre muestras se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). La hipótesis nula fue aceptada para todos los valores de los conjuntos en la que F no fue significativa en el nivel de $p \leq 0.05$. En segundo lugar, los grupos de datos en los que la que F fue significativa fueron examinados por un t-test modificado con $p \leq 0.05$ como el límite crítico.

IV. RESULTADOS

4.1 Citotoxicidad celular del péptido A β

La determinación de la citotoxicidad, definida como la mínima concentración de sustancia que es tóxica para el cultivo de astrocitos, se realiza mediante el ensayo de MTT. En experimentos previos en nuestro laboratorio se ha determinado que el péptido A β_{1-42} presenta citotoxicidad a partir de una concentración de 5 μ M por lo que esta será la concentración utilizada en nuestros experimentos para inducir los efectos adversos del péptido A β_{1-42} (Vallés et al., 2008; 2010).

4.2 Efectos del péptido A β en cultivo primario de astrocitos

Los efectos del péptido A β sobre cultivos primarios de astrocitos se han determinado por inmunofluorescencia. La figura 9A recoge la imagen de astrocitos tratados con A β_{40-1} utilizado como control. El primer panel corresponde a la tinción de las mitocondrias con Mito Tracker (color verde); la del segundo panel a la tinción de los núcleos con Hoechst (color azul) y el tercer panel corresponde a la superposición de las dos tinciones. La figura 9B corresponde a las mismas tinciones cuando los astrocitos son tratados con A β_{1-42} . La incubación de los astrocitos durante 24 h con 5 μ M A β_{1-42} , produce un incremento en el número de mitocondrias que sugiere una alteración en la dinámica mitocondrial, compatible con un incremento del estrés oxidativo (Yan et al., 2013) y un aumento en la producción de citoquinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (Mrak y

Griffin., 2005). La figura 10 corresponde al cultivo de astrocitos en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. El primer panel corresponde a la tinción del núcleo con Hoechst (azul) y el segundo a la tinción con yoduro de propidio (rojo) como indicativo de muerte celular. La incubación con $A\beta_{1-42}$ aumenta la muerte celular (Wyss-Coray y Muckie, 2002), resultados que son consistentes con el aumento de estrés oxidativo.

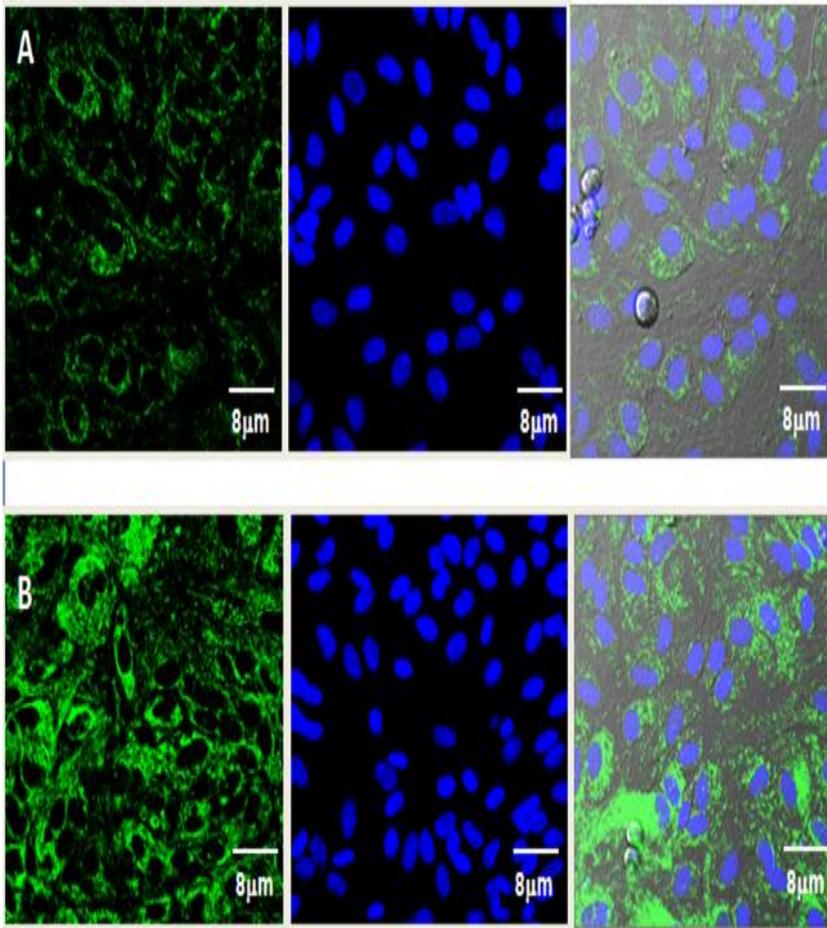


Figura 9. Microfotografía de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (A); 5 μ M A β 1-42 (B). El primer panel corresponde a la tinción de mitocondrias con Mito Tracker Green (verde), el segundo panel a la tinción de los núcleos marcados con Hoechst (azul) y el tercer panel a la superposición de ambos. Barra de escala 8 μ m.

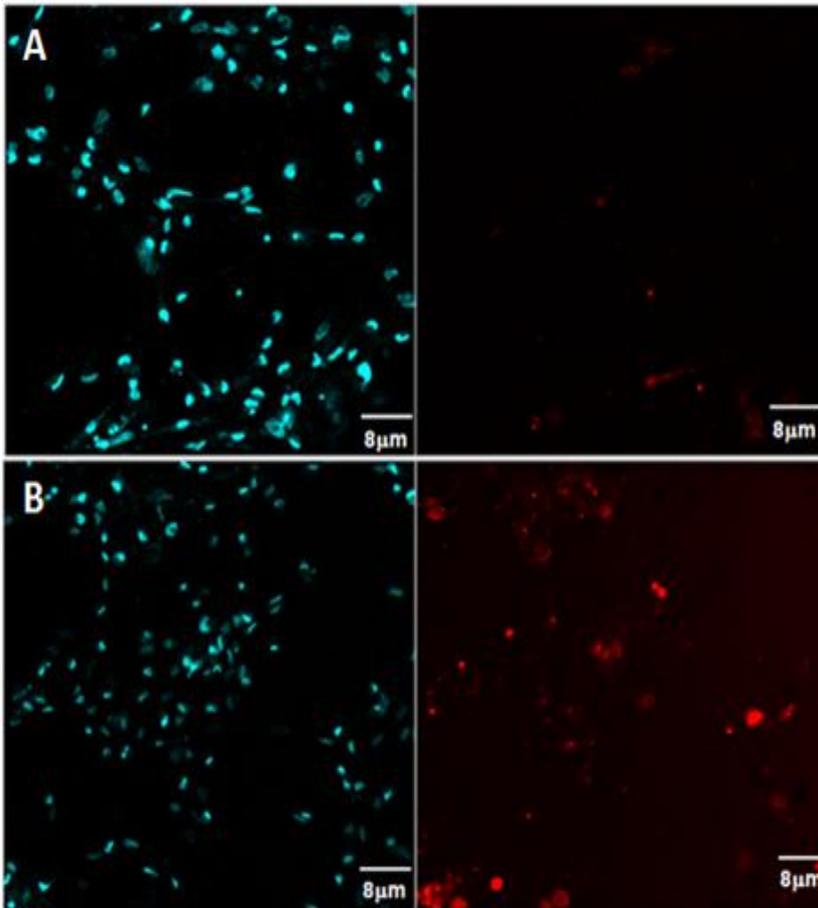


Figura 10. Microfotografía de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (A); 5 μ M A β 1-42 (B). El primer panel corresponde a la tinción de los núcleos marcados con Hoechst (azul) y el segundo a la tinción con yoduro de propidio (rojo). Barra de escala 8 μ m.

Polifenoles

4.3 Viabilidad celular

La determinación de la viabilidad celular, definida como el % de células vivas tras un tratamiento determinado, se realiza mediante el ensayo de MTT. En experimentos previos se ha determinado que la concentración fisiológica mínima de estradiol que produce una mayor viabilidad celular en células MCF-7 es de 0.2 nM; mientras que la concentración mínima nutricional de genisteína es de 0.5 μ M (Borras et al., 2005; 2006). Estas son las concentraciones de polifenoles a las que se produce una mayor viabilidad celular en neuronas (Vallés et al., 2008) y por consiguiente van a ser las concentraciones utilizadas para estudiar los efectos de los polifenoles en cultivo primario de astrocitos.

El tratamiento con $A\beta_{1-42}$ produce una disminución significativa (alrededor del 50%) de la viabilidad de astrocitos en cultivo primario respecto al control (Figura 11). El pre-tratamiento con polifenoles incrementa significativamente la viabilidad celular del cultivo. Estos resultados indican que la pre-incubación durante 24 h ya sea de genisteína o estradiol antes a la adición del tóxico $A\beta_{1-42}$ protege a estas células de la muerte celular inducida por el péptido tóxico $A\beta_{1-42}$. No hay diferencias entre genisteína y estradiol.

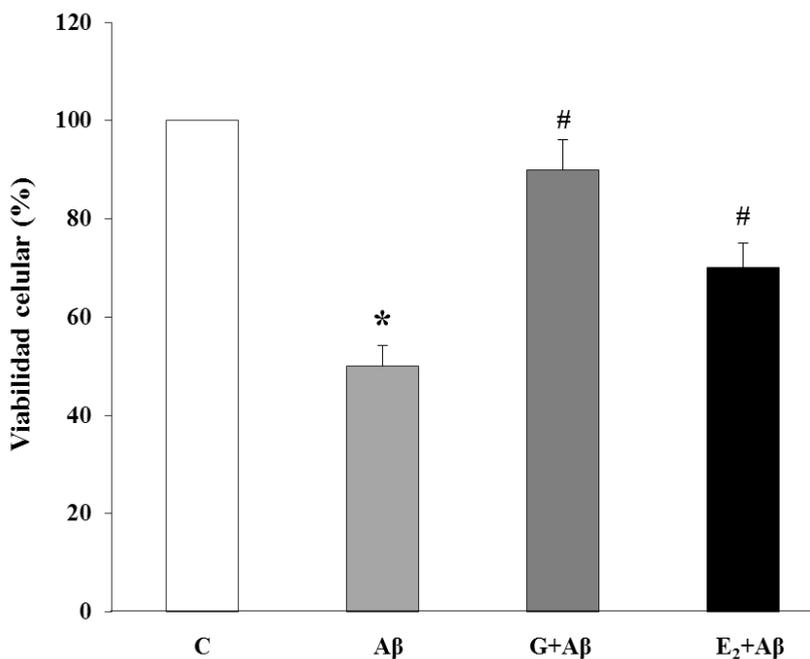


Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E₂+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

4.4 Citoquinas pro-inflamatorias. Efecto de los polifenoles

Para valorar los efectos anti-inflamatorios de los polifenoles se incubaron los astrocitos durante 24 h en ausencia (control); en presencia de $A\beta_{1-42}$ (5 μ M); 0.5 μ M de genisteína y 0.2 nM de estradiol. Transcurridas las 24 h de incubación, a los cultivos incubados con polifenoles se les añade el péptido $A\beta_{1-42}$ y tras 24 h de incubación se midió la liberación de IL-1 β y TNF- α por inmunoensayo enzimático (ELISA). El tratamiento con una dosis única de $A\beta$ (5 μ M) durante 24 h aumenta 4,5 veces la secreción de IL-1 β (105 \pm 74 vs 478 \pm 127 pg/ml; $p < 0.05$, Figura 12) y 2,3 veces los niveles de TNF- α (250 \pm 87 vs 570 \pm 115 pg/ml; $p < 0.05$, Figura 13) con respecto a los valores control. El tratamiento con genisteína o estradiol revierte el incremento de IL-1 β y TNF- α inducido por el péptido $A\beta_{1-42}$ (105 \pm 76 pg/ml y 108 \pm 74 pg/ml; $p < 0.05$; 265 \pm 73 pg/ml y 252 \pm 75 pg/ml; $p < 0.05$) respectivamente (Figuras 12 y 13) y devuelve los valores de IL-1 β a los valores control (Figura 12). Estos resultados implican que en cultivo primario de astrocitos, la presencia del péptido $A\beta_{1-42}$ induce un aumento de los niveles de sustancias pro-inflamatorias. El tratamiento con polifenoles protege los astrocitos del aumento de IL-1 β y TNF- α inducido por el péptido $A\beta_{1-42}$. No hay diferencias entre genisteína y estradiol.

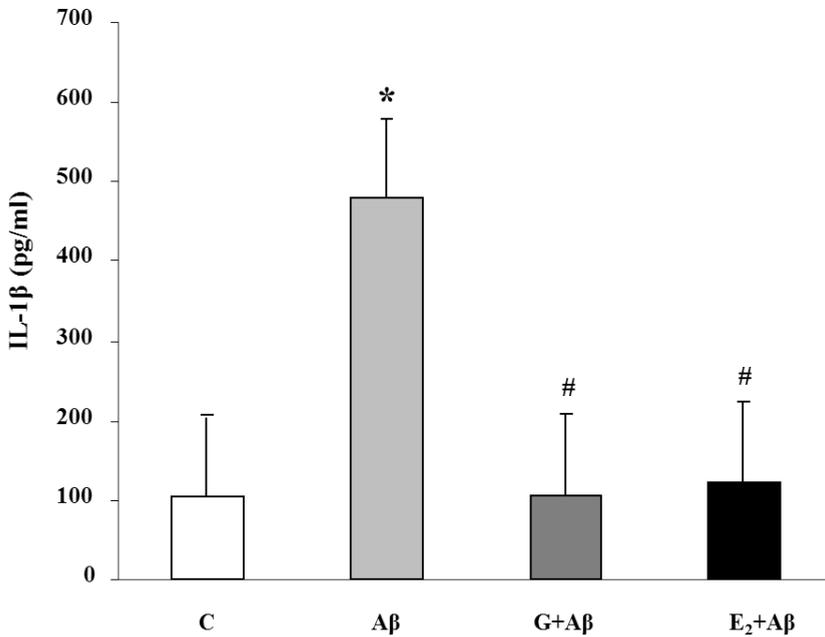


Figura 12. Niveles de IL-1 β en cultivo primario de astrocitos incubados con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E₂+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

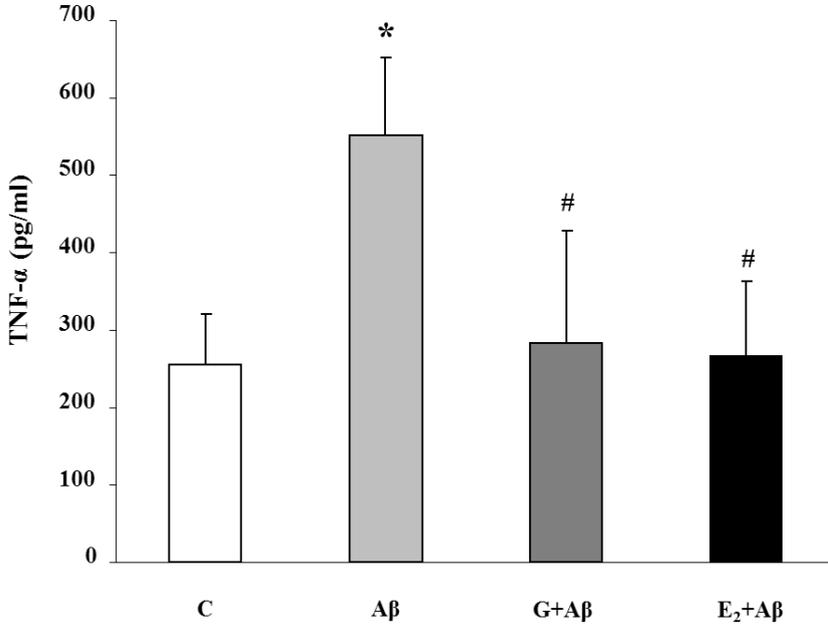


Figura 13. Niveles de TNF- α en cultivo primario de astrocitos incubados con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2 nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E₂+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂ que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

4.5 Proteínas pro- y anti- inflamatorias. Efecto de los polifenoles

Para valorar si el tratamiento con el péptido $A\beta_{1-42}$ induce cambios en la COX-2 y en la iNOS, se midió la expresión proteica de estas enzimas en cultivo primario de astrocitos, usando la técnica de Western-blot. La incubación con $A\beta_{1-42}$ durante 24 h produjo un aumento significativo (alrededor de 10 veces) en la expresión proteica de COX-2 (Figura 14) e iNOS (Figura 15). La proteína GFAP se utiliza como control de la cantidad de proteína total de la muestra ya que su expresión proteica no varía con los tratamientos. El pre-tratamiento de los astrocitos durante 24 h con 0.2 nM de estradiol o 0.5 μ M de genisteína, disminuye el incremento de la expresión proteica de COX-2 e iNOS inducida por $A\beta_{1-42}$, lo que sugiere que estos compuestos pueden proteger a las células contra estos mediadores inflamatorios.

La regulación de la expresión de genes anti-inflamatorios es compleja y puede ser regulada por los miembros de la superfamilia de receptores nucleares, los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). Para valorar la influencia del péptido $A\beta_{1-42}$ sobre la expresión de proteínas antiinflamatorias, se han incubado astrocitos en ausencia y en presencia del péptido β -amiloide. $A\beta_{1-42}$ no modifica la expresión proteica de la proteína anti-inflamatoria PPAR- γ . Para estudiar los efectos de los polifenoles sobre PPAR- γ se incubaron cultivos de astrocitos en presencia de genisteína (0.5 μ M) o estradiol (0.2 nM). Posteriormente se les añade el péptido $A\beta_{1-42}$ durante 24 h más.

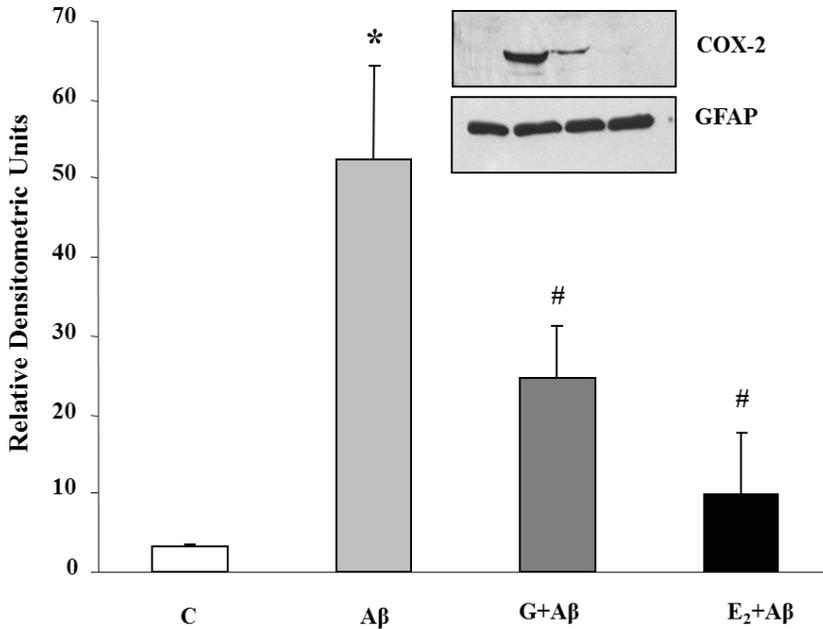


Figura 14. Expresión proteica de COX-2 en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E₂+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂ que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

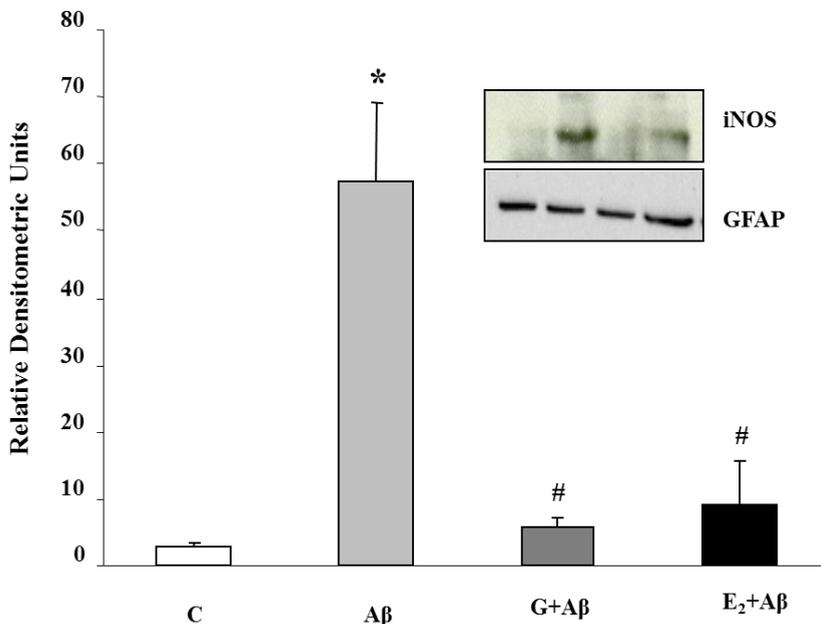


Figura 15. Expresión proteica de iNOS en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E₂+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

La figura 16 muestra los resultados de la expresión proteica de PPAR- γ en cultivo primario de astrocitos. El pre-tratamiento durante 24 h con estradiol o genisteína, incrementan significativamente la expresión proteica de PPAR- γ . La respuesta es similar entre genisteína y estradiol.

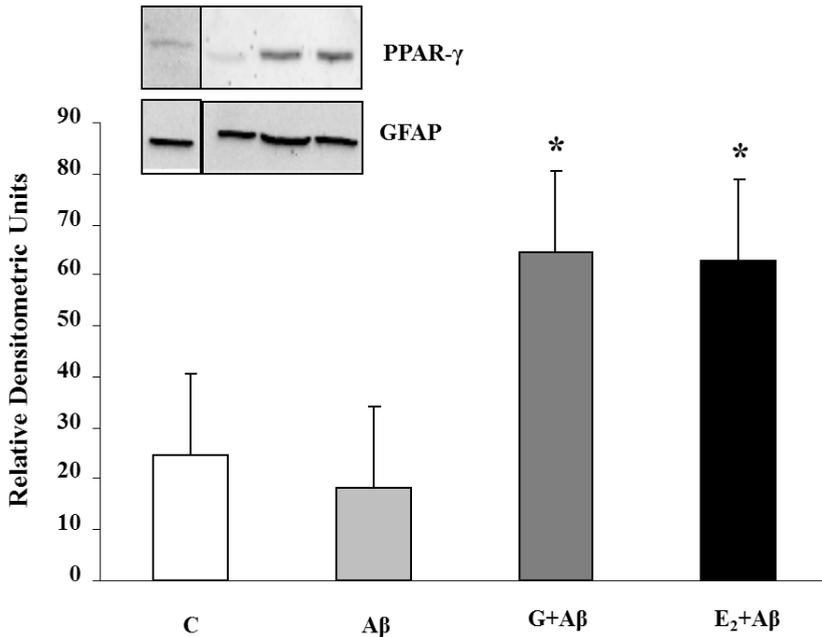


Figura 16. Expresión proteica de PPAR- γ en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E $_2$ +A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas *vs* control (* $p \leq 0,05$) y *vs* A β (# $p \leq 0,05$).

4.6 Estrés oxidativo: Cociente GSSG/GSH. Efecto de los polifenoles

Los valores de glutatión reducido (GSH) y de glutatión oxidado se determinan por HPLC. La incubación con $A\beta_{1-42}$ durante 24 h en ausencia y en presencia de los polifenoles genisteína y estradiol, no modifica los niveles de GSH (Figura 17) mientras que la incubación con $A\beta_{1-42}$ durante el mismo tiempo, produjo un aumento en los niveles de GSSG que disminuyen en presencia de genisteína y estradiol (Figura 18). El cociente GSSG/GSH indicativo de estrés oxidativo aumenta en presencia de $A\beta_{1-42}$ (alrededor de 3 veces) respecto al control (Figura 19). Estos resultados indican que $A\beta_{1-42}$ altera el glutatión como mecanismo de defensa antioxidante. El pre-tratamiento de los astrocitos durante 24 h con 0.2 nM de estradiol o 0.5 μ M de genisteína, disminuye el incremento del cociente GSSG/GSH inducido por $A\beta_{1-42}$, lo que sugiere un efecto protector de los polifenoles ante el estrés oxidativo.

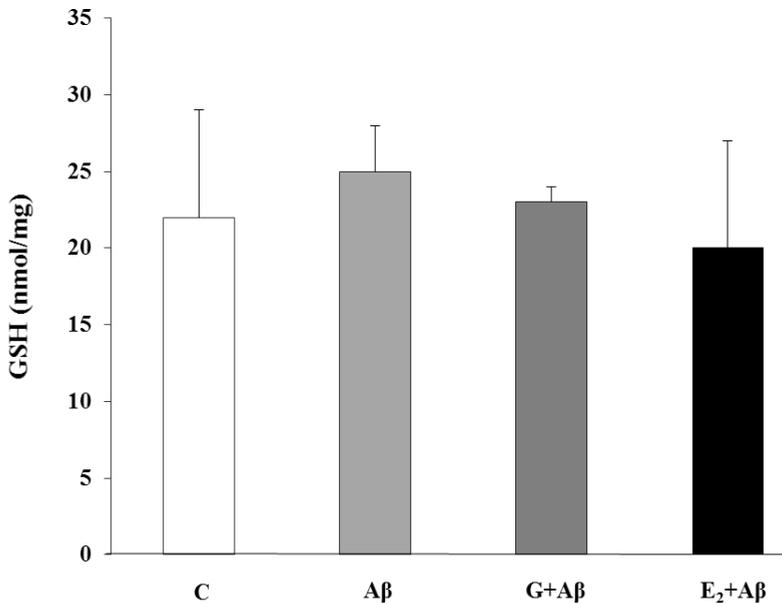


Figura 17. Valores de GSH en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E₂+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

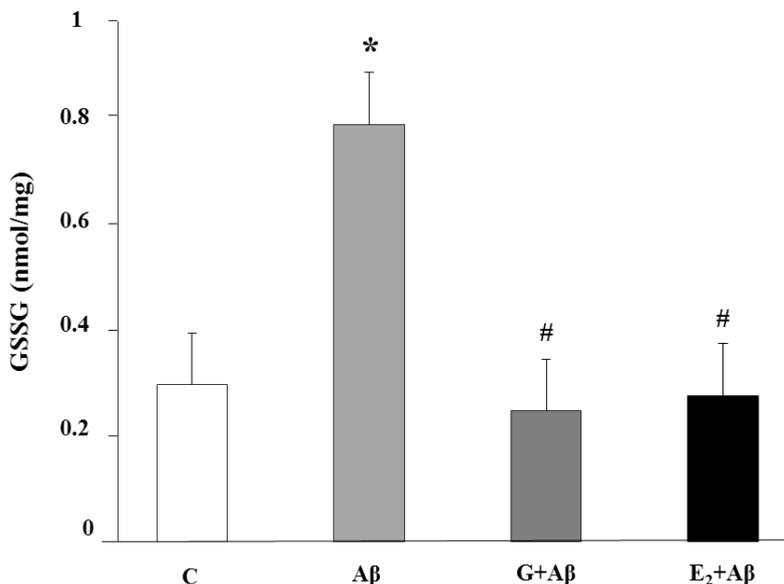


Figura 18. Valores de GSSG en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E₂+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β 1-42, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

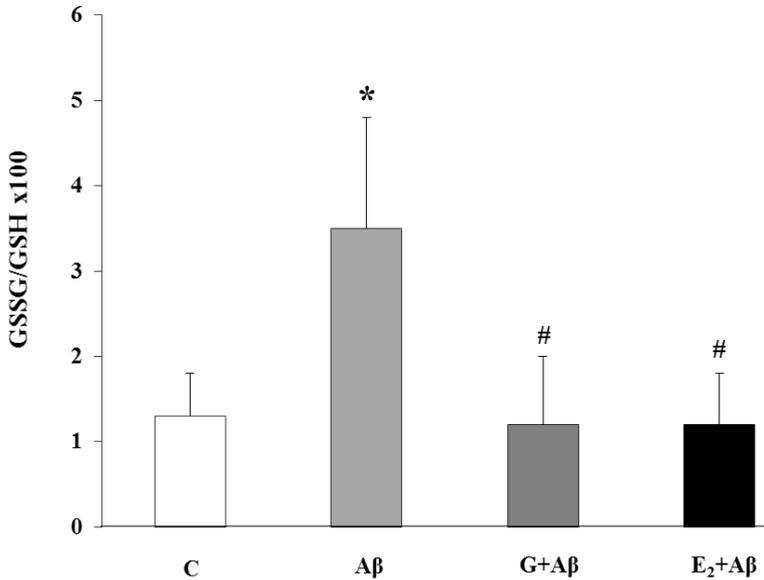


Figura 19. Cociente GSSG/GSH en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 0.5 μ M Genisteína + 5 μ M A β 1-42 (G+A β) y 0.2nM Estradiol + 5 μ M A β 1-42 (E₂+A β). Tanto genisteína como estradiol se añadieron 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

Cannabinoides

4.7 Viabilidad celular

Para analizar la viabilidad celular del WIN 55, 121-2 (en adelante Win), se incubaron astrocitos en cultivo primario en ausencia (control) y en presencia de distintas concentraciones de Win (1, 2, 5, 10 y 20 μM). Win no indujo cambios significativos en la viabilidad celular a 1, 2 y 5 μM ($p > 0.05$). A 10 μM se produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al control, por lo tanto esta ha sido la concentración seleccionada para los posteriores ensayos (Figura 20). El tratamiento con $\text{A}\beta_{1-42}$ produce una disminución significativa de la viabilidad de astrocitos en cultivo primario respecto al control (Figura 21). El tratamiento previo con Win incrementa significativamente la viabilidad celular del cultivo. Estos resultados indican que la adición de Win durante 24 h antes a la adición del tóxico $\text{A}\beta_{1-42}$ protege a estas células de la muerte celular inducida por el péptido tóxico $\text{A}\beta_{1-42}$.

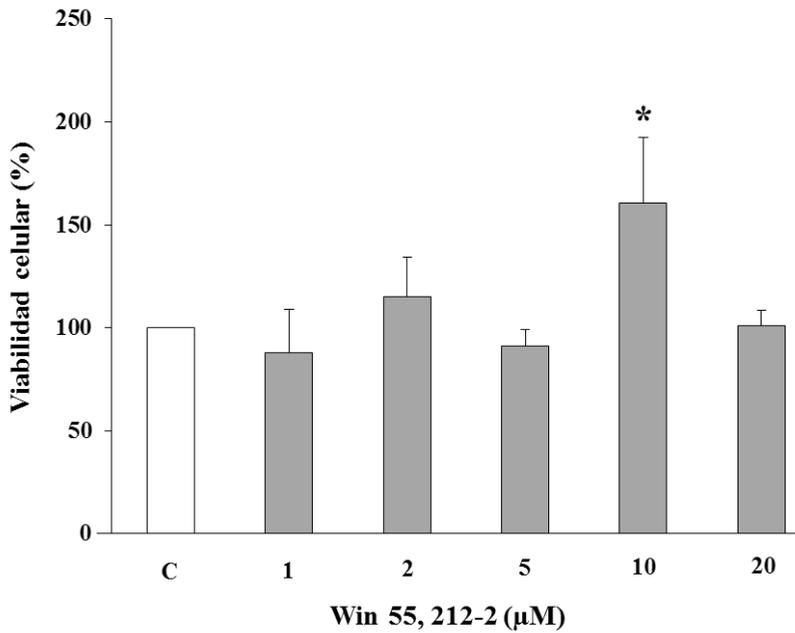


Figura 20. Porcentaje de viabilidad de astrocitos en cultivo primario en condiciones control (control, C) y tras la adición de diferentes concentraciones de WIN 55, 212-2 (1, 2, 5, 10 y 20 μM). Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$).

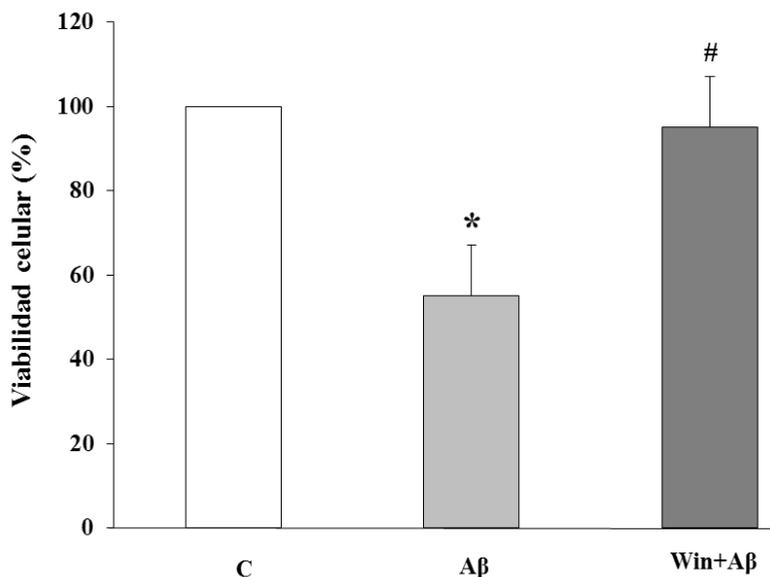


Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

4.8 Receptores cannabinoides

Para determinar la expresión proteica de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en astrocitos, se incubaron este tipo de células en cultivo primario en diferentes condiciones: en ausencia (control), $A\beta_{1-42}$ (5 μ M), Win (10 μ M) y la pre-incubación con Win antes de la adición de $A\beta_{1-42}$. En las diferentes condiciones, se observa la expresión de ambos receptores y no se presentan cambios significativos con respecto al control (Figura 22 y 23). Comparando las imágenes, se observa una mayor expresión de CB2 que CB1, ya que es el receptor que está más ligado al sistema inmune, en este caso a los astrocitos, siendo células inmunes del cerebro.

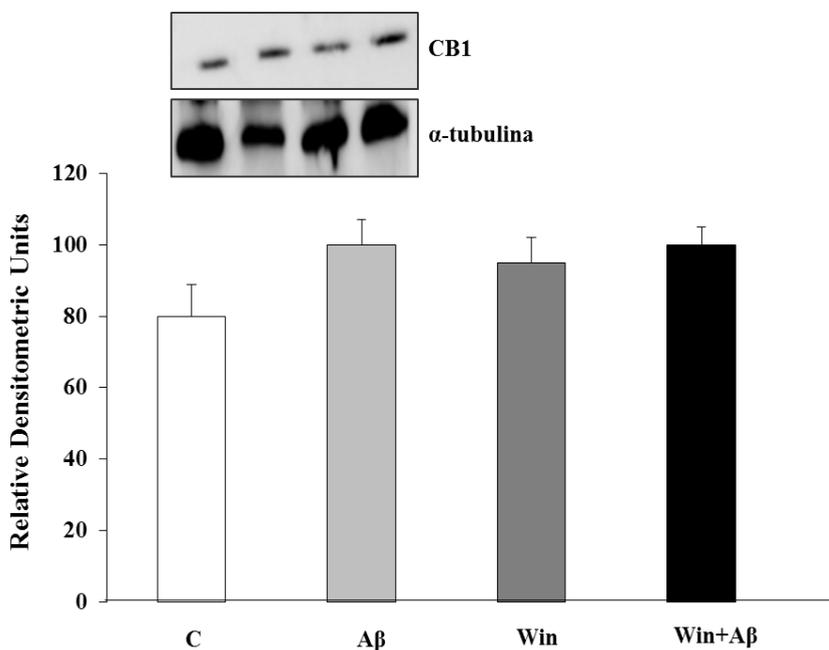


Figura 22. Expresión proteica de CB1 en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

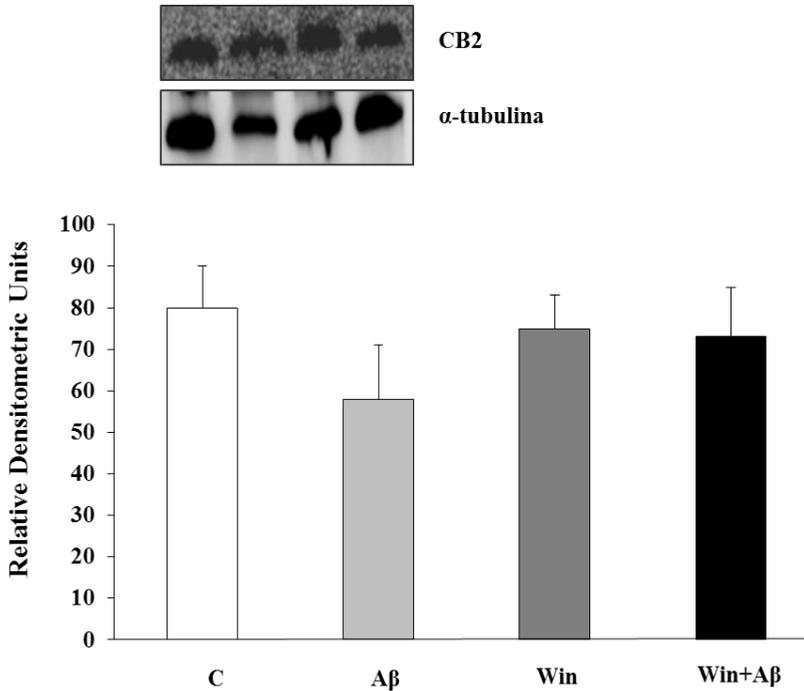


Figura 23. Expresión proteica de CB2 en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

4.9 Citoquinas pro-inflamatorias. Efecto de los cannabinoides

Para valorar los efectos anti-inflamatorios de los cannabinoides se incubaron los astrocitos durante 24 h en ausencia (control); en presencia de $A\beta_{1-42}$ (5 μ M) y en presencia de Win 10 μ M. Transcurridas las 24 h de incubación, a los cultivos incubados con Win se les añade el péptido $A\beta_{1-42}$ y tras 24 h de incubación se midió la liberación de IL-1 β y TNF- α por inmuno-ensayo enzimático (ELISA). El tratamiento con una dosis única de $A\beta$ (5 μ M) durante 24 h aumenta 4 veces la secreción de IL-1 β (120 \pm 85 vs 480 \pm 135 pg/ml; $p < 0.05$, Figura 22) y 2,6 veces los niveles de TNF- α (230 \pm 85 vs 600 \pm 120 pg/ml; $p < 0.05$, Figura 23) con respecto a los valores control. El tratamiento con Win no modifica los valores basales de IL-1 β y TNF- α , pero revierte el incremento de IL-1 β y TNF- α inducido por el péptido $A\beta_{1-42}$ (120 \pm 83 pg/ml; $p < 0.05$; 265 \pm 73 pg/ml; $p < 0.05$) respectivamente y devuelve los valores de IL-1 β a los valores control (Figuras 24 y 25). Estos resultados implican que en cultivo primario de astrocitos, la presencia del péptido $A\beta_{1-42}$ induce un aumento de los niveles de sustancias pro-inflamatorias. El tratamiento con cannabinoides exógenos protege los astrocitos del aumento de IL-1 β y TNF- α inducido por el péptido $A\beta_{1-42}$.

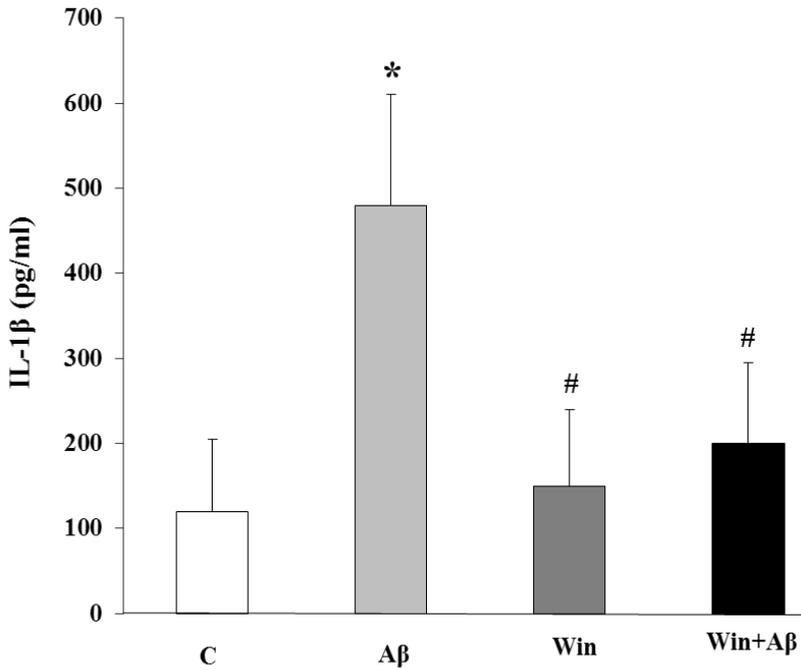


Figura 24. Niveles de IL-1 β en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M Win 55, 212-2 y 10 μ M Win 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

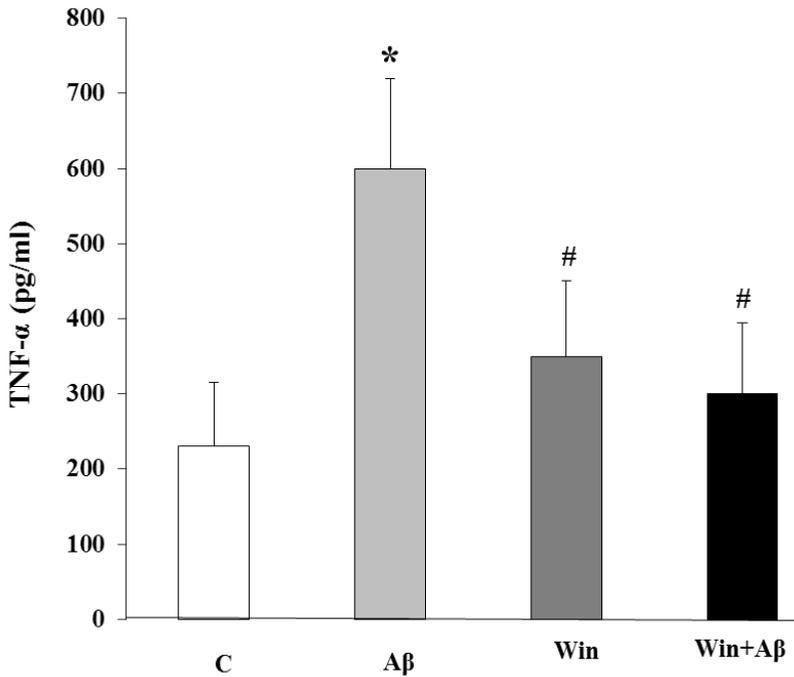


Figura 25. Niveles de TNF- α en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

4.10 Proteínas pro- y anti- inflamatorias. Efecto de los cannabinoides

Para valorar si el tratamiento con el péptido $A\beta_{1-42}$ induce cambios en la COX-2 y en la iNOS, se midió la expresión proteica de estos enzimas en cultivo primario de astrocitos, usando la técnica de Western-blot. La incubación con el tóxico $A\beta$ durante 24 h produjo un aumento significativo (de 1.6 veces) en la expresión proteica de COX-2 (Figura 26) y de 1.7 veces en la expresión proteica de iNOS (Figura 27). Win 10 μ M no modifica los valores de COX-2 ni de iNOS con respecto a los valores control (Figuras 26 y 27). El pre-tratamiento de los astrocitos durante 24 h con Win 10 μ M disminuye el incremento de la expresión proteica de COX-2 e iNOS inducida por $A\beta_{1-42}$ (Figuras 26 y 27), lo que sugiere que estos compuestos pueden proteger a las células contra estos mediadores inflamatorios inducidos por el péptido $A\beta_{1-42}$. En todos los casos se ha utilizado α -tubulina como control de la cantidad de proteína total de la muestra.

Para valorar la influencia del péptido $A\beta_{1-42}$ sobre la expresión de proteínas antiinflamatorias, se han incubado astrocitos en ausencia y en presencia del péptido $A\beta_{1-42}$. $A\beta_{1-42}$ no modifica la expresión proteica de la proteína anti-inflamatoria PPAR- γ (Figura 28). Para estudiar los efectos de los cannabinoides sobre PPAR- γ se incubaron cultivos de astrocitos en presencia de Win (10 μ M) durante 24 h y posteriormente se les añadió el péptido $A\beta_{1-42}$ durante 24 h. más. El pre-tratamiento con cannabinoides, incrementa significativamente la expresión proteica de PPAR- γ tanto en ausencia como en presencia de $\square\square$ (Figura 28).

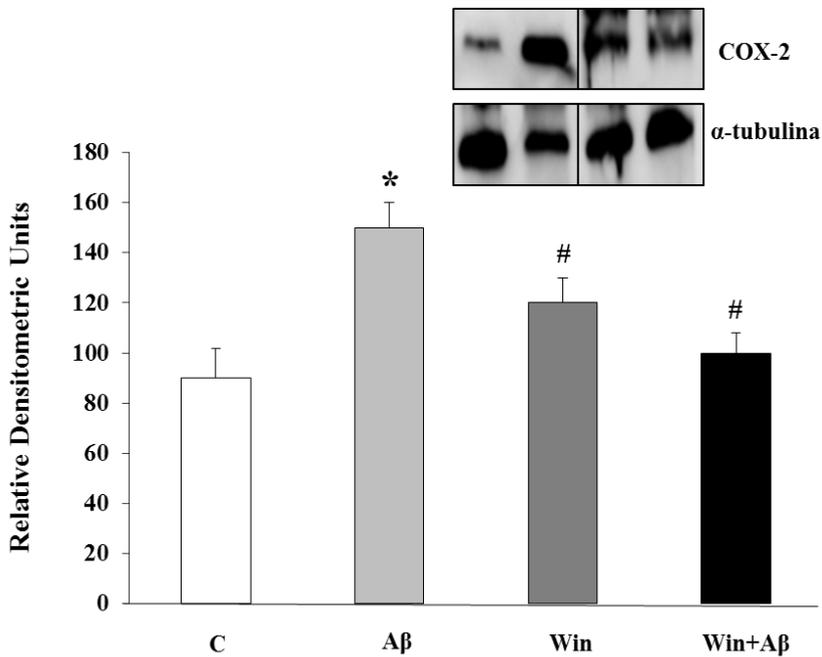


Figura 26. Expresión proteica de COX-2 en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

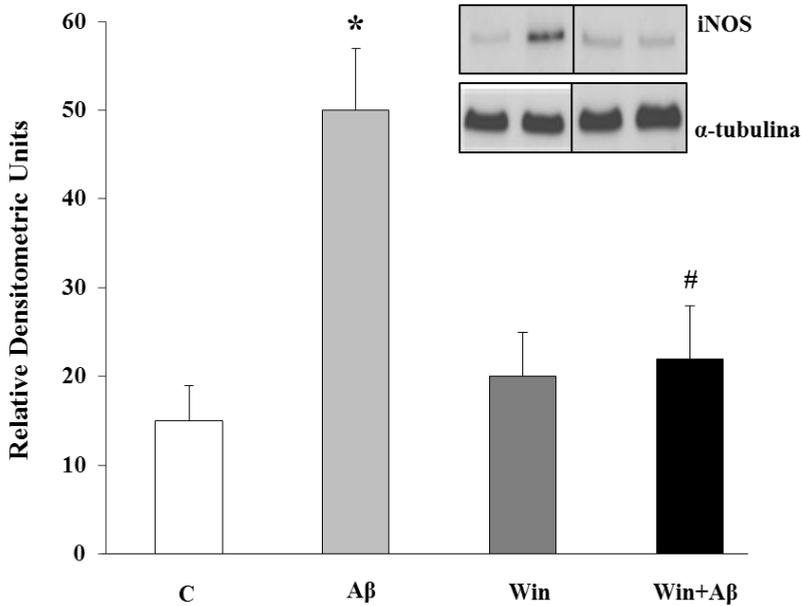


Figura 27. Expresión proteica de iNOS en cultivo primario de astrocitos tratados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

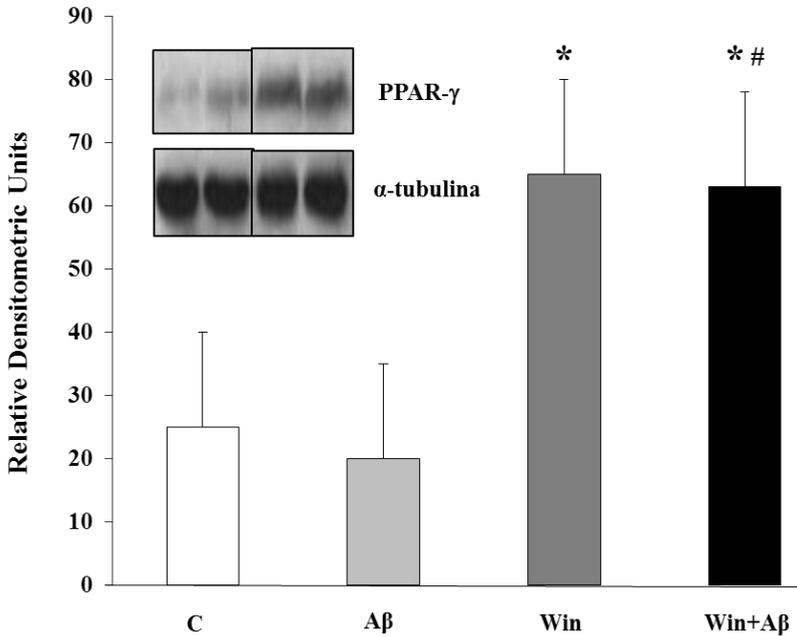


Figura 28. Expresión proteica de PPAR- γ en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μ M A β 40-1 (control, C), 5 μ M A β 1-42 (A β), 10 μ M WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μ M WIN 55, 212-2 + 5 μ M A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

4.11 Estrés oxidativo: SOD Cu/Zn, como proteína antioxidante. Efecto de los cannabinoides

Se ha valorado la capacidad antioxidante de los cannabinoides mediante la determinación de la expresión proteica del enzima antioxidante SOD Cu/Zn.

La incubación durante 24h de astrocitos con 5 μM con $\text{A}\beta_{1-42}$ disminuye la expresión proteica de SOD Cu/Zn (Figura 29). Win 10 μM no modifica la expresión proteica de SOD Cu/Zn con respecto al control, pero revierte la disminución inducida por el tratamiento con $\text{A}\beta_{1-42}$. Estos resultados sugieren que los cannabinoides pueden proteger a las células contra el estrés oxidativo incrementando la expresión de SOD Cu/Zn como proteína antioxidante.

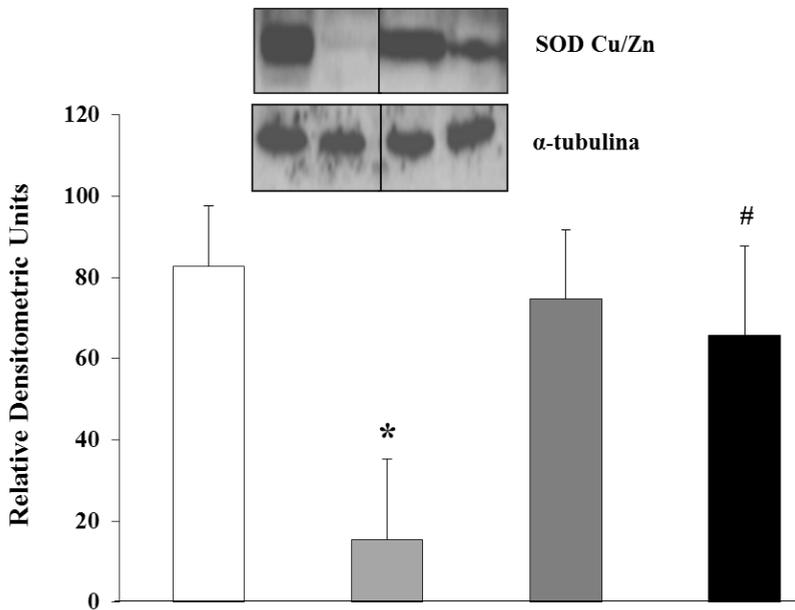


Figura 29. Expresión proteica de Cu/Zn SOD en cultivo primario de astrocitos incubados 24 h con 5 μM A β 40-1 (control, C), 5 μM A β 1-42 (A β), 10 μM WIN 55, 212-2 (Win) y 10 μM WIN 55, 212-2 + 5 μM A β 1-42 (Win+A β). El Win se añadió 24 h previamente a la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂, que se incubó durante 24 h más. Cada valor representa la media \pm D.S. de 4 experimentos independientes. Diferencias significativas vs control (* $p \leq 0,05$) y vs A β (# $p \leq 0,05$).

4.12 Ventajas y limitaciones del estudio

Una de las ventajas de trabajar con cultivos celulares primarios estriba en la posibilidad de controlar estrictamente las condiciones y composición del medio de cultivo, permitiendo por tanto el estudio del efecto de sustancias activas sobre células específicas. En este sentido nos permite estudiar mecanismos en estado puro que no están sometidos a la influencia de otros factores fisiológicos o compensatorios. Además, evita las consideraciones legales y éticas que puedan derivar del estudio con muestras humanas o en animales de experimentación.

El poder extrapolar los resultados obtenidos en los ensayos en cultivos celulares a lo que ocurre *in vivo* es una limitación a tener siempre presente, precisamente por evitar la posible influencia de mecanismos de compensación. Sin embargo, a partir de estos resultados se puede sugerir mecanismos y procesos implicados en la patología como de posibles dianas terapéuticas y estudiar los efectos de posibles tratamientos.

V. DISCUSIÓN

Durante los últimos años se ha demostrado que la inflamación y el estrés oxidativo son mecanismos claves en la progresión de diversas patologías neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer (Eikelenboom y van Gool., 2004; Zhu et al., 2004; Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013). En este estudio se han determinado marcadores implicados en la inflamación y en el estrés oxidativo inducidos por el péptido $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos, para valorar los efectos antioxidantes y anti-inflamatorios de compuestos tanto hormonales humanos (estradiol) como de origen vegetal (polifenoles y cannabinoides).

5.1. Efectos del péptido $A\beta_{1-42}$ sobre la viabilidad celular y la morfología de astrocitos en cultivo primario

El ensayo MTT es un método que está bien establecido, es utilizado con frecuencia y fácilmente reproducible para las investigaciones de la viabilidad celular, en diferentes tipos de células en cultivo y además en células incubadas con diferentes tóxicos, concretamente el $A\beta_{1-42}$ (Rönicke et al., 2008).

Los resultados obtenidos en el ensayo MTT muestran que una concentración mínima tóxica ($5\mu\text{M}$) del péptido $A\beta_{1-42}$, induce una disminución (Hou et al., 2011) de alrededor del 50% en la viabilidad celular de los astrocitos con respecto a los astrocitos control, incubados con la misma concentración de $A\beta_{40-1}$. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por inmunofluorescencia, donde se

observa un aumento de la muerte celular (Wyss-Coray y Muckie, 2002) de los astrocitos tratados con $A\beta_{1-42}$.

Cuando los astrocitos se activan en respuesta a ciertas patologías del SNC, incrementan de tamaño, y modifican su forma, presentando prolongaciones más gruesas, aumentando el número de mitocondrias, lisosomas y la actividad del retículo endoplasmático (Aguilhon et al., 2008; Guillamón-Vivancos et al., 2013). En estudios realizados previamente, se observó por inmunofluorescencia un aumento de la agregación mitocondrial (Vallés et al., 2008) en las neuronas afectadas por la adición del tóxico $A\beta_{1-42}$. En las imágenes obtenidas de astrocitos realizadas para este estudio y comparando con las imágenes obtenidas por Vallés et al (2008), se observa también una agregación mitocondrial. Datos no publicados de nuestro laboratorio, indican un posible aumento del número de mitocondrias en los astrocitos cuando se vuelven reactivos (Aguilhon et al., 2008; Guillamón-Vivancos et al., 2013), en respuesta al daño inducido por $A\beta_{1-42}$. Estos previos resultados sugieren una alteración en la dinámica mitocondrial (Pagani y Eckert., 2011; Leuner et al., 2012), que así mismo induce aumento en la producción de mediadores inflamatorios, especies reactivas de oxígeno (Mrak y Griffin., 2005) y en los niveles de estrés oxidativo (Yan et al., 2013). Todo esto se traduciría en disminución de la viabilidad y aumento de muerte celular. De hecho, la teoría de los radicales libres (Harman et al., 1956), apoya que dichos radicales participan en el envejecimiento, posteriormente esta teoría fue modificada por Miquel (Miquel J et al., 1980) que propuso que el envejecimiento era provocado por daño a las mitocondrias, que conllevarían a una cascada de problemas metabólicos y energéticos ocasionados por sustancias tóxicas. La enfermedad de Alzheimer es

una de las patologías que se ha indicado poseer mayor incidencia en el proceso del envejecimiento (Ferri et al., 2005; Dong et al., 2007; Kalaria et al., 2010; Alzheimer's Association., 2010), por lo tanto cuanto más envejecemos, la incidencia de la enfermedad aumenta de manera muy significativa, llegando a ser de alrededor de un 60-70% (Ferri et al., 2005) en personas mayores de 65 años.

5.2. Moléculas inflamatorias inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos

Determinados autores han publicado que la neurotoxicidad en el Alzheimer es mediada por procesos inflamatorios (Eikelenboom y van Gool., 2004; Zhu et al., 2004, Vallés et al., 2010) y que tanto las células gliales como los astrocitos deben producir algún factor o factores que son activados o aumentados en presencia de $A\beta_{1-42}$ o cuando se produce la hiperfosforilación de TAU. Estos factores provocarían en la célula la producción de citoquinas o mediadores pro-inflamatorios como IL-1 β y TNF- α , entre otros (Allan y Rothwell., 2001; Allan y Rothwell., 2003). Además, las sinapsis se encuentran rodeadas por las citoquinas emitidas por los astrocitos, que curiosamente rodean y co-localizan con las placas seniles de los enfermos de Alzheimer (Wallace et al., 1997; Hu et al., 1998; Liu y Hong., 2003) provocando la fagocitosis de la placa amiloidea. Estudios publicados en 2013, demuestran que los astrocitos utilizan casi todo el ATP necesario cerebral para provocar la limpieza de los tóxicos en el cerebro, ayudados obviamente por la glía (Wakabayashi y Miki., 2013; Yan et al., 2013).

Dependiendo del daño en el tiempo y en el espacio (cantidad de células dañadas), el proceso inflamatorio juega un papel destacado en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. En una primera fase la inflamación es beneficiosa, puesto que produce sustancias pro-inflamatorias que participan en la protección del tejido, ya que limitan la supervivencia y la proliferación de agentes tóxicos (Allan y Rothwell., 2001; Allan y Rothwell., 2003). Por lo tanto se limita el daño inducido por el tóxico $A\beta_{1-42}$. Si por el contrario, la producción de moléculas pro-inflamatorias no se detiene o la cantidad de proteínas anti-inflamatorias no aumenta adecuadamente, para permitir que se equilibre la balanza entre proteínas pro- y anti-inflamatorias, podría ocurrir una exacerbación de la respuesta inflamatoria y un aumento de la muerte celular como en los resultados obtenidos en este trabajo, que son consistentes con los obtenidos por Vallés et al (2010). En este trabajo se determinó la implicación de las células gliales, como los astrocitos en el proceso inflamatorio inducido por el tóxico $A\beta_{1-42}$ (Eikelenboom y van Gool., 2004; Zhu et al., 2004; McGeer et al., 2006; Yu y Chung., 2007).

En nuestros resultados se encuentran aumentados los niveles de mediadores inflamatorios (Mrak y Griffin., 2005) tales como IL-1 β y TNF- α después de la adición de $A\beta_{1-42}$, contribuyendo a la progresión del daño y aumento de la muerte celular (Wyss-Coray y Muckie, 2002; Vallés et al., 2010) presente en esta patología (Strohmeier y Rogers, 2001). En estudios realizados para determinar la activación astrogliar, en respuesta a los oligómeros $A\beta_{1-42}$ en la corteza de rata *in vivo*, se demuestra un aumento en la activación del factor nuclear transcripcional-kB (NF-kB/p-65) que inicia la reacción inflamatoria. Este factor se encuentra aumentado en astrocitos tras la

adición de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (datos no presentados en este trabajo) y también afecta la regulación de mediadores inflamatorios como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ y $COX-2$ (Carrero et al., 2012).

La respuesta inflamatoria inducida por la $IL-1$ es mediada por un sistema de receptores que envuelven básicamente tres ligandos (Dinarello 1996). El inicio de la señal ocurre a través de la unión de la $IL-1$ a un receptor heterodimérico formado por el receptor tipo 1 ($IL-1RI$) y la proteína accesoria (AcP) (Sims et al., 1988; Greenfeder et al., 1995). La unión del ligando al receptor, induce la activación del factor de transcripción $NF-\kappa B$. En resultados obtenidos por el grupo de Qvarnstrom y Dower, se ha podido demostrar que el complejo citoquina-receptor es capaz de unirse, no solo la citoquina al receptor, sino a otras proteínas de la matriz extracelular para producir señales inflamatorias, que podrían tener importancia en todas aquellas patologías ligadas a cambios en la matriz extracelular, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer (Bondareff., 2013). La $IL-1\beta$ se ha identificado como agente fundamental del proceso neurodegenerativo inducido en múltiples modelos de neuro-inflamación (Rothwell y Luheshi., 2000). Así mismo, en este estudio se observa que en cultivo primario de astrocitos el $A\beta_{1-42}$ estimula la producción de esta molécula contribuyendo a la progresión del daño.

Otro mediador inflamatorio, es el $TNF-\alpha$. En la mayoría de los estudios en el sistema nervioso central se observan, niveles aumentados tras ocurrir trauma cerebral agudo, isquemia, infecciones o enfermedades neurodegenerativas (Wang y Shuaib., 2002). La producción de $TNF-\alpha$ junto con la producción de $IL-1\beta$ e $IL-6$, se ha demostrado que contribuyen al proceso inflamatorio que se produce

por neurotoxicidad mediada en la enfermedad de Alzheimer, debido a la presencia de células gliales que contribuyen al proceso inflamatorio (McGeer et al., 2006; Yu y Ghung., 2007). Ensayos realizados por Hurtado et al (2001), observaron que al estar aumentada la liberación de TNF- α en el cerebro, se regulaba la activación de otros mediadores implicados en la neuro-inflamación generada por estrés como COX-2 e iNOS. Estos resultados corroboran los obtenidos en este estudio, donde se puede observar una respuesta similar con relación al TNF- α , donde A β_{1-42} induce aumento y liberación de esta molécula.

En general, durante los procesos inflamatorios, estos dos mediadores que inician la cascada de la respuesta inflamatoria actúan de forma sinérgica (Dinarello., 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, al estar aumentada la liberación de TNF- α e IL-1 β , se regula la activación de otros mediadores implicados en el proceso inflamatorio tales como COX-2 e iNOS. Una enzima como la COX-2 se encuentra sobre-activada en neuronas de diversas patologías del sistema nervioso central, como la isquemia, enfermedad de Alzheimer y ciertos tipos de epilepsia (Miettinen et al., 1997; Pasinetti., 1998). Nuestros resultados indican que los astrocitos también hay sobreexpresión de COX-2 inducida por A β_{1-42} . El aumento de iNOS se traduce en un incremento de la síntesis de NO que puede alcanzar niveles tóxicos que están implicados en los fenómenos de citotoxicidad que se correlacionan con diversas patologías como epilepsia, isquemia, Alzheimer, Parkinson y corea de Huntington (Moncada et al., 1991; Gross y Wolin., 1995). En estudios con cerebros de pacientes Alzheimer, se ha demostrado la sobreexpresión de iNOS (Nathan et al., 2005) y nuestros resultados

corroboran la sobreexpresión de esta enzima en los astrocitos, contribuyendo a la progresión del daño en estas células.

Se ha demostrado que estas vías inflamatorias están activadas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, el proceso inflamatorio juega un papel destacado en el desarrollo y progresión de esta enfermedad. Nuestros resultados son compatibles con los detectados en la bibliografía para estos mediadores inflamatorios.

Por otra parte, el receptor- γ activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR- γ), es un factor de transcripción activado por ligandos e influye en la expresión o actividad de varios genes, incluyendo homeostasis de la glucosa, metabolismo de la energía y la inflamación (Chen et al., 2012). Kainu et al (1994) fueron los primeros en demostrar la presencia de ARNm y de la proteína PPAR- γ en células del SNC. En estudios posteriores, se ha detectado la expresión de PPAR- γ en microglía y en astrocitos, convirtiendo así a las células gliales en posibles dianas (Luna-Medina et al., 2005; Vallés et al., 2010). Es interesante observar que fármacos anti-inflamatorios no esteroides (AINES) pueden activar este receptor en modelos animales para la enfermedad de Alzheimer y además, en pacientes con ingesta a largo plazo de AINES (ibuprofeno, indometacina, naproxeno) mostraron menor riesgo de desarrollar esta patología (McGeer y McGeer., 2004; Sastre et al., 2006; Heneka y Landreth., 2007). Se ha demostrado que agonistas de PPAR- γ proporcionan efectos neuroprotectores contra las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Wang et al., 2010, Vallés et

al., 2010; Chen et al., 2012). El estudio realizado por Wang et al (2010), mostró que la activación de PPAR- γ afecta la vía amiloidogénica. Además, se han proporcionado nuevos conocimientos sobre cómo la señalización de PPAR- γ contrarresta la toxicidad inducida por A β ₁₋₄₂ y el deterioro cognitivo en modelos animales de Alzheimer (Yamanaka et al., 2012). Con estos resultados se ha sugerido que la activación de PPAR- γ podría ser un gen candidato hacia la terapia en la enfermedad de Alzheimer.

La implicación de PPAR- γ se ha demostrado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, al encontrarse disminuida la actividad y la expresión de este receptor (Koivisto et al., 2006; Scacchi et al., 2007; Vallés et al., 2010). En los resultados obtenidos en este estudio, se confirma la implicación de este receptor, al encontrarse disminuida su expresión en los astrocitos tratados con A β ₁₋₄₂, ocasionando que la cantidad de proteína anti-inflamatoria no aumente adecuadamente y provoque que no se equilibre la balanza entre proteínas pro- y anti-inflamatorias. Nuestros resultados obtenidos en este trabajo, son consistentes con los obtenidos por Vallés et al (2010) y demás autores, donde se demuestra la implicación de este receptor en esta patología.

5.3. Moléculas de estrés oxidativo inducidas por A β ₁₋₄₂ en cultivo primario de astrocitos

Uno de los factores importantes asociados con la patología de la enfermedad de Alzheimer es el estrés oxidativo (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013).

Se ha asociado el estrés oxidativo a la toxicidad inducida por $A\beta_{1-42}$, dado que se estimula la producción de especies reactivas de oxígeno que disminuyen los niveles de GSH en la enfermedad de Alzheimer, tanto en modelos de experimentación *in vitro* (Ghosh et al., 2012) como *in vivo* (Resende et al., 2008). Se ha correlacionado la disminución de GSH con aumento de los niveles de estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer y se ha demostrado la disminución de los niveles del antioxidante glutatión (GSH) en cerebro (Saharan y Mandal., 2014). El glutatión (GSH) es un tripéptido situado en el citosol y la mitocondria, actúa como un antioxidante endógeno de vital importancia para combatir el estrés oxidativo (Abdul et al., 2006). Existen evidencias del papel clave del GSH en diversas patologías relacionadas con el envejecimiento y la neurodegeneración, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Bains y Shaw., 1997; Schulz et al., 2000; Pocernich y Butterfield., 2011). Esto es debido a que los niveles de GSH disminuyen con la edad, dejando neuronas vulnerables al daño oxidativo iniciado por $A\beta_{1-42}$ (Liu y Choi., 2000) y en consecuencia $A\beta_{1-42}$ puede llevar al agotamiento de GSH como antioxidante disponible en las neuronas. Las células gliales también participan en la regulación de los niveles de GSH. Como $A\beta_{1-42}$ disminuye la receptación de GSH por las células gliales, puede contribuir a la disminución de las defensas antioxidantes por lo que una deficiente defensa glial podría contribuir al daño neuronal existente (Heales et al., 2004). Por lo tanto, la regulación de GSH podría jugar un papel terapéutico en la enfermedad de Alzheimer (Butterfield y Lauderback., 2002).

Se ha descrito un aumento del estrés oxidativo en los ratones transgénicos con mutaciones de presenilina-1 (LaFontaine et al., 2002). Así mismo, en modelos de ratones transgénicos de Alzheimer con aumento de la expresión de la APP y en otros modelos experimentales, se ha observado aumento del daño oxidativo (Smith et al., 1998), de la peroxidación lipídica (Matsuoka et al., 2001) que precede a la formación de la placa amiloide (Reiter., 1995, Drake et al., 2003), y de la producción de nitrotirosina (Matsuoka et al., 2001), siendo indicadores de estrés oxidativo. Aunque uno de los indicadores más relevantes es el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH), en el cual existe un aumento del glutatión oxidado alterando el estado redox celular (Sies., 1986).

Datos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la concentración mínima tóxica del péptido $A\beta_{1-42}$ ($5\mu\text{M}$) provoca estrés oxidativo a las neuronas (Vallés et al., 2008) producido por la disminución del glutatión reducido (GSH), aumentando el glutatión oxidado (GSSG). En nuestros resultados, el cociente GSSG/GSH se encuentra aumentado en los astrocitos tras la incubación con $A\beta_{1-42}$, lo cual se traduce en un aumento del estrés oxidativo, presentando un desequilibrio entre la formación de pro- y anti-oxidantes celulares (Garrido et al., 2004; Bernhard y Wang 2007), por lo que ya desde hace tiempo se relacionó la unión de estrés oxidativo y enfermedad de Alzheimer. Por el contrario, estudios realizados por Abramov et al, en astrocitos (Abramov et al., 2003) y en neuronas (Abramov et al., 2004) demuestran datos contrarios a los obtenidos por la gran mayoría de los autores en la literatura.

Para contrarrestar el efecto nocivo de los radicales libres, los organismos aerobios tienen mecanismos de defensa antioxidantes, donde se incluyen moléculas, enzimas y sequestradores químicos. Dentro de la defensa antioxidante, las enzimas forman la primera línea de defensa celular frente al daño oxidativo, las cuales eliminan $O_2\cdot$ y H_2O_2 . Las enzimas que actúan sobre las especies reactivas de oxígeno inician el proceso con la dismutación de $O_2\cdot$ a H_2O_2 , por acción de la peróxido dismutasa (SOD). Posteriormente, actúa la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) convirtiendo H_2O_2 a H_2O , con lo cual estas enzimas mantienen el equilibrio redox intracelular (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez., 2013). La acumulación del daño producido por los radicales libres, induce alteraciones en las actividades o expresión de enzimas antioxidantes como la SOD y la catalasa, que se ha observado tanto en el SNC como en los tejidos periféricos de pacientes de Alzheimer (Marcus et al., 1998; Padurariu et al., 2010).

Dentro de las enzimas SOD que nos interesan, están la Cu/Zn-SOD, que se encuentra en el citoplasma y la enzima Mn-SOD, que se localiza en la mitocondria. También se ha demostrado que está alterada la expresión de Cu/Zn-SOD (Pappolla et al., 1998) y que se encuentra afectado este mecanismo antioxidante en astrocitos tratados con $A\beta_{1-42}$, al igual que en nuestros resultados. Así mismo, datos preliminares de nuestro laboratorio demuestran también, que la enzima Mn-SOD se encuentra afectada, con lo cual, el mecanismo antioxidante de la enzima SOD se encuentra alterada en los astrocitos tratados con $A\beta_{1-42}$, tanto en la enzima mitocondrial como en la forma de la enzima citoplásmica.

5.4. Efectos de polifenoles sobre la viabilidad celular de astrocitos en cultivo primario

La administración de polifenoles ha demostrado inhibir la toxicidad inducida por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de neuronas prefrontales corticales de rata, lo cual se traduce en un aumento de la viabilidad celular (Qin et al., 2012). También en estudios con neuronas del hipocampo, tratamientos con polifenoles aumentan la viabilidad celular (Menard et al., 2013) y así mismo se observa este mismo dato en astrocitos, con disminución de la muerte celular. (Yang et al., 2008; Feng et al., 2009).

Por la similitud estructural química que tiene la genisteína con el 17β -estradiol, estos compuestos tienen la capacidad de unirse a receptores estrogénicos (Setchell., 2001). Los fitoestrógenos como la genisteína, pueden actuar por vía no hormonal. Por tanto, los mecanismos de acción de estas moléculas pueden ser en dependencia de si son compuestos hormono-dependientes (mediados por receptores estrogénicos) o no hormonales (independientes del receptor estrogénicos) (Magee y Rowland., 2004).

Varios estudios han indicado que, los estrógenos promueven la supervivencia neuronal contra varias moléculas neurotóxicas incluyendo el $A\beta_{1-42}$ (Viña et al., 2007; Cizas et al., 2001; Mateos et al., 2012). Así mismo, se ha demostrado que la genisteína, ejerce un efecto neuroprotector frente a la neurotoxicidad y daño neuronal inducido por $A\beta_{1-42}$ (Yu et al., 2009; Yang et al., 2010). En neuronas de hipocampo de rata, el tratamiento previo con genisteína, aumentó

de manera significativa la viabilidad celular (Liao et al., 2013). Estos datos se corroboran con los obtenidos en este estudio.

Estudios previos han demostrado que pre-tratamiento, ya sea con concentraciones mínimas fisiológicas de 17β -estradiol (0.2 nM) o con concentraciones mínimas nutricionales de genisteína (0.5 μ M), aumentan la viabilidad celular en células MCF-7 (Borras et al., 2005; 2006; Viña et al., 2007) y de neuronas (Valles et al., 2008).

En este trabajo, hemos evidenciado que el pre-tratamiento con polifenoles, tales como la genisteína o los estrógenos (17β -estradiol), aumentan la viabilidad celular de los astrocitos en cultivo primario, y disminuyen la muerte celular inducida por $A\beta_{1-42}$, datos que son consistentes con la literatura.

5.5. Efecto de polifenoles sobre moléculas inflamatorias y estrés oxidativo inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos

Existen fuertes evidencias de que los depósitos de $A\beta_{1-42}$ y la hiperfosforilación de TAU, causan inflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial con muerte celular al final del proceso (Wallace., 2000; Lesnefsky et al., 2001; Chen et al., 2003; Abeti y Duchén., 2012). Se han buscado y se siguen buscando numerosos fármacos y/o compuestos naturales, tanto de animales como de plantas, para minimizar el efecto del daño producido por el estrés oxidativo y/o la inflamación en la enfermedad de Alzheimer. Diferentes autores han encontrado efectos beneficiosos en los polifenoles, debido a sus propiedades antioxidantes (Dai y Mumper., 2010) y anti-inflamatorias (Hoensch y Oertel., 2012). Estas propiedades les confieren un alto potencial terapéutico en el

tratamiento de diversas patologías, incluida la enfermedad de Alzheimer (Ramassamy., 2006; Simonyi et al., 2010; Choi et al, 2012).

Aunque el efecto inhibitorio del estradiol en los macrófagos del hueso en la inflamación es claro (Cuzzocrea et al., 2003), el efecto final de la acción del estradiol en la inflamación del cerebro ha sido poco analizado y sigue siendo un tema de controversia (Vegeto et al., 2006). El estudio realizado por Ghisletti et al (2005), ha demostrado un mecanismo específico para la acción del estradiol en las células inflamatorias, mostrando efectos inhibitorios para NFκB, una familia de factores de transcripción que estimulan la transcripción de genes inflamatorios. Resultados obtenidos por Vallés et al (2010) indican que el pre-tratamiento con estradiol protege a los astrocitos contra insultos tóxicos como el Aβ₁₋₄₂, al reducir los niveles de moléculas inflamatorias liberadoras como IL-1β y TNF-α y la expresión de proteínas intracelulares como iNOS y COX-2. Por lo tanto, el estradiol ejerce un efecto anti-inflamatorio claro favoreciendo la recuperación del daño y además nuestros resultados son consistentes con los obtenidos por Vallés et al (2010) y corroboran estos resultados.

El efecto anti-inflamatorio que ejerce el estradiol podría estar mediado por la activación del receptor PPAR-γ, ya que en estudios previos realizados por Vallés et al (2010), se indujo un aumento en la expresión proteica de este receptor en los astrocitos pre-tratados con estradiol y se ha demostrado que agonistas de PPAR-γ proporcionan efectos neuro-protectores contra las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Wang et al., 2010, Vallés et al., 2010; Chen et al., 2012). Así mismo, en estudios *in vitro*

realizados por Dang et al (2003) demostraron que la genisteína actuaba como agonista del receptor PPAR- γ . Estudios previos realizados por Vallés et al., apoyan la activación de estos receptores en astrocitos pre-tratados con genisteína (Vallés et al., 2010). En nuestros resultados, se observa que el pre-tratamiento con genisteína induce también la activación de PPAR- γ , indicando una acción anti-inflamatoria de este tipo de receptor en astrocitos en cultivo primario. También en estudios anteriores, se demuestra que la genisteína inhibe o reduce la producción de TNF- α , así como la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico en los macrófagos activados por LPS, un efecto asociado con la inhibición por parte de la genisteína sobre la vía de NFkB (Genolet et al., 2004; Wan et al., 2007; Comalada et al., 2006). En estudios con astrocitos en cultivo primario, se ha demostrado que la genisteína puede prevenir la inflamación inducida por A β_{1-42} (Steele y Robinson., 2012), al inhibir la expresión de iNOS y COX-2 (Lu et al., 2009; Vallés et al., 2010). En los datos obtenidos en este estudio, se observa que el pre-tratamiento con genisteína redujo también los niveles de moléculas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α y expresión de proteínas como iNOS y COX-2. Estos resultados son consistentes con los descritos en la literatura. En conclusión, tanto el estradiol como la genisteína ejercen efectos anti-inflamatorios en los astrocitos cuando se pre-tratan 24 horas antes de añadir el tóxico A β_{1-42} .

El estrés oxidativo, se ha correlacionado con la disminución de enzimas antioxidantes como GSH. Se ha demostrado que la disminución de los niveles de este antioxidante en cerebro de pacientes con Alzheimer, (Saharan y Mandal., 2014) presentan aumento de estrés oxidativo al encontrarse elevados los niveles del

cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH). Además, el aumento de estrés oxidativo se ha correlacionado con un aumento en la incidencia de esta patología. Por otra parte, la enfermedad se produce en mayor número en mujeres que en hombres (Andersen et al., 1999; Di Carlo et al., 2002; Henderson., 2013), lo cual apoya la idea de que compuestos estrogénicos pueden aumentar la expresión de enzimas antioxidantes, que conduciría a la disminución de estrés oxidativo y protección contra la toxicidad del péptido β -amiloide (Viña et al., 2007; Ma et al., 2010; Gamba et al., 2011; Ding et al., 2011). Se ha demostrado que los estrógenos protegen a las neuronas contra las moléculas inflamatorias, inducidas por la reacción crónica inflamatoria (Simpkins et al., 2009), que se traduce en una disminución de estrés oxidativo y protección contra la toxicidad del péptido $A\beta_{1-42}$. La modulación del estado oxidativo inducido por $A\beta$, se ha especulado que podría tener un potencial terapéutico en la enfermedad de Alzheimer. Borrás et al (2005) publicaron que el 17 β -estradiol puede aliviar el estrés oxidativo, facilitando la expresión de enzimas antioxidantes, incluyendo SOD y GSH-Px (Borrás et al., 2005). En el estudio realizado por Vallés et al (2008), el pre-tratamiento con estradiol, reduce los niveles de estrés oxidativo (GSSG/GSH), al reducir los niveles de glutatión oxidado (GSSG). Los resultados obtenidos en este estudio, se corroboran con los obtenidos por Vallés et al (2008) y la literatura, donde se observa una disminución del estrés oxidativo en los astrocitos pre-tratados con estradiol. Por otra parte, evidencias clínicas y experimentales han demostrado que la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos puede ser beneficiosa para la prevención de la enfermedad de Alzheimer en las mujeres posmenopáusicas (Ohkura et al., 1994;

Asthana et al., 1999; Shaywitz et al., 2003; Canderelli et al., 2007; Valen-Sendstad et al., 2010). Sin embargo, se ha puesto en peligro el uso de estrógenos debido al aumento del riesgo de desarrollar tanto cáncer de mama como de endometrio, en las mujeres que toman terapia de reemplazo de estrógenos. Por esta razón, la búsqueda de sustitutos estrogénicos eficaces y seguros se convirtió en una cuestión práctica y se planteó el uso de fitoestrógenos procedentes de plantas, tales como la genisteína, principal polifenol de la soja. Estos polifenoles se convirtieron en posibles alternativas a los estrógenos, ya que tiene efectos farmacológicos no hormonales (Bang et al., 2004).

La genisteína también es capaz de inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno y mejorar la actividad de enzimas antioxidantes (Hsieh et al., 2001), demostrando un efecto neuroprotector a través de la supresión de la activación de NF- κ B. Este factor es inducido bajo estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno en cultivos primarios astroglicales (Caccamo et al., 2005). Resultados obtenidos por Vallés et al (2008) sugieren que la genisteína protege a las neuronas contra el estrés oxidativo inducido por la toxicidad de A β ₁₋₄₂ y el efecto fue similar al del 17 β -estradiol. En esta tesis los ensayos se realizaron con astrocitos en cultivo primario produciéndose, al igual que en neuronas (Vallés et al., 2008), una disminución del estrés oxidativo cuando los astrocitos fueron pre-tratados con genisteína, resultados que son consistentes con la literatura. Los datos indican que los efectos protectores de la genisteína son similares al 17 β -estradiol y se podría usar como alternativa a los estrógenos para la prevención y progresión de los trastornos neurodegenerativos crónicos, donde se encuentran implicados tanto los astrocitos como las neuronas en la enfermedad de

Alzheimer. El uso de la genisteína en mujeres posmenopáusicas abriría un nuevo campo para el tratamiento del daño oxidativo en astrocitos en esta patología, siendo posiblemente más seguro que el uso de la propia hormona. Aun así, la eficacia clínica de la genisteína requiere de ensayos más amplios y rigurosos para continuar con su uso.

En resumen, estradiol o genisteína disminuyen mediadores pro-inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , iNOS y COX-2) y aumentan los mediadores anti-inflamatorios (PPAR- γ). También se produce la disminución de moléculas pro-oxidantes (GSSH) y el mantenimiento de moléculas anti-oxidantes (GSH), que se traduce en una disminución del estrés oxidativo en los astrocitos en cultivo primario pre-tratados con estradiol o genisteína y la posterior adición del péptido A β ₁₋₄₂.

5.6. Efectos de cannabinoides sobre la viabilidad celular de astrocitos en cultivo primario

Existen evidencias de efectos tanto beneficiosos como perjudiciales de los cannabinoides sobre la supervivencia de diversas células en cultivo (Guzmán et al., 2002). En la literatura se encuentra estudios de cáncer, que concluyen que tratamiento con cannabinoides inhiben la proliferación de células cancerígenas, siendo más eficaz a concentraciones muy altas (20nM) (Pourkhalili et al., 2013) y por tanto una disminución en la viabilidad celular en este tipo de células, que se traduce en efectos anti-proliferativos (Olea-Herrero et al., 2009; Wang et al., 2010; De Petrocellis et al., 2013 Rocha et al., 2014). En nuestros resultados en cultivo de astrocitos, la incubación con

cannabinoides (WIN 55, 212-2: 10 μ M) contrarresta la disminución de la viabilidad celular inducida por el $A\beta_{1-42}$, aumentando la viabilidad en un 40% con respecto a los astrocitos incubados solo con $A\beta_{1-42}$ y se aproxima a una viabilidad casi del 100% con respecto a los astrocitos control. Estos efectos contrarios se deben a que diversos tipos de células pueden reaccionar de manera diferente frente al mismo cannabinoide (Sánchez et al., 1998). Cabe destacar que las células cancerosas son células muy proliferativas y no diferenciadas. En cambio los astrocitos, al tiempo que nosotros introducimos el tóxico ($A\beta_{1-42}$), son células totalmente diferenciadas. Por lo tanto, el efecto de los cannabinoides sobre los mecanismos implicados en la muerte celular depende de la patología y del tipo de célula implicada.

Los cannabinoides han demostrado proteger a las células neuronales frente a la exposición de $A\beta$ (Milton., 2002) inhibiendo la apoptosis (Iuvone et al., 2004). Estudios realizados por Esposito et al (2006), demuestra que las células neuronales pre-tratadas con cannabinoides mantuvieron los niveles más altos de viabilidad celular, ejerciendo un efecto neuroprotector inducido por la activación de vías anti-apoptóticas en respuesta al daño inducido por $A\beta$ (Milton., 2002; Mnich et al., 2010). Así mismo, los cannabinoides han demostrado proteger a células gliales de la muerte celular (Marsicano et al., 2002; Gómez del Pulgar et al., 2002). Por tanto, los cannabinoides pueden aumentar la viabilidad celular en células neurales. Datos que corroboran los resultados obtenidos en este estudio.

5.7. Efecto de cannabinoides sobre moléculas inflamatorias y estrés oxidativo inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos

Por la amplia distribución de los receptores cannabinoides, la utilidad terapéutica de compuestos cannabinoides (Scuderi et al., 2011), es un área relativamente nueva de investigación, que tiene mucho futuro para el desarrollo de tratamientos eficaces para diversas patologías, incluida la enfermedad de Alzheimer. Existen amplias evidencias de la implicación de la inflamación y el estrés oxidativo presentes en la enfermedad de Alzheimer (Wallace., 2000; Lesnefsky et al., 2001; Chen et al., 2003; Abeti y Duchen., 2012). En los últimos años, se han buscado fármacos y/o compuestos naturales, para disminuir el efecto del daño producido por el estrés oxidativo y/o la inflamación en esta patología. En la enfermedad de Alzheimer, se conoce la implicación de las células astrogliales en esta patología, que pueden proporcionar una diana terapéutica, y cualquier compuesto capaz de modular la activación de los astrocitos podría ser considerado como nuevo fármaco de relevancia terapéutica (Bélanger y Magistretti., 2009). Se han propuesto los cannabinoides como tratamiento preventivo para la enfermedad de Alzheimer (Ramírez et al., 2005; Campbell y Gowran., 2007) por sus efectos neuroprotectores (Mechoulam et al., 2002; van der Stelt et al., 2002) y por su capacidad para modular funciones del sistema inmune (Klein et al., 2003; Pandey et al., 2009) ejerciendo efectos anti-inflamatorios (Walter y Stella., 2004; Klein., 2005; Correa et al., 2009).

Estudios recientes, han demostrado que los cannabinoides mitigan la activación de los astrocitos en la neuro-inflamación inducida por A β en cultivo primario de astrocitos, al reducir los niveles de moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF- α , COX-2 e iNOS (Sheng et al., 2005; Ramírez et al., 2005; Ehrhart et al., 2005; Esposito et al., 2007; Scuderi et al., 2011; Burgos et al., 2012). También la activación de los receptores cannabinoides, tienen efectos anti-inflamatorios y neuro-protectores, al demostrarse una reducción en la liberación de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en microglía (Puffenbarger et al., 2000; Facchinetti et al., 2003) y astrocitos (Ortega -Gutiérrez et al., 2005), así como de COX-2 e iNOS (Castillo et al., 2010). En nuestros resultados con astrocitos, se observa también la activación de los receptores cannabinoides tanto CB1 como CB2, al igual que una reducción de moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF- α , COX-2 e iNOS. También en ensayos *in vivo*, el tratamiento con el cannabinoide sintético WIN 55, 212-2, impidió el deterioro cognitivo, la activación glial y la pérdida neuronal en ratas tratadas con el péptido A β (Ramírez et al., 2005; Martín-Moreno et al., 2011), además disminución de los niveles de COX-2 y TNF- α (Martín-Moreno et al., 2012). Estos últimos datos corroboran nuestros resultados donde el pre-tratamiento de los astrocitos con cannabinoides, redujo los niveles de TNF- α y COX-2. Así mismo, las células pre-tratadas con cannabinoides redujeron los niveles de nitritos y la expresión de iNOS tras la adición del tóxico A β (Esposito et al., 2006).

Por otra parte, se ha demostrado que agonistas de PPAR- γ proporcionan efectos neuroprotectores contra las enfermedades

neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Wang et al., 2010, Vallés et al., 2010; Chen et al., 2012). Los efectos neuroprotectores ejercidos por agonistas de PPAR- γ , en condiciones neuropatológicas, incluidas la neuro-inflamación inducida por A β y la neurodegeneración se han descrito en los últimos años (Bright et al., 2008, Vallés et al., 2010). Los datos indican también que las neuronas y los astrocitos son células diana para efectos beneficiosos de los ligandos PPAR- γ (Landreth et al., 2008, Vallés et al., 2010). Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC, una vez estas células se vuelven reactivas, producen moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria, que contribuye de manera significativa en el daño cerebral. Además, los astrocitos expresan los niveles más altos de PPAR- γ en el SNC (Bodles y Barger., 2005; Ho et al., 2005). Agonistas de PPAR- γ pueden regular una activación inflamatoria prolongada ejerciendo efectos anti-inflamatorios y neuroprotectores (Kapadia et al., 2008). Estudios realizados por Esposito et al (2011), han demostrado que los cannabinoides pueden ejercer efectos protectores por medio de una activación dependiente de PPAR- γ . En nuestros resultados se observa que en los astrocitos pre-tratados con cannabinoides se induce un aumento en la expresión de este receptor, lo cual sugiere que compuestos cannabinoides protegen contra la inflamación inducida por la toxicidad de A β ₁₋₄₂.

Son pocos los estudios que se encuentran en la literatura, del efecto de los cannabinoides sobre los niveles del estrés oxidativo. Los cannabinoides pueden atenuar el estrés oxidativo y la toxicidad subsecuente en neuronas corticales en cultivo primario (Hampson y Grimaldi., 2001), antagonizan el estrés oxidativo inducido en células

linfoblastoides (Chen y Buck., 2000) y previenen el daño oxidativo inducido en cultivos neuronales (Hampson et al., 1998). Así mismo, estudios con células PC12, muestran los efectos neuroprotectores de los cannabinoides frente al péptido $A\beta_{1-42}$ reduciendo los niveles de estrés oxidativo (Iuvone et al., 2004). En nuestros resultados, el pre-tratamiento de los astrocitos con cannabinoides, indujo un aumento en la enzima anti-oxidante citoplasmática Cu/Zn-SOD que se encuentra reducida en los astrocitos tratados con $A\beta_{1-42}$, lo cual nos indicaría una protección frente al estrés oxidativo inducido por $A\beta_{1-42}$.

Datos preclínicos sugieren el uso de medicamentos a base de cannabinoides para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Volicer et al., 1997; Walther et al., 2006). En el año 2003 se concede la patente en EEUU para el uso de cannabinoides como antioxidantes y neuroprotectores (U.S Department of Health and Human Services, www.fda.gov). A pesar de estos resultados prometedores, el uso de medicamentos a base de cannabinoides para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer está a la espera de resultados de ensayos clínicos rigurosos (Krishnan et al., 2009).

En resumen, nuestros resultados demuestran que cannabinoides, son capaces de reducir la inflamación y estrés oxidativo asociados a la enfermedad de Alzheimer, mediante el aumento de la expresión proteica de PPAR- γ en astrocitos en cultivo primario, lo que demuestra sus efectos anti-inflamatorios y el aumento de la expresión de SOD Cu/Zn, lo que demuestra sus efectos antioxidantes. Todos estos resultados refuerzan la hipótesis de que los mecanismos inflamatorios y de estrés oxidativo contribuyen significativamente a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y

sugieren el uso de compuestos naturales como los cannabinoides (sin componente psicoactivo) para disminuir la progresión del daño.

VI. CONCLUSIONES

Efectos sobre la viabilidad celular y la morfología de astrocitos en cultivo primario:

1. $A\beta_{1-42}$ genera un aumento en la agregación mitocondrial e incremento de la muerte celular de los astrocitos de alrededor del 50%, compatible con la disfunción mitocondrial de los astrocitos presente en la enfermedad de Alzheimer.
2. La adición de 17β -estradiol, genisteína o cannabinoides, produce un aumento en la viabilidad celular de los astrocitos previniendo la muerte celular inducida por $A\beta_{1-42}$.

Moléculas inflamatorias inducidas por $A\beta_{1-42}$ en cultivo primario de astrocitos. Efectos de polifenoles y cannabinoides:

3. $A\beta_{1-42}$ produce un aumento de los niveles de mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF- α , COX-2 e iNOS y una disminución de la expresión de proteínas anti-inflamatorias como PPAR- γ .
4. La pre-incubación con estradiol, genisteína o Win reducen los niveles de mediadores inflamatorios como IL-1 β , TNF- α , COX-2 e iNOS inducidas por $A\beta_{1-42}$ e inducir la expresión de proteínas anti-inflamatorias como PPAR- γ .

Moléculas de estrés oxidativo inducidas por A β ₁₋₄₂ en cultivo primario de astrocitos. Efectos de polifenoles y cannabinoides:

5. A β ₁₋₄₂ induce aumento del glutatión oxidado produciendo aumentando el cociente GSSG/GSH.

6. La pre-incubación con estradiol, genisteína o Win reducen los niveles de estrés oxidativo (GSSG/GSH) y aumentan los niveles de proteínas anti-oxidantes como Cu/Zn SOD.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1):41-53.

Abdul HM, Calabrese V, Calvani M, Butterfield DA. (2006). Acetyl-L-carnitine-induced up regulation of heat shock proteins protects cortical neurons against amyloid-beta peptide 1-42-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 84(2):398-408.

Abeti R, Duchen MR. (2012). Activation of PARP by Oxidative Stress Induced by β -Amyloid: Implications for Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* 37(11):2589-96.

Aboud ME, Rizvi G, Sallapudi N, McAllister SD. (2011). Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neurosci Lett* 309(3):197-201.

Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. (2003). Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J Neurosci* 23(12):5088-95.

Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. (2004). Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta* 1742(1-3):81-7.

Agencia Europea de Medicamentos, EMA, www.ema.europa.eu

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS, www.aemps.gob.es

Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. (2010). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 16(25):2766-78.

Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. (2005). The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J* 19(12):1704-6.

Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiocco TA, McCarthy KD. (2008). What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59(6):932-46.

Agurell S, Halldin M, Lindgren JE, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H, Hollister L. (1986). Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev* 38(1):21-43.

- Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM., Haqqi TM. (2002). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 1097–1105.
- Allan SM, Rothwell NJ. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2(10):734-44.
- Allan SM, Rothwell NJ. (2003). Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1438):1669-77.
- Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74(3):342-52.
- Alvarez-de-la-Rosa M, Silva I, Nilsen J, Pérez MM, García-Segura LM, Avila J, Naftolin F. (2005). Estradiol prevents neural tau hyperphosphorylation characteristic of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1052:210-24.
- Ames D, Kaduszkiewicz H, van den Bussche H, Zimmermann T, Birks J, Ashby D. (2008). For debate: is the evidence for the efficacy of cholinesterase inhibitors in the symptomatic treatment of Alzheimer's disease convincing or not? *Int Psychogeriatr* 20(2):259-92.
- Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology* 53(9):1992-7.
- Appendino G, Cascio MG, Bacchiaga S, Moriello AS, Minassi A, Thomas A, Ross R, Pertwee R, De Petrocellis L, Di Marzo V. (2006). First "hybrid" ligands of vanilloid TRPV1 and cannabinoid CB2 receptors and non-polyunsaturated fatty acid-derived CB2-selective ligands. *FEBS Lett* 580(2):568-74.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1(1):103-16.
- Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301(1):231-5.

Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrela JM, Viña J. (1994). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem* 217(2):323-8.

Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela JM. (2011). Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48(5-6):197-216.

Ashkenazi A, Dixit VM. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Ashton CH. (1999). Adverse effects of cannabis and cannabinoids. *Br J Anaesth* 83(4):637-49.

Asthana, S, Craft, S, Baker, LD, Raskind, MA, Birnbaum, RS, Lofgreen, CP, Veith, RC, Plymate, SR. (1999). Cognitive and neuroendocrine response to transdermal estrogen in postmenopausal women with Alzheimer's disease: results of a placebo-controlled, double-blind, pilot study. *Psychoneuroendocrinology* 24, 657-677.

Auld DS, Robitaille R. (2003). Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40(2):389-400.

Azizi SA, Krynska B. (2013). Derivation of neuronal cells from fetal normal human astrocytes (NHA). *Methods Mol Biol* 1078:89-96.

Baehrecke E.H. (2002). How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 779-787.

Bains JS, Shaw CA. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: The role of glutathione in oxidative stress mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev* 25, 335-358.

Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ. (2004) Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 145(11):5021-32.

Balcz B, Kirchner L, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. (2001). Increased brain protein levels of carbonyl reductase and alcohol dehydrogenase in Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 61 (Suppl): S193-201.

Baliga MS, Katiyar SK. (2006). Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem Photobiol Sci* 5(2):243-53.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16(1):1-13.

- Bal-Price A, Brown GC. (2001). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 21(17):6480-91.
- Bang OY, Hong HS, Kim DH, Boo JH, Huh K, Mook-Jung I. (2004). Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiol Dis* (16):21–28.
- Barnum SR. (2002). Complement in central nervous system inflammation. *Immunol Res* 26(1-3):7-13.
- Bastianetto S, Krantic S, Chabot JG, Quirion R. (2011). Possible involvement of programmed cell death pathways in the neuroprotective action of polyphenols. *Curr Alzheimer Res* 8(5):445-51.
- Bauman J. (1980). Health Consequence of Marijuana Use. *US Government Printing Office*: Washington, Marijuana and the female reproductive system; pp. 85–97.
- Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV. (1995) Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* 10(2):89-97.
- Bélanger M, Magistretti PJ. (2009). The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci* 11(3):281-95.
- Bell MR, D'Ambra TE, Kumar V, Eissenstat MA, Herrmann JL Jr, Wetzel JR, Rosi D, Phillion RE, Daum SJ, Hlasta DJ, et al. (1991). Antinociceptive (aminoalkyl)indoles. *J Med Chem* 34(3):1099-110.
- Ben Amar M. (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol* 105(1-2):1-25.
- Bernhard D, Wang XL. (2007). Smoking, oxidative stress and cardiovascular diseases—do anti-oxidative therapies fail? *Curr Med Chem* 14(16):1703-12.
- Birks J, Grimley Evans J, Iakovidou V, Tsolaki M, Holt FE. (2009). Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD001191
- .
Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368(9533):387-403.
- Bodles AM, Barger SW. (2005). Secreted β -amyloid precursor protein activates microglia via JNK and p38-MAPK. *Neurobiol Aging* 26:9–16.

Bondareff W. (2013). Age-related changes in brain extracellular space affect processing of amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 35(1):1-6.

Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardó FV, Mann GE, Viña J. (2005). 17 β -oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NF κ B cascade. *Aging Cell* 4(3):113-8.

Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardó FV, Mann GE, Viña J. (2006). Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NF κ B. *FASEB J* 20(12):2136-8.

Bradford HF. (1988). Células Gliales: Células de soporte mecánico y funcional del sistema nervioso. Fundamentos de Neuroquímica, Barcelona, *Labor*.

Bras M, Queenan B, Susin SA. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* 70, 231-239.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-33.

Brigelius R. (1983). Glutathione oxidation and activation of pentose phosphate cycle during hydroperoxide metabolism. A comparison of livers from fed and fasted rats. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 364(8):989-96.

Brosková Z, Drábíková K, Sotníková R, Fialová S, Knezl V. (2013). Effect of plant polyphenols on ischemia-reperfusion injury of the isolated rat heart and vessels. *Phytother Res* 27(7):1018-22.

Brown SM, Wager-Miller J, Mackie K. (2002). Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1576(3):255-64.

Brunk UT, Terman A. (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 269:1996-2002.

Burgos E, Gómez-Nicola D, Pascual D, Martín MI, Nieto-Sampedro M, Goicoechea C. (2012). Cannabinoid agonist WIN 55,212-2 prevents the development of paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. Possible involvement of spinal glial cells. *Eur J Pharmacol* 682(1-3):62-72.

Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, Lister C, Matthews D, MacLean M.R, Lean ME, Duthie GG, Crozier A. (2000). Relation-ship

among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 220–230.

Burstein S, Budrow J, Debatis M, Hunter SA, Subramanian A. (1994). Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid. *Biochem Pharmacol* 48(6):1253-64.

Butterfield DA, Lauderback CM. (2002). Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 32:1050–1060.

Cabral GA, Harmon KN, Carlisle SJ. (2001). Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB1 receptor participation. *Adv Exp Med Biol* 493:207-14.

Cabral GA, Marciano-Cabral F. (2005). Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol* 78(6):1192-7.

Caccamo D, Campisi A, Currò M, Bramanti V, Tringali M, Li Volti G, Vanella A, Ientile R. (2005). Antioxidant treatment inhibited glutamate-evoked NF-kappaB activation in primary astroglial cell cultures. *Neurotoxicology* 26(5):915-21.

Cajal SR. (1913). Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 11: 255-315.

Camins A, Pallas M, Silvestre JS. (2008). Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30:43-65.

Campbell VA, Gowran A. (2007). Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids? *Br J Pharmacol* 152:655-662.

Canderelli R, Leccesse LA, Miller NL, Unruh Davidson J. (2007). Benefits of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J. Am. Acad. Nurse Pract* 19, 635–641.

Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, Marambaud P. (2012). Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and Aβ-mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-kappaB/STAT signaling cascade. *Journal of Neurochemistry* 120, 461–472.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47(4):936-42.

Carney JM, Smith CD, Carney AM, Butterfield DA. (1994). Aging and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. *Ann NY Acad Sci* 738: 44-53.

Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, Sanz-Anquela JM, Arévalo-Serrano J, Gonzalo-Ruiz A. (2012). Oligomers of β -amyloid protein (A β 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α , and a nuclear factor κ -B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol* 236(2):215-27.

Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. (2004). Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65(4):999-1007.

Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J. (2010). The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis* 37(2):434-40.

Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A. (2002). The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132(1):1-15.

Chen Y, Swanson RA. (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 137-149.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278(38):36027-31.

Chen YC, Wu JS, Tsai HD, Huang CY, Chen JJ, Sun GY, Lin TN. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 46:114–124.

Chen Y, Buck J. (2000). Cannabinoids protect cells from oxidative cell death: a receptor-independent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 293, 807–812.

Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, WHI Investigators. (2010). Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 304, 1684–1692.

- Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ. (2012). Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 87(2-3):144-53.
- Chong YH, Sung JH, Shin SA, Chung JH, Suh YH. (2001). Effects of the beta-amyloid and carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein on the production of the tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-9 by human monocytic THP-1. *J Biol Chem* 276(26):23511-7.
- Chukwumah, Y., Walker, L., Vogler, B., Verghese, M. (2007). Changes in the phytochemical composition and profile of raw, boiled, and roasted peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9266–9273.
- Citraro R, Russo E, Ngomba RT, Nicoletti F, Scicchitano F, Whalley BJ, Calignano A, De Sarro G. (2013). CB1 agonists, locally applied to the cortico-thalamic circuit of rats with genetic absence epilepsy, reduce epileptic manifestations. *Epilepsy Res* 106(1-2):74-82.
- Cizas P, Jekabsonė A, Borutaitė V, Morkūnienė R. (2011). Prevention of amyloid-beta oligomer-induced neuronal death by EGTA, estradiol, and endocytosis inhibitor. *Medicina (Kaunas)* 47(2):107-12.
- Comalada M, Ballester I, Bailón E, Sierra S, Xaus J, Gálvez J, de Medina FS, Zarzuelo A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 72(8):1010-21.
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. (2001). beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21(4):1179-88.
- Compston A, Coles A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372 (9648): 1502–17.
- Condie R, Herring A, Koh WS, Lee M, Kaminski NE. (1996). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2. *J Biol Chem* 271(22):13175-83.
- Cone EJ, Johnson RE, Moore JD, Roache JD. (1986). Acute effects of smoking marijuana on hormones, subjective effects and performance in male human subjects. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1749–1754.

- Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G. (2002). Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 135(1):181-7.
- Corbo JM, Brown JN, Moss JM. (2013). Galantamine-associated nightmares and anxiety. *Consult Pharm* 28(4):243-6.
- Correa FG, Mestre L, Docagne F, Borrell J, Guaza C. (2009). The endocannabinoid anandamide from immunomodulation to neuroprotection. Implications for multiple sclerosis. *Vitam Horm* 81:207-230.
- Costacou T, Evans RW, Schafer GL, Orchard TJ. (2013). Oxidative stress and response in relation to coronary artery disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 36(11):3503-9.
- 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(3):423-31.
- Craig MC, Murphy DG. (2009). Alzheimer's disease in women. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 23(1):53-61.
- Cribbs DH, Poon WW, Rissman RA, Blurton-Jones M. (2004). Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 165:353-355.
- 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(4):1405-15.
- Cuenca-López MD, Brea D, Segura T, Galindo MF, Antón-Martínez D, Agulla J, Castillo J, Jordán J. (2010). Inflammation as a therapeutic agent in cerebral infarction: cellular inflammatory response and inflammatory mediators. *Rev Neurol* 50(6):349-59.
- Cuerda MC, Bretón I, Cambor M, García P. (1998). Modulación farmacológica del apetito. *Nutr Hosp* 13: 69-75.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Genovese T, Di Paola R, Ruggeri Z, Vegeto E, Caputi AP, Van De Loo FA, Puzzolo D, Maggi A. (2003). Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology* 144(3):1098-107.

- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci* 11(4):1321-42.
- D'Ambra TE, Estep KG, Bell MR, Eissenstat MA, Josef KA, Ward SJ, Haycock DA, Baizman ER, Casiano FM, Beglin NC, et al. (1992). Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 35(1):124-35.
- Dai J, Mumper RJ. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-52.
- Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116(2):205-19.
- Day N, Sambamoorthi U, Taylor P, Richardson G, Robles N, Jhon Y, Scher M, Stoffer D, Cornelius M, Jasperse D. (1991). Prenatal marijuana use and neonatal outcome. *Neurotoxicol Teratol* 13(3):329-34.
- Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA, Löwik CW. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem* 278(2):962-7.
- Davoust N, Vuailat C, Androdias G, Nataf S. (2008). From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol* 29(5):227-34.
- Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G. (2000). Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med* 29(12):1234-43.
- Degtrev A, Yuan J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5):378-90.
- Dei R, Takeda A, Niwa H, Li M, Nakagomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Washimi Y, Yasuda Y, Horie K, Miyata T, Sobue G. (2002). Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 104(2):113-22.
- Denizot F, Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89(2):271-7.
- De Sant'Anna M, Morat B. (2013). Non-drug-based management of Alzheimer's disease. *Soins Gerontol* (102):15-8.

- de Oliveira GP, Duobles T, Castelucci P, Chadi G. (2010). Differential regulation of FGF-2 in neurons and reactive astrocytes of axotomized rat hypoglossal nucleus. A possible therapeutic target for neuroprotection in peripheral nerve pathology. *Acta Histochem* 112(6):604-17.
- De Petrocellis L, Ligresti A, Schiano Moriello A, Iappelli M, Verde R, Stott CG, Cristino L, Orlando P, Di Marzo V. (2013). Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *Br J Pharmacol* 168(1):79-102.
- Del Río-Hortega P. (1928). Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglia. *Memorias de la Sociedad Española de Historia Natural Tomo XIV*: 1-122.
- Del Rio-Hortega P. (1932). Microglia. Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System. Volume 2. Edited by *W Penfield, Hoeber, New York* 482-534.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34(5):605-13.
- 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(5090):1946-9.
- Dewey WL. (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* 38(2):151-78.
- Di Carlo A, Baldereschi M, Amaducci L, Lepore V, Bracco L, Maggi S, Bonaiuto S, Perissinotto E, Scarlato G, Farchi G, Inzitari D; ILSA Working Group. (2002). Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study. *J Am Geriatr Soc* 50(1):41-8.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Brandi I, Jefferson RG, Winckler RL, Davis JB, Dasse O, Mahadevan A, Razdan RK, Martin BR. (2001). Highly selective CB(1) cannabinoid receptor ligands and novel CB(1)/VR(1) vanilloid receptor "hybrid" ligands. *Biochem Biophys Res Commun* 281(2):444-51.
- Di Marzo V, Griffin G, De Petrocellis L, Brandi I, Bisogno T, Williams W, Grier MC, Kulasegram S, Mahadevan A, Razdan RK, Martin BR. (2002). A structure/activity relationship study on arvanil, an endocannabinoid and vanilloid hybrid. *J Pharmacol Exp Ther* 300(3):984-91.
- Dinarello CA. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87(6):2095-147.

- Dinarello CA. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118(2):503-8.
- Ding B, Yuan L, Yu H, Li L, Ma W, Bi Y, Feng J, Xiao R. (2011). Genistein and folic acid prevent oxidative injury induced by β -amyloid peptide. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 108(5):333-40.
- Do Carmo Barbosa Mendes De Vasconcelos, M., Bennett, R.N., Rosa, E.A., FerreiraCardoso, J.V. (2007). Primary and secondary metabolite composition of kernels from three cultivars of Portuguese chestnut (*Castanea sativa* Mill.) at different stages of industrial transformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3508–3516.
- Dodla MC, Mumaw J, Stice SL. (2010). Role of astrocytes, soluble factors, cells adhesion molecules and neurotrophins in functional synapse formation: implications for human embryonic stem cell derived neurons. *Curr Stem Cell Res Ther* 5(3):251-60.
- Drake J, Link CD, Butterfield DA. (2003). Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging* 24(3):415-20.
- Dzenko KA, Weltzien RB, Pachter JS. (1997). Suppression of A beta-induced monocyte neurotoxicity by antiinflammatory compounds. *J Neuroimmunol* 80(1-2):6-12.
- Eddleston M, Mucke L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54(1):15-36.
- Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle RD. (2005). Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation* 2:29.
- Eikelenboom P, van Gool WA. (2004). Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 111(3):281-94.
- ElSohly MA. (2003). Practical challenges to positive drug tests for marijuana. *Clin Chem* 49(7):1037-8.
- Erlund I, Alfthan G, Siren H, Ariniemi K, Aro A. (1999). Validated method for the quantitation of quercetin from human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 727(1-2):179-89.

Espeland MA, Rapp SR, Shumaker SA, Brunner R, Manson JE, Sherwin BB, Hsia J, Margolis KL, Hogan PE, Wallace R, Dailey M, Freeman R, Hays J; Women's Health Initiative Memory Study. (2004). Conjugated equine estrogens and global cognitive function in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA* 291(24):2959-68.

Esposito G, De Filippis D, Carnuccio R, Izzo AA, Iuvone T. (2006). The marijuana component cannabidiol inhibits β -amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/ β -catenin pathway rescue PC12 cells. *J Mol Med* 84:253-258.

Esposito G, Scuderi C, Savani C, Steardo L Jr, De Filippis D, Cottone P, Iuvone T, Cuomo V, Steardo L. (2007). Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br J Pharmacol* 151(8):1272-9.

Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, De Filippis D, Cipriano M, Carratù MR, Iuvone T, Steardo L. (2011). Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS One* 6(12):e28668.

Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A. (2003). Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia* 41(2):161-8.

Fang Yu. (2011). Guiding research and practice: a conceptual model for aerobic exercise training in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 26(3):184-94.

Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, Choe H. (2000). BACE2, a beta-secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17):9712-7.

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin 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(2-3):231-5.

Feng Y, Yang SG, Du XT, Zhang X, Sun XX, Zhao M, Sun GY, Liu RT. (2009). Ellagic acid promotes A β 42 fibrillization and inhibits A β 42-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 390(4):1250-4.

Ferrer Pastor, Paula (2008). Tesis Doctoral: Efectos anticancerosos de polifenoles naturales: pterostilbeno y quercetina. *Universitat de València. Servei de Publicacions*.

- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M. (2005). Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366(9503):2112-7.
- Fernández-Ruiz J, Berrendero F, Hernández ML, Ramos JA. (2000). The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci* 23(1):14-20.
- Fields R, Stevens-Graham B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556-62.
- Francis PT, Ramírez MJ, Lai MK. (2010). Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 59(4-5):221-9
- Frank DA, Bauchner H, Parker S, Huber AM, Kyei-Aboagye K, Cabral H, Zuckerman B. (1999). Neonatal body proportionality and body composition after in utero exposure to cocaine and marijuana. *J Pediatr* 117(4):622-6.
- Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA. (1994). Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11(2):83-93.
- Fride E, Ginzburg Y, Breuer A, Bisogno T, Di Marzo V, Mechoulam R. (2001). Critical role of the endogenous cannabinoid system in mouse pup suckling and growth. *Eur J Pharmacol* 419(2-3):207-14.
- Fried PA, Watkinson B, Willan A. (1984). Marijuana use during pregnancy and decreased length of gestation. *Am J Obstet Gynecol* 150:23-27.
- Fuller S, Münch G, Steele M. (2009). Activated astrocytes: a therapeutic target in Alzheimer's disease? *Expert Rev Neurother* 9(11):1585-94.
- Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, Bachstetter AD, Van Eldik LJ, Norris CM. (2012) Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32(46):16129-40.
- Gabbitta SP, Lovell MA, Markesbery WR. (1998). Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 71: 2034-40.
- Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438 .
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, 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(1):54-61.
- Galve-Roperh I, Rueda D, Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. (2002). Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 62(6):1385-92.
- Gamba P, Leonarduzzi G, Tamagno E, Guglielmotto M, Testa G, Sottero B, Gargiulo S, Biasi F, Mauro A, Viña J, Poli G. (2011). Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell* 10(3):403-17.
- Gandy S. (2005). The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115(5), 1121-9.
- Gaoni Y, Mechoulam R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 86:1646-1647.
- Garrett ER, Gouyette AJ, Roseboom H. (1978). Stability of tetrahydrocannabinols II. *J Pharm Sci* 67(1):27-32.
- Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 6(1):59-65.
- Gasic-Milenkovic J, Loske C, Munich G. (2003). Advanced glycation endproducts cause lipid peroxidation in the human neuronal cell line SHSY5Y. *J Alzheimer Dis* 5: 25-30.
- Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP. (2000). Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology* 49(1-2):171-86.
- Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. (1995). Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20(3):269-87.
- Genolet R, Wahli W, Michalik L. (2004). PPARs as drug targets to modulate inflammatory responses?. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3(4):361-75.
- 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 (Pt 1):129-34.

Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E. (2005). 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol* 25(8):2957-68.

Ghosh D, LeVault KR, Barnett AJ, Brewer GJ. (2012). A reversible early oxidized redox state that precedes macromolecular ROS damage in aging nontransgenic and 3xTg-AD mouse neurons. *J Neurosci* 32, 5821-5832.

Giaume Christian. (2009). Los astrocitos tienen un papel clave en las funciones neuronales. *Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología*.

Giulian D. (1999). Microglia and the immune pathology of Alzheimer's disease. *Am. J. Hum. Genet* 65:13-18.

Glass M, Dragunow M, Faull RL. (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77(2):299-318.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349(6311):704-6.

Gómez del Pulgar, T., de Ceballos, M. L., Guzmán, M. and Velasco, G. (2002). Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem* 277, 36527-36533.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071(1):10-23.

Gotz ME, Wacker M, Luckhaus C, Wanek P, Tatschner T, Jellinger K, et al. (2002). Unaltered brain levels of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxynonenal in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 324: 49-52.

Greenfeder SA, Varnell T, Powers G, Lombard-Gillooly K, Shuster D, McIntyre KW, Ryan DE, Levin W, Madison V, Ju G. (1995). Insertion of a structural domain of interleukin (IL)-1 beta confers agonist activity to the IL-1 receptor antagonist. Implications for IL-1 bioactivity. *J Biol Chem* 270(38):22460-6.

Greenland S, Staisch KJ, Brown N, Gross SJ. (1982). Effects of marijuana on human pregnancy, labor and delivery. *Neurobehav Toxicol Teratol* 4:447-450.

- Greenland S, Richwald GA, Honda GD. (1983). The effects of marijuana use during pregnancy. II. A study in a low-risk home-delivery population. *Drug Alcohol Depend* 11:359–366.
- Griffin G, Tao Q, Abood ME. (2000). Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 292(3):886-94.
- Griffin WS, Mrak RE. (2002). Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol* 72(2):233-8.
- Grimm A, Lim YA, Mensah-Nyagan AG, Götz J, Eckert A. (2012). Alzheimer's disease, oestrogen and mitochondria: an ambiguous relationship. *Mol Neurobiol* 46(1):151-60.
- Gross SS, Wolin MS. (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57: 737-69.
- Gubandru M, Margina D, Tsitsimpikou C, Goutzourelas N, Tsarouhas K, Ilie M, Tsatsakis AM, Kouretas D. (2013). Alzheimer's disease treated patients showed different patterns for oxidative stress and inflammation markers. *Food Chem Toxicol* 61:209-14.
- Guetin S, Portet F, Picot MC, Defez C, Pose C, Blayac JP, Touchon J. (2009). Impact of music therapy on anxiety and depression for patients with Alzheimer's disease and on the burden felt by the main caregiver (feasibility study). *Encephale* 35(1):57-65.
- Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. (2013). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): Function and molecular description. *Neurologia pii: S0213-4853(13)00004-2*.
- Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, Mattson MP (1997) . Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 17:4212-4222.
- Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I. (2002). Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther* 95(2):175-84.
- Halaris A. (2013). Inflammation, heart disease, and depression. *Curr Psychiatry Rep* 15(10):400.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J Lab Clin Med* 119: 598-620.

- Halliwell B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59: 1609-23.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford Science Publication 3rd ed.*
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. (1998). Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 8268–8273.
- Hampson AJ, Grimaldi M. (2001). Cannabinoid receptor activation and elevated cyclic AMP reduce glutamate neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 13:1529–1536.
- Hanisch UK. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40(2):140-55.
- Harbone JB. (1989). Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics. *Academic Press: London.*
- Harman D. (1986). Free radicals theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging, and disease processes. In: Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases. *Alan R. Liss, Inc. Ed 3-49.*
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3):298-300.
- Harmon J, Aliapoulios MA. (1972). Gynecomastia in marihuana users. *N Engl J Med* 287:936.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ. (1993). Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci* 695:109-16.
- Haass C. (1999). Apoptosis. Dead end for neurodegeneration?. *Nature* 399:204-205, 207.
- Haass C. (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23(3), 483-8.
- Hanus LO. (2009). Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Med Res Rev* 29(2):213-71.

Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, Pertwee RG, Ross RA, Mechoulam R, Fride E. (1999). HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25):14228-33.

Harada J, Sugimoto M. (1999). Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Res* 842:311-323.

Hatch EE, Bracken MB. (1986). Effect of marijuana use in pregnancy on fetal growth. *Am J Epidemiol* 124:986-993.

Heales SJ, Lam AA, Duncan AJ, Land JM. (2004). Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res* 29(3):513-9.

Hembree WC, Nahas GG, Zeidenberg P, Huang HF. (1978). Changes in human spermatozoa associated with high dose marihuana smoking. *Adv Biosci* 23:429-439.

Heneka MT, Landreth GH. (2007). PPARs in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1771 pp. 1031-1045.

Henderson VW. (2013). Alzheimer's disease: Review of hormone therapy trials and implications for treatment and prevention after menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol* S0960-0760(13)00081-2.

Hensley K, Hall N, Suramanian R, Cole P, Harris M, Aksenov M. et al. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* 65: 2146-56.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11(2):563-83.

Hermon M, Cairns N, Egly JM, Fery A, Dabudova O, Lubec G. (1998). Expression of DNA excision-repair-cross-complementing proteins p80 and p89 in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 251: 45-8.

Ho GJ, Dreger R, Hakimian E, Masliah E. (2005). Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:247-256.

Hoensch H, Oertel R. (2012). Anti-inflammatory effects of tea-flavonoids. *Dtsch Med Wochenschr* 137, 2738-40.

Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. (2000). Down-

regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290(5497):1768-71.

Hollister LE. (1986). Health aspects of cannabis. *Pharmacol Rev* 38: 1-20.

Hong CY, Chaput de Saintonge DM, Turner P, Fairbairn JW. (1982). Comparison of the inhibitory action of delta-9-tetrahydrocannabinol and petroleum spirit extract of herbal cannabis on human sperm motility. *Hum Toxicol* 1:151-154.

Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20(6):2218-28.

Hou L, Liu Y, Wang X, Ma H, He J, Zhang Y, Yu C, Guan W, Ma Y. (2011). The effects of amyloid- β 42 oligomer on the proliferation and activation of astrocytes in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47(8):573-80.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R and Pertwee RG. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev* 54, 161-202.

Hsieh MC, Graham TL. (2001). Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry* 58(7):995-1005.

Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ. (1998). Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res* 785(2):195-206.

Huber G, Martin JR, Löffler J, Moreau JL. (1993). Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: an indirect antibody approach. *Brain Res* 603(2):348-52.

Huestis MA, Mitchell JM, Cone EJ. (1996). Urinary excretion profiles of 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol in humans after single smoked doses of marijuana. *J Anal Toxicol* 20(6):441-52.

Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, Frank RA. (2001). Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch Gen Psychiatry* 58(4):322-8.

Hüll M, Fiebich BL, Schumann G, Lieb K, Bauer J. (1999). Anti-inflammatory substances - a new therapeutic option in Alzheimer's disease. *Drug Discov Today* 4(6):275-282.

Hurtado O, Cárdenas A, Lizasoain I, Boscá L, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA. (2001). Up-regulation of TNF-alpha convertase (TACE/ADAM17) after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacology* 40(8):1094-102.

Iida T, Furuta A, Nishioka K, Nakabeppu Y, Iwaki T. (2002). Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 103(1):20-5.

Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. National *Academy Press, Washington, DC*.

Issidorides MR. (1978). Observations in chronic hashish users: nuclear aberrations in blood and sperm and abnormal acrosomes in spermatozoa. *Adv Biosci* 23:377-388.

Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA. (2004). Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 89:134-141.

Iwase Y, Fukata H, Mori C. (2006). Estrogenic compounds inhibit gap junctional intercellular communication in mouse Leydig TM3 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 212(3):237-46.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13(1):45-53.

Jaimez Melgoza, Ruth. (2013). Estrógenos de uso clínico. Mensaje Bioquímico, Vol XXXVII. *Departamento de Bioquímica, facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México*.

Jayasena T, Poljak A, Smythe G, Braidy N, Münch G, Sachdev P. (2013). The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 12(4):867-883.

Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, Ayuso-Peralta L, Jabbour-Wadiah T. (2006). Oxidative stress and Alzheimer's disease. *Rev Neurol* 42(7):419-27.

- Jiménez-Jiménez FJ, De Bustos F, Gasalla T, Ortí-Pareja M. (1996). Estrés oxidativo y sistema nervioso central. *Neurología* 11 (Supl 3): 13-22.
- Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. (2012). Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients* 4(10):1399-440.
- Johnston H, Boutin H, Allan SM. (2011). Assessing the contribution of inflammation in models of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 39(4):886-90.
- Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 799, 101–110.
- Kainu T, Wikström AC, Gustafsson JA, Peltö-Huikko M. (1994). Localization of the peroxisome proliferator-activated receptor in the brain. *Neuroreport* 5(18):2481-5.
- Kandel ER., y cols. (2000). The nervous system has two classes of cells. *McGraw-Hill* 19-352.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325(6106):733-6.
- Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. (2008). Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR- γ agonists. *Front Biosci* 13:1813–1826.
- Karelson E, Bogdanovic N, Garlind A, Winblad B, Zilmer K, Kullisaar T, Vihalemm T, Kairane C, Zilmer M. (2001). The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res* 26(4):353-61.
- Kehl LJ, Fairbanks CA, Laughlin TM, Wilcox GL. (1997). Neurogenesis in postnatal rat spinal cord: a study in primary culture. *Science* 276(5312):586-9.
- Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. (2006). Targeting multiplesignaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Research* 66, 2500–2505.
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11):6382-7.

- Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA. (1995). Cannabinoids selectively decrease paired-pulse facilitation of perforant path synaptic potentials in the dentate gyrus in vitro. *Brain Res* 688(1-2):114-20
- Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H. (2000). The cannabinoid system and cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med* 225(1):1-8.
- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H. (2003). The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 74(4):486-96.
- Klein WK. (2005). Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol* 5:400-411.
- Klonoff-Cohen HS, Natarajan L, Chen RV. (2006). A prospective study of the effects of female and male marijuana use on *in vitro* fertilization (IVF) and gamete intrafallopian transfer (GIFT) outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 194:369–376.
- Koivisto AM, Helisalmi S, Pihlajamaki J, Hiltunen M, Koivisto K, Moilanen L, Kuusisto J, Helkala EL, Hanninen T, Kervinen K, Kesaniemi YA, Laakso M, Soininen H. (2006). Association analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma polymorphisms and late onset Alzheimer's disease in the Finnish population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22(5-6):449-53.
- Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G. (1974). Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marijuana use. *N Engl J Med* 290:872–874.
- Kondo T, Raff M. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289, 1754–1757.
- Kornack DR, Rakic P. (2001). Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294, 2127–2130.
- Krishnan S, Cairns R, Howard R. (2009). Cannabinoids for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 15(2):CD007204.
- Kuiper GG, Lemmen JB, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139(10):4252-63.
- Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV, Jawahar MS, Fay MP, Nutman TB, Babu S. (2013). Type 2 diabetes mellitus coincident with pulmonary tuberculosis is associated with heightened systemic type 1, type 17, and other proinflammatory cytokines. *Ann Am Thorac Soc* 10(5):441-9.

- Kwiatkowska M, Parker LA, Burton P, Mechoulam R. (2004). A comparative analysis of the potential of cannabinoids and ondansetron to suppress cisplatin-induced emesis in the *Suncus murinus* (house musk shrew). *Psychopharmacology (Berl)* 174(2):254-9.
- LaFerla FM, Oddo S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11:170-176.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8(7):499-509.
- LaFontaine MA, Mattson MP, Butterfield DA. (2002). Oxidative stress in synaptosomal proteins from mutant presenilin-1 knock-in mice: implications for familial Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 27(5):417-21.
- Landreth G, Jiang Q, Mandrekar S, Heneka M. (2005). PPAR γ agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5:481-489.
- Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski HM. (1995). Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol* 89:35-41.
- Lee JH, Sevigny J. (2011). Effects of body weight on tolerability of rivastigmine transdermal patch: a post-hoc analysis of a double-blind trial in patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 25(1):58-62.
- Lee M, Schwab C, McGeer PL. (2011). Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* 59(1):152-65.
- Lee MC, Ting KK, Adams S, Brew BJ, Chung R, Guillemin GJ. (2010). Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *PLoS One* 5(11):e14123.
- Lee WH, Javedan S, Bondy CA. (1992). Coordinate expression of insulin-like growth factor system components by neurons and neuroglia during retinal and cerebellar development. *J Neurosci* 12(12):4737-44.
- Lecour S, Lamont KT. (2011). Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini Rev Med Chem* 11: 1191-9.
- Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. (2001). Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33(6):1065-89.

Leuner K, Müller WE, Reichert AS. (2012). From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 46(1):186-93.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269(5226):973-7.

Li X, Kaminski NE, Fischer LJ. (2001). Examination of the immunosuppressive effect of delta9-tetrahydrocannabinol in streptozotocin-induced autoimmune diabetes. *Int Immunopharmacol* 1(4):699-712.

Liao W, Jin G, Zhao M, Yang H. (2013). The effect of genistein on the content and activity of α - and β -secretase and protein kinase C in A β -injured hippocampal neurons. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112(3):182-5.

Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol* 156(5):445-53.

Liu R, Choi J. (2000). Age-associated decline in γ -glutamylcysteine synthetase gene expression in rats. *Free Radic Biol Med* 28:566–574.

Liu B, Hong JS. (2003). Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther* 304:1-7.

Lockshin RA, Zakeri Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36:2405-2419.

Lois C, Alvarez-Buylla A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 2074–2077.

López-Pousa S, Garre-Olmo J, Vilalta-Franch J. (2007). Galanthamine versus donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Rev Neurol* 44(11):677-84.

Losy J. (2013). Is MS an inflammatory or primary degenerative disease? *J Neural Transm* 120(10):1459-62.

Love S, Barber R, Wilcock GK. (1999). Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain* 122: 247-53.

Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45(8):1594-601.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.
- Lu H, Shi JX, Zhang DM, Wang HD, Hang CH, Chen HL, Yin HX. (2009). Inhibition of hemolysate-induced iNOS and COX-2 expression by genistein through suppression of NF- κ B activation in primary astrocytes. *J Neurol Sci* 278(1-2):91-5.
- Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Alonso M, Santos A, Martínez A, Perez-Castillo A. (2005). Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by thiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *J Biol Chem* 280(22):21453-62.
- Luterman JD, Haroutunian V, Yemul S, Ho L, Purohit D, Aisen PS, Mohs R, Pasinetti GM. (2000). Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Arch Neurol* 57(8):1153-60.
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68: 2061-9.
- Ma W, Yuan L, Yu H, Ding B, Xi Y, Feng J, Xiao R. (2010). Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by beta-amyloid peptides 25-35 in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci* 28(4):289-95.
- McCarthy KD, de Vellis J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85(3):890-902.
- McCormack D, McFadden D (2012). Pterolstilbene and cancer: current review. *J Surg Res* 173: e53-61.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50(1):121-7.
- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. (1996). Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47(2):425-32.
- McGeer PL, McGeer EG. (2004). Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci* 1035:104-16.

- McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. (2006). Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis* 9(3 Suppl):271-6.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405(6789):951-5.
- Magee PJ, Rowland IR. (2004). Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 91(4):513-31.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldmann M. (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17):9561-6.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79,727–747.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB. (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6(7):521-32.
- Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, Freedman ML. (1998). Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 150(1):40-4.
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95(2):437-45.
- Markesbery WR, Lovel MA. (1998). Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19: 33-6.
- Marsicano G, Moosmann H, Lutz B, Bel C. (2002). Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem* 80, 448–456.
- Martínez Dorado C, Rugerios Vargas C, Rivas Arancibia S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM* Vol.46 No.6.
- Martín-Moreno AM, Reigada D, Ramírez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML. (2011). Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 79:964-973.

- Martín-Moreno AM, Brera B, Spuch C, Carro E, García-García L, Delgado M, Pozo MA, Innamorado NG, Cuadrado A, de Ceballos ML. (2012). Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers β -amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice. *J Neuroinflammation* 16;9:8.
- Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbracchio MP, Parolaro D. (2004). Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 308(3):838-45.
- Mateos L, Persson T, Katoozi S, Gil-Bea FJ, Cedazo-Minguez A. (2012). Estrogen protects against amyloid- β toxicity by estrogen receptor α -mediated inhibition of Daxx translocation. *Neurosci Lett* 506(2):245-50.
- 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(6284):561-4.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327(4):535-50.
- Matsuoka Y, Picciano M, La Francois J, Duff K. (2001). Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 104(3):609-13.
- Matute C. (2007). Interaction between glutamate signalling and immune attack in damaging oligodendrocytes. *Neuron Glia Biol* 3(4):281-5.
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36(5):747-51.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50(1):83-90.
- Mechoulam R, Ben Shabat S, Hanus L, Fride E, Vogel Z, Bayewitch M, Sulcova AE. (1996). Endogenous cannabinoid ligands--chemical and biological studies. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14(1-3):45-9.
- Mechoulam R, Spatz M, Shohami E (2002). Endocannabinoids and Neuroprotection. *Sci STKE* 23;2002(129):re5.

- Menard C, Bastianetto S, Quirion R. (2013). Neuroprotective effects of resveratrol and epigallocatechin gallate polyphenols are mediated by the activation of protein kinase C gamma. *Front Cell Neurosci* 7:281.
- Mendelson JH, Mello NK. (1984). Effects of marijuana on neuroendocrine hormones in human males and females. *NIDA Res Monogr* 44:97–114.
- Mendelson JH, Mello NK, Ellingboe J. (1985). Acute effects of marihuana smoking on prolactin levels in human females. *J Pharmacol Exp Ther* 232:220–222.
- Mendelson JH, Mello NK, Ellingboe J, Skupny AS, Lex BW, Griffin M. (1986). Marihuana smoking suppresses luteinizing hormone in women. *J Pharmacol Exp Ther* 237:862–866.
- Merlo S, Sortino MA. (2012). Estrogen activates matrix metalloproteinases-2 and -9 to increase beta amyloid degradation. *Mol Cell Neurosci* 49(4):423-9.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21):12683-8.
- Miettinen S, Fusco FR, Yrjänheikki J, Keinänen R, Hirvonen T, Roivainen R, Närhi M, Hökfelt T, Koistinaho J. (1997). Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12):6500-5.
- Milton NG. (2002). Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide. *Neurosci Lett* 332(2):127-30.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15(6):575-91.
- Mnich K, Finn DP, Dowd E, Gorman AM. (2010). Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. *Int J Cell Biol* 818497.
- Mo FM, Offertáler L, Kunos G. (2004). Atypical cannabinoid stimulates endothelial cell migration via a Gi/Go-coupled receptor distinct from CB1, CB2 or EDG-1. *Eur J Pharmacol* 489(1-2):21-7.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 22(22):9742-53.

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(16):6470-4.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2):109-42.

Montine TJ, Huang DY, Valentine WM, Amarnath V, Saunders A, Weisgraber KH, Graham DG, Strittmatter WJ. (1996). Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(2):202-10.

Morimoto T, Ohsawa I, Takamura C, Ishiguro M, Kohsaka S. (1998). Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 51(2):185-95.

Morinaga A, Hirohata M, Ono K, Yamada M. (2007). Estrogen has anti-amyloidogenic effects on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 359(3):697-702.

Morinaga A, Ono K, Takasaki J, Ikeda T, Hirohata M, Yamada M. (2011). Effects of sex hormones on Alzheimer's disease-associated β -amyloid oligomer formation in vitro. *Exp Neurol* 228(2):298-302.

Mrak RE, Griffin WS. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 26(3):349-54.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1(5):345-7.

Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ. (2000). Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *JAMA* 283(8):1007-15.

Munoz DG, Feldman H. (2000). Causes of Alzheimer's disease. *CMAJ* 162(1), 65-72.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365(6441):61-5.

Nackley AG, Makriyannis A, Hohmann AG. (2003) Selective activation of cannabinoid

CB(2) receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 119(3):747-57.

Nathan C, Calingasan N, Nezezon J, Ding A, Lucia MS, La Perle K, Fuortes M, Lin M, Ehrst S, Kwon NS, Chen J, Vodovotz Y, Kipiani K, Beal MF. (2005). Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 202(9):1163-9.

Ndubaku U, de Bellard ME. (2008). Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem* 110(3):182-95.

Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. (2002). Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3(9):748-55.

Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 42(1):29-42.

Neumann H, Wekerle H. (1998). Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(1):1-9.

Newman EA. (2003). New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536-42.

Novo R, Azevedo PS, Minicucci MF, Zornoff LA, Paiva SA. (2013). Effect of beta-carotene on oxidative stress and expression of cardiac connexin 43. *Arq Bras Cardiol* (3):233-9.

Nucci C, Bari M, Spanò A, Corasaniti M, Bagetta G, Maccarrone M, Morrone LA. (2008). Potential roles of (endo)cannabinoids in the treatment of glaucoma: from intraocular pressure control to neuroprotection. *Prog Brain Res* 173:451-64.

Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolón RM, Romero J. (2004). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53(4):208-13.

Núñez E, Benito C, Tolón RM, Hillard CJ, Griffin WS, Romero J. (2008). Glial expression of cannabinoid CB(2) receptors and fatty acid amide hydrolase are beta amyloid-linked events in Down's syndrome. *Neuroscience* 151(1):104-10.

- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(8):759-67.
- Nussbaum RL, Ellis C. E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 348(14), 1356-64.
- Obrenovitch TP, Urenjak J. (1997). Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog Neurobiol* 51:39-87.
- Ohkura T, Isse K, Akazawa K, Hamamoto M, Yaoi Y, Hagino N. (1994). Evaluation of estrogen treatment in female patients with dementia of the Alzheimer type. *Endocrinol. J* 41, 361–371.
- Olazarán J, Muñoz R, Reisberg B, Peña-Casanova J, del Ser T, Cruz-Jentoft AJ, Serrano P, Navarro E, García de la Rocha ML, Frank A, Galiano M, Fernández-Bullido Y, Serra JA, González-Salvador MT, Sevilla C. (2004). Benefits of cognitive-motor intervention in MCI and mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 63(12):2348-53.
- Olea-Herrero N, Vara D, Malagarie-Cazenave S, Díaz-Laviada I. (2009). Inhibition of human tumour prostate PC-3 cell growth by cannabinoids R(+)-Methanandamide and JWH-015: involvement of CB2. *Br J Cancer* 101(6):940-50.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfiz L, Uhl GR. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann NY Acad Sci* 1074:514-36.
- Ortega-Gutiérrez S, Molina-Holgado E, Guaza C. (2005). Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia* 52(2):163-8.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115(5):1298-305.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58(3):389-462.

- Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C. (2010). Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 469(1):6–10.
- Pagani L, Eckert A. (2011). Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *Int J Alzheimers Dis* 2011:925050.
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. (2006). Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J* 20(13):2405-7.
- Palmer AM, Burns MA. (1994). Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res* 645(1-2):338-42.
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8(6):389-404.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19(19):8487-97.
- Palmer SL, Thakur GA, Makriyannis A. (2002). Cannabinergic ligands. *Chem Phys Lipids* 121(1-2):3-19.
- Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P. (2009). Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res* 60(2):85-92.
- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B. (2002). *Citología e histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales. McGraw-Hill Interamericana de España* ISBN 84-486-0436-9.
- Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, Hsiao K, Perry G, Smith MA, Bozner P. (1998). Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am J Pathol* 152(4):871-7.
- Parker LA, Mechoulam R, Schlievert C. (2002). Cannabidiol, a non-psychoactive component of cannabis and its synthetic dimethylheptyl homolog suppress nausea in an experimental model with rats. *Neuroreport* 13(5):567-70.
- Parker LA, Mechoulam R, Schlievert C, Abbott L, Fudge ML, Burton P. (2003). Effects of cannabinoids on lithium-induced conditioned rejection reactions in a rat model of nausea. *Psychopharmacology (Berl)* 166(2):156-62.

- Parker LA, Kwiatkowska M, Burton P, Mechoulam R. (2004). Effect of cannabinoids on lithium-induced vomiting in the *Suncus murinus* (house musk shrew). *Psychopharmacology (Berl)* 171(2):156-61.
- Parkkari T, Savinainen JR, Raitio KH, Saario SM, Matilainen L, Sirviö T, Laitinen JT, Nevalainen T, Niemi R, Järvinen T. (2006). Synthesis, cannabinoid receptor activity, and enzymatic stability of reversed amide derivatives of arachidonoyl ethanolamide. *Bioorg Med Chem* 14(15):5252-8.
- Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF Jr, Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 121(1):4-27.
- Pasinetti GM. (1998). Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: experimental approaches and clinical interventions. *J Neurosci Res* 54(1):1-6.
- Pastor Ferrer, Paula (2008) Efectos anticancerosos de polifenoles naturales: pterostilbeno y quercetina. *Universitat de València. Servei de Publicacions*.
- Pazos MR, Tolón RM, Benito C, Rodríguez CF, Gorgojo JJ, Nevado M, Alvarez M, Arias F, Almodóvar F, Fernández MT, Lledó JL, González S, Fernández-Ruiz JJ, Romero J. (2008). Cannabinoid CB1 receptors are expressed by parietal cells of the human gastric mucosa. *J Histochem Cytochem* 56(5):511-6.
- Penalvo JL, Haajanen KM, Botting N, Adlercreutz H. (2005). Quantification of lignans in food using isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9342–9347.
- Perea G, Araque A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317(5841):1083-6.
- Perez-Reyes M, Wall ME. (1982). Presence of delta9-tetrahydrocannabinol in human milk. *N Engl J Med* 307(13):819-20.
- Persaud TV, Ellington AC. (1967). Cannabis in early pregnancy. *Lancet* 2:1306.
- Pertwee RG. (2001). Cannabinoid receptors and pain. *Progress in Neurobiology* 63: 569-611.
- Pertwee RG. (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6: 635-64.
- Pertwee RG. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74(2):129-80.

- Pertwee RG, Wickens AP. (1991). Enhancement by chlordiazepoxide of catalepsy induced in rats by intravenous or intrapallidal injections of enantiomeric cannabinoids. *Neuropharmacology* 30: 237-44.
- Pertwee R. (2004). Receptors and pharmacodynamics: natural and synthetic cannabinoids and endocannabinoids. *London: Pharmaceutical Press* 103- 117.
- Phillips NR, Simpkins JW, Roby RK. (2013). Mitochondrial DNA deletions in Alzheimer's brains: A review. *Alzheimers Dement* pii: S1552-5260(13)02422-9.
- Pinar-Sueiro S, Rodríguez-Puertas R, Vecino E. (2011). Cannabinoid applications in glaucoma. *Arch Soc Esp Oftalmol* 86(1):16-23.
- Piskula MK, Terao J. (1998). Accumulation of (-) epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 128: 1172-1178.
- Pocernich CB, Butterfield DA. (2011). Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta* 1822, 625-630.
- Pourkhalili N, Ghahremani MH, Farsandaj N, Tavajohi S, Majdzadeh M, Parsa M, Lavasani NJ, Ostad SN. (2013). Evaluation of anti-invasion effect of cannabinoids on human hepatocarcinoma cells. *Toxicol Mech Methods* 23(2):120-6.
- Pratico D, MY Lee V, Trojanowski JQ, Rokach J, Fitzgerald GA. (1998). Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J* 12: 1777-83.
- Praticò D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. (2001). Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 21(12):4183-7.
- Puffenbarger RA, Boothe AC, Cabral GA. (2000). Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia* 29(1):58-69.
- Qazi QH, Mariano E, Milman DH, Beller E, Crombleholme W. (1985). Abnormalities in offspring associated with prenatal marijuana exposure. *Dev Pharmacol Ther* 8:141-148.
- Qin XY, Cheng Y, Yu LC. (2012). Potential protection of green tea polyphenols against intracellular amyloid beta-induced toxicity on primary cultured prefrontal cortical neurons of rats. *Neurosci Lett* 513(2):170-3.

- Quintanilla RA, Orellana JA, von Bernhardt R. (2012). Understanding risk factors for Alzheimer's disease: interplay of neuroinflammation, connexin-based communication and oxidative stress. *Arch Med Res* 43(8):632-44.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 50(3):586-621.
- Rivas AS, Colín-Barenque L, Dorado-Martínez C, Fortoul T. (2001). Estrés oxidativo y neurodegeneración en temas selectos de neurociencias II. *UNAM-PUIS*.
- Rakic P. (2002). Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J. Neurosci* 22, 614-618.
- Ramaekers JG, Berghaus G, van Laar M, Drummer OH. (2004). Dose related risk of motor vehicle crashes after cannabis use. *Drug Alcohol Depend* 73(2):109-19.
- Ramassamy C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* 545(1):51-64.
- Ramesh BN, Rao TS, Prakasam A, Sambamurti K, Rao KS. (2010). Neuronutrition and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19(4):1123-39.
- Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm* 2013:480739.
- Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, de Ceballos ML. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25:1904-1913.
- Ramos Atance JA, Fernández Ruiz J. (2000). Cannabinoides: propiedades químicas y aspectos metabólicos. *Adicciones* 12 (supl 2): 41-56.
- Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ. (2001). Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci* 21(6):1876-83.
- Reibaud M, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Böhme GA, (1999). Imperato A. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 379(1):R1-2.

- Reiter RJ. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9: 526-33.
- Renart J, Reiser J, Stark GR. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (7): pp. 3116–3120.
- Resende R, Moreira PI, Proenca T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira CR. (2008). Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 44, 2051-2057.
- Reynolds BA, Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T. (1994). Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16):7450-4.
- Rocha FC, Dos Santos Júnior JG, Stefano SC, da Silveira DX. (2014). Systematic review of the literature on clinical and experimental trials on the antitumor effects of cannabinoids in gliomas. *J Neurooncol* 116(1):11-24.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17(4):942-64.
- Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 414(6860):209-12.
- Rogers J, Kirby LC, Hempelman SR, Berry DL, McGeer PL, Kaszniak AW, Zaluski J, Cofield M, Mansukhani L, Willson P, et al. (1993). Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 43(8):1609-11.
- Rojanathammanee, L., Puig, K.L., Combs, C.K. (2013). Pomegranate polyphenols and extract inhibit nuclear factor of activated T-cell activity and microglial activation in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Nutrition* 143, 597–605.
- Romeo, Ibrahim, Varin, DeLuca. (2000). Evolution of Pathways. Vol 34. *Edit. Pergamon*.

Rönicke R, Klemm A, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reymann KG. (2008). Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture?. *PLoS One* 3(9):e3236.

Ross RA, Coutts AA, McFarlane SM, Anavi-Goffer S, Irving AJ, Pertwee RG, MacEwan DJ, Scott RH. (2001). Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* 40(2):221-32.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403(6767):316-21.

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16(3):675-86.

Rothwell NJ, Luheshi GN. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci* 23(12):618-25.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152(7):1092-101.

Sáez R, Burgal M, Renau-Piqueras J, Marqués A, Guerri C. (1991). Evolution of several cytoskeletal proteins of astrocytes in primary culture: effect of prenatal alcohol exposure. *Neurochem Res* 16(7):737-47.

Saharan S, Mandal PK. (2014). The Emerging Role of Glutathione in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24496077.

Sala G, Galimberti G, Canevari C, Raggi ME, Isella V, Facheris M, Appollonio I, Ferrarese C. (2003). Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity. *Neurobiol Aging* 24(7):909-14.

Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M. (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett* 436(1):6-10.

Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Departamento de Investigación Biomédica. *Fundación Clínica Sur* 20(3):161-168.

Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita* 43, 394–405.

Sarubin Fragaakis A, Thomson C. (2007). The Health Professional's Guide to Popular Dietary Supplements. 3rd ed. Chicago *IL: American Dietetic Association*.

Sastre M, Dewachter I, Rossner S, Bogdanovic N, Rosen E, Borghgraef P, Evert BO, Dumitrescu-Ozimek L, Thal DR, Landreth G, Walter J, Klockgether T, van Leuven F, Heneka MT. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(2):443-8.

Savić A, Mimica N. (2013). Two cases of loss of consciousness after long-term memantine treatment. *J Am Med Dir Assoc* 14(5):375-6.

Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. (1997). 4-hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation and products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68: 2092-97.

Scacchi R, Pinto A, Gambina G, Rosano A, Corbo RM. (2007). The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma2) Pro12Ala polymorphism is associated with higher risk for Alzheimer's disease in octogenarians. *Brain Res* 1139:1-5.

Scalbert A, Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073S-85S.

Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE. (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142(2):278-87.

Scheuner D., y cols. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2(8), 864-70.

Schmid PC, Kuwae T, Krebsbach RJ, Schmid HH. (1997). Anandamide and other N-acylethanolamines in mouse peritoneal macrophages. *Chem Phys Lipids* 87(2):103-10.

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267, 4904-4911.

Scuderi C, Esposito G, Blasio A, Valenza M, Arietti P, Steardo L Jr, Carnuccio R, De Filippis D, Petrosino S, Iuvone T, Di Marzo V, Steardo L. (2011).

Palmitoylethanolamide counteracts reactive astrogliosis induced by β -amyloid peptide. *J Cell Mol Med* 15(12):2664-74.

Selkoe DJ. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6(4), 487-98.

Selkoe DJ. (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* 275(5300):630-1.

Setchell KD. (2001). Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr* 20(5Suppl):354S-362S; discussion 381S-383S.

Shaywitz SE, Naftolin F, Zelterman D, Marchione KE, Holahan JM, Palter SF, Shaywitz BA. (2003). Better oral reading and short-term memory in midlife, postmenopausal women taking estrogen. *Menopause* 10, 420-426.

Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK. (2005). Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia* 49(2):211-9.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375(6534):754-60.

Sherwood RA, Keating J, Kavvadia V, Greenough A, Peters TJ. (1999). Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr* 158:488-492.

Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. (1997). FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol* 148(2):577-86.

Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. (2000). Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20(23):8727-35.

Shire D, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Oustric D, Pessègue B, Bonnin-Cabanne O, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. (1996). Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1307(2):132-6.

- Shumaker SA, Legault C, Kuller L, Rapp SR, Thal L, Lane DS, Fillit H, Stefanick ML, Hendrix SL, Lewis CE, Masaki K, Coker LH; Women's Health Initiative Memory Study. (2004). Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA* 291(24):2947-58.
- Shuvaev VV, Laffont I, Serot JM, Fujii J, Taniguchi N, Siest G. (2001). Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22: 397-402.
- Sies H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem* 25:1058-1071.
- Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, et al. (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241(4865):585-9.
- Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, Sun GY. (2005). Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 31(1-3):135-47.
- Simonyi A, He Y, Sheng W, Sun AY, Wood WG, Weisman GA, Sun GY. (2010). Targeting NADPH oxidase and phospholipases A2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 41(2-3):73-86.
- Simpkins JW, Yi KD, Yang SH. (2009). Role of protein phosphatases and mitochondria in the neuroprotective effects of estrogens. *Front Neuroendocrinol* 30(2):93-105.
- Sinforiani E, Pasotti C, Chiapella L, Malinverni P, Zucchella C. (2012). Memantine in Alzheimer's disease: experience in an Alzheimer's disease assessment unit. *Aging Clin Exp Res* 24(2):193-6.
- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A. (1996). The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9):3984-9.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417(6884):39-44.

- Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srail SK, Rice-Evans C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 458(2):224-30.
- Stanley CP, Hind WH, O'Sullivan SE. (2013). Is the cardiovascular system a therapeutic target for cannabidiol?. *Br J Clin Pharmacol* 75(2):313-22.
- Stella N. (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 48(4):267-277.
- Stella N. (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* 58:1017-1030.
- Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. (2007). PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res* 2007:95974.
- Strohmeier R, Rogers J. (2001). Molecular and cellular mediators of Alzheimer's disease inflammation. *J Alzheimers Dis* 3(1):131-157.
- Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW. (1994). Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5:2529-2533.
- 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(5):405-46.
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. (1996). Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383(6601):624-7.
- Sulaiman SF, Ooi KL. (2012). Polyphenolic and Vitamin C Contents and Antioxidant Activities of Aqueous Extracts from Mature-Green and Ripe Fruit Fleshes of *Mangifera* sp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11832–11838.
- Sutherland GT, Chami B, Youssef P, Witting PK. (2013). Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product?. *Redox Rep* 18(4):134-41.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276(5319):1699-702.
- Temple S, Alvarez-Buylla A. (1999). Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol* 9, 135–141.

- Temple S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–117
- Tolkovsky AM, Xue L, Fletcher GC, Borutaite V. (2002). Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease?. *Biochimie* 84:233-240.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76 (9): pp. 4350–4354.
- Tramèr MR, Carroll D, Campbell FA, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. (2001). Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. *BMJ* 323(7303):16-21.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-85.
- 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(2):393-411.
- Tuppo EE, Arias HR. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 289–305.
- U.S Food and Drug Administration, U.S Department of Health and Human Services, www.fda.gov
- Valen-Sendstad, A., Engedal, K., Stray-Pedersen, B., ADACT Study, Group, Strobel, C., Barnett, L., Meyer, N., Nurminen, M. (2010). Effects of hormone therapy on depressive symptoms and cognitive functions in women with Alzheimer disease: a 12 month randomized, double-blind, placebo-controlled study of low-dose estradiol and norethisterone. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 18, 11–20.
- Vallés SL, Borrás C, Gambini J, Furriol J, Ortega A, Sastre J, Pallardó FV, Viña J. (2008). Oestradiol or genistein rescues neurons from amyloid beta-induced cell death by inhibiting activation of p38. *Aging Cell* 7(1):112-8.
- Valles SL, Dolz-Gaiton P, Gambini J, Borrás C, Lloret A, Pallardo FV, Viña J. (2010). Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes. *Brain Res* 1312:138-44.

- Vann RE, Cook CD, Martin BR, Wiley JL. (2007). Cannabimimetic properties of ajulémico acid. *J Pharmacol Exp Ther* 320(2):678-86.
- Van der Stelt M, Veldhuis WB, Maccarrone M, Bär PR, Nicolay K, Veldink GA, Di Marzo V, Vliegenterhart JFG. (2002). Acute neuronal injury, excitotoxicity, and the endocannabinoid system. *Mol Neurobiol* 26:317-346.
- Van Der Zee EA, De Jong GI, Strosberg AD, Luiten PG. (1993). Muscarinic acetylcholine receptor-expression in astrocytes in the cortex of young and aged rats. *Glia* 8(1):42-50.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310(5746):329-32.
- Van Sickle MD, Oland LD, Ho W, Hillard CJ, Mackie K, Davison JS, Sharkey KA. (2001). Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology* 121(4):767-74.
- Vassar R. (2001). The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17(2), 157-70.
- Vassar R. (2004). BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 23(1- 2), 105-14.
- Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Eteri S, Maggi A. (2006). The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology* 147(5):2263-72.
- Vescovi PP, Pedrazzoni M, Michelini M, Maninetti L, Bernardelli F, Passeri M. (1992). Chronic effects of marihuana smoking on luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin levels in human males. *Drug Alcohol Depend* 30:59-63.
- Viña J, Lloret A, Vallés SL, Borrás C, Badía MC, Pallardó FV, Sastre J, Alonso MD. Effect of gender on mitochondrial toxicity of Alzheimer's Abeta peptide. *Antioxid Redox Signal* 2007 Oct; 9(10):1677-90.
- Vitrac X, Bornet A, Vanderlinde R, Valls J, Richard T, Delaunay JC, Merillon JM, Teissedre PL. (2005). Determination of stilbenes (delta-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, epsilon-viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5664-5669.

- Vlachou S, Panagis G. (2013). Regulation of Brain Reward by the Endocannabinoid System: A critical Review of Behavioral Studies in Animals. *Curr Pharm Des*
- Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ. (1997). Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 12:913–919.
- Wakabayashi K, Miki Y. (2013). Deposition and clearance of β -amyloid in the brain. *Brain Nerve* 65(12):1433-44.
- Wallace MN, Geddes JG, Farquhar DA, Masson MR. (1997). Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Exp Neurol* 144(2):266-72.
- Wallace DC. (2000). Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am Heart J* 139:S70–S85.
- Walker EB. (2007). HPLC analysis of selected xanthenes in mangosteen fruit. *Journal of Separation Science* 30, 1229–1234.
- Walther S, Mahlberg R, Eichmann U, Kunz D. (2006). Delta-9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia. *Psychopharmacology (Berl)* 185(4):524-8.
- Wan H, Yuan Y, Qian A, Sun Y, Qiao M. (2007). Pioglitazone, a PPAR γ ligand, suppresses NF κ B activation through inhibition of I κ B kinase activation in cerulein-treated AR42J cells. *Biomed. Pharmacother* 62:466–472.
- Wang CX, Shuaib A. (2002). Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 67(2):161-72.
- Wang HM, Zhao YX, Zhang S, Liu GD, Kang WY, Tang HD, Ding JQ, Chen SD. (2010). PPAR- γ agonist curcumin reduces the amyloid- β -stimulated inflammatory responses in primary astrocytes. *J Alzheimers Dis* 20:1189–1199.
- Wang Y, Zhou YT, Zhao Q. (2010). The effect of the activation of cannabinoid receptor on the proliferation and apoptosis of hepatoma HepG2 cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 26(4):344-7.
- Walther S, Mahlberg R, Eichmann U, Kunz D. (2006). 9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia. *Psychopharmacology (Berl)* 185:524–528.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N. (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23(4):1398-405.

- Walter L, Stella N (2004). Cannabinoids and neuroinflammation. *Brit J Pharmacol* 141:775-785.
- Watson DG, Oliveira EJ. (1999) Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin un human urine after consumption of Ginkgo biloba tablest. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 723:203-10.
- Wei R, Jonakait GM. (1999). Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J Neuroimmunol* 95(1-2):8-18.
- Whan LB, West MC, McClure N, Lewis SE. (2006). Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function *in vitro*. *Fertil Steril* 85:653–660.
- Widman M, Agurell S, Ehrnebo M, Jones G. (1974). Binding of (+)- and (minus)-delta-1-tetrahydrocannabinols and (minus)-7-hydroxy-delta-1-tetrahydrocannabinol to blood cells and plasma proteins in man. *J Pharm Pharmacol* 26(11):914-6.
- Wightman, Frank; Lighty, Douglas L. (1982). Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiologia Plantarum* 55 (1): pp. 17.
- Wiley JL, Ryan WJ, Razdan RK, Martin BR. (1998). Evaluation of cannabimimetic effects of structural analogs of anandamide in rats. *Eur J Pharmacol* 355(2-3):113-8.
- Williams CM, Kirkham TC. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* 143: 315-17.
- Williamson G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol Nutr Food Res* 57: 48-57.
- Williamson J, Goldman J, Marder KS. (2009). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist* 15(2):80-6.
- Wilson DM, Peart J, Martin BR, Bridgen DT, Byron PR, Lichtman AH. (2002). Physiochemical and pharmacological characterization of a Delta(9)-THC aerosol generated by a metered dose inhaler. *Drug Alcohol Depend* 67(3):259-67.
- Wotherspoon G, Fox A, McIntyre P, Colley S, Bevan S, Winter J. (2005). Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience* 135(1):235-45.

Wyss-Coray T, Mucke L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease-A double-edged sword. *Neuron* 35:419-432.

Xie B, Shi H, Chen Q, Ho CT. (1993). Antioxidant properties of fractions and polyphenol constituents from green, oolong and black teas. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences* 17, 77-84.

Yang H, Jin GF, Ren DD, Luo SJ, Zhou TH. (2010). Neuro-protective mechanism of isoflavones on senescence-accelerated mice. *Chin J Nat Med* 4:280-4.

Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Saido TC, Ihara Y. (1998). Diffuse plaques associated with astroglial amyloid beta protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol* 95(3):217-22.

Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. (2007). Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1772(8):958-67.

Yamamoto M, Kamatsuka Y, Ohishi A, Nishida K, Nagasawa K. (2013). P2X7 receptors regulate engulfing activity of non-stimulated resting astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 439(1):90-5.

Yamanaka M, Ishikawa T, Griep A, Axt D, Kummer MP, Heneka MT. (2012). PPAR γ /RXR α -induced and CD36-mediated microglial amyloid- β phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J Neurosci* 32(48):17321-31.

Yan MH, Wang X, Zhu X. (2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 62:90-101.

Yang CS, Tzou BC, Liu YP, Tsai MJ, Shyue SK, Tzeng SF. (2008). Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium. *J. Cell. Biochem* 103:825-834.

Yang H, Jin GF, Ren DD, Luo SJ, Zhou TH. (2010). Neuro-protective mechanism of isoflavones on senescence-accelerated mice. *Chin J Nat Med* 4:280-4.

Yatabe Y, Hashimoto M, Kaneda K, Honda K, Ogawa Y, Yuuki S, Ikeda M. (2013). Efficacy of increasing donepezil in mild to moderate Alzheimer's disease patients who show a diminished response to 5 mg donepezil: a preliminary study. *Psychogeriatrics* 13(2):88-93.

Yu WF, Nordberg A, Ravid R, Guan ZZ. (2003). Correlation of oxidative stress and the loss of the nicotinic receptor alpha 4 subunit in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 338: 13-6.

- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171:87-98.
- Yu BP, Chung HY. (2007). The inflammatory process in aging. *Rev. Clin. Gerontol* 179-187.
- Yu HL, Li L, Zhang XH, Xiang L, Zhang J, Feng JF, Xiao R. (2009). Neuroprotective effects of genistein and folic acid on apoptosis of rat cultured cortical neurons induced by beta-amyloid 31-35. *Br J Nutr* 102(5):655-62.
- Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufenbiel M, Harada N, Zhong Z, Shen Y, Li R. (2005). Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(52):19198-203.
- Zhang HX, Duan GL, Wang CN, Zhang YQ, Zhu XY, Liu YJ. (2014). Protective effect of resveratrol against endotoxemia-induced lung injury involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Pulm Pharmacol Ther* 27(2):150-5.
- Zhang ZY, Daniels R, Schluesener HJ. (2013). Oridonin ameliorates neuropathological changes and behavioural deficits in a mouse model of cerebral amyloidosis. *J Cell Mol Med* 17(12):1566-76.
- Zhou Y, Li HL, Zhao R, Yang LT, Dong Y, Yue X, Ma YY, Wang Z, Chen J, Cui CL, Yu AC. (2010). Astrocytes express N-methyl-D-aspartate receptor subunits in development, ischemia and post-ischemia. *Neurochem Res* 35(12):2124-34.
- Zhu X, Smith MA, Perry G, Aliev G. (2004). Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 19(6):345-52.
- Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. (2007) Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 64(17):2202-10.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6(1):43-50.
- Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E, Karniol IG. (1982). Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 76(3):245-50.

