

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Programa de doctorado en Biotecnología, Medicina y Ciencias
Biosanitarias**



TESIS DOCTORAL

**La enzima amidohidrolasa de ácidos grasos en el contexto de
la neuroinflamación asociada a la Enfermedad de Alzheimer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Noelia Aparicio Muñoz

Directores

Julián Romero Paredes

Rosa María Tolón Rafael

Pozuelo de Alarcón (Madrid), 2019

“Nuestro conocimiento es necesariamente finito, mientras que nuestra ignorancia es necesariamente infinita”.

Karl Popper

ABREVIATURAS

Δ^9-THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
2-AG	2-araquidonoilglicerol
AA	Ácido Araquidónico
Aβ	Amiloide β
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AEA	Anandamida
APP	Proteína Precursora Amiloide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BACE1	β -secretasa (<i>β-site-APP-cleaving enzyme</i>)
BrEt	Bromuro de Etidio
CB(s)	Cannabinoide(s)
CB₁R	Receptor Cannabinoide tipo 1
CB₂R	Receptor Cannabinoide tipo 2
CBD	Cannabidiol
CBR(s)	Receptor(es) Cannabinoides
CNR1	Gen codificante para el CB ₁ R
CNR2	Gen codificante para el CB ₂ R
COX2	Ciclooxigenasa 2
Cx	Conexinas
EA	Enfermedad de Alzheimer
EC	Endocannabinoide(s)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAAH	Amidohidrolasa de ácidos grasos
G_{i/o}	Proteína G de subtipo i/o
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GJ	<i>Gap junction</i> (uniones en hendidura)
GPCR	Receptores Acoplados a Proteínas G
HC	Hemicanales
Iba1	Molécula adaptadora ionizante de unión a calcio 1

IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-1R-1	Receptor de la IL-1 tipo 1
IL-1Ra	Proteína antagonista de IL-1R
IL-10	Interleuquina 10
i.p.	intraperitoneal
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem
LTP	Potenciación a largo plazo
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MWM	Laberinto acuático de Morris
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLRP3	Inflamasoma que contienen la proteína NALP3 (proteína 3 con dominios NACHT, LRR y PYD)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGE₂	Prostaglandinas E ₂
PPARs	Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas
PS1	Presenilina 1
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT-qPCR	Retrotranscripción - PCR cuantitativa
SEC	Sistema Endocannabinoide
SEM	Error estándar de la media
SNC	Sistema Nervioso Central
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris Borato EDTA
TBS	Solución salina tamponada con tris
TLR	Receptores tipo <i>Toll</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TRPV1	Receptor de Potencial Transitorio Vanilloide 1
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild Type</i>

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN.....	7
1. SISTEMA CANNABINOIDE.....	9
1.1. Cannabinoides	9
1.2. Historia y relevancia	10
1.3. Sistema Endocannabinoide: definición y descubrimiento	11
1.4. Componentes y metabolismo.....	12
1.4.1. Ligandos endógenos (endocannabinoides).....	12
1.4.1.1. Anandamida.....	12
1.4.1.2. 2-Araquidonoilglicerol	13
1.4.1.3. Otros endocannabinoides	14
1.4.2. Receptores	15
1.4.2.1. CB ₁ R.....	16
1.4.2.2. CB ₂ R.....	17
1.4.2.3. Otros receptores.....	18
1.4.3. Metabolismo de la AEA.....	19
1.4.3.1. Síntesis de la AEA.....	19
1.4.3.2. Degradación de la AEA.....	20
1.4.3.2.1. FAAH	21
1.4.4. Metabolismo del 2-AG.....	23
2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	24
2.1. Introducción	24
2.2. Historia	24
2.3. Epidemiología	25
2.4. Etiología	26
2.5. Patología.....	27
2.6. Componentes bioquímicos implicados en la EA.....	28

2.6.1.	APP.....	28
2.6.2.	A β	28
2.6.3.	tau.....	30
2.7.	Patogénesis.....	30
2.7.1.	Hipótesis de la cascada amiloide.....	31
2.7.2.	Hipótesis inflamatoria.....	33
2.7.3.	Hipótesis de tau.....	33
2.8.	Diagnóstico.....	34
2.9.	Tratamientos farmacológicos actuales.....	35
3.	NEUROINFLAMACIÓN EN LA EA.....	38
3.1.	Citoquinas.....	39
3.1.1.	IL-1 β	39
3.1.2.	TNF α	41
3.1.3.	IL-10.....	41
3.2.	Quimioquinas.....	42
3.3.	Prostaglandinas.....	42
3.4.	Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	43
3.5.	Glía: función y actividad.....	43
3.5.1.	Astrocitos.....	44
3.5.2.	Microglía.....	47
4.	POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL SEC PARA EL TRATAMIENTO DE LA EA.....	50
4.1.	El SEC durante el envejecimiento, neuroinflamación, y la EA.....	50
4.2.	La FAAH como diana terapéutica en el contexto neuroinflamatorio de la EA.....	53
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
1.	ANIMALES DE EXPERIENTACIÓN.....	61
2.	METODOLOGÍA <i>IN VITRO</i>	65
2.1.	Cultivos primarios de glía.....	65

2.2.	Cuantificación de la proporción microglía/ astrocitos en los cultivos de trabajo	66
2.3.	Fibrilación del péptido A β ₁₋₄₂	67
2.4.	Exposición al péptido A β ₁₋₄₂	68
2.4.1.	Exposición al péptido A β ₁₋₄₂ HiLyteTM Fluor 555	69
2.5.	Exposición a las citoquinas IL-1 β y TNF α	69
2.6.	Cuantificación de la actividad de hemicanales: captación de BrEt	70
2.7.	Extracción y cuantificación de la proteína Cx43 en membrana plasmática.....	71
2.8.	Extracción de ARN y RT-qPCR.....	72
2.9.	Cuantificación de AEA: espectrometría de masas (LC-MS/MS)	74
2.10.	Estudio de la actividad fagocítica de la glía <i>in vitro</i> : citometría de flujo.....	75
3.	METODOLOGÍA <i>IN VIVO</i>	75
3.1.	Edad, genotipo, número de animales	75
3.2.	Protocolo del tratamiento farmacológico con minociclina.....	76
3.3.	Prueba de memoria espacial: Laberinto acuático de Morris (MWM)	77
3.4.	Recolección y procesamiento de muestras	79
3.5.	Extracción de ARN y RT-qPCR.....	79
3.6.	Cuantificación del péptido A β ₁₋₄₂ y de la proteína IL-1 β : técnica ELISA .	80
3.7.	Cuantificación de placas neuríticas: tinción con methoxy X04.....	80
3.8.	Estudio del fenotipo microglial y de la fagocitosis: citometría de flujo	81
4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	83
	RESULTADOS.....	85
1.	APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	87
1.1.	Caracterización de los cultivos primarios.....	87
1.2.	Expresión de los componentes de la cascada de señalización de IL-1 β y otras citoquinas.....	88
1.3.	Estudio de los hemicanales de membrana.....	92
1.3.1.	Cuantificación de la proteína Cx43 en membrana plasmática.....	93

1.3.2.	Cuantificación de la actividad hemicanal tras exposición al péptido A β ₁₋₄₂	94
1.3.3.	Cuantificación de la actividad hemicanal tras exposición a las citoquinas IL-1 β y TNF α	95
1.4.	Cuantificación de la producción/ liberación de AEA	96
1.5.	Impacto de la inhibición genética de FAAH en la actividad fagocítica de A β ₁₋₄₂	97
2.	APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	98
2.1.	Expresión de citoquinas y de los componentes de la cascada de señalización de IL-1 β tras el tratamiento con minociclina	99
2.1.1.	Expresión de citoquinas	99
2.1.2.	Expresión de los componentes de la cascada de señalización de IL-1 β	103
2.1.3.	Cuantificación de la proteína IL-1 β	104
2.2.	Patología amiloide	105
2.2.1.	Cuantificación de A β ₁₋₄₂	105
2.2.2.	Cuantificación de placas neuríticas	106
2.3.	Fenotipo microglial.....	108
2.3.1.	Índice M1/M2	108
2.3.2.	Cuantificación de la actividad fagocítica microglial	109
2.4.	Evaluación de la memoria espacial: MWM.....	110
	DISCUSIÓN.....	113
	CONCLUSIONES	137
	BIBLIOGRAFÍA.....	141
	ANEXOS	155
	Anexo I: Cuantificación de la proporción microglía/ astrocitos en los cultivos de trabajo.....	157
	Anexo II: Cuantificación de la captación de BrEt mediante la intensidad de fluorescencia total emitida por célula.....	159
	Anexo III: Análisis y cuantificación de AEA por LC-MS/MS	162

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

La planta *Cannabis Sativa*, de la cual se obtiene la marihuana, se viene empleando desde tiempos ancestrales con fines terapéuticos y religiosos. El interés por conocer la causa responsable de los efectos asociados al consumo de marihuana llevó al aislamiento del principal componente psicoactivo de la planta, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), al descubrimiento de los receptores de cannabinoides (CBRs), y al de sus ligandos endógenos, los endocannabinoides (ECs). Junto con el resto de moléculas responsables de su metabolismo, estos componentes pasaron a formar parte del denominado Sistema Endocannabinoide (SEC), el cual ha sido, y sigue siendo de interés por su implicación en diversos procesos fisiopatológicos.

La Enfermedad de Alzheimer (EA), la forma más común de demencia, provoca el deterioro de la memoria, razonamiento, comportamiento y realización de actividades cotidianas. Tradicionalmente, la deposición del péptido amiloide β ($A\beta$) y la hiperfosforilación de la proteína tau han sido establecidas como las causas responsables de esta enfermedad, pero su progresión se ve favorecida por otros procesos fisiopatológicos como el estrés oxidativo, la gliosis, y la neuroinflamación.

La conexión entre el SEC y la EA se da por diversos procesos modulados por el SEC y afectados en la enfermedad, como son la neurogénesis, la conectividad neuronal, los procesos de eliminación de restos celulares, así como el estrés oxidativo, la gliosis, o la neuroinflamación, mencionados anteriormente. Dado el poder antiinflamatorio de los EC, varias aproximaciones experimentales estudian la relevancia del bloqueo de las enzimas de degradación de los EC para aumentar los niveles endógenos de los mismos. Datos previos de nuestro grupo de investigación demostraron que la inhibición genética de FAAH (y no la farmacológica) da lugar a una mejora de la adquisición de memoria espacial en ratones con la patología amiloide (5xFAD), así como a la reducción de la producción y deposición de $A\beta_{1-40}$ y de $A\beta_{1-42}$ en hipocampo. Paradójicamente, describimos un aumento de la expresión de citoquinas y marcadores pro-inflamatorios, entre los que se encuentra la IL-1 β . Dado el papel relevante que juega esta citoquina en procesos de neuroinflamación, planteamos la hipótesis de que la interleuquina IL-1 β adquiere una función relevante en un contexto neuroinflamatorio asociado a la patología amiloide, en el que FAAH se encuentra inactivada genéticamente. Específicamente, se propone su relación con una respuesta inflamatoria de la glía más eficiente ante la presencia del péptido $A\beta_{1-42}$, y por otro lado, con las mejoras patológicas observadas en ratones 5xFAD, incluyendo el aumento de la memoria espacial. Por tanto, la inhibición

de la producción de la IL-1 β mediante un tratamiento antiinflamatorio con minociclina, provocaría la reversión de dichas mejoras, incluyendo las de tipo cognitivo.

El procedimiento experimental se basó en dos paradigmas. El primero consistió en el empleo de cultivos primarios de glía WT y FAAH^{-/-} expuestos al péptido A β ₁₋₄₂, con el fin de conocer el efecto de la inactivación genética de FAAH en cuatro propiedades gliales: 1) el perfil de expresión de citoquinas, marcadores inflamatorios, y algunos componentes de la familia IL-1; 2) la actividad de los hemicanales de Cx43; 3) la producción y liberación de AEA; 4) la actividad fagocítica. El segundo procedimiento se basó en el empleo de modelos animales de la EA, con o sin actividad FAAH (5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}, respectivamente), a los que se les trató con minociclina. Con ellos, se estudió si dicho fármaco era capaz de revertir los efectos derivados de la inactivación genética de FAAH, en el contexto patológico de la EA, tales como: 1) el perfil de expresión de citoquinas y algunos componentes de la familia IL-1; 2) los niveles de A β ₁₋₄₂, y el grado de deposición en corteza e hipocampo; 3) el fenotipo inflamatorio y la capacidad fagocítica de la microglía; 4) la adquisición de memoria espacial.

Los resultados revelan que la glía FAAH^{-/-} en cultivo expresa más ARN mensajero (ARNm) de los componentes de la familia IL-1 estudiados, así como de TNF α y COX2 en condiciones basales, mientras que la presencia del péptido A β ₁₋₄₂ solo afecta a la expresión de IL-1 β . A su vez, la inhibición genética de FAAH se asocia a un aumento de los niveles de proteína Cx43 en membrana, y a la prevención de la reducción de AEA en presencia de A β ₁₋₄₂. Sin embargo, la actividad fagocítica de la glía sin actividad FAAH permanece inalterada. El análisis de la expresión de citoquinas en corteza e hipocampo de ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} muestra una mayor expresión de IL-1 β , y en menor medida, de TNF α , en aquellos animales sin actividad FAAH. Paralelamente, la inhibición genética de FAAH favorece la disminución de los niveles de A β ₁₋₄₂, así como su deposición. Sin embargo, dicha inhibición da lugar a que la microglía sea mayoritariamente pro-inflamatoria, y que ejerza una mayor actividad fagocítica respecto de su homóloga WT. El tratamiento con minociclina provoca una disminución de los niveles de IL-1 β , pero en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} aumentan los niveles y la deposición de A β ₁₋₄₂, a la vez que empeora la adquisición de memoria espacial.

Estos datos sugieren que la inhibición genética de FAAH favorece un estado de preparación de la glía (*priming*) protagonizado por la IL-1 β , el cual favorece una actuación más temprana en presencia del péptido A β ₁₋₄₂. Por ello, se propone el estudio del SEC, y en particular la modulación de la enzima FAAH, como potencial diana terapéutica para el tratamiento de la EA.

ABSTRACT

The plant *Cannabis Sativa*, source of marijuana, is being employed since ancient times for therapeutic and religious purposes. The interest for knowing the cause responsible of the effects associated to marijuana consumption gave rise to the isolation of the principal psicoactive component of the plant, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), the cannabinoid receptors (CBRs) discovery, and later, of their endogenous ligands, the endocannabinoids (ECs). Along with the rest of molecules liable of EC metabolism, all of them become part of the so-called Endocannabinoid System (SEC). The SEC was, and continue being of interest because of its implication in a variety of physio-pathologic processes.

Alzheimer's Disease (EA), the most common form of dementia, provokes the impairment of memory, reasoning and behaviour, which disturb the ability of performing daily routine. Traditionally, amyloid- β ($A\beta$) deposition and tau hyperphosphorilation have been considered the main causes of this disease. However, its progression is favoured by other phenomena, such as oxidative stress, gliosis and neuroinflammation.

The connection between SEC and EA is found in processes that are modulated by SEC and are altered during the disease, for example neurogenesis, connectivity, cell *debris* removal, and the mentioned oxidative stress, gliosis and neuroinflammation. Due to the anti-inflammatory action of the EC, several experimental approaches study the relevance of blocking the EC degrading enzymes in order to increase their endogenous levels. Previous data from our group demonstrated that the genetic (and no pharmacologic) inhibition of FAAH give rise to the improving of memory acquisition in mice with amyloid pathology (5xFAD). Furthermore, this *knocking* of FAAH leads to a reduction in $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ production and deposition in hippocampus. However, the genetic inactivation of FAAH provokes, paradoxically, an increase of the expression of cytokines and pro-inflammatory markers, highlighting IL-1 β . Owing to the relevant role of this cytokine in neuroinflammatory processes, we hypothesis that the interleukin IL-1 β gain a significant function in the neuroinflammatory context associated to the amyloid pathology, without FAAH activity. Specifically, it is proposed a direct relationship between IL-1 β and a more efficient inflammatory response in the presence of $A\beta_{1-42}$, as well as with the pathologic and memory improvements in 5xFAD mice. Therefore, the inhibition of IL-1 β production by an anti-inflammatory treatment with minocycline would cause the reversion of the mentioned improvements.

The experimental procedure was based on two paradigms. The first one consisted of using WT and FAAH^{-/-} glial primary cultures exposed to Aβ₁₋₄₂ peptide. The purpose was to elucidate the effect of the genetic inhibition of FAAH in glial properties such as 1) the expression profile of cytokines, inflammatory markers, and some components of IL-1 family, 2) the activity of Cx43 hemichannels, 3) the production and release of AEA, 4) the phagocytic activity. The second experimental procedure consisted of treating with minocycline to EA animal models, either with or without FAAH activity (5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}, respectively). From them, it was studied if minocycline was able to revert the effects observed after the genetic inactivation of FAAH, in the pathologic context of EA, such as 1) the expression profile of cytokines, inflammatory markers, and some components of IL-1 family, 2) the Aβ₁₋₄₂ levels and deposition in cortex and hippocampus, 3) the phenotype of microglia and its phagocytic ability, and 4) the spatial memory acquisition.

The data obtained reveal that glia FAAH^{-/-} *in vitro* expresses in basal conditions more messenger RNA (ARNm) of the components of the IL-1 family studied, as well as of TNFα and COX2. However, the presence of Aβ₁₋₄₂ only affects the expression of IL-1β in these cells. At the same time, the genetic inhibition of FAAH is associated to an increase of the levels of Cx43 protein in membrane, as well with the prevention of AEA reduction in presence of Aβ₁₋₄₂. Also, the phagocytic activity of the glia FAAH^{-/-} remains unaltered. Analysis of cytokine expression in the cortex and hippocampus of 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} mice show high expression of IL-1β, and TNFα to a lesser extent, in animals without FAAH activity. At the same time, the inhibition of FAAH give rise to the decrease of Aβ₁₋₄₂ levels and its deposition in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice. Nonetheless, such inhibition of the enzyme in the mentioned mice favours the pro-inflammatory phenotype of the microglia, but a higher phagocytic activity than its homologous WT (5xFAD). The treatment with minocycline causes a reduction of IL-1β levels, but in 5xFAD/FAAH^{-/-} animals induces a boost of levels and deposition of Aβ₁₋₄₂, while the spatial memory acquisition worsens.

These data suggest that the genetic inhibition of FAAH promotes a readiness status in glia (priming), started by IL-1β. This priming state would favour an earlier action of this glia in presence of the Aβ₁₋₄₂ peptide. Therefore, it is proposed the study of SEC, and particularly, the modulation of FAAH enzyme, as a potential therapeutic target for Alzheimer's Disease.

INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA CANNABINOIDE

1.1. Cannabinoides

Los cannabinoides (CBs) se definen como compuestos naturales propios de la planta *Cannabis sativa*, de la cual se obtiene la marihuana. De entre los 500 compuestos que tiene esta planta, se han identificado como cannabinoides aproximadamente más de 100, aunque es difícil establecer una cifra exacta, ya que sus estructuras y propiedades físicas son muy parecidas entre sí, lo que complica su separación y aislamiento (Mechoulam & Parker, 2013; Basavarajappa *et al.*, 2017; Lafaye *et al.*, 2017). No obstante, los primeros en identificarse, y por tanto, los más conocidos, son el Δ^9 - tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), y el cannabidiol (CBD) (figura 1). El Δ^9 -THC fue aislado y descrito estructuralmente por Yehiel Gaoni y Raphael Mechoulam en 1964 (Gaoni & Mechoulam, 1964), mientras que en 1967 Mechoulam y cols. lograron sintetizarlo (Mechoulam *et al.*, 1967), facilitando su disponibilidad para su estudio en investigación. Este componente de la marihuana se caracteriza por ser el principal CB con propiedades psicoactivas, por lo que su concentración en la planta, y más concretamente, la relación THC:CBD, suele indicar su potencia psicoactiva (Lafaye *et al.*, 2017).

En cuanto al CBD, aunque fue aislado a finales de 1930, no se conoció su estructura hasta 1963. Su estudio no se avivó hasta hace 20 años, al descubrir sus propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes, así como su capacidad para atenuar las alteraciones en la memoria que provoca el Δ^9 -THC. Es importante destacar que el CBD carece de psicoactividad (Mechoulam & Parker, 2013).

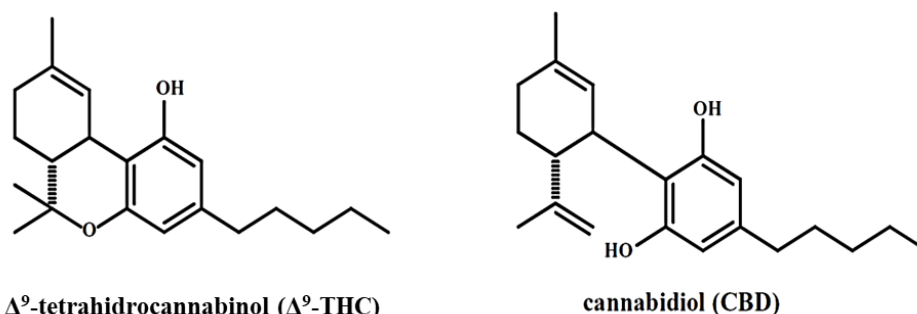


Figura 1: Estructura de los dos CBs principales de la planta *Cannabis Sativa*: Δ^9 -THC (izquierda), y CBD (derecha) (Mechoulam & Parker, 2013).

El contenido en CBs difiere notablemente entre las diferentes variedades de la planta existentes. Por ejemplo, en el cáñamo industrial, la concentración de THC no supera el 0,3%. En el hachís (obtenido a partir de la resina de la planta), era de alrededor un 5% en los años 60, mientras que la de la marihuana (mezcla de hojas y flores secas de la planta), en la misma década se situaba entre el 2-3%. Sin embargo, actualmente, para ganar un mayor poder psicoactivo, se han desarrollado variedades de cannabis que han aumentado su contenido en THC hasta un 20%, acompañado de una reducción en el contenido de CBD, lo que aumenta la potencia de la droga comercializada. Esto podría estar relacionado con el aumento de los efectos nocivos asociados al consumo de cannabis en los últimos años. (Mechoulam & Parker, 2013; Lafaye *et al.*, 2017).

1.2. Historia y relevancia

El cannabis era conocido y empleado desde tiempos antiguos con diferentes propósitos (Mechoulam & Parker, 2013). Ya entre el segundo milenio y el 600 antes de Cristo, los asirios, un grupo étnico de Asia Occidental, usaban el cannabis tanto por sus efectos psicoactivos como por sus propiedades medicinales (como por ejemplo para la amenorrea femenina). En China se conocían sus efectos duales, puesto que en su farmacopea médica clásica conocida como *Pen Ts'ao* (figura 2), la planta era recomendada para tratar varias patologías, pero también se recogía la posibilidad de “ver demonios” cuando se consumía en exceso (Mechoulam & Parker, 2013).



Figura 2: Imagen de la página de una de las ediciones del libro de plantas medicinales chino *Pen Ts'ao*, en el que se ilustra y describe la planta del cáñamo. Fuente:(La planta, 2019).

En Europa, el consumo de cannabis comenzó en el siglo XIX. Los efectos psicológicos derivados de dicho consumo se recogieron en escritos de autores franceses pertenecientes al grupo *Le Club des Hachichins*. Entre ellos se encontraba Moreau, un psiquiatra que describió en uno de sus libros los fenómenos psicológicos observados en pacientes: sentimiento de felicidad, excitación y disociación de ideas,

desorientación espacial y temporal, aumento de la sensación de audición, ilusiones y alucinaciones, fluctuación emocional, impulsividad y delirios. Muchos de los síntomas manifestados por el consumo de cannabis son opuestos y contradictorios, lo que ha tenido confundidos a los investigadores durante muchos años, hasta conocer la actividad bifásica del Δ^9 -THC (los efectos a dosis bajas difieren de los descritos a dosis altas) (Mechoulam & Parker, 2013).

Actualmente, el estudio de los CBs y de los endocannabinoides (ECs) ha cobrado protagonismo tanto por su potencial terapéutico como por el consumo recreacional de marihuana (Mechoulam & Parker, 2013).

1.3. Sistema Endocannabinoide: definición y descubrimiento

Los efectos descritos, ya incluso desde la antigüedad, tras el consumo de cannabis, dieron lugar a la búsqueda de las moléculas responsables de dichas respuestas. A raíz del aislamiento del Δ^9 -THC en 1964 (Gaoni & Mechoulam, 1964), se continuó con la caracterización de la vía de señalización bioquímica que culminaba con los efectos biológicos tan dispares descritos tras dicho consumo. En un principio se pensó que los CBs, debido a su naturaleza lipófila, actuaban a través de un mecanismo asociado a la membrana plasmática de tipo inespecífico. Sin embargo, en 1984, el grupo de la Dra. Howlett (Howlett, 1984) publicó los primeros datos indicativos de la posible existencia de receptores cannabinoides (CBRs). Concretamente, observaron que los CBs inhibían la adenilato ciclasa, así como que la potencia de estos dependía del mecanismo por el cual ejercieran su acción. El mismo grupo describió posteriormente la existencia de sitios de unión específicos en el cerebro (Devane *et al.*, 1988), cuya distribución concordaba con las propiedades psicotrópicas de los CBs. Finalmente, se clonaron el receptor cannabinoide tipo 1 (CB₁R) (Matsuda *et al.*, 1990), y poco después, el receptor cannabinoide tipo 2 (CB₂R) (Munro *et al.*, 1993).

El descubrimiento de los CBRs dio pie a la búsqueda e identificación de ligandos endógenos que actuaran sobre los receptores, así como enzimas responsables tanto de su síntesis como de degradación. El conjunto de todas estas moléculas se denominó Sistema Endocannabinoide (SEC), que se define como grupo de ligandos endógenos, (ECs), de receptores específicos, y de enzimas responsables de la síntesis y degradación de los ECs.

1.4. Componentes y metabolismo

1.4.1. Ligandos endógenos (endocannabinoides)

Los ECs son moléculas de carácter lipófilo, capaces de unirse a los CBRs y desencadenar una respuesta biológica. A diferencia de otros neurotransmisores, y precisamente por su naturaleza lipófila, se sintetizan “a demanda” a partir de fosfolípidos de membrana tras un incremento intracelular de Ca^{2+} , y se liberan al espacio sináptico, sin almacenarse previamente en vesículas. Los CB_1R se localizan presinápticamente, mientras que la liberación de ECs se realiza desde las neuronas postsinápticas (señalización retrógrada). Finalmente, para terminar la respuesta, los ECs son incorporados de nuevo a la célula, y degradados por las enzimas de degradación correspondientes (Ahn *et al.*, 2008; Mechoulam & Parker, 2013; Lu & MacKie, 2016).

Los primeros ECs en ser identificados, así como los más estudiados, son la anandamida (AEA), y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG). A continuación, se describen con más detalle cada uno de ellos.

1.4.1.1. Anandamida

La N-araquidonoil etanolamida, más comúnmente conocida como anandamida, o AEA (*ananda = felicidad interior*), fue el primer EC en ser identificado y caracterizado estructuralmente (Devane *et al.*, 1992) (figura 3). Es capaz de unirse tanto al CB_1R como al CB_2R , sin embargo, actúa como agonista parcial de CB_1R , y la afinidad por CB_2R es de cuatro veces menos aproximadamente, con respecto a la que tiene por CB_1R (Svíženská *et al.*, 2008; Zou & Kumar, 2018). Su baja eficacia como agonista sobre los CBRs sugiere que en aquellas regiones donde la expresión de receptores sea baja, o en las que dichos receptores se acoplen débilmente a una cascada de señalización, la AEA puede llegar a antagonizar los efectos de otros agonistas más eficaces (Lu & MacKie, 2016).

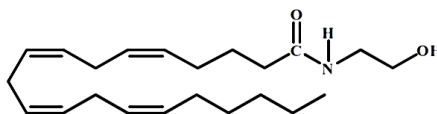


Figura 3: Estructura de la anandamida (AEA) (Basavarajappa *et al.*, 2017).

En cuanto a su distribución en el cerebro, los mayores niveles de AEA se detectan en las regiones cerebrales donde los niveles de CBRs también son elevados, como en hipocampo, estriado, cerebelo o corteza cerebral. No obstante, la AEA también puede actuar sobre otros receptores, como el receptor de potencial transitorio vanilloide 1 (TRPV1), los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), en particular los subtipos α y γ , así como sobre los receptores acoplados a proteínas G 55 (GPR55) y 119 (GPR119). Esta propiedad de la AEA de interactuar con una variedad tan amplia de receptores explica en parte su participación en diversas actividades biológicas en múltiples órganos y sistemas, según la distribución de los receptores mencionados (Maccarrone, 2017).

1.4.1.2. 2-Araquidonoilglicerol

El hecho de que la AEA no fuera capaz de reproducir por sí misma todos los efectos observados con el THC fue uno de los motivos por los que continuó la búsqueda de más ligandos para los CBRs, hasta descubrir el 2-Araquidonoilglicerol, o 2-AG (figura 4). El 2-AG es un monoacilglicerol que fue aislado por primera vez en 1995 a partir de intestino canino (Mechoulam *et al.*, 1995) y de cerebro de rata (Sugiura *et al.*, 1995). Junto con la AEA, es considerado como uno de los endocannabinoides más importantes.

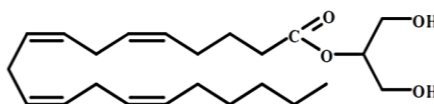


Figura 4: Estructura del 2-Araquidonoilglicerol (2-AG) (Basavarajappa *et al.*, 2017).

Al igual que la AEA, el 2-AG se une a CB₁R y CB₂R, pero con la diferencia de que 2-AG es un agonista completo de ambos receptores (Lu & MacKie, 2016). Los niveles de 2-AG son mayores que los de AEA, aunque no se pueden valorar con exactitud, debido a que existen diferencias según el contexto fisiológico o patológico (Justinová *et al.*, 2011; Baggelaar *et al.*, 2018; Zou & Kumar, 2018). No obstante, se estima que los niveles de 2-AG en cerebro son unos 170 veces mayor que los de AEA (Baggelaar *et al.*, 2018). Estos datos, junto con el hecho de que por su alta afinidad con los CBRs no se une a otros receptores con la misma facilidad que la AEA, ha llevado a proponer que el 2-AG es el endocannabinoide clave en la regulación de la señal retrógrada en el cerebro (Justinová *et al.*, 2011; Zou & Kumar, 2018).

1.4.1.3. Otros endocannabinoides

Además de los dos ECs clásicos descritos anteriormente, dentro del SEC se incluyen otros ligandos derivados de ácidos grasos poliinsaturados de al menos 18 átomos de carbono (LC-PUFAs, de sus siglas en inglés), o del ácido oleico. La mayoría de todos ellos son amidas, ésteres, o éteres de ácidos grasos, pero también se incluyen algunos análogos del 2-AG, como el 2-oleoilglicerol o el 2-linoleoilglicerol. Junto con la AEA y el 2-AG, siete de estos ligandos han sido incluidos dentro del grupo de ECs componentes del SEC (figura 5). Además, todos ellos participan en otras rutas biológicas, y pueden actuar sobre otros receptores que no son CBRs, con más o menos potencia (Witkamp, 2016).

Entre otros ligandos, se incluyen además los propios metabolitos derivados de la síntesis o degradación de los ECs, los cuales pueden ejercer un efecto ambiental que favorezca la acción de otros ECs. En particular, compuestos similares a los ECs, como la N-palmitoiletanolamina (PEA), o la N-oleoiletanolamina (OEA), ejercen su acción por otras vías independientes de CB₁R/CB₂R, potenciando la acción de otros ECs sobre sus dianas (Maccarrone, 2017).

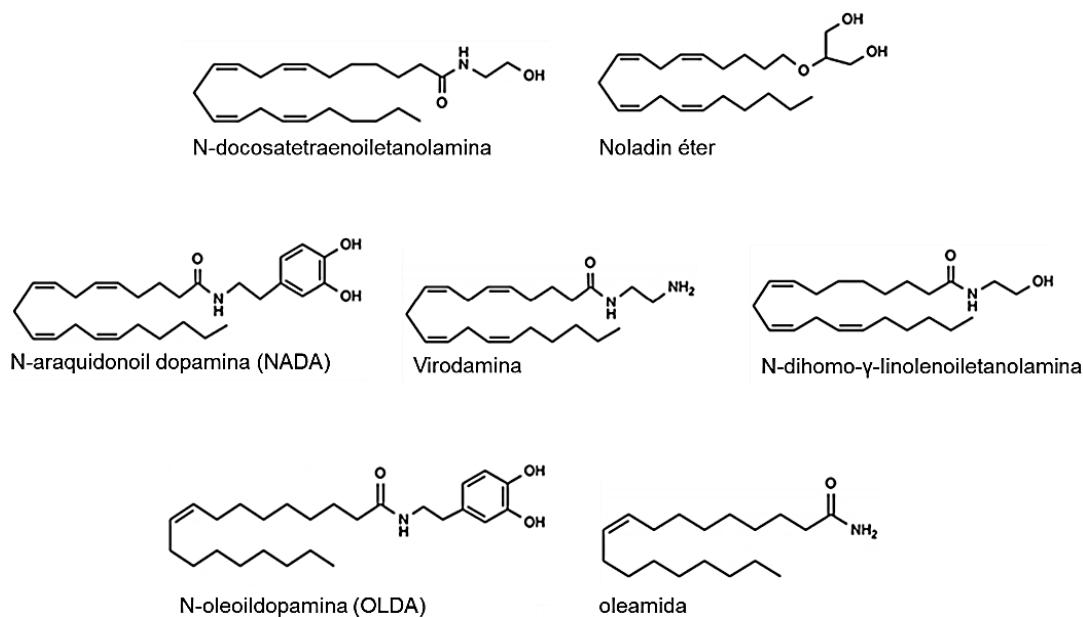


Figura 5: Estructura de los siete ECs que, además de la AEA y el 2-AG, se clasifican como tal por el sistema de clasificación de fármacos y nomenclatura de receptores de la IUPHAR (Witkamp, 2016).

1.4.2. Receptores

Los CBRs pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors* -GPCRs-). Desde que se confirmó su existencia en 1984 por el grupo de Allyn C. Howlett, los receptores CB₁R y CB₂R se han caracterizado en cuanto a su estructura primaria, propiedades de unión a ligandos y/o transducción de señales. Se ha podido determinar su estructura tridimensional, lo que abre la puerta a poder conocer la disposición de sus hélices proteicas según la especie (humana, murina etc.), y según el ligando que se una al receptor (Svíženská *et al.*, 2008). La unión del ligando al receptor produce la activación de este último, tras la cual, a través de proteínas G de tipo G_{i/o} principalmente, se da lugar a 1) la inhibición de la adenilato ciclasa; 2) el cierre de algunos canales de calcio dependientes de voltaje; 3) la activación de algunas proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y; 4) la apertura de canales rectificadores de K⁺ (Mackie, 2008; Zou & Kumar, 2018). No obstante, existen variaciones dependiendo del tipo celular, y del tipo de proteína G a la que se acoplen. La estructura secundaria de los CBRs consiste en siete dominios transmembrana conectados por horquillas intra- y extracelulares, así como de un extremo N-terminal extracelular con sitios de glicosilación, y un dominio C-terminal intracelular, a través del cual se acopla a los complejos de proteínas G (figura 6) (Svíženská *et al.*, 2008). Cabe destacar que, en el caso del CB₂R, las funciones reguladoras de los canales iónicos son más variables (Mackie, 2008).

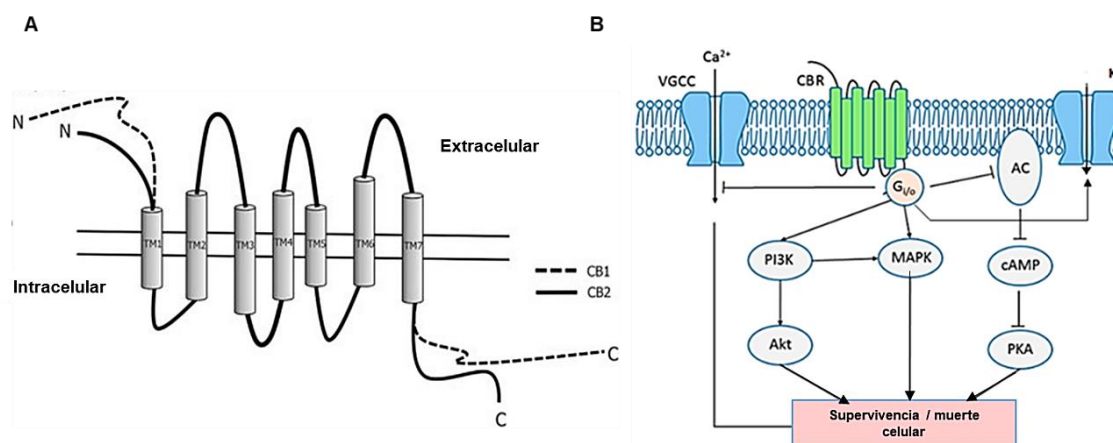


Figura 6: A: Representación esquematizada de la estructura de los CBRs, donde se observan los 7 dominios transmembrana (TM), y los dominios N- y C- terminales (Brown & Farquhar-Smith, 2018). B: Representación ilustrada de las vías de señalización principales reguladas por los CBRs, tras su acoplamiento a proteínas G_{i/o} (bloqueo de la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje -VGCC-, inhibición de la adenilato ciclasa (AC), activación de la cascada PI3K/Akt, y la de las MAPK, así como la activación de la apertura de canales rectificadores de K⁺. (adaptación de (Zou & Kumar, 2018)).

1.4.2.1. CB₁R

Como ya se ha mencionado anteriormente, el CB₁R fue el primero en ser descubierto y clonado (figura 7). Este receptor, el GPCR más abundante en el cerebro, está codificado por el gen *CNR1*, y se compone de 472 aminoácidos en humanos, y de 473 en rata y ratón, existiendo un 97-99% de identidad en la secuencia de aminoácidos entre dichas especies. Existen otras dos isoformas con el N-terminal más corto que la forma canónica del receptor, resultantes del *splicing* alternativo, pero de las que aún no se conocen sus propiedades farmacológicas y fisiológicas (Zou & Kumar, 2018).

Este receptor abunda en corteza, núcleos basales, hipocampo y cerebelo. La mayoría de ellos se encuentran en los terminales axónicos y segmentos axónicos pre-terminales de las neuronas presinápticas, a cierta distancia de la zona activa, de manera que, cuando se activan, se produce una supresión de la excitabilidad, y una inhibición de la liberación de neurotransmisores (Mackie, 2008). Dentro de la corteza e hipocampo, las neuronas con mayor densidad de CB₁R son las interneuronas que expresan colecistoquinina. No obstante, en neuronas glutamatérgicas, aunque existen en menor número, estos receptores adquieren una gran relevancia funcional (Marsicano & Lutz, 1999; Lu & MacKie, 2016). CB₁R también se ha detectado en células gliales, y su activación da lugar a efectos importantes también relacionados con la transmisión sináptica. Por ejemplo, la activación del CB₁R de la zona perisináptica de los procesos astrocíticos da lugar a la liberación de Ca²⁺ intracelular vía G_{q/11}/fosfolipasa C(PLC)/inositol trifosfato (IP₃), así como a la liberación adicional de gliotransmisores, principalmente glutamato, que actúan tanto en los receptores metabotrópicos de glutamato de la neurona presináptica como en los NMDAR postsinápticos (Navarrete *et al.*, 2014; Scheller & Kirchhoff, 2016). Esto significa que, la activación de los CB₁R en los procesos astrogliales adyacentes a la sinapsis, pueden afectar a sinapsis más lejanas a través de las uniones en hendidura (*gap junctions*-GJs-), mediante las cuales los astrocitos se acoplan entre sí formando una red de unión y comunicación astrocitaria. Es por ello por lo que la activación de CB₁R en astrocitos puede dar lugar tanto a la potenciación como la depresión de la neurotransmisión. Este proceso es de gran importancia en corteza e hipocampo, para los procesos de plasticidad neuronal y memoria (Scheller & Kirchhoff, 2016).

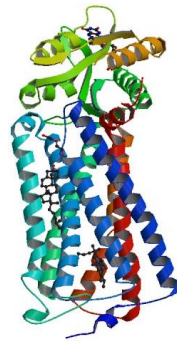


Figura 7: Estructura cristalizada de CB₁R interaccionando con el agonista AM841 (5XR8, Protein Data Bank).

1.4.2.2. CB₂R

El CB₂R (figura 8) está codificado por el gen *CNR2*, y se compone de 360 aminoácidos en humanos. Comparte un 44% de homología de secuencia a nivel proteico con CB₁R. A diferencia de este último, CB₂R difiere en homología entre humanos y roedores en mayor medida, ya que, en este caso, es de un 80%. Se han identificado dos isoformas: la predominante se encuentra mayoritariamente en testículos, y en menor cantidad en regiones cerebrales relacionadas con la recompensa, mientras que la isoforma menos predominante, se expresa fundamentalmente en bazo, y, en menor medida, en cerebro. Sin embargo, en rata se han descrito cuatro isoformas, mientras que en ratón también se conocen solo dos (Zou & Kumar, 2018).

Este receptor se expresa predominantemente en tejidos periféricos, destacando el sistema inmune. En particular, se ha establecido que los niveles de CB₂R en células inmunes humanas es mayor en linfocitos B, seguidos de las células *Natural Killer*, monocitos/macrófagos, linfocitos T citotóxicos (CD8), y linfocitos T cooperadores (CD4) (Galiegue *et al.*, 1995; López *et al.*, 2018). En el Sistema Nervioso Central (SNC), el CB₂R se expresa en niveles mucho más bajos que CB₁R. Se detecta principalmente en microglía y células endoteliales. Sin embargo, existen grupos de investigación que refieren la expresión funcional de CB₂R en neuronas (García *et al.*, 2015; Li & Kim, 2015; Zhang *et al.*, 2017). Una particularidad de los CB₂R es que son altamente inducibles tras daño tisular o durante procesos inflamatorios (Zou & Kumar, 2018). En SNC, la activación de los CB₂R da lugar a la disminución de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de la microglía activada, así como a la estabilización y aumento de la eficacia de la barrera hematoencefálica (Scheller & Kirchhoff, 2016).

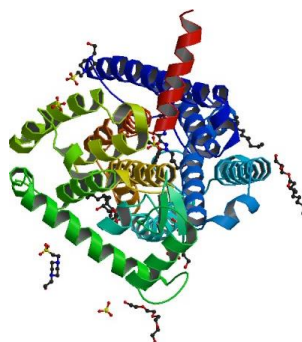


Figura 8: Estructura cristalizada de CB₂R interaccionando con el agonista AM10257 (5ZTY, Protein Data Bank).

1.4.2.3. Otros receptores

Existen otros receptores que pueden ser activados por ECs, y principalmente por la AEA. Uno de ellos es el receptor TRPV1, perteneciente a la familia de receptores de potencial transitorio (TRP). El TRPV1 es un canal iónico que responde a diferentes estímulos, tales como temperaturas altas o pH bajo, y que puede participar en la transducción de estímulos nocivos que se detectan en los terminales nociceptivos (Caterina *et al.*, 1997; Rosenbaum & Simon, 2007; Jara-Oseguera *et al.*, 2010). Además, este receptor es el único de todos los TRPs activado por la capsaicina, responsable del sabor picante de los pimientos. Sin embargo, su inhibición parece tener interés terapéutico para el alivio del dolor de diversas patologías (Jara-Oseguera *et al.*, 2010). La AEA puede activar el receptor TRPV1 en determinadas condiciones, pero su acción varía según el contexto (Rosenbaum & Simon, 2007; Lu & MacKie, 2016). En cualquier caso, actúa sobre este receptor como agonista completo, pero con una afinidad de unión relativamente baja.

Otros receptores activados por los CBs son los PPAR α y γ , los cuales median en algunos de los efectos analgésicos, neuroprotectores, moduladores de la función neuronal, anti-inflamatorios, etc., a menudo en conjunción con la activación de CBRs. Su función, tras su activación, se encuentra asociada a la modulación de la transcripción génica, y una de las vías de activación de los PPAR conocida es mediante el aumento del tono EC (Lu & MacKie, 2016; O'Sullivan, 2016).

Finalmente, el receptor GPR55 se ha identificado como un nuevo CBR. Se trata de otro GPCR muy extendido tanto en cerebro como en tejidos periféricos, lo que sugiere su participación en diferentes procesos biológicos. Sin embargo, es reseñable el hecho de que este receptor no se ha localizado en áreas cerebrales como corteza e hipocampo en humanos, mientras que sí se ha hecho en roedores. GPR55 solo comparte un 13%

de homología con el CB₁R, y un 14% con CB₂R, y entre especies, el gen humano es similar en un 75% en secuencia con el gen de ratón, y un 78% con el de rata (Tudurí *et al.*, 2017).

1.4.3. Metabolismo de la AEA

Ambos ECs (AEA y 2-AG) tienen en común ser derivados del ácido araquidónico (AA) (figura 9), pero las rutas de síntesis y degradación de cada uno de ellos son diferentes entre sí. Por su relevancia en esta tesis, se describirán con más detalle las rutas de síntesis y degradación de la AEA.

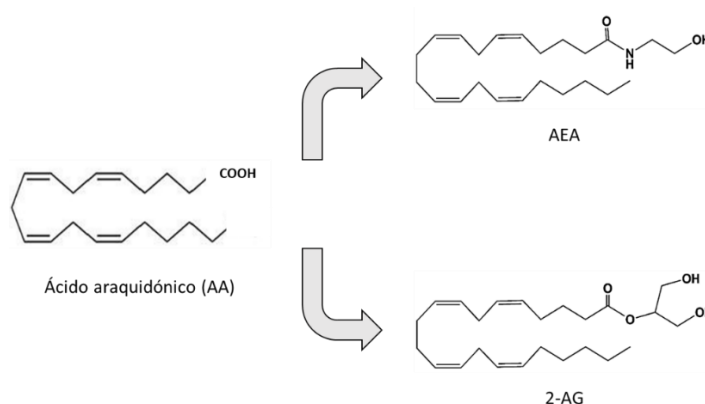


Figura 9: Representación de la molécula de AA, como molécula común entre la AEA y el 2-AG.

1.4.3.1. Síntesis de la AEA

La síntesis de la AEA comienza a partir de los fosfolípidos de membrana. A día de hoy se conocen varias rutas por las cuales se sintetiza AEA, las cuales parecen ser redundantes (Maccarrone, 2017). Estas variaciones, que pueden ocurrir en diferentes regiones cerebrales, (e incluso entre diferentes tejidos y órganos), podrían existir debido a las diferencias fisiológicas y patológicas de dichas regiones/ órganos.

Actualmente hay descritas cuatro rutas de síntesis de AEA: 1) la dependiente de la enzima fosfolipasa D específica de N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD); 2), la que lo es de la enzima fosfolipasa C (PLC), seguida de la proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22 (PTPN22); 3) aquella en la que se lleva a cabo una doble hidrólisis de grupos acilo: la primera por parte de la proteína 4 que contiene el dominio α/β hidrolasa (ABHD4), seguida de la glicerofosfodiesterasa 1 (GDE1) y; 4) aquella en la que se produce la hidrólisis de un grupo acilo por parte de la fosfolipasa A₂ soluble (sPLA₂),

seguida de la liberación de la AEA por parte de la lisofosfolipasa D específica de NAPE (liso-NAPE-PLD) (figura 10) (Lu & MacKie, 2016; Maccarrone, 2017). De todas ellas, la que se erige como la ruta de síntesis más estudiada, a la vez que la más relevante, es la de la NAPE-PLD.

El proceso de síntesis a través de la primera ruta enumerada comenzaría con la acción de las N-acil transferasas (NAT) dependientes de Ca^{2+} , o independientes del catión (iNAT), que llevan a cabo la transferencia de un grupo acetilo a los fosfolípidos de membrana, dando lugar a la N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NArPE). Entonces, la NAPE-PLD cataliza la obtención de la AEA a partir de la NArPE, al liberar el ácido fosfatídico de la molécula sustrato (figura 10) (Lu & MacKie, 2016).

La siguiente ruta de síntesis de la AEA más relevante es la que tiene como partícipes a la PLC seguida de la PTPN22, la cual es la que más se ha estudiado con detalle en células inmunes, aunque también puede ocurrir en cerebro. Consiste en la obtención de la fosfo-AEA a partir de la NArPE mediante la acción de la PLC, liberando como subproducto el 1,2-diacilglicerol. Después, la fosfo-AEA es desfosforilada por la PTPN22, dando lugar a la AEA (figura 10) (Lu & MacKie, 2016).

Las otras dos rutas de obtención de la AEA se han esbozado a partir de sistemas de expresión, pero aún se desconoce su implicación en la producción de AEA en el SNC (Lu & MacKie, 2016).

1.4.3.2. Degradación de la AEA

En cuanto a la degradación de la AEA, también existen varias alternativas metabólicas según las enzimas intervinientes, dando lugar, en consecuencia, a productos distintos (figura 10). Existen 3 rutas de degradación de la AEA, que se enumeran a continuación por orden de importancia: 1) la ruta dependiente de la acción de la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH); 2) aquellas basadas en la oxidación de la AEA, bien por parte de la ciclooxigenasa 2 (COX2), o lipooxigenasas 5, 12 y 15 (5-/12-/15-LOX) y; 3) la dependiente de la acción de monooxigenasas citocromo P450 (P450s) (Maccarrone, 2017).

La FAAH es la principal responsable de la hidrólisis de la AEA en AA y etanolamina. Sin embargo, otra enzima, la amidohidrolasa ácida de la N-aciletanolamina (NAAA), también puede llevar a cabo esta misma reacción.

En lo referente a las rutas de oxidación de la AEA, una de las responsables del proceso sería la COX2, responsable de la hidrólisis de AEA en diferentes prostaglandin-etanolaminas (PGs-EA) (figura 10), mientras que las LOXs convierten la AEA en hidroxi-anandamidas, o en hidroxi-eicosatetraenoil-etanolaminas (HETEs-EA). Finalmente, la intervención de las P450s daría lugar a la hidrólisis de la AEA en epoxieicosatrienoil-etanolaminas (EETs-EA). Es destacable que los productos derivados de la oxidación de la AEA desempeñan una actividad biológica por sí mismos, aunque todavía no se conoce la relevancia de dicha actividad (Maccarrone, 2017).

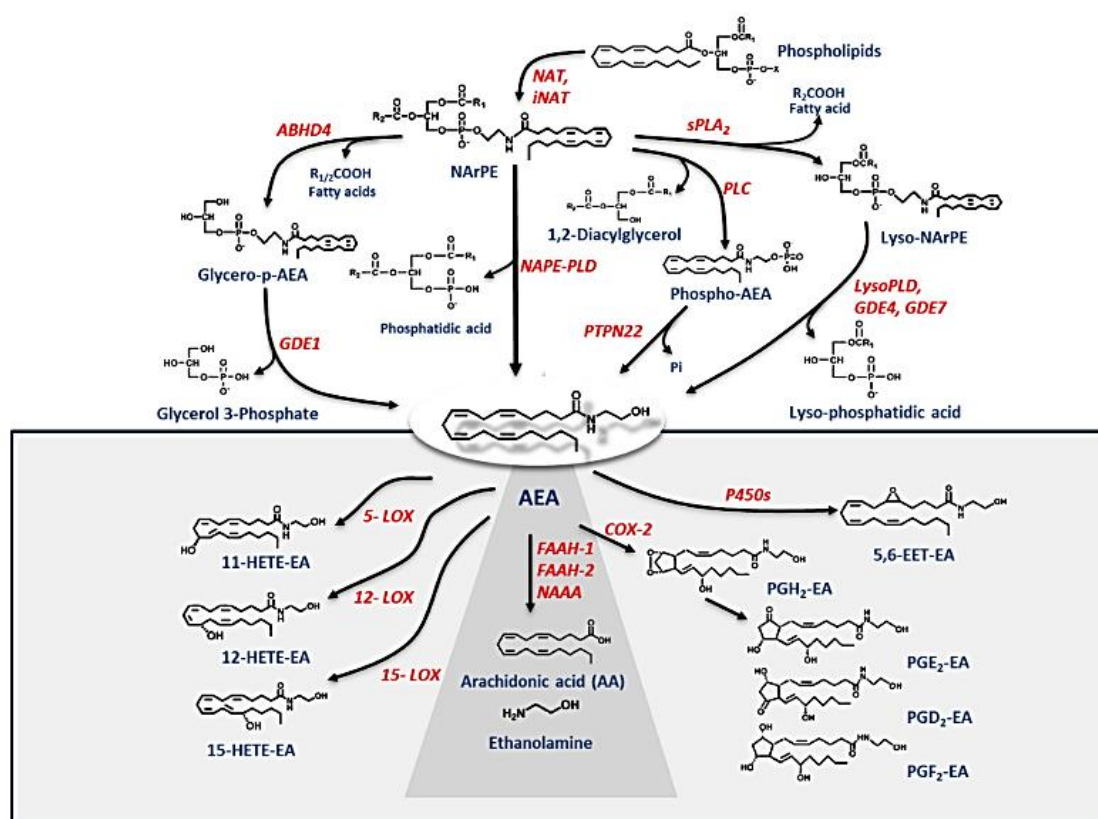


Figura 10: Representación de las rutas metabólicas de síntesis y degradación de la AEA (Maccarrone, 2017).

1.4.3.2.1. FAAH

Como se ha mencionado anteriormente, la enzima FAAH es la principal responsable de la degradación de AEA en los metabolitos AA y etanolamina. Se trata de una proteína integral transmembrana descrita en 1996 por B.F. Cravatt y cols. como enzima capaz de metabolizar la AEA, además de la OEA (Cravatt *et al.*, 1996). A partir de entonces, se procedió con la descripción de la estructura de la enzima (figura 11), sus propiedades cinéticas, y su distribución en el organismo, hasta que, finalmente, crearon el modelo murino FAAH *knockout* (FAAH^{-/-}), con el que se confirma su papel decisivo en el control

del tono de la AEA, puesto que este modelo contiene aproximadamente 15 veces más AEA en cerebro que los correspondientes ratones *wild type* (WT) (Cravatt *et al.*, 2001). La construcción genética de este modelo animal se explica con más detalle en el capítulo de *Materiales y Métodos* de esta tesis, ya que es uno de los modelos murinos en los cuales están basados los resultados presentados.

A nivel estructural, FAAH se compone de un único dominio transmembrana NH₂-terminal, un dominio amidasa, y una secuencia de poliprolina, con capacidad de interacción con dominios específicos proteicos (conocidos como Homer y SH3). El gen de esta enzima se encuentra altamente conservado entre las especies humana, murina, y porcina. La proteína FAAH de humanos y de rata se expresa en abundancia en el SNC, destacando la corteza cerebral e hipocampo, (Hu & Mackie, 2015), y a nivel celular, se detecta con mayor abundancia en neuronas corticales piramidales, células piramidales de hipocampo, y células de Purkinje. No obstante, también se ha descrito en elementos gliales, solapando con CB₁R, principalmente en áreas relacionadas con el control motor y de la memoria (Romero *et al.*, 2002; Benito *et al.*, 2003). En cuanto a microglía, no se encuentran muchos artículos que describan la presencia de FAAH en este tipo celular, pero existen algunos que han detectado su expresión y actividad, aunque a bajos niveles, tanto en microglía BV-2 como en microglía primaria cortical de rata (Muccioli *et al.*, 2007; Tham *et al.*, 2007).

Puesto que los CBs ejercen acciones beneficiosas a nivel medicinal, pero llevan asociados efectos secundarios psicoactivos, una de las opciones terapéuticas que se han barajado hasta la fecha es la de aumentar el tono EC mediante la inhibición de las enzimas de degradación. A diferencia de los efectos subyacentes a la activación de CB₁R mediante agonistas, tanto la inhibición farmacológica como genética de FAAH ha resultado en efectos analgésicos, anti-inflamatorios, ansiolíticos, anti-depresivos, e inductores del sueño, a la vez que se mantienen estables las funciones motoras y cognitivas, el peso y la temperatura corporal (Ahn *et al.*, 2009).

FAAH no solo degrada AEA, sino que también es responsable de la hidrólisis de otras amidas de ácidos grasos, como la OEA y la PEA (Lu & MacKie, 2016).

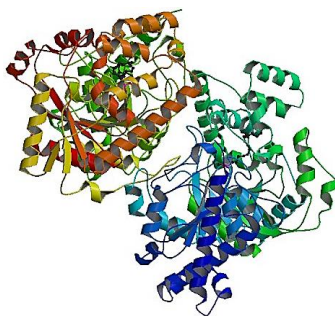


Figura 11: Estructura cristalizada de la enzima FAAH (1MT5, Protein Data Bank).

1.4.4. Metabolismo del 2-AG

Se han descrito dos rutas principales para la síntesis de 2-AG: 1) aquella que parte del sustrato fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2), y 2) una ruta metabólica que emplea triglicéridos que contienen sn2-araquidonato (figura 12). Por el contrario, la degradación del 2-AG puede llevarse a cabo por varias vías, siendo la ruta predominante la que conlleva la hidrólisis del enlace éster para dar lugar a AA y glicerol. La enzima responsable de la hidrólisis de 2-AG en estos metabolitos es la monoacilglicerol lipasa (MAGL), pero existen otras enzimas también responsables de dicha hidrólisis, aunque con una relevancia biológica menor. Estas enzimas incluyen la proteína con el dominio alfa beta hidrolasa de mamíferos, 12 (ABHD12), o la ABHD6, e incluso COX, LOX y la citocromo P450 (estas tres últimas también intervienen en el metabolismo de la AEA) (figura 12) (Baggelaar *et al.*, 2018).

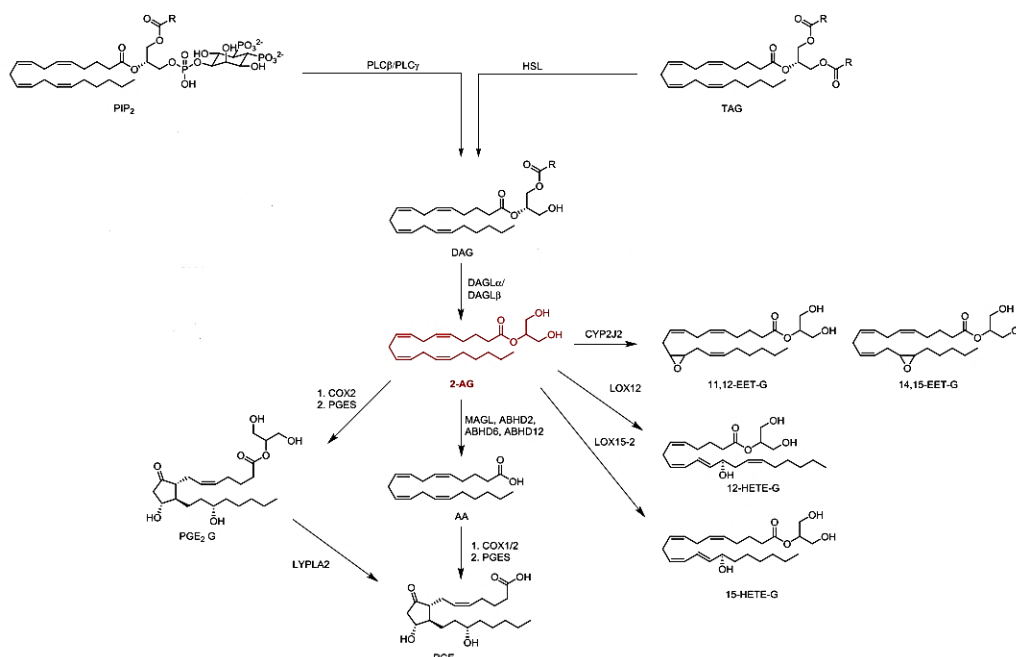


Figura 12: Representación de las rutas metabólicas de síntesis y degradación del 2-AG (Baggelaar *et al.*, 2018).

2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1. Introducción

El aumento de la esperanza de vida, y, con ello, el envejecimiento de la población, ha dado lugar a la aparición de nuevas enfermedades, entre las que destaca la demencia. La demencia, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se define como un síndrome de progresión crónica, que, aunque pueda tener diferentes causas, todas convergen en la afección de la memoria, razonamiento, comportamiento y realización de actividades cotidianas (Duthey, 2013). Debido al grado de condicionamiento que provoca (tanto en las personas que la padecen como en sus familias), y su impacto en la población, la OMS la declaró en el año 2008 “prioridad de salud pública”. La forma más común de la demencia es la Enfermedad de Alzheimer (EA), puesto que es responsable del 50%-75% de los casos, aunque existen otras variantes, como la demencia vascular, demencia mixta, demencia con cuerpos de Lewy, o degeneración frontotemporal (Duthey, 2013).

2.2. Historia

La EA fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer (imagen A figura 13) el 3 de noviembre de 1906, en la 37ª Reunión de Psiquiatras Alemanes del Sur-Oeste, en Tubinga (Alemania). Fue presentada como una enfermedad peculiar y severa de la corteza cerebral. Todo comenzó con el estudio de la paciente Auguste D., de 50 años de edad, que fue ingresada en el hospital universitario de Munich (donde Alzheimer ejercía como profesor) por un cuadro de paranoia, trastorno del sueño, alteraciones de la memoria, agresividad y aturdimiento. A los 5 años de su ingreso, la paciente falleció, y tras la autopsia, Alzheimer pudo llevar a cabo un examen, tanto morfológico como histológico, del cerebro de Auguste. Lo que halló fue unas alteraciones histológicas particulares, que posteriormente se denominaron placas neuríticas y ovillos neurofibrilares (imagen B figura 13). En los tres años siguientes, junto con su grupo de investigación, observaron 4 casos más de EA. Es interesante destacar que uno de estos casos (perteneciente al año 1911) presentaba únicamente placas neuríticas. Ello se interpretó como una primera señal de la existencia de diferentes etapas en la evolución

de la enfermedad, en comparación con el caso original de Auguste D. (Hippius & Neundörfer, 2003).

Desde entonces, se conocen tanto los marcadores como las características histológicas y patológicas de la enfermedad, pero, paradójicamente, a día de hoy no se ha conseguido el tratamiento que la cure.

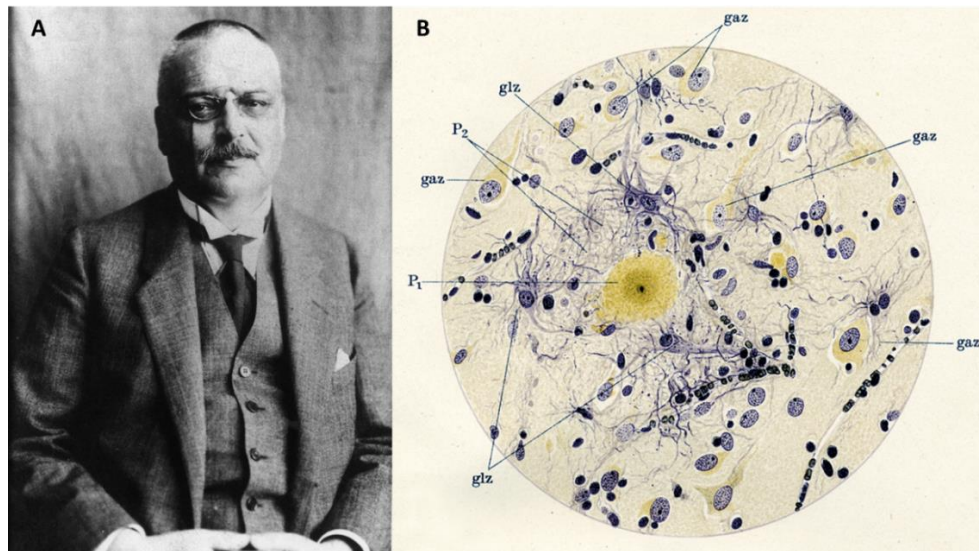


Figura 13: A: Retrato de Alois Alzheimer (1864-1915), B: Imagen ilustrativa con la que A. Alzheimer representó la patología de la EA en cerebro: gaz: neuronas; glz: células gliales; P₁: núcleo central de la placa; P₂: periferia de la placa. Esta ilustración la incluyó en su artículo de 1911 donde describe la patología de Auguste D. (Dahm, 2006).

2.3. Epidemiología

Recientemente se ha estimado que existen 44 millones de personas en el mundo que padecen demencia, pero se prevé que dicha cifra aumente más del triple para el año 2050. En el año 2017, esta enfermedad se posicionó en Inglaterra y Gales como la principal causa de muerte (Office for National Statistics, 2017; Lane *et al.*, 2018), y a nivel mundial, como la tercera mayor causa de disfunción y muerte en la senectud, solo después de las enfermedades cerebro- y cardiovasculares, y tumores malignos (Du *et al.*, 2018). Un meta-análisis realizado en 2017 cifra la prevalencia de la EA en Europa en un 5,05%, con tendencia creciente por grupos de edad, mientras que la de la incidencia fue de 11,08 por 1000 personas-año, también con tendencia creciente con el aumento de la edad (Niu *et al.*, 2017). En el Informe mundial sobre el Alzheimer del 2018 se puntualiza que “el número de personas con demencia está aumentando rápidamente en los países de renta media y baja porque está aumentando la esperanza de vida”, favoreciendo también el aumento de las enfermedades cardiovasculares, hipertensión

y diabetes. Sin embargo, en los países de renta alta parece existir una reducción de la tasa de incidencia (que no necesariamente la de prevalencia), quizá debida a “las mejoras en la salud cardiovascular, nutrición y educación” (Christina Patterson, 2018; Lane *et al.*, 2018).

2.4. Etiología

Las causas más influyentes en el desarrollo de la EA son: 1) el envejecimiento *per se*, ya que las funciones fisiológicas del organismo empiezan a deteriorarse, y 2) la genética, ya que mutaciones genéticas, y/o ciertas variantes alélicas pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad.

En ratones y en monos Rhesus ancianos se ha descrito que el envejecimiento va asociado a un aumento de la inflamación basal y de la deposición de proteínas en el parénquima cerebral. Esto puede deberse, en primer lugar, a un aumento de la formación de vesículas intracelulares en neuronas, las cuales contienen orgánulos celulares y proteínas, como la precursora amiloide (APP), y en segundo lugar, a la acumulación de dichas vesículas debido a la alteración de la funcionalidad de la microglía y astrocitos. (Krstic & Knuesel, 2012).

Otro factor importante, en cuanto al desarrollo de la EA se refiere, es el genético. La EA de aparición temprana se caracteriza por su herencia mendeliana de tipo dominante, y por darse en personas adultas jóvenes, de entre 30 y 50 años de edad. Representa menos del 5% de la población con EA, y se debe directamente a mutaciones en los genes de la APP, presenilina 1 (PSEN1), y presenilina 2 (PSEN2) (Barber, 2012). Las mutaciones que se dan en estos genes convergen en el procesamiento aberrante de la APP, dando lugar a los péptidos tóxicos denominados amiloide β de 40 ($A\beta_{1-40}$) y 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$), que se acumulan en el espacio extracelular y dan lugar a la formación de placas neuríticas.

La EA de aparición tardía, la cual se asocia al envejecimiento, es la forma más común de la EA, y los primeros síntomas comienzan a partir de los 65 años aproximadamente. Su origen se debe a una combinación de factores genéticos y ambientales, pero actualmente se cree que el riesgo de padecer EA “tardía” se debe en un 70% aproximadamente a factores genéticos. Uno de los más conocidos es la variante $\epsilon 4$ del gen APOE. En comparación con portadores de las otras variantes alélicas, las personas heterocigotas para $\epsilon 4$ tienen un riesgo 3 veces mayor de padecer la

enfermedad, mientras que el de las personas homocigotas asciende a 12 (Lane *et al.*, 2018). Gracias a estudios de asociación del genoma completo (Genome-wide association study-GWAS-) se han identificado otros genes implicados en la regulación de la inflamación y/o de la endocitosis como factores de riesgo genético (Barber, 2012; Lane *et al.*, 2018). Algunos factores ambientales implicados en la protección ante el desarrollo de la EA tardía podrían ser la educación y el ejercicio físico, mientras que la hipertensión y la diabetes podrían favorecerla (Lane *et al.*, 2018).

2.5. Patología

Independientemente del origen o causas de la enfermedad, en la EA convergen dos aspectos esenciales: 1) el acúmulo de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ en forma de placas neuríticas extracelulares, y 2) la hiperfosforilación de tau, que da lugar a la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares (figura 14). Estos fenómenos están asociados, a su vez, a una activación microglial y astrocítica, que mantenida en el tiempo, se suman al agravamiento de la neurotoxicidad, y finalmente, se produce la disfunción y muerte neuronal. Existen varios modelos que explican el patrón de desposición espacio-temporal del péptido amiloide en el cerebro humano, debido a que dicha desposición es poco predecible. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre con el péptido $A\beta$, la evolución de la desposición de la proteína tau hiperfosforilada sí resulta más previsible (Serrano-Pozo *et al.*, 2011; Lane *et al.*, 2018).

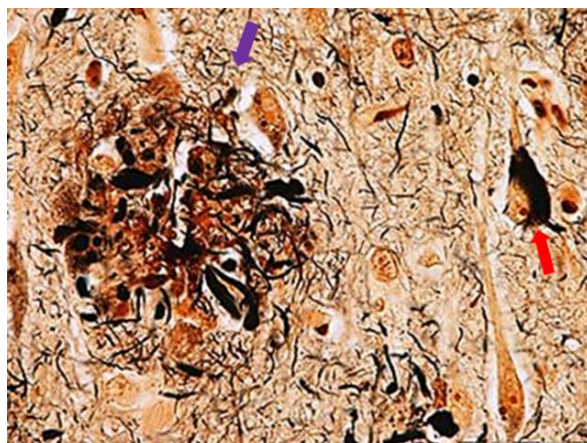


Figura 14: A: Imagen de una tinción de plata modificada sobre tejido cerebral donde se observa una placa neurítica extracelular (flecha morada), y un ovillo neurofibrilar de tau intraneuronal (flecha roja). Fuente: (Alzforum, 2015).

2.6. Componentes bioquímicos implicados en la EA

Las proteínas principales implicadas en el desarrollo de la EA son las siguientes:

2.6.1. APP

La APP es una proteína transmembrana que se caracteriza por su ubicuidad entre especies, encontrándose incluso en algunos invertebrados como el gusano *C. elegans*, o la mosca *D. melanogaster*. La APP695 es la isoforma más abundante en cerebro, y consta de un dominio C-terminal pequeño intracelular, y de uno N-terminal extracelular más largo, que recuerda a un receptor transmembrana. Aunque no se conoce con exactitud su función y relevancia, se ha observado su implicación en diferentes aspectos de la homeostasis neuronal, como en el desarrollo neuronal, señalización o transporte intracelular (Chen *et al.*, 2017).

2.6.2. A β

Es el principal componente de las placas neuríticas de la neocorteza de pacientes con EA. Se trata de un péptido de 4 KDa que resulta del procesamiento de la APP a través de la ruta amiloidogénica, cuando el fragmento C99 generado por la β -secretasa (β -site-APP-cleaving enzyme -BACE1-) se proteoliza debido a la acción de la γ -secretasa (proceso explicado con más detalle en el apartado 2.7.1.). El resultado es la obtención de fragmentos de 43 a 51 aminoácidos, que finalmente, son procesados en los péptidos A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ en compartimentos endocíticos. Estudios de modelización por resonancia magnética nuclear han permitido observar que la mayor tendencia a agregar del A β ₁₋₄₂ puede deberse a la conformación del extremo C-terminal, el cual es más estructurado que el del A β ₁₋₄₀, y contiene una horquilla β que reduce su flexibilidad, y aumenta su facilidad de agregación (Chen *et al.*, 2017).

El A β puede encontrarse en varios estados de “ensamblado”, cada uno de los cuales recibe una terminología particular. A dichos estados se les ha denominado “pools” (agrupaciones) de A β , y se les correlaciona con el estado clínico del paciente con EA (Murphy & LeVine, 2010). De menor a mayor tamaño, los tipos de ensamblados se denominan monómeros, oligómeros, fibrillas, y placas (figura 15).

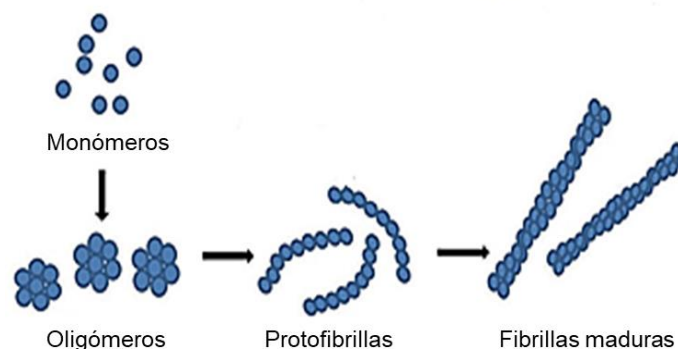


Figura 15: A: Diagrama representativo del proceso de fibrilación del A β desde monómeros, hasta oligómeros, protofibrillas y fibrillas. Figura adaptada de (Chen *et al.*, 2017).

- Oligómeros:** Por consenso, se definen como estructuras esferoides resultantes del ensamblado de monómeros de A β en dímeros hasta dodecámeros, con una conformación diferente a la de las fibrillas (Sengupta *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017) (figura 15). Se les considera los verdaderos responsables de la toxicidad asociada al péptido A β , puesto que se ha descrito que causan déficits cognitivos en ausencia de placas, como se pudo observar en ratones con patología amiloide, en los que la reducción de dichos oligómeros daba lugar a una mejora de la memoria (Sengupta *et al.*, 2016). Además, otro dato que corrobora la responsabilidad de los oligómeros en la disfunción cognitiva es que existe una falta de correlación entre la manifestación de la enfermedad y la cantidad de placas. La toxicidad de los oligómeros es inversamente proporcional al tamaño, y dependiente del grado de agregación y de la capacidad de difusión de estos (Sengupta *et al.*, 2016).
- Fibrillas:** Se trata de una organización superior del péptido A β a partir de los oligómeros, que resulta en una estructura insoluble y alargada, en forma de lámina β cruzada. Esto significa que se compone principalmente de estructuras en hoja β , donde los filamentos β se organizan perpendicularmente al eje fibrilar, sin ramificaciones (figura 15) (Hoshino, 2017).
- Placas:** Son el resultado de la acumulación de fibrillas insolubles en el parénquima extracelular, de manera que podrían existir como “reservorio” desde el cual los oligómeros podrían difundir, o como mecanismo protector que los secuestra, hasta que se alcanza el punto de saturación fisiológica (Lane *et al.*, 2018). Como se ha mencionado en el apartado de los oligómeros, la cantidad de placas no determina el estado clínico del paciente.

2.6.3. tau

La proteína tau es una proteína asociada a los microtúbulos (*microtubule-associated protein* o MAP) altamente soluble que, en condiciones fisiológicas, se encarga de la estabilización de estos. Es principalmente una proteína axonal de neuronas maduras, que se caracteriza por su solubilidad y su bajo contenido en estructuras secundarias. Estas características le confieren flexibilidad y movilidad para ejercer su función. Los microtúbulos son estructuras que suponen una base para sustentar cambios estructurales de las células, así como para el transporte axonal, y crecimiento neuronal. (Mandelkow & Mandelkow, 2012).

En la búsqueda de los cambios que sufre esta proteína en la EA para explicar su agregación en ovillos neurofibrilares intracelulares se identificó la hiperfosforilación. En condiciones fisiológicas suelen encontrarse aproximadamente dos fosfatos por cada molécula de tau en cerebro adulto, mientras que, en condiciones patológicas, se han contabilizado ocho o incluso más por molécula. Esta fosforilación parece causar la disminución de las interacciones entre tau y los microtúbulos, promoviendo a su vez que agregue y fibrile consigo misma. Las causas responsables de la hiperfosforilación no están claras, pero una de ellas podría ser consecuencia de la mediación de los oligómeros de A β , como se ha observado en cultivos neuronales, ya que alteran las actividades fosfatasa/quinasa (Lane *et al.*, 2018). Sin embargo, puesto que no todos los sitios de fosforilación parecen favorecer la agregación de tau, existen explicaciones alternativas que proponen otras causas para ello, no incompatibles con la hiperfosforilación a su vez. Una de ellas se basa en que la proteólisis de tau da lugar a fragmentos proclives a la agregación, pero hay otras hipótesis, como la oxidación, ubiquitinación-degradación por el proteasoma, glicosilación defectuosa, etc. (Mandelkow & Mandelkow, 2012; Sanabria-Castro *et al.*, 2017).

2.7. Patogénesis

En la actualidad, la EA se entiende como una enfermedad compleja en la que pueden verse implicados diversos factores, por lo que existen diferentes hipótesis que explican su patogénesis. De entre todas ellas, se detallan a continuación las más relevantes:

2.7.1. Hipótesis de la cascada amiloide

Es la más establecida de todas. Propone que el desequilibrio entre la acumulación de los péptidos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ y su aclaramiento es el desencadenante de los sucesos patológicos responsables de la EA (daño neuronal, formación de los ovillos neurofibrilares de tau, neuroinflamación). Todo comenzaría con el procesamiento (o modo de procesamiento) de la proteína APP, que puede ocurrir de dos maneras: bien a través de la vía “no-amiloidogénica” o fisiológica, o por la vía “amiloidogénica”, o patológica. Esta última es la responsable de la obtención de los péptidos $A\beta$ proclives a agregar (figura 16) (Querfurth & LaFerla, 2010; Chen *et al.*, 2017; Kuruva & Reddy, 2017).

En la ruta no amiloidogénica, la APP es proteolizada por enzimas con actividad α -secretasa en el centro del dominio $A\beta$, generando el fragmento carboxiterminal C83 y el sAPP- α . En el fragmento C83 actúa, en segundo lugar, la γ -secretasa, que es un complejo enzimático de 4 subunidades: las presenilinas (PS1 y PS2), la nicastrina (NCSTN), la subunidad faringe anterior-defectuosa 1 (APH-1 de su acrónimo en inglés), y el activador de la presenilina 2 (*presenilin enhancer 2* -PEN-2-). La acción de este complejo enzimático da lugar a los fragmentos p3, que se eliminan fácilmente en la célula, y al dominio AICD (*amyloid intracellular domain*) (figura 16) (Querfurth & LaFerla, 2010; Chen *et al.*, 2017).

A diferencia de la anterior, la vía amiloidogénica se caracteriza por la actuación, en primer lugar, de la enzima BACE1, que es una proteasa transmembrana con actividad β -secretasa, y cuya expresión puede verse regulada por el estrés oxidativo, isquemia, inflamación, hipoxia o trauma. BACE1 actúa en uno de los extremos del dominio $A\beta$ de la APP, lo que da lugar a la generación del péptido soluble sAPP- β , y al fragmento carboxiterminal C99. El procesamiento de este último por la γ -secretasa genera el péptido $A\beta$ y el dominio AICD (figura 16) (Querfurth & LaFerla, 2010; Chen *et al.*, 2017; Kuruva & Reddy, 2017). El sitio de actuación de la γ -secretasa en la ruta amiloidogénica determina cuál de las especies de $A\beta$ se formarán, aunque las más comunes son las de 40 y 42 aminoácidos ($A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, respectivamente). $A\beta_{1-42}$ es el más hidrofóbico y neurotóxico, y el que más tiende a agregar. El dominio AICD, además, puede translocarse al núcleo y regular la expresión de genes, entre ellos, los apoptóticos (Querfurth & LaFerla, 2010; Chen *et al.*, 2017).

Los péptidos $A\beta$, una vez generados a través de la ruta amiloidogénica, se unen en forma de oligómeros de $A\beta$, que se van ensamblando a su vez para formar protofibrillas,

fibrillas, y finalmente, las láminas β que conforman las placas neuríticas. (Kuruva & Reddy, 2017; Sanabria-Castro *et al.*, 2017).

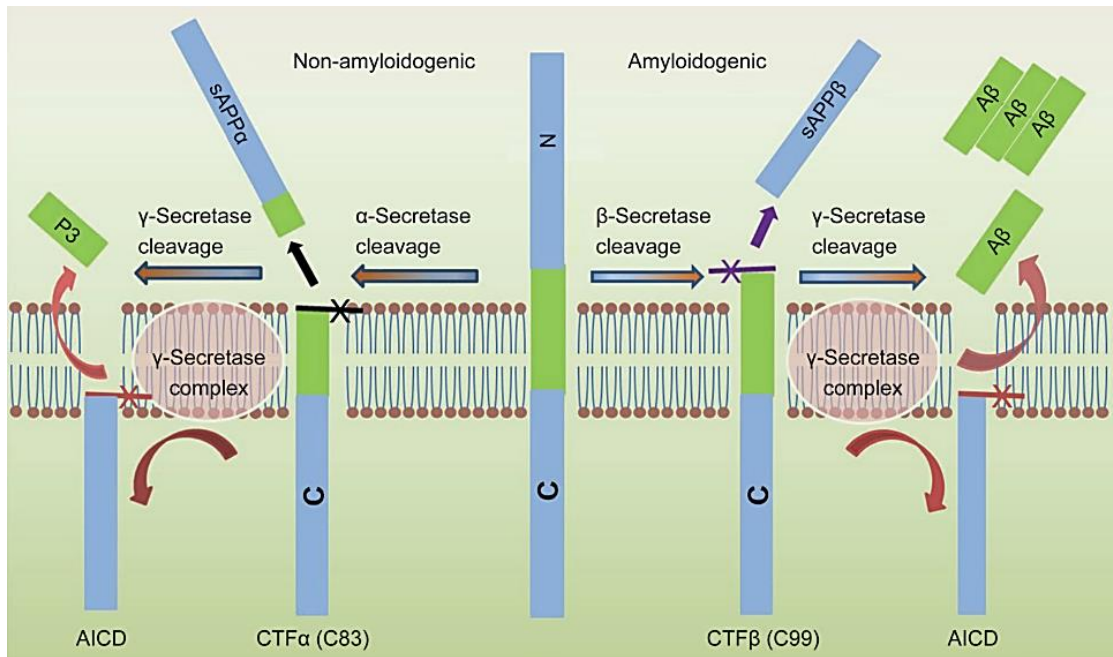


Figura 16: **Esquema de las rutas no amiloidogénica y amiloidogénica de la APP.** En la ruta no amiloidogénica (desde el centro de la imagen hacia la izquierda) la acción consecutiva de la α -secretasa y la γ -secretasa sobre la APP da lugar a la formación del péptido P3 (fácilmente eliminado por la célula) y el fragmento AICD, que puede translocarse al núcleo y regular la expresión génica. La ruta amiloidogénica (centro de la imagen hacia la derecha) comienza con la acción de la β -secretasa (BACE1) sobre la APP, dando lugar al precursor amiloide β soluble (sAPP β) y al fragmento C99, sustrato a su vez de la γ -secretasa. El resultado es la liberación del péptido A β al espacio extracelular, donde se irá agregando y depositando, y la internalización del péptido AICD (Chen *et al.*, 2017).

Como se mencionó anteriormente, esta hipótesis establece que la patogénesis de la EA no se debe únicamente al procesamiento aberrante de la APP, sino también, al aclaramiento ineficiente del A β . Esto se debe a que los receptores encargados de su movilización a través de la barrera hematoencefálica (LRP-1 y RAGE) se encuentran desregulados durante el proceso patológico. Además, la expresión de enzimas encargadas de la degradación proteolítica del A β , como la neprilisina (NEP) o la enzima degradadora de la insulina (IDE), disminuye, agravando así el proceso (Lane *et al.*, 2018). Finalmente, la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de la microglía realimenta el proceso patológico, por lo que su actividad fagocítica acaba siendo insuficiente (Querfurth & LaFerla, 2010; Guedes *et al.*, 2018).

2.7.2. Hipótesis inflamatoria

Además del A β y de tau, otro de los marcadores característicos de la EA es la neuroinflamación, en la que cobra protagonismo la gliosis. De hecho, algunos de los marcadores genéticos asociados al riesgo de padecer EA “tardía” están relacionados con la regulación de la inflamación, y en particular, con vías de señalización relacionadas con la microglía (como, por ejemplo, los receptores TREM2 o CD33) (Heneka *et al.*, 2015; Heppner *et al.*, 2015). Según la hipótesis de la cascada amiloide, el acúmulo de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares provoca un reclutamiento de microglía y astrocitos alrededor, favoreciendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, y con ello, la respuesta inflamatoria (Querfurth & LaFerla, 2010; Heppner *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2018). Sin embargo, a día de hoy no solo se considera todo este fenómeno como consecuencia de los agregados proteicos, si no que la propia neuroinflamación puede contribuir en la enfermedad de igual manera, o incluso en mayor grado, que las propias placas u ovillos por sí mismos. De hecho, se ha observado una coincidencia temporal entre síntomas pre-clínicos anteriores a la EA (lo que se conoce como daño cognitivo leve o *mild cognitive impairment*) con la existencia de cambios inflamatorios (en el líquido cefalorraquídeo, por ejemplo), lo que indicaría que el proceso neuroinflamatorio está implicado aún más tempranamente de lo que se pensaba (Heppner *et al.*, 2015). Junto con la sobre-expresión de genes inflamatorios en tejidos de pacientes con EA, se piensa que la neuroinflamación podría ser la responsable de dirigir el proceso patológico de la enfermedad, al menos en un momento determinado, e incluso promover el aumento de los niveles de A β y su acumulación, exacerbando y retroalimentando el proceso. Por tanto, situaciones o patologías que activen el sistema inmune, y provoquen inflamación (como diabetes tipo 2, aterosclerosis, obesidad, lesión cerebral, e incluso el propio envejecimiento), aumentan el riesgo de desarrollar EA. (Heneka *et al.*, 2015; Heppner *et al.*, 2015).

2.7.3. Hipótesis de tau

Esta hipótesis establece que la fosforilación excesiva y aberrante de la proteína tau da lugar a su transformación en pares de filamentos helicoidales (*paired helical filament* -PHF-), en primer lugar, y en ovillos neurofibrilares (*neurofibrillary tangles* -NFT-), en segundo lugar (Mohandas *et al.*, 2009; Querfurth & LaFerla, 2010). En la EA, las 6 isoformas existentes de tau pueden encontrarse frecuentemente en un estado hiperfosforilado, formando PHFs.

Se han encontrado mutaciones que alteran la función y la expresión de tau, las cuales también favorecen la hiperfosforilación. En ausencia de mutaciones, las causas que puedan dar pie a su agregación son la des-regulación de la acción de las quinasas-fosfatasas o la acción de proteasas. Independientemente de las causas que originen la hiperfosforilación, la tau hiperfosforilada da lugar a la desestructuración de los microtúbulos y el secuestro de la tau normal, de las MAP 1 y 2, y la ubiquitina, en ovillos de PHF. Estas estructuras, que se caracterizan por su insolubilidad, alteran las funciones citoplasmáticas y el transporte axonal, causando la muerte neuronal (Mohandas *et al.*, 2009).

En resumen, la hipótesis de la cascada amiloide ha sido hasta hace pocos años la referencia para explicar la evolución patológica de la EA. Sin embargo, el descubrimiento de otros posibles desencadenantes de la enfermedad ha requerido el establecimiento de otras hipótesis para explicar, con mayor precisión, la complejidad de esta patología.

2.8. Diagnóstico

Gracias al descubrimiento de 1) que los sucesos patológicos preceden en años a los síntomas clínicos, 2) al establecimiento de los biomarcadores A β y tau, y 3) a la cuantificación de la atrofia cerebral por resonancia magnética de imagen (RMI), a día de hoy se puede establecer un diagnóstico antes de la muerte del paciente, aunque el diagnóstico definitivo solo es posible *post-mortem* (Lane *et al.*, 2018). Los criterios de diagnóstico han sido establecidos por el *National Institute of Aging* (NIA), el *International Working Group* (IWG), y por la 5ª edición del Manual de Diagnóstico y Estadística para Enfermedades Mentales (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition*) los cuales se basan en la existencia de biomarcadores patológicos en ausencia de sintomatología, para poder realizar un diagnóstico “temprano” (Atri, 2019).

El protocolo consiste, en primer lugar, en una evaluación del paciente mediante una entrevista tanto a dicho paciente como a su “informador”, para llevar a cabo una valoración física y cognitiva. A partir de ahí, se hacen analíticas de sangre y/o pruebas serológicas para descartar otras situaciones que puedan provocar los síntomas cognitivos. Si se confirman los déficits cognitivos, se realiza una evaluación por resonancia magnética (RM) para conocer si existen alteraciones estructurales que puedan causar la sintomatología de la EA. La detección de atrofia focalizada y simétrica en el área temporal medial se consideraría un patrón de predicción de la EA, y si se

detectasen micro-sangrados en la zona lobular, podrían indicar la existencia de angiopatía amiloide cerebral, también marcador predictivo de la EA. Además, puede emplearse la tomografía por emisión de positrones (PET) en combinación con el 18-fluorodesoxiglucosa (FDG) para conocer el metabolismo en las diferentes áreas cerebrales. Si existe hipometabolismo en las regiones parieto-temporal, en el área cingulada, y el precúneo, puede indicar la presencia de EA. No obstante, las pruebas basadas en la búsqueda de marcadores en el líquido cefalorraquídeo ($A\beta_{1-42}$, tau), así como la imagen PET “amiloide” (que emplean bien el florbetapir, flutemetamol o el florbetaben para detectar $A\beta$) solo se emplean en casos atípicos, de rápida progresión, o cuando, tras una evaluación ordinaria, el diagnóstico no es concluyente (Lane *et al.*, 2018; Atri, 2019).

Bajo consentimiento del paciente, se pueden realizar también pruebas genéticas para buscar variantes alélicas relacionadas con un mayor riesgo de desarrollo de la EA, (expuestas en el apartado 2.4.). Pero de nuevo, además de no ser concluyentes para un diagnóstico, su elevado coste hace que se descarten como opción (Lane *et al.*, 2018).

2.9. Tratamientos farmacológicos actuales

A día de hoy no existe tratamiento alguno que revierta o cure la enfermedad. El tratamiento actual para la EA es de tipo multidisciplinar, basado en una combinación de aproximaciones médicas y atención social. Un tratamiento únicamente farmacológico no tiene la suficiente potencia si no es aplicado junto con tratamiento psiquiátrico, ya que el 90% de los pacientes experimentan síntomas neuropsiquiátricos y problemas de conducta no cognitivos. Estos se asocian con un declive e internamiento más temprano del paciente, mayor estrés, peor calidad de vida, y, además, aumento de los costes sanitarios (Atri, 2019).

Los fármacos aprobados en la actualidad son los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEs) donepezilo, galantamina y la rivastigmina, y el antagonista de los receptores NMDA, la memantina. Se trata de medicamentos que ralentizan la progresión de la sintomatología de la enfermedad, pero no la curan.

Los AChEs aumentan la disponibilidad de la acetilcolina en el espacio sináptico, y favorecen así la comunicación interneuronal. El donepezilo y la rivastigmina están aprobados para el EA en fase leve, moderada y severa, mientras que la galantamina solo lo está para la fase leve y moderada. No se ha descrito que alguno de ellos sea

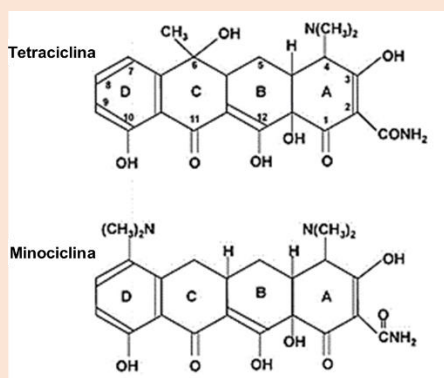
más efectivo que otro, sin embargo, se sabe que la intermitencia del tratamiento con AChEIs es contraproducente, acelerando, incluso irreversiblemente, el progreso de la enfermedad (Lane *et al.*, 2018; Atri, 2019).

La memantina es otro fármaco para el tratamiento de la sintomatología de la EA, y se trata de un antagonista de baja afinidad a los receptores NMDA, que se aplica con el objetivo de reducir la neurotoxicidad del glutamato. Está aprobado para su uso en EA moderada o severa, bien como monoterapia, o en combinación con AChEIs (normalmente suele añadirse a un tratamiento con AChEIs previo) (Lane *et al.*, 2018; Atri, 2019).

Actualmente, el propósito de la investigación está focalizada en la búsqueda de dianas terapéuticas que consigan tener una acción reversible de la EA. Debido a que la sintomatología se detecta una vez que la patología está muy avanzada, los puntos de mira se sitúan en estrategias anti-amiloideas (inhibición de la γ -secretasa y BACE, reducción de la síntesis de $A\beta_{1-42}$, o inmunoterapia anti-amiloide mediante anticuerpos), y anti-tau (inhibición de la fosforilación y agregación, e inmunoterapia). Sin embargo, todas ellas han fracasado en fases II o III de ensayos clínicos, o bien, como en el caso de las aproximaciones dirigidas contra tau, no han podido ser probadas a nivel clínico (Coman & Nemeş, 2017). También se probó el tratamiento con anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) para la reducción de la neuroinflamación, cuando empezó a cobrar importancia su participación en la enfermedad, pero no se observaron mejoras significativas en los pacientes con EA (Heppner *et al.*, 2015). No obstante, una tetraciclina de segunda generación, conocida como minociclina, ha llamado la atención de los investigadores en los últimos años. Sus propiedades anti-inflamatorias, inmunomoduladoras y neuroprotectoras, independientes de sus funciones antibióticas (Kim & Suh, 2009; Garrido-Mesa *et al.*, 2013), han mostrado tener efectos beneficiosos en modelos animales de la EA, aunque queda por conocer su potencial en estudios clínicos (Cuadro 1).

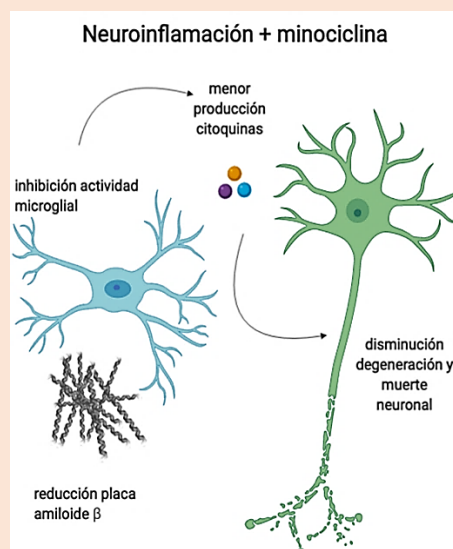
Cuadro 1: MINOCICLINA

La minociclina es un análogo de las tetraciclinas semisintéticas de segunda generación, que se caracteriza por sus propiedades antibióticas (Kim & Suh, 2009; Garrido-Mesa *et al.*, 2013). Actualmente su uso está aprobado para el tratamiento del acné vulgar y algunas enfermedades de transmisión sexual (Garrido-Mesa, Zarzuelo, y Gálvez 2013). Sin embargo, el descubrimiento de sus propiedades no antibióticas ha dado la posibilidad de ampliar su espectro de actuación.



Su potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la EA, radica en sus propiedades anti-inflamatorias y neuroprotectoras.

La principal vía de actuación de la minociclina en la EA es la inhibición de la activación microglial (Kim & Suh, 2009; Garrido-Mesa *et al.*, 2013), dando lugar a la reducción de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF α).



En modelos de la EA se ha descrito la reducción de la neuroinflamación, y en fases tempranas de la patología, además, se ha logrado reducir los niveles de APP, A β y BACE, así como los daños cognitivos y conductuales (Garrido-Mesa, Zarzuelo, y Gálvez 2013; Ferretti *et al.* 2012).

3. NEUROINFLAMACIÓN EN LA EA

La neuroinflamación se define como la activación de una respuesta inflamatoria a través del sistema inmune innato, localizada en el SNC y derivada de un daño neuronal, con el objetivo principal de protegerle de aquellos agentes responsables de dicho daño (Zhang y Jiang 2015; Calsolaro y Edison 2016). La respuesta inflamatoria que se da es bastante compleja, puesto que implica una serie de cambios celulares y moleculares, entre los que se encuentran la activación de la glía cerebral (microglía y astrocitos, principalmente) o inducción de cascadas de señalización intracelulares que favorecen la liberación de mediadores inflamatorios y el reclutamiento de células inmunes periféricas (Zhang y Jiang 2015). Al igual que el proceso inflamatorio sistémico, la neuroinflamación es necesaria para resolver y eliminar aquello que ha causado el daño en el SNC, pero una respuesta excesiva, o mantenida en el tiempo, puede contribuir al daño cerebral y al desarrollo de la patología, e incluso constituirse como la causa de ambos (Calsolaro & Edison, 2016).

A día de hoy, está ampliamente descrito que la deposición del A β y de tau hiperfosforilada dan lugar a una respuesta neuroinflamatoria, que se mantiene en el tiempo y contribuye a la toxicidad y muerte neuronal (Querfurth & LaFerla, 2010; Heneka *et al.*, 2015). El péptido A β puede ejercer su función perjudicial de forma directa sobre las neuronas diferenciadas, provocando su daño y muerte. Sin embargo, también puede actuar de manera indirecta mediante la inducción de la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y activación de la neuroinflamación, amplificándose así el daño (Calsolaro & Edison, 2016). Tal y como se explicó en el apartado 2.7. (patogénesis de la EA), la hipótesis de la cascada amiloide se mantuvo hasta hace pocos años como la teoría predominante del desarrollo patológico de la enfermedad, pero no puede explicar por sí sola el daño neuronal y sintomatología que se produce durante su desarrollo, porque 1) existen personas que desarrollan deposición amiloide o de proteína tau, sin dar lugar a síntomas, y 2) el aclaramiento del A β en modelos animales y en humanos, aunque reduce la presencia del péptido, no modifican la progresión de la enfermedad (Calsolaro & Edison, 2016; Lane *et al.*, 2018). Estas premisas, junto con el descubrimiento de *loci* de riesgo para el desarrollo de EA de genes relacionados con el sistema inmune, son las que dieron pie a plantear que la agregación y deposición de los péptidos solo era necesaria, pero no suficiente, para el desarrollo de la EA. Por tanto, para la progresión de la patología eran necesarios otros factores intervinientes en el proceso, como, por ejemplo, la neuroinflamación.

A continuación, se listan algunos de los principales participantes en el proceso neuroinflamatorio.

3.1. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas pequeñas no estructurales, de entre 8 a 40 KDa, que llevan a cabo diferentes actividades biológicas cuando se secretan. La fuente principal de estas moléculas en el SNC durante el proceso neuroinflamatorio es la glía activada (Zhang y Jiang 2015).

Algunas de las citoquinas más destacadas son las siguientes:

3.1.1. IL-1 β

IL-1 fue la primera interleuquina en describirse (como su propio nombre indica), y se caracteriza por participar en diferentes actividades biológicas, lo que hizo que hasta 1980 tuviera diferentes nombres, creyendo que eran diferentes moléculas (Sims & Smith, 2010). IL-1 β es la principal forma soluble, y se ha descrito su presencia en enfermedades neurodegenerativas, tanto agudas como crónicas. Como otros mediadores inflamatorios, en condiciones fisiológicas, pueden detectarse niveles bajos en cerebro, pero en respuesta a un daño, su expresión aumenta rápidamente (Sims & Smith, 2010; Zhang & Jiang, 2015). En SNC, la fuente principal de IL-1 β es la microglía, aunque se ha descrito que los astrocitos y células periféricas pueden contribuir en su producción (Simi et al. 2007; Zhang y Jiang 2015). Es considerada como la principal reguladora de la cascada inflamatoria en cerebro, actuando a través de su receptor IL-1R-1, puesto que tiene un papel esencial en la regulación de la expresión de otras citoquinas pro-inflamatorias, como TNF α e IL-6. (Kinney *et al.*, 2018).

IL-1 se sobre-expresa ya en etapas tempranas de EA (principalmente en corteza prefrontal e hipocampo de pacientes), manteniéndose elevada durante el progreso de la enfermedad, y se la considera esencial para la deposición del péptido A β (Kinney *et al.*, 2018).

A diferencia de otras citoquinas, su biosíntesis y regulación es compleja, puesto que tiene varios puntos de regulación, tanto para su producción como para su posterior procesamiento y secreción (Sims & Smith, 2010). A partir de estudios con microglía activada mediante lipopolisacárido (LPS), se ha descrito que su producción depende

principalmente de la activación de NF- κ B, pero las p38 MAPK también pueden verse involucradas. Sin embargo, otros estudios donde emplean el A β como activador de la glía, describen la participación de las rutas de señalización que implican a ERK y JNK, además de las p38 MAPK (Simi *et al.*, 2007; Benito *et al.*, 2012).

La traducción del ARNm da lugar a la citoquina en su forma inactiva, conocida como pro-IL-1 β (31 KDa), la cual permanece en la célula hasta que un segundo estímulo favorece su procesamiento y secreción, ya en su forma activa (17 KDa). Para dicho procesamiento, es necesario que se ensamble el complejo multimolecular conocido como inflammasoma, siendo el NLRP3 el más conocido y estudiado. Este complejo proteico intracelular se compone de 1) un receptor de reconocimiento de patrones (PRR), que en este caso es el receptor similar al receptor NOD3; 2) la molécula adaptadora ASC; y 3) la enzima caspasa-1, que proteoliza la pro-IL-1 β inmadura para dar lugar a su forma madura, secretándose entonces de la célula (Daniels & Brough, 2017).

Desde que se conoció la importancia del proceso neuroinflamatorio durante el desarrollo de la EA, la IL-1 β se ha descrito como intermediario relevante durante el proceso, aunque siempre con connotación negativa. En ratones APP/PS1 se produce un aumento de expresión de la citoquina en microglía asociada a placas, y ratones que no expresan la proteína antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RN), muestran mayor número de microglía activada, que se correlaciona con un mayor daño neuronal tras la inyección intracerebroventricular del péptido A β (White *et al.*, 2017). También se ha descrito que la citoquina puede dar lugar al aumento de los niveles de APP y a la producción de A β en astrocitos, así como a la fosforilación de tau a través de la ruta de las p38 MAPK (Zhang y Jiang 2015; White *et al.* 2017). El aumento de la producción de A β y la deposición de placas por la influencia de la IL-1 β sobre la γ -secretasa, se ha presentado como el origen de un círculo vicioso en el que el aumento de A β contribuye a mayor activación microglial, y por ello, a la producción de IL-1 β (Kinney *et al.*, 2018).

Sin embargo, existen estudios que describen un potencial papel beneficioso de la sobre-expresión de IL-1 β en el contexto neuropatológico de la EA, como, por ejemplo, que la sobre-expresión prolongada de la citoquina en hipocampo de ratones APP/PS1, favorece el aclaramiento de las placas neuríticas mediante el fomento de la acción de la microglía (Shaftel *et al.*, 2007; Matousek *et al.*, 2012).

3.1.2. TNF α

TNF α es una citoquina que participa en procesos muy diversos, como en la diferenciación, inflamación o la muerte celular. En cerebro se expresa poco en condiciones fisiológicas, pero durante la EA sus niveles aumentan, asociándose a procesos de regulación del APP y al aumento de expresión de BACE1, que favorecen el incremento de la producción de A β (Zhang y Jiang 2015; Calsolaro y Edison 2016; Kinney et al. 2018). A su vez, el A β puede inducir de forma directa la producción de TNF α por parte de la microglía, activando NF- κ B (Kinney et al., 2018). Sin embargo, existen otros estudios que correlacionan la presencia de TNF α con mejoras en la patología de la EA, como, por ejemplo, el llevado a cabo por Chakrabarty y cols. (Chakrabarty et al., 2011) en un modelo animal transgénico para APP (TgCRND8), con el que observaron que la sobre-expresión de TNF α en hipocampo atenuaba la deposición del péptido A β .

La regulación de la expresión y síntesis de TNF α no es tan compleja como la de la IL-1 β . En macrófagos se ha descrito un alto nivel de expresión de la citoquina en condiciones basales, y cuando llega un estímulo, los elementos inhibidores de su traducción dejan de actuar (lo que se denomina como mecanismo de des-represión), favoreciendo la producción de la proteína en un tiempo muy corto (Schott et al., 2014). Una vez sintetizada como proteína transmembrana, debe ser proteolizada por la enzima “convertidora” de la TNF α (TACE) en su forma soluble de 51 KDa, aunque ambas formas son biológicamente activas. Puede sintetizarse por parte de la microglía y los astrocitos, e incluso por algunas poblaciones de neuronas, y, tras la unión a TNFR1, puede producir la activación de NF- κ B o de JNK, dando lugar a procesos de proliferación, migración celular, apoptosis, necrosis, e inflamación (Mccoy & Tansey, 2008).

3.1.3. IL-10

La IL-10 es una de las principales citoquinas anti-inflamatorias, de gran importancia para la supervivencia celular y la homeostasis neuronal. Se asocia a la adquisición, por parte de la microglía, de un fenotipo resolutorio de la inflamación, ya que antagoniza las respuestas pro-inflamatorias que favorecen la inhibición de la fagocitosis de A β por parte de la microglía (Tang & Le, 2016). Está presente en tejido cerebral sano, pero se sobre-expresa en pacientes con EA. Se sintetiza y libera tanto por microglía como por astrocitos en respuesta a un aumento de citoquinas pro-inflamatorias, con el objetivo de mantener la homeostasis del sistema inmune (Kinney et al., 2018).

Sin embargo, hay estudios que sostienen que la IL-10 puede promover la neuroinflamación y causar disfunción microglial. Por ejemplo, se ha descrito que la delección de IL-10 en ratones APP/PS1 da lugar a una disminución de la presencia de placas en corteza e hipocampo, así como una disminución de los niveles de A β ₁₋₄₀ y de A β ₁₋₄₂ de hasta un 85% (Guillot-Sestier *et al.*, 2015). Esto se correlaciona con otros experimentos que demuestran que la sobre-expresión de la citoquina en hipocampo de ratones TgCRND8 y Tg2576 (otros dos modelos murinos de la EA) da lugar a un aumento de la producción y acumulación de A β en corteza e hipocampo, así como a procesos de gliosis, deficiencias sinápticas y daños cognitivos (Chakrabarty *et al.*, 2015).

3.2. Quimioquinas

Las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas, encargadas de mediar en la migración de las células inmunes hacia el foco de inflamación. En el SNC, y en particular durante la EA, se propone que favorecen la infiltración de monocitos y el acúmulo de la microglía en los puntos donde se deposita el A β , con el objeto de facilitar la fagocitosis del péptido (Guedes *et al.*, 2018). Es destacable que en microglía se expresa en abundancia el receptor de la fractalquina (CX3CR1), el cual se relaciona con un mantenimiento de la homeostasis microglial, limitando su activación (Guedes *et al.*, 2018). En el contexto de la EA, dependiendo del modelo murino utilizado, se describen efectos neuroprotectores o neurotóxicos asociados a este receptor. Por ello, se requieren más estudios para esclarecer con mayor profundidad el papel de CX3CR1 en particular, y de las quimioquinas en general, ya que sus funciones pueden variar en paralelo a las distintas fases de progresión de la enfermedad (Guedes *et al.*, 2018).

3.3. Prostaglandinas

Las prostaglandinas son otro tipo de mediadores inflamatorios. Son ácidos grasos saturados de 20 átomos de carbono, derivados del ácido araquidónico, y sintetizados por la COX1 y la COX2 (Heneka *et al.*, 2015; Calsolaro & Edison, 2016). Estas enzimas se expresan en cerebro, pero la COX2 se induce en contextos neurodegenerativos, tanto en neuronas como en células gliales (Calsolaro & Edison, 2016). En la EA se ha detectado el aumento de PGD₂ en corteza frontal de pacientes, mientras que en modelos murinos, los niveles de la sintasa de PGD₂ y de su receptor se encuentran elevados tanto en microglía como en astrocitos asociados a placas neuríticas (Calsolaro & Edison,

2016). En experimentos *in vitro*, se ha descrito que la activación de los receptores 2 (EP2) microgliales para la PGE₂ inhibe la fagocitosis de A β y favorece sus acciones neurotóxicas, mientras que la delección de estos en modelos de EA reduce el estrés oxidativo, la neuroinflamación, los niveles de A β y la expresión de BACE1 (Heneka *et al.*, 2015). Sin embargo, la activación del receptor 4 de la PGE₂ (EP4) en microglia da lugar a la supresión de la inflamación y el aumento de la fagocitosis de A β , mientras que su delección en modelos murinos produce un aumento de placas, y la producción de IL-1 β y CCL3 (Heneka *et al.*, 2015). Al igual que con el resto de mediadores de la neuroinflamación, su participación en el proceso durante la EA demuestra ser más complejo, ya que no solo implica a la microglía, sino también al resto de tipos celulares, lo que puede matizar notablemente el resultado neto de sus efectos.

3.4. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Las ROS forman parte de las moléculas químicas conocidas como radicales libres, que se caracterizan por tener un electrón desapareado, lo que les confiere una alta inestabilidad electrónica, y tendencia a reaccionar con otras moléculas en busca de la estabilidad. La generación excesiva de estas moléculas lleva asociada efectos perjudiciales importantes, como daños en el ADN, lípidos y proteínas (Manoharan *et al.*, 2016). El A β es un inductor oxidativo, ya que cuando se deposita aumenta la peroxidación lipídica, y con ello, la desestabilización de las membranas plasmáticas. También puede favorecer la aparición de radicales hidroxilo a partir del hierro (al cual puede unirse) y de otros fenómenos descritos en la patología. Algunos de ellos son el daño mitocondrial (que conlleva una mayor generación de ROS y menor de ATP), la reducción de los niveles del glutatión en astrocitos, o el aumento de la actividad de la superóxido dismutasa en regiones de hipocampo (Manoharan *et al.*, 2016).

3.5. Glía: función y actividad

En el siglo XIX, Santiago Ramón y Cajal describió la neurona por primera vez como la unidad, definida e independiente, constituyente del SNC. Sin embargo, fue Virchow el que denominó al resto de elementos del SNC como “glía”, haciendo referencia a aquellas células no neuronales que actuaban como el “pegamento” (*glue*) del cerebro. Estas células fueron identificadas como astroglia, microglía, y oligodendroglía (Perez-

Nievas & Serrano-Pozo, 2018). Por su relevancia en la EA, a continuación, se hablará con más detalle de los dos primeros tipos celulares.

3.5.1. Astrocitos

Los astrocitos son un tipo celular residente del SNC, y muy importante para el desarrollo de distintos aspectos fisiológicos. Deben su nombre a su morfología estrellada cuando son observados bajo el microscopio (figura 17), y, de forma similar a las neuronas, engloban una población celular muy heterogénea con diversas características funcionales y morfológicas (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018). De hecho, ante daños agudos o crónicos, pasan de una apariencia “estrellada”, asociada a su estado en “reposo”, a una apariencia hipertrófica, o “reactiva”, en la que se produce una sobre-expresión de la proteína fibrilar glial ácida (*glial fibrilar acidic protein*) o GFAP (imagen B figura 17), así como de la vimentina.

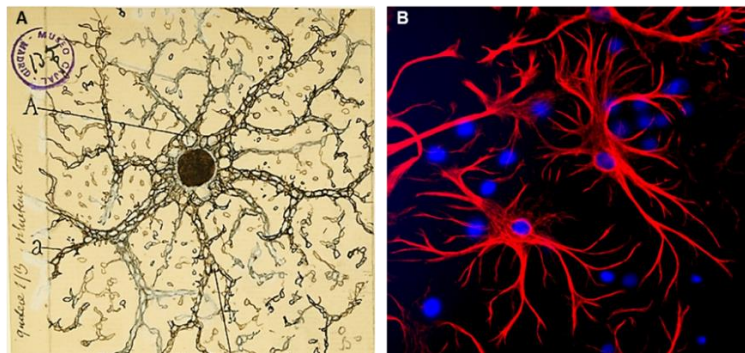


Figura 17: Imágenes de astrocitos. A: Reproducción de un dibujo representativo de la “neuroglia”, hecho por Santiago Ramón y Cajal (Fuente: (Navarrete & Araque, 2014). B: Inmuntinción de GFAP (rojo) de cultivos mixtos de corteza de ratón, y tinción con DAPI (azul) de los núcleos de todas las células presentes en el cultivo. Fuente: (Antibodies Incorporated, 2019).

Para comprender la relevancia de su participación en el desarrollo patológico de la EA, es preciso conocer primero las funciones fisiológicas de los astrocitos en el SNC sano, las cuales son (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018):

- Neurodesarrollo: promueven la formación de sinapsis excitatorias durante el desarrollo del SNC, y eliminan aquellas (tanto excitatorias como inhibitorias) que pasan a ser redundantes o innecesarias.
- Sinapsis: mediante la conocida como “sinapsis tripartita”, contactan tanto con el terminal postsináptico como con la dendrita presináptica, modulando la comunicación inter-neuronal y la plasticidad mediante la recaptación de glutamato desde el espacio sináptico. En corteza murina se ha contabilizado que cada astrocito

puede rodear una media de 4 neuronas, y hasta 600 dendritas de diferentes neuronas. Otros mecanismos de modulación sináptica son los que implican la liberación de gliotransmisores (ATP y D-Ser), aunque en este caso, si implica la liberación de estos mediante vesículas, queda en duda si son liberados realmente por astrocitos, o por las neuronas.

- Neurovasculatura: sus prolongaciones terminales forman parte de la barrera hematoencefálica, y junto con el resto de componentes, coordinan el flujo sanguíneo con la actividad neuronal (acoplamiento neurovascular), así como el flujo de agua entre el cerebro y el flujo sanguíneo, e incluso el drenaje de sustancias tóxicas.
- Metabolismo energético: se encargan de almacenar glucosa (en forma de glucógeno), que es la principal fuente de energía de las neuronas, mediante un mecanismo acoplado a la captación de glutamato. Cuando las neuronas lo requieren, los astrocitos las surten de ella, e incluso en determinadas ocasiones, en forma de lactato.

En el contexto patológico de la EA, se ha descrito cómo los astrocitos más cercanos a los depósitos amiloideos adquieren un estado reactivo, y dirigen sus procesos hacia las placas para fagocitar y eliminar dichos depósitos (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018). Son capaces de retirar depósitos oligoméricos y protofibrilares de A β (más que estructuras fibrilares de mayor tamaño), y de liberar enzimas que degradan el A β , como metaloproteinasas (MMP) o la IDE (Heneka *et al.*, 2015; Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018), lo que ha llevado a proponerles como barrera que frena el crecimiento de las placas neuríticas. Sin embargo, el análisis de su transcriptoma, tanto en cerebros humanos como murinos con EA, revelan que adquieren un perfil neurotóxico y pierden funciones neuroprotectoras (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018). Su neurotoxicidad se debe a la pérdida de eficacia para la retirada del exceso de glutamato, que se da entre neuronas cercanas a depósitos amiloideos, así como por la incapacidad de llevar a cabo sus funciones a nivel de la barrera hematoencefálica, y por expresar genes pro-inflamatorios (Heneka *et al.*, 2015; Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018).

En la funcionalidad astrocitaria adquieren gran importancia unos canales de membrana compuestos por las proteínas denominadas conexinas (Cx). Las Cx son proteínas integrales que se unen en grupos de 6 para dar lugar a los conexones, más conocidos como hemicanales (HC) (imagen B figura 18). Al integrarse en la membrana plasmática, permiten el flujo de iones y pequeñas moléculas entre el citoplasma celular y el medio extracelular (Giaume *et al.*, 2013; Freitas-Andrade & Naus, 2016). Esto es

posible gracias a cambios en las concentraciones de iones divalentes, fuerzas mecánicas, variaciones del pH, la acción de ligandos extracelulares, quinasas, fosfatasas o agentes oxidantes y reductores (Giaume *et al.*, 2013) (imagen C figura 18). Además de canales de membrana, estas estructuras pueden emparejarse con otros HC de astrocitos vecinos, lo que se conoce como uniones en hendidura, o *gap junctions* (GJ) (imagen A figura 18). Estas estructuras se constituyen como un canal común que comunica los citoplasmas de las células acopladas entre sí, permitiendo así el intercambio de iones y moléculas de bajo peso molecular (Freitas-Andrade & Naus, 2016) (imagen A figura 18).

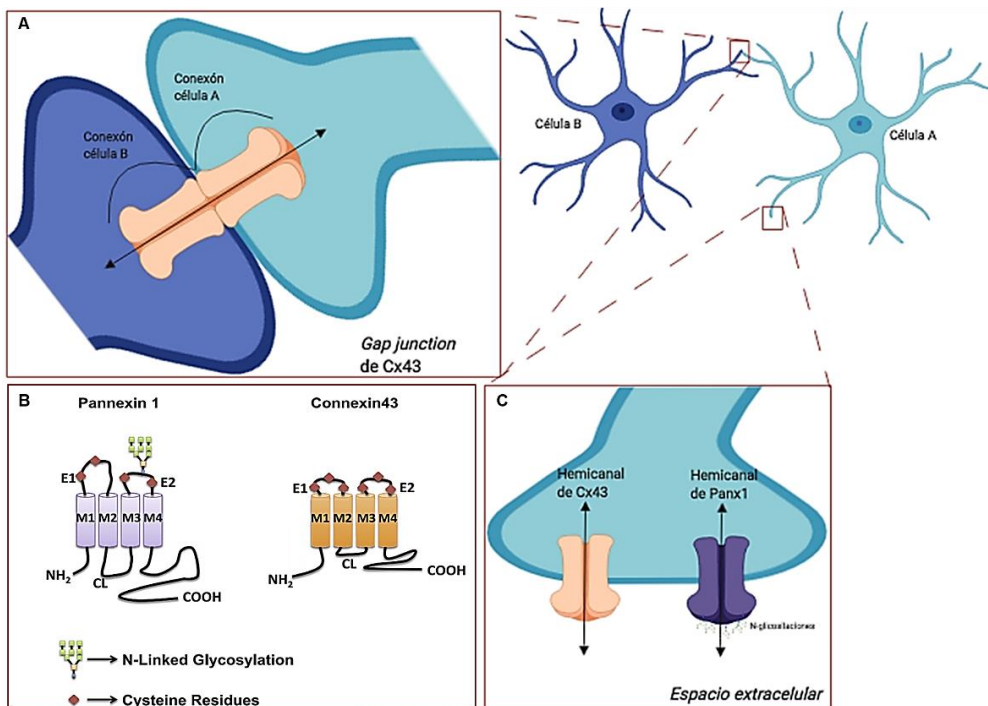


Figura 18: Representación gráfica de HC y GJ en astrocitos. A: GJ formados por la unión de dos hemicanales de Cx43, cada uno perteneciente a una célula diferente, y adyacentes entre sí. B: Representación esquemática de la estructura secundaria de la Panx1 (izda) y Cx43 (dcha). Ambas proteínas tienen 4 dominios α -hélice transmembrana (M1-M4), con dos horquillas extracelulares (E1 y E2), y una horquilla citoplasmática (CL), quedando los extremos N- y C- terminal en el interior celular. Panx1 presenta además N-glicosilaciones en las horquillas extracelulares (Freitas-Andrade & Naus, 2016). C: Representaciones gráficas de los HC de Cx43 (izda) y de Panx1 (dcha). La presencia de glicosilaciones impide el acoplamiento de HC de Panx1 entre sí para formar GJ.

La Cx43 se constituye como la isoforma predominante de Cx en la membrana de astrocitos, aunque también se ha detectado la existencia de otras Cx, e incluso de otro tipo de proteínas conocidas como panexinas (Panx). Estas proteínas se asemejan a las Cx en cuanto a estructura y función (intercambio de iones y moléculas de bajo peso molecular), pero a diferencia de la función dual que adquieren los canales de Cx, los de Panx solo forman HC (Giaume *et al.*, 2013). Existen tres isoformas: la isoforma 1, la 2, y la 3 (Freitas-Andrade & Naus, 2016).

En el contexto patológico de la EA, se ha descrito un aumento del acoplamiento de los astrocitos mediante GJ de Cx43, lo que podría sugerir una acción neuroprotectora actuando en la disipación del exceso de glutamato extracelular procedente de neuronas disfuncionales o muertas, en conjunto con los receptores y transportadores del neurotransmisor. Sin embargo, el aumento de la actividad HC de Cx43, también descrita en la patología, podría dar lugar a efectos perjudiciales, como se ha visto en experimentos *in vitro*, en los que la exposición de astrocitos al A β , o a citoquinas pro-inflamatorias, promueve la apertura de los HC, y la liberación de ATP y glutamato, aumentando la excitotoxicidad y muerte neuronal (Retamal *et al.*, 2007; Orellana *et al.*, 2011; Bosch & Kielian, 2014). Sin embargo, puesto que las metodologías *in vitro* vs. *in vivo* no siempre desembocan en conclusiones similares, a día de hoy es complicado establecer las funciones de cada una de las estructuras formadas por Cx43 en EA (Nielsen *et al.*, 2017), lo que sirve como aliciente para seguir con su investigación.

3.5.2. Microglía

Las células microgliales son los macrófagos residentes del SNC. De origen mieloide, su función principal es la de sondear las regiones de su alrededor en busca de patógenos o *debris* celular mediante la extensión de sus procesos celulares, así como de proporcionar factores tróficos para el mantenimiento del tejido cerebral (Heneka *et al.*, 2015). Al igual que los astrocitos, también participan en la remodelación sináptica, importantes para los procesos de memoria y aprendizaje (Mecha *et al.*, 2016).

En condiciones fisiológicas, la microglía adopta una morfología “ramificada”, ya que cobran protagonismo sus procesos ramificados respecto de su pequeño soma celular, para lograr sondear mayor superficie (Mecha *et al.*, 2016) (imágenes A y B figura 19), pero, ante la presencia de un daño patogénico (muerte celular o agregado proteico), la microglía extiende sus procesos al lugar del daño, migra hacia allí, cambia su morfología a un estado “ameboide” (retroceso de sus procesos celulares e hinchamiento de su soma celular), y comienza la respuesta inmune (Calsolaro & Edison, 2016). Toda respuesta inmune inicial ante un daño es necesaria para reparar el tejido, pero, mantenida en el tiempo (respuesta crónica) porque el estímulo permanezca, se convierte en perjudicial y dañina, dando lugar a la pérdida neuronal (Calsolaro & Edison, 2016).

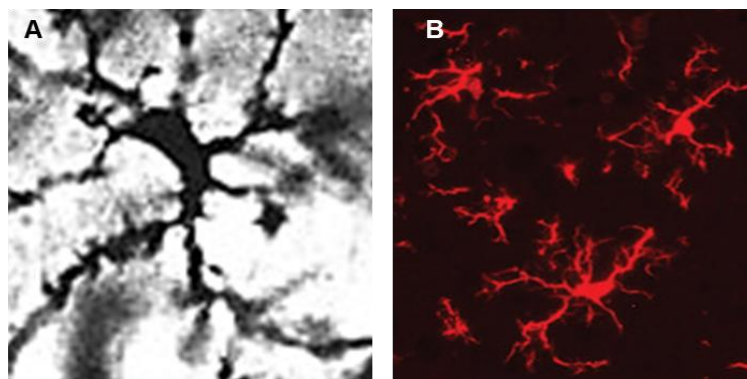


Figura 19: Imágenes de la microglía. A: Reproducción de un dibujo representativo de la microglía, hecho por Pío del Río Hortega. Fuente: (Ransohoff & Brown, 2012). B: Inmunotinción de Iba1 (rojo) de tejido de médula espinal de rata. Fuente: (Biocare Medical, 2019).

La microglía detecta los oligómeros y fibrillas de A β a través de receptores *Scavenger* de clase A1, CD36, CD14, y aquellos de tipo *Toll* (ej: TLR4 y TLR6), entre otros. Cuando el péptido se une a ellos, tiene lugar la producción de citoquinas pro-inflamatorias (mediante la activación de NF- κ B) y quimioquinas, así como la fagocitosis del A β . Las fibrillas se degradan en los lisosomas, mientras que el A β soluble puede hacerse de manera extracelular por parte de las enzimas IDE o neprilisina (Heneka *et al.*, 2015; Calsolaro & Edison, 2016). El A β también puede promover la expresión de citoquinas pro-inflamatorias a través de la cascada de las MAPK (Calsolaro & Edison, 2016).

Desde hace años se ha descrito la existencia de microglía activada asociada a las placas neuríticas (Calsolaro & Edison, 2016), las cuales podrían estar llevando a cabo la fagocitosis de estas, o su compactación. Se ha afirmado incluso que, en modelos animales de APP, la activación crónica de la microglía da lugar a la disminución de los niveles de A β (Navarro *et al.*, 2018). Sin embargo, en la EA “tardía”, se ha identificado la ineficiencia del aclaramiento de A β por parte de la microglía como una de las principales causas del desarrollo de la enfermedad. En algunos casos se debe a mutaciones de pérdida de función de algunos de los receptores que median en la fagocitosis (como TREM2) (Heneka *et al.*, 2015). Sin embargo, un exceso de actividad (incluyendo la liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias), también puede conllevar efectos deletéreos en las neuronas y células vecinas (Calsolaro & Edison, 2016; Navarro *et al.*, 2018).

Como célula mieloide que es, su proceso de activación es bastante complejo, puesto que pasa por diferentes estados, cada uno necesario para llevar a cabo diferentes funciones durante el proceso neuroinflamatorio. Dichos estados de activación se han caracterizado en macrófagos *in vitro*, pero se extrapolan a la microglía por su condición

mieloide. El primer extremo de ellos es el fenotipo o estado M1, durante el cual la microglía expresa genes citotóxicos, como las citoquinas pro-inflamatorias TNF α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-18, a la vez que su capacidad fagocítica se encuentra paralizada (Heneka *et al.*, 2015; Mecha *et al.*, 2016). El segundo extremo de los fenotipos microgliales es el M2, durante el cual se produce la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-4, IL-10, IL-13, o el factor de crecimiento transformante β (TGF β) (Heneka *et al.*, 2015). Entre M1 y M2, existe una gran diversidad de fenotipos, sobre todo en inflamación crónica, lo que hace muy difícil identificar la función real que tiene cada célula en un momento determinado. Es posible incluso, que se produzca la combinación de fenotipos en un mismo espacio y tiempo determinados (Heneka *et al.*, 2015; Mecha *et al.*, 2016).

Una de las características de la microglía en edad avanzada, tal y como se ha observado en humanos, primates y ratones, es que se muestra más “sensible” a los estímulos pro-inflamatorios. Este fenómeno, conocido como estado de preparación o *priming*, se cree consecuencia del envejecimiento, y en las condiciones adecuadas, podría favorecer el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa. En el estado de *priming* se ha descrito que existe un aumento de la producción de citoquinas y ROS, pero también de su capacidad fagocítica (Heneka *et al.*, 2015).

Al igual que en los astrocitos, la microglía también presenta HC de membrana de Cx43 y de Panx1 (figura 18) (Giaume *et al.*, 2013).

4. POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL SEC PARA EL TRATAMIENTO DE LA EA

La variedad de funciones del SEC en el SNC le han colocado en el punto de mira de numerosos estudios relacionados con patologías neurodegenerativas. Ello es debido a que en la mayoría de estas enfermedades no hay una única causa que origine la enfermedad, sino que suelen combinarse diferentes factores que provocan su desarrollo.

4.1. El SEC durante el envejecimiento, neuroinflamación, y la EA

Numerosos estudios en los últimos años han evidenciado que los componentes del SEC modifican sus niveles de expresión en el cerebro durante el envejecimiento. Y no solo con la edad, sino también durante procesos patológicos, e incluso entre diferentes fases del progreso de la enfermedad (Di Marzo *et al.*, 2015).

Durante el envejecimiento se ha reportado tanto en roedores como en humanos la bajada de la expresión de CB₁R, y/o de la unión de ligandos específicos en corteza, probablemente por una regulación post-transcripcional, ya que no siempre se correlacionan los niveles de ARNm de CB₁R con los propios del receptor en membrana. En humanos también se ha observado la disminución de la DAGL α y MAGL, mientras que la NAPE-PLD (y en menor medida, FAAH) aumentan. (Di Marzo *et al.*, 2015).

La reducción de la presencia de CB₁R en áreas imprescindibles para los procesos de memoria y aprendizaje en individuos mayores (corteza e hipocampo) se correlaciona con una pérdida de las capacidades cognitivas (Di Marzo *et al.*, 2015). Bilkei-Gorzo y cols. (Bilkei-Gorzo *et al.*, 2017) demostraron que la administración de dosis bajas de Δ^9 -THC a ratones de 12 y 18 meses recuperaba las funciones cognitivas hasta un nivel equiparable al de ratones jóvenes (2 meses de edad). Esto demuestra una posible vía de actuación por la cual poder intervenir en enfermedades neurodegenerativas que cursen con disminución de la señalización vía CB₁R, como en la EA.

Otro de los efectos perjudiciales de la reducción de la señalización dependiente de CB₁R es que disminuye la neurogénesis hipocampal. En particular, se ha descrito que

los ratones FAAH^{-/-}, al tener mayores niveles de AEA en cerebro respecto de ratones WT, muestran tener mayores niveles de neurogénesis adulta (Di Marzo *et al.*, 2015).

Un aspecto importante durante el proceso de envejecimiento es el aumento de la inflamación basal, lo que se conoce en inglés como “*inflammaging*”. Durante el envejecimiento, por causas como la acumulación de proteínas u otros productos por el empeoramiento en la eficacia de su aclaramiento, se da una producción de citoquinas pro-inflamatorias a bajas dosis, así como la activación de la vía NF-κB, que resulta en una leve respuesta inflamatoria. El SEC puede activarse por estímulos inflamatorios, los cuales provocan cambios de expresión de algunos de sus componentes, como por ejemplo en CB₁R de neuronas, el cual disminuye su expresión, o en CB₂R de microglía activada, el cual aumenta su expresión. La producción de ECs por parte de las neuronas disminuye, pero aumenta en células gliales, particularmente en microglía. Sin embargo, estos cambios pueden acentuarse si la inflamación es más exacerbada, como la que se produce en EA (Krstic & Knuesel, 2012; Di Marzo *et al.*, 2015).

En la EA existen datos controvertidos sobre los cambios de expresión y/o presencia de CB₁R, ya que algunos estudios indican que no existen diferencias a nivel proteico del receptor entre individuos sanos y enfermos, pero sí se ha detectado una reducción de su expresión en corteza cerebral de pacientes. Se ha descrito incluso que los CBRs se encuentran nitrosilados, lo que podría estar perjudicando el acoplamiento a proteínas G, y la activación consecuente de sus cascadas de señalización (Aso & Ferrer, 2014; Bedse *et al.*, 2014). Sin embargo, en modelos animales se han detectado aumentos de expresión de CB₁R en fases tempranas de la enfermedad, y una posterior bajada en fases más avanzadas. Por tanto, se deduce que la funcionalidad de este receptor cambia según progresa la enfermedad, es decir, el aumento de sus niveles durante las fases tempranas de la EA podría tener funciones neuroprotectoras, mientras que la disminución indicaría una deficiencia en su acción (Bedse *et al.*, 2014).

Existe más consenso en cuanto a la expresión de CB₂R y FAAH, de los que se ha descrito mayor expresión en glía asociada a placas en análisis *post-mortem* de pacientes de EA (Benito *et al.*, 2003). El aumento de la actividad de FAAH dependiente de la presencia del Aβ tendría dos consecuencias negativas favorecedoras de la evolución de la EA: 1) disminuiría la disponibilidad de AEA, lo que estaría asociado a la disfunción cognitiva de los pacientes, y 2) contribuiría al proceso inflamatorio mediante el aumento del ácido araquidónico, tras la metabolización de AEA (Aso & Ferrer, 2014). Esto es lo que podría estar ocurriendo en los astrocitos asociados a las placas neuríticas, mientras que la sobre-expresión de CB₂R en microglía podría estar buscando

compensar dicha pro-inflamación (Bedse *et al.*, 2014; Fernández-Ruiz *et al.*, 2015). En modelos animales de la EA también se ha demostrado un aumento de expresión de CB₂R en microglía asociada a placas neuríticas (López *et al.*, 2018).

El potencial del SEC como diana terapéutica para la EA tiene su base, por tanto, en sus propiedades neuroprotectoras, antioxidantes, anti-apoptóticas y anti-inflamatorias. Mediante la activación de los CBRs se previene la excitotoxicidad, entradas de Ca²⁺ continuadas, estrés oxidativo e inflamación (Fernández-Ruiz *et al.*, 2015), entre otros procesos. Ejemplos de ello proceden de aproximaciones *in vitro*, donde neuronas expuestas a diferentes formas tóxicas de Aβ aumentan su supervivencia con el aumento de ECs en el medio, o incluso de CBs exógenos como el CBD, u otros agonistas de los CBRs (Aso & Ferrer, 2014). A partir de aproximaciones *in vivo* con modelos de amiloidosis, se comprueba que los roedores mejoran sus capacidades cognitivas tras el tratamiento con agonistas CB, sobre todo cuando la patología está en fases tempranas (Aso & Ferrer, 2014). Los mecanismos de actuación de los ECs para conseguir la neuroprotección contra el Aβ son varios, tanto de acción directa sobre el péptido como indirecta, los cuales se asume que se desarrollan en paralelo (Aso & Ferrer, 2014). Estos mecanismos, que se postulan como perfectas dianas terapéuticas a través de la modulación del SEC (mediante la aplicación de CBs exógenos, o favoreciendo el aumento de los niveles endógenos actuando sobre las enzimas de degradación), son (Bedse *et al.*, 2014):

- El aclaramiento del péptido Aβ: principalmente mediante la activación de CB₂R en microglía, pero también aumentando la expresión de transportadores de Aβ a través de la barrera hematoencefálica, lo cual ocurre vía PPARγ, o aumentando los niveles de ECs (inhibiendo sus enzimas de degradación).
- Modulación de la neuroinflamación: Bloqueando la liberación de ROS, prostaglandinas y citoquinas pro-inflamatorias por parte de la microglía y astrocitos, evitando así la producción de más péptido debido a que favorecen la sobre-expresión de BACE1.
- Regulación de la actividad glial: A través de CB₂R, se puede reducir la actividad pro-inflamatoria de la microglía, así como favorecer su proliferación y su actividad fagocítica. La actuación de los ECs sobre receptores PPARγ también da lugar a efectos anti-inflamatorios, ya que puede inhibir la vía NF-κB.
- Regulación de precursores pro-inflamatorios: Se puede conseguir mediante la inhibición de las enzimas degradadoras de los ECs (MAGL y FAAH), ya que los productos metabólicos resultantes dan lugar a ácido araquidónico, sustrato

de COX para la síntesis de PGs. Además, la mayor disponibilidad de ECs en el contexto patológico de la EA favorecería la señalización vía CBRs, dando lugar a mejoras patológicas.

- Neuroprotección: Que se consigue evitando la apoptosis mediante la estabilización de los lisosomas que contienen A β . La neuroprotección llevada a cabo por los ECs puede ejercerse bien a través de CB₁R, o por otros receptores no CBs, la cual resulta en la inhibición de caspasas pro-apoptóticas.
- Protección contra el daño oxidativo y disfunción mitocondrial: mediante la inhibición de la ruta NF- κ B vía CB₁R, se logra reducir la expresión de iNOS, y consecuentemente, la producción de NO. También se logra disminuir la toxicidad por glutamato y por Ca²⁺, como se ha comprobado que hace el CBD, probablemente a través de los receptores PPAR γ .
- Mejoras en la memoria y aprendizaje: Los ECs modulan la plasticidad a largo plazo (por ejemplo, la LTP) a través de CB₁R. Puesto que A β suprime la LTP en hipocampo, se propone que activando CB₁R se favorecería la recuperación de esta actividad neuronal en la EA, ya que indirectamente también se estaría activando a los receptores PPAR γ , los cuales regulan la transcripción génica y promoverían así la neuroprotección, y la anti-inflamación.

4.2. La FAAH como diana terapéutica en el contexto neuroinflamatorio de la EA

En el año 2003, describimos la sobre-expresión de FAAH, así como el aumento de su actividad, en astrocitos asociados a placas neuríticas de tejido humano de pacientes con EA (Benito *et al.*, 2003). Este precedente sentó las bases para seguir investigando sobre el papel de la enzima FAAH durante el proceso patológico desencadenado en la EA. Sin embargo, no fue hasta 2012 cuando se publicaron datos originales sobre la relevancia del bloqueo de FAAH en astrocitos *in vitro*, tanto de forma farmacológica (empleando el inhibidor URB597) como genética (empleando cultivos de astrocitos primarios obtenidos de ratones FAAH^{-/-}). Estos datos demostraron que los astrocitos que tenían inactivada genéticamente la FAAH mostraban una respuesta pro-inflamatoria más exacerbada ante la presencia del péptido A β ₁₋₄₂ respecto de los astrocitos WT, destacando además que dicha respuesta, derivada del aumento de los niveles de AEA endógenos, implicaba a receptores no CBs: PPAR α , PPAR γ y TRPV1. Sin embargo, el bloqueo farmacológico de la enzima no daba lugar a sensibilidad inflamatoria en

presencia del péptido, mientras que la aplicación exógena de AEA y otras aciletanolaminas (PEA y OEA), provocaban efectos anti-inflamatorios (Benito *et al.*, 2012).

Posteriormente, quisimos caracterizar la relevancia de la inhibición genética de FAAH en diferentes contextos de daño cerebral *in vivo*. Un primer estudio que se llevó a cabo mediante microscopía intravital sobre la glía, ante una lesión parenquimática (quemadura láser), reveló que la inactivación genética de la enzima daba lugar a un aumento de la actividad de los HC de proteínas Cx43 de astrocitos, provocando un aumento de la respuesta y de la migración de los procesos microgliales hacia la lesión. En este suceso cobraban protagonismo la mediación de AEA por CB₁R, así como la liberación de ATP. Sin embargo, el bloqueo farmacológico de la enzima no reproducía los efectos observados bajo la inhibición genética de esta (Vázquez, Tolón, Pazos, *et al.*, 2015).

El estudio de dicho comportamiento glial se trasladó, finalmente, al contexto de la patología amiloide de la EA, mediante el empleo del modelo murino 5xFAD. La inhibición genética de FAAH en este modelo resultó en una disminución de la producción de APP, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂, así como de la deposición en placas neuríticas y de gliosis en hipocampo, culminando con la mejoría de su memoria espacial (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015). Sin embargo, el estudio del perfil de citoquinas y marcadores pro-inflamatorios reveló un aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, en el que cobró protagonismo la IL-1 β , ya que, a pesar de las mejoras patológicas observadas en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, los niveles de proteína de esta citoquina eran similares a los de los controles 5xFAD. Estos efectos eran mediados por la señalización vía CB₁R, y el bloqueo farmacológico de la enzima no reproducía los mismos efectos observados con la inactivación genética (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015).

En resumen, todos estos datos se suman a los ya publicados que demuestran el potencial terapéutico del SEC para el tratamiento de la EA. En concreto, el aumento del tono EC (particularmente el de la AEA) previo a la aparición de los marcadores patológicos de la enfermedad, así como el mantenimiento de dicho aumento, parecen ser claves para generar una respuesta inflamatoria beneficiosa en la resolución de la patología. No obstante, estas peculiaridades inflamatorias dieron lugar a nuevas preguntas dirigidas a conocer la relevancia de dicho perfil inflamatorio derivado de la inhibición genética de FAAH, y específicamente, el de la citoquina IL-1 β .

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha sido caracterizar el papel de la citoquina IL-1 β en el proceso neuroinflamatorio asociado a la patología amiloide, tras la inhibición genética de la enzima FAAH. Para ello, se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales, una *in vitro* y otra *in vivo*, con las que se abordaron los siguientes objetivos específicos:

Aproximación experimental *in vitro*

Mediante el uso de cultivos primarios de células gliales de ratón, se abordó el estudio de la relevancia de la señalización dependiente de IL-1 β en la funcionalidad de la glía carente de actividad FAAH (FAAH^{-/-}). Estos estudios se centraron en:

1. Caracterizar el perfil pro- y anti-inflamatorio, así como los niveles de expresión de los componentes responsables del inicio de la señalización de IL-1 β .
2. Caracterizar la actividad y cantidad de hemicanales Cx43.
3. Cuantificar la producción/ liberación de AEA, en presencia del péptido A β ₁₋₄₂.
4. Caracterizar la actividad fagocítica de la glía FAAH^{-/-}.

Aproximación experimental *in vivo*: tratamiento con minociclina

Ante la sospecha de que la señalización IL-1 β podría desempeñar un papel fundamental en los efectos derivados de la inactivación genética de FAAH, empleamos la minociclina como herramienta farmacológica para inhibir la producción de esta citoquina. De este modo, pretendíamos esclarecer su relevancia en la mejoría del fenotipo asociada a la inhibición genética de FAAH. Para ello procedimos a abordar los siguientes objetivos específicos:

1. El estudio de los cambios en la expresión de las citoquinas pro- y anti-inflamatorias, y de los componentes responsables del inicio de la señalización de IL-1 β .
2. Análisis de las modificaciones en los niveles de A β ₁₋₄₂ y de placas neuríticas en corteza e hipocampo.

3. Perfil inflamatorio y actividad fagocítica de la microglía FAAH^{-/-} en el contexto de la patología amiloide.
4. Evaluación de la memoria espacial en ratones 5xFAD (con o sin actividad FAAH), y los efectos en ella tras el tratamiento con minociclina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de los experimentos presentados en esta tesis doctoral se emplearon ratones con fondo genético C57BL/6 de 4 genotipos diferentes: *wild type* (WT), FAAH *knockout* (FAAH^{-/-}), 5xFAD, y 5xFAD/FAAH^{-/-}. La estabulación de estos animales y la experimentación con ellos se realizaron bajo las normativas para la “protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”, tanto europea (2010/63/UE), como española (RD 1386/2018). Dicha estabulación y experimentación fueron llevadas a cabo en el Animalario del Centro de Apoyo Tecnológico de la Universidad Rey Juan Carlos, donde los animales crecieron bajo condiciones controladas de temperatura (23°C), humedad relativa (55-60%) y ciclos de luz/oscuridad (12h/12h). Además, los animales tuvieron acceso ilimitado a agua y a dieta estándar.

A continuación, se detallan las características genéticas de cada genotipo:

- WT: Ratones cuyo genotipo no tiene ninguna modificación genética añadida. Por ello, se usan como controles en las aproximaciones experimentales.
- FAAH^{-/-}: Modelo animal que tiene borrado genéticamente (delecionado) el exón 1 (E1) del gen de la enzima FAAH, resultando en la inactivación funcional de la proteína. Este modelo animal, generado y cedido por el Dr. Benjamin F. Cravatt (Cravatt *et al.*, 2001), se creó mediante la sustitución por recombinación homóloga de dicho exón, equivalente a la secuencia de aminoácidos 1-65 de la enzima, por un *cassette* que contenía las secuencias del gen de la neomicina fosfotransferasa bajo el promotor de la fosfoglicerato quinasa (figura 20). Los clones de células madre embrionarias 129SvJ que contenían la mutación fueron identificados por *Southern blot*, y dos de dichos clones se emplearon para la generación de quimeras bajo el fondo genético C57BL/6, con el fin de propagar y fijar la mutación mediante sucesivos retrocruzamientos (Cravatt *et al.*, 2001).

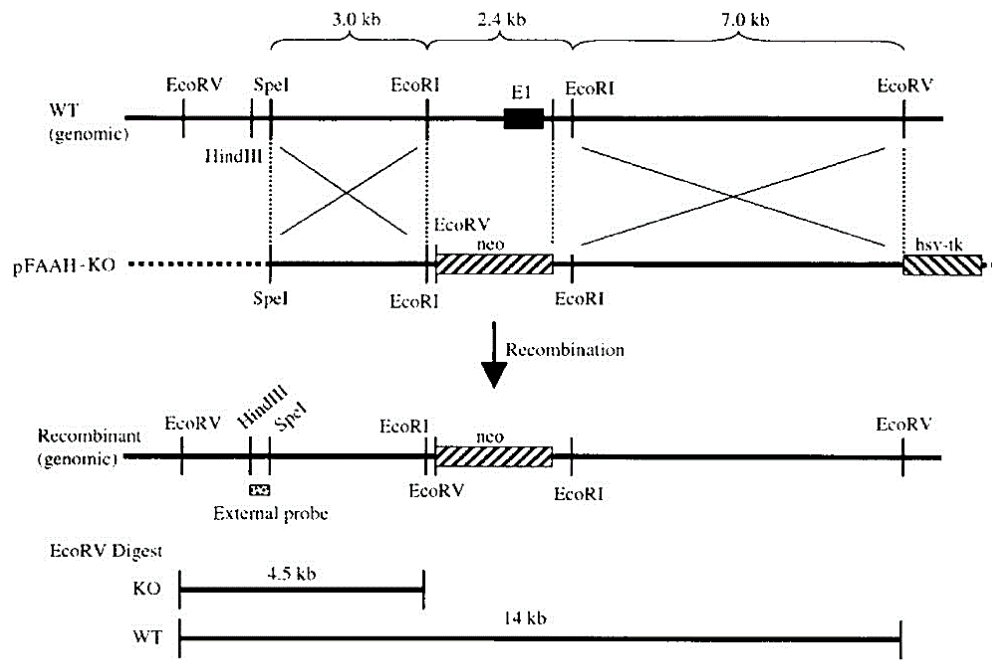


Figura 20: Esquema del proceso de generación del modelo murino FAAH^t. La recombinación homóloga da lugar a la sustitución del exón1 y de 2 kb, aproximadamente, de secuencia anterior (“upstream”) al exón (Cravatt *et al.*, 2001).

- **5xFAD:** Modelo murino transgénico que expresa cinco mutaciones genéticas humanas de la EA de tipo familiar (Oakley *et al.*, 2006). Específicamente, este ratón sobre-expresa el gen APP (695) humano con las mutaciones Suecas (K670N/M671L), Florida (I716V) y Londres (V717I), así como el gen humano PS1 con las mutaciones M146L y L286V. Ambos transgenes se encuentran regulados por elementos neuronales específicos del promotor murino *Thy1*, con el fin de favorecer la sobre-expresión de dichas proteínas en cerebro (figura 21). Este modelo se caracteriza por la alta expresión de APP, que se correlaciona con un aumento de la acumulación del péptido A β ₁₋₄₂ casi en exclusividad. Es decir, las mutaciones Suecas aumentan la producción de A β total, mientras que las denominadas Florida y Londres, así como las presentes en el PS1, aumentan de manera específica la formación de A β ₁₋₄₂.

Esta línea de ratones, adquiridos de *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, Maine, EE.UU.), tiene un fondo genético B6/SJL, mientras que el resto de modelos animales que empleamos tienen el fondo C57BL/6. Por ello, los ratones progenitores 5xFAD se cruzaron durante más de seis generaciones con ratones C57BL/6 para igualar los fondos genéticos.

Dentro de las características fenotípicas de este modelo murino, se encuentra la rapidez con la que se desarrolla la amilopatía. La deposición amiloide y la gliosis comienzan a los dos meses de edad en el parénquima cerebral, aunque existe acumulación intraneuronal en el soma y neuritas ya al mes y medio (antes de que comience la formación de placas). Esta acumulación intraneuronal ha sido descrita en cerebros de pacientes con EA, personas con Síndrome de Down, y en modelos animales de EA, lo que podría sugerir un rol en el desarrollo de la patología amiloide (Oakley *et al.*, 2006). La formación de placas comienza en el subículo y la capa 5 de la corteza, y con el tiempo va aumentando y se van extendiendo por el hipocampo y corteza, como se observa a los seis meses de edad. Sin embargo, cabe destacar que este modelo no muestra formación de ovillos neurofibrilares.

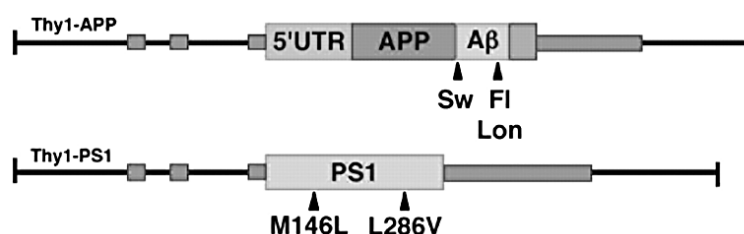


Figura 21: **Representación esquemática de los transgenes APP y PS1 del modelo 5xFAD.** Las mutaciones vienen indicadas por flechas: Sw, mutación Sueca; Lon, mutación Londres; FI, mutación Florida. Los rectángulos pequeños representan los exones de *Thy1* (Oakley *et al.*, 2006).

- **5xFAD/FAAH^{-/-}:** Ratones obtenidos a partir del cruzamiento entre las líneas 5xFAD y FAAH^{-/-}, descritas anteriormente, durante al menos 10 generaciones. Estos ratones se crearon con el fin de estudiar la importancia del SEC, y en particular, del aumento de los niveles de AEA, en el contexto fisiopatológico de la EA.

Genotipado

Para que los ratones 5xFAD desarrollen la enfermedad y se transmita a la progenie de forma estable, basta con que los descendientes porten los dos transgenes (hAPP y hPS1 con las 5 mutaciones) en hemiciogosis. Por tanto, cada generación obtenida requería ser genotipada, puesto que los posibles genotipos a obtener eran 5xFAD, o WT. En cuanto a la colonia de ratones FAAH^{-/-} (WT/FAAH^{-/-} y 5xFAD/FAAH^{-/-}), para asegurar que no existiera la expresión de la enzima FAAH funcional, se precisó que

todos ellos fueran homocigotos para la delección del E1, de manera que también fue necesario genotipar para asegurar la homocigosis en la descendencia.

Los genotipados se llevaron a cabo mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), seguida de la comprobación del tamaño de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,5% en tampón Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X (en mM: 44,57 de Tris Base, 44,48 de Ácido Bórico, y 10 de EDTA a pH 8). El ADN genómico del animal se obtuvo de una pequeña porción de la cola. La extracción del material genético se realizó mediante digestión alcalina con un tampón de lisis (25 mM de NaOH y 0,2 mM EDTA) a 95° C durante 30 minutos, y después se neutralizó con un tampón Tris-HCl a 40 mM. La integridad del ADN se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en TBE 0,5X, mientras que la calidad y concentración se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop (SimpliNano™, biochrom, Holliston, Massachusetts, EE.UU.). Finalmente, las muestras se guardaron a -20° C hasta su análisis por PCR.

Para la realización de la PCR, se emplearon entre 30-50 ng de ADN, y se mezclaron con tampón de reacción 1X, ADN polimerasa, cebadores (*primers*), y desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs -Biotools, Madrid, España-). La PCR se realizó en un termociclador (iCycler™ 96 Well Reaction Module, Bio-Rad, Hércules, California, EE.UU.), y los productos de PCR obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1,5% en TBE. Las bandas resultantes se observaron en un transiluminador de UV (Gel Doc™ EZ Imager, Bio-Rad).

Para el genotipado de la colonia 5xFAD se realizaron dos PCR: una, para amplificar el transgen hAPP, y la otra, para amplificar el hPS1. En ambos casos, lo que se observa en el gel son bandas de 500 pares de bases (pb) siempre que el ratón sea 5xFAD, mientras que, si se trata de un ratón WT, no se observa banda alguna, ya que no presentan ni el gen APP ni el PS1 humano. En el genotipado de los ratones FAAH^{-/-} (la delección del E1 de FAAH), la banda que se obtiene es de 300 pb si el ratón es FAAH^{-/-}, 200 pb si fuera WT, y ambas si se tratase de un heterocigoto.

La concentración final a la que se utilizaron los dNTPs es de 0,25 mM. En cuanto a los *primers*, para la PCR de genotipado de 5xFAD se emplearon a 1,92 μM, mientras que para la de FAAH, se utilizaron a 0,5 μM. Finalmente, de ADN polimerasa se emplearon 0,08 U/reacción para la PCR de hAPP y hPS1, y 0,03 U/reacción para la de FAAH. La secuencia de los *primers* son las siguientes (tabla 1):

GENES	PRIMERS	SECUENCIAS (5' - 3')
FAAH	Directo	TAA CTA GGC AGT CTG ACT CTA G
	Reverso 1	ACT CAA GGT CAG CCT GAA ACC
	Reverso 2	TTT GTC ACG TCC TGC ACG ACG
hAPP	Directo	AGA GTA CCA ACT TGC ATG ACT ACG
	Reverso	ATG CTG GAT AAC TGC CTT CTT ATC
hPS1	Directo	GCT TTT TCC AGC TCT CAT TTA CTC
	Reverso	AAA ATT GAT GGA ATG CTA ATT GGT

Tabla 1: Secuencias de los *primers* empleados para el genotipado de ratones 5xFAD (PCR de hAPP y de hPS1) y de los ratones FAAH^{-/-}.

2. METODOLOGÍA *IN VITRO*

2.1. Cultivos primarios de glía

La glía primaria se obtuvo de cerebros de ratones WT y FAAH^{-/-} de 0 a 2 días de edad, en base al protocolo descrito por Mecha y cols. (Mecha, 2011), pero con modificaciones (figura 22). El homogeneizado de tejido obtenido se repartió en frascos de 75 cm² (T-75) tratados previamente con poli-L-ornitina a 5 µg/ml (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU), en los que el volumen final de medio celular más disgregado cerebral era de 15 ml. Dicho medio celular fue medio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM, Cultek, Madrid, España) con alta concentración de glucosa (4,5 g/l), el cual fue suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado (iFCS, HyClone, Logan, Utah, EE.UU.), con un 1U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina (100X, Sigma-Aldrich). A este medio suplementado lo denominaremos a partir de este punto como medio completo. Para un correcto desarrollo y crecimiento celular, la relación número de cerebros: frasco T-75 fue de 2:1.

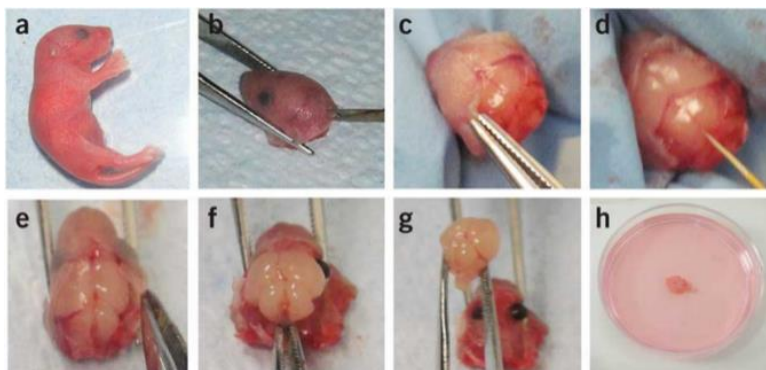


Figura 22: **Secuencia en imágenes del proceso de extracción del cerebro de crías de ratón**. a: cría de ratón recién nacida. b: decapitación para la obtención del cerebro. c: retirada de la piel sobre el cráneo. d: incisión por la base del cráneo para cortarlo por la línea media. e: retirada del cráneo. f y g: extracción del encéfalo. h: traspaso a placa Petri con medio DMEM. Figura obtenida de (Beaudoin *et al.*, 2012).

Los frascos se mantuvieron en un incubador celular (37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad ambiental) durante 15-19 días, renovándose el medio completamente por medio completo nuevo a día 7. El día 15-19 post-cultivo, los frascos se agitaron a 280 rpm a 37° C, en un agitador orbital durante 8 horas, tras las cuales, el medio de cultivo se desechó, y las células adheridas se lavaron con PBS-EDTA (Lonza, Basilea, Suiza) y se tripsinizaron hasta su completo levantamiento (TrypLE Express, Gibco™, Carlsbad, California, EE.UU.). Tras parar la tripsinización con medio completo, se recogieron las células y se centrifugaron a 168x g durante 10 minutos. A continuación, las células se resuspendieron en medio completo, se contaron en la cámara de Neubauer, y se sembraron en placas de cultivo. Para todos los experimentos se emplearon placas pre-tratadas con poli-L-ornitina a 5 µg/ml (incluidos los cubreobjetos que se emplean para experimentos de inmunocitoquímica o de medición de la actividad de HC).

2.2. Cuantificación de la proporción microglía/astrocitos en los cultivos de trabajo

Con el objeto de determinar la proporción de cada población celular en los cultivos de glía primaria, se realizaron diferentes tinciones inmunocitoquímicas con marcadores específicos de microglía y astrocitos. Para la detección de microglía, se empleó el anticuerpo anti-Iba1 (Wako, Tokio, Japón), mientras que para el marcaje de astrocitos, se empleó el anti-GFAP-Cy3 (Sigma).

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) que contenían cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Superior Marienfeld, Lauda-

Königshofen, Alemania). La densidad celular fue de 2×10^5 células/pocillo, y el medio de crecimiento empleado fue medio completo. Pasados tres días, las células se lavaron con PBS 1X y se pre-fijaron con paraformaldehído (PFA, PanReac Applichem, Darmstadt, Alemania) al 2% en PBS 1X, durante 15 minutos y a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se fijaron en PFA al 4% durante 20 minutos a TA, y tras los lavados con PBS 1X frío, se realizó el post-fijado con metanol: ácido acético glacial, 95:5 (PanReac Applichem), durante 30 minutos. Finalmente, se repitieron los lavados con PBS 1X, y se guardaron las células a 4°C en PBS 1X + 0,01% de azida sódica hasta su uso.

La inmunocitoquímica comenzó con 3 lavados de las células (sobre los cubreobjetos) con PBS 1X. A continuación, se incubaron con solución de bloqueo [PBS 1X + 1% BSA (Merk, Darmstadt, Alemania) + 1% Tritón X100 (PanReac Applichem)], durante 30 minutos a TA. Pasado este tiempo, los cubreobjetos se incubaron con α -Iba1 a 1:250 en solución de bloqueo, a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS 1X, y se incubaron simultáneamente con α -rabbit-alexa 488 a 1:200 y con α -GFAP-Cy3 a 1:1000, en solución de bloqueo, durante 2 horas a 37° C. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X, y se montaron en medio acuoso con DAPI (Fluoromount-G™ + DAPI, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Las imágenes se tomaron con una cámara (DXM1200F) acoplada a un microscopio de fluorescencia Nikon 90i (Nikon, Tokio, Japón), empleando el *software* ACT-1. Iba1 fue visualizado con el filtro FITC (Ex 465-495/Em 515-555). GFAP lo fue a través del G-2A (Ex 510-560/Em 590), y para el DAPI, se utilizó el filtro UV-2A (Ex 330-380/Em 420). Después, empleando el programa *Wolfram Mathematica*, se contaron las células de cada tipo, observadas en cada campo fotografiado (5 campos por cubreobjetos), y se calculó el porcentaje de cada tipo celular respecto al número total de células (contabilizadas con el marcaje DAPI), correspondiente a cada "cubre" (ver anexo I para una descripción más detallada del proceso de análisis de imagen y cuantificación de cada población celular).

2.3. Fibrilación del péptido A β ₁₋₄₂

El péptido A β ₁₋₄₂ (Bachem, Bubendorf, Suiza) consiste en el fragmento del péptido A β que contiene los aminoácidos 1-42. El liofilizado adquirido se resuspendió en NH₃ al 0,1% en agua destilada (H₂O_d), a una concentración final de 1mg/ml (221,5 μ M), y a continuación, se incubó a 37° C en agitación durante 7 días (Benito *et al.*, 2012). El

empleo de una solución alcalina favorece una mayor disolución y aumento de los sitios de nucleación, mientras que la incubación durante 7 días a 37° C facilita la fibrilación del péptido. Así se asegura que la solución de A β ₁₋₄₂ tenga un alto contenido en fibrillas, aunque no se puede descartar la presencia de estructuras intermedias (como oligómeros). La concentración final a la que se empleó en los experimentos fue de 5 μ M, en base a experimentos previos realizados en nuestro grupo de investigación (Benito *et al.*, 2012).

2.4. Exposición al péptido A β ₁₋₄₂

Según el objetivo final del experimento, las células se sembraron en un tipo de placa u otro, a una determinada densidad celular.

En primer lugar, para los estudios de expresión de citoquinas y otros genes (obtención de ARN y análisis por RT-qPCR), así como los de análisis de producción/ liberación de AEA (LC-MS/MS), se sembraron 10⁶ células/pocillo en placas de 6 pocillos (Sarstedt), destinando tres pocillos a cada condición experimental (vehículo o tratamiento con A β ₁₋₄₂), realizándose tres experimentos en total. A los dos días, las células se trataron con 5 μ M del péptido A β ₁₋₄₂, en medio DMEM con un 1U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina y sin suero (al que denominaremos medio sin suero). Paralelamente, las células que fueron tratadas con vehículo recibieron el mismo volumen de NH₃ al 0,1% en H₂O_d que el que recibieron las células tratadas con A β ₁₋₄₂. Cumplido el tiempo de tratamiento estimado en el incubador de células (8 o 24 horas), se procedió como sigue, dependiendo del destino final de las células:

- Obtención de ARN: Se les retiró el medio, se lavaron con PBS 1X frío, y se congelaron a -80° C.
- Obtención y cuantificación de AEA: Se recogieron los medios celulares y se congelaron a -80°C. En el caso de las células, se lavaron con PBS-EDTA, se tripsinizaron, y se recogieron en tubos eppendorf. Tras centrifugarlas 10 minutos a 1000 rpm (MiniSpin®, Eppendorf, Madrid, España), se aspiró el sobrenadante, y el *pellet* celular se congeló a -80°C.

Para los estudios de la actividad de HC de membrana, las células se sembraron sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Superior Marienfield). La densidad celular en este caso fue de 2 x 10⁵ células/pocillo, destinándose tres pocillos a cada condición experimental (vehículo o tratamiento con A β ₁₋₄₂), realizándose tres experimentos en

total. A día 3 tras la siembra, se aplicó en medio sin suero el tratamiento con vehículo o con A β ₁₋₄₂ 5 μ M, según correspondiera, y se incubaron durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se continuó con la adición de bromuro de etidio (BrEt, Sigma-Aldrich) a cada pocillo para la cuantificación de la captación de dicha molécula (metodología descrita en el apartado 2.6 “cuantificación de la actividad de hemicanales: captación de BrEt”).

2.4.1. Exposición al péptido A β ₁₋₄₂ HiLyte™ Fluor 555

Para los estudios de fagocitosis se empleó el péptido A β ₁₋₄₂ HiLyte™ Fluor 555 (AnaSpec, Fremont, California, EE.UU.), el cual emite fluorescencia a 555 nm, y por ello, puede ser detectado en el interior celular con técnicas que permitan la cuantificación de fluorescencia, como es el caso de la citometría de flujo. El protocolo seguido fue una adaptación de Pul y cols. (Pul *et al.*, 2013). Los tratamientos se realizaron por duplicado (dos pocillos por condición), y se realizaron 4 experimentos en total. Las células fueron sembradas a una densidad de 2×10^5 células por pocillo, en placas de 24 pocillos (Sarstedt). Dos días tras el sembrado, se aplicó 30 minutos de pre-tratamiento con 10 μ M de citocalasina D (inhibidor de la polimerización de filamentos de actina -Sigma-Aldrich-) o con vehículo (DMSO, PanReac AppliChem), en medio sin suero. Para el calibrado del citómetro de flujo (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Madrid, España), se reservaron unos pocillos con células mantenidas en medio sin suero. Pasado el tiempo de incubación, se añadió 0,5 μ M de A β ₁₋₄₂- HiLyte™ Fluor 555 a los pocillos tratados previamente con citocalasina D o con vehículo, y se mantuvieron en el incubador durante 4 horas. Trascurrido este tiempo, las células fueron lavadas con PBS 1X, se tripsinizaron, y se centrifugaron a 1200 rpm (MiniSpin®, Eppendorf) durante 5 min. Después, tras descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 μ L de PBS 1X a 4° C, y se analizaron en el citómetro de flujo (MACSQuant, Miltenyi Biotec).

2.5. Exposición a las citoquinas IL-1 β y TNF α

Para el estudio de la actividad de los HC bajo exposición a las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF α , se sembraron 2×10^5 células en placas de 24 pocillos, con cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro. Se realizaron tres experimentos, en los que cada condición experimental se realizó por triplicado. Pasados 3 días tras la

siembra, se trataron durante 24 horas con el cóctel de citoquinas IL-1 β y TNF α (10ng/ml de cada una -Sigma-Aldrich-), o con vehículo (Froger *et al.*, 2009), en medio sin suero. Pasadas 24 horas de incubación, se estudió la actividad de los hemicanales mediante la captación de BrEt (descripción metodológica en el apartado 2.6 “cuantificación de la actividad de hemicanales: captación de BrEt”).

2.6. Cuantificación de la actividad de hemicanales: captación de BrEt

El BrEt es un fluoróforo catiónico capaz de penetrar en la célula e intercalarse entre las dos hebras del ADN, dando lugar a la emisión de fluorescencia en el espectro rojo cuando se observa a las longitudes de onda de excitación/ emisión correspondientes. Su bajo peso molecular le hace posible traspasar la membrana celular a través de los hemicanales de membrana, lo que le convierte en un candidato idóneo para el estudio de la apertura de estos.

Para cuantificar la internalización de BrEt a través de los HC, una vez realizados los tratamientos correspondientes, se aplicó a cada pocillo 4 μ M de BrEt durante 10 minutos a 37° C. Pasado este tiempo, se hicieron 3 lavados con *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, en mM: 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,34 Na₂HPO₄, 0,44 KH₂PO₄, 1,2 CaCl₂, pH 7,4), y se montaron los cubreobjetos con Fluoromount-G™ + DAPI (Thermo Fisher Scientific).

Para la toma de imágenes, se empleó la cámara DXM1200F acoplada al microscopio de fluorescencia Nikon 90i (Nikon). Se utilizó el filtro G-2A (Ex 510-560/Em 590) para observar y tomar imágenes de la fluorescencia emitida por el BrEt, mientras que, para el DAPI, se utilizó el filtro UV-2A (Ex 330-380/Em 420). El *software* empleado para la adquisición de imágenes fue el ACT-1 (Nikon), mientras que para el análisis se utilizó el denominado *Wolfram Mathematica*, mediante el cual se obtuvo, entre otros datos, la intensidad de fluorescencia total (IFT) por célula. Para conocer una descripción más detallada del cálculo de la IFT, así como del cálculo del número de células total, leer el Anexo II.

2.7. Extracción y cuantificación de la proteína Cx43 en membrana plasmática

Para profundizar en la caracterización de las bases moleculares de la actividad de los HC, se llevó a cabo el aislamiento de proteína de la membrana plasmática, para después poder cuantificar específicamente la proteína Cx43 mediante *Western Blot* (WB). El aislamiento se basó en la unión de la sulfo-NHS-SS-biotina (Pierce Premium Grade Sulfo-NHS-SS-Biotin, Thermo Scientific), con las ϵ -aminas de los residuos de lisina, y las α -aminas presentes en los N-terminales de los péptidos. En un ambiente alcalino, las aminas reaccionan con el éster NHS, provocando que la biotina quede unida a la amina del péptido, y que el éster NHS se libere como subproducto. Después, con la ayuda de la neutravidina (NeutrAvidin Biotin-Binding Protein, Thermo Scientific), se forma el complejo proteína-biotina-avidina, fácilmente aislable mediante centrifugación.

Las células fueron sembradas en placas petri de 100 mm de diámetro (Sarstedt), a una densidad de 4×10^6 células/placa, y empleando medio completo. A los 3 días, se les cambió el medio por medio sin suero, y se las mantuvo en el incubador durante 24 horas. Cumplido este tiempo, las células fueron lavadas 3 veces con tampón HBSS frío a pH 8, e incubadas con sulfo-NHS-SS-biotin a 0,5mg/ml, durante 30 minutos, y a 4°C. Después, se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío más 15 mM de glicina a pH 8, para bloquear la biotina no unida, y a continuación, se añadió neutravidina en exceso a 1mg/ml, en PBS 1X suplementado con inhibidor de proteasas al 1X (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Con este tampón añadido, se levantaron las células con raspadores celulares (Sarstedt), se recogieron en tubos eppendorf y se incubaron a 4°C durante 1 hora. Después, se añadió tampón de lavado a cada tubo (PBS 1X, pH 7,2 más 0,1% SDS y 1% Nonidet P-40) y se centrifugaron 3 minutos a 17.000x g a 4°C (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Scientific). Tras desechar el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió en PBS 1X, pH 2,8 más 0,1 M de glicina, para liberar las proteínas de la biotina-avidina, y los tubos se centrifugaron de nuevo 3 minutos a 17.000x g, 4°C. Tras pasar el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf, se neutralizó inmediatamente su pH con Tris 1M pH 7,5 y se guardó a -80°C.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo colorimétrico con BCA (*Pierce BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, EE.UU.). 1 μ g de cada muestra se mezcló con tampón de carga al 1X (Laemmli 8X: 520 mM Tris-HCl pH 6,8, 16% de SDS, 40% de glicerol, 0,8% de azul de bromofenol, 8% de β -mercaptoetanol) y se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos.

Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE de 1,5 mm de grosor, al 8% de acrilamida-bisacrilamida, y, una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después, la membrana se tiñó con rojo ponceau (Fagron, Róterdam, Países Bajos), para comprobar que las proteínas se transfirieron correctamente, y para utilizarse como control de carga. Tras desteñir la membrana con TBS-Tween 20 (TBS-T: 20mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5M NaCl, 0,1% Tween 20), se bloqueó 1 hora con leche desnatada en polvo (Sigma-Aldrich) al 5% en TBS-T, y a continuación, se incubó con el anticuerpo α -conexina 43/ GJA 1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las condiciones fueron: una dilución de 1:8000 del anticuerpo en leche al 5% en TBS-T, a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T, y se incubó con el anticuerpo secundario α -rabbit IgG-HRP (CST, Danvers, Massachusetts, EE.UU.) a una dilución de 1:5000, en leche al 5% en TBS-T, durante 1 hora a TA. Finalmente, tras 3 lavados con TBS-T y un lavado con TBS 1X, la membrana se incubó con *Western Lightning* Plus-ECL (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) durante un minuto, y se tomaron imágenes de quimioluminiscencia para su posterior análisis (ChemiDoc™ Imaging System, Bio-Rad). Las diferencias de intensidad de banda se analizaron por densitometría (ImageJ, NIH, Bethesda, Maryland, EE.UU.), y los valores obtenidos se normalizaron a la señal de proteína total, cuantificada en la imagen de la membrana teñida con rojo ponceau.

2.8. Extracción de ARN y RT-qPCR

Para la obtención de ARN a partir de cultivos celulares, se empleó el MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Madison, Wisconsin, EE.UU.), de acuerdo con las indicaciones del proveedor, aunque con modificaciones. Las muestras de ARN recuperado se resuspendieron en 15 μ l de H₂O_d pre-tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC -Sigma-Aldrich-) y posteriormente autoclavada, y se conservaron finalmente a -80° C.

La calidad del ARN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, en Tris-Acetato EDTA (TAE) 1X (TAE 50X, PanReac AppliChem), empleando el colorante de ácidos nucleicos GelRed (Biotium, Hayward, California, EE.UU.). Para conocer la concentración del ARN obtenido se realizó la lectura de la absorbancia a 260/280 nm en un nanodrop (SimpliNano™, biochrom).

La retrotranscripción se realizó a partir de 1 μ g de ARN mediante el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics). Las qPCRs se realizaron en el

termociclador *LightCycler® 480 Instrument II* (Roche Diagnostics), y los *kits* de reacción que se utilizaron fueron los de *LightCycler® TaqMan® Master* (Roche Diagnostics) y *Quantimix Easy Probes Kit* (Biotools). Los genes analizados fueron los siguientes: Rn18s (ARN ribosómico 18S, empleado como control interno para la normalización de los datos durante el análisis), Il1b, Il10, Il1r1 (receptor de IL-1 β), Il1rn (antagonista del receptor IL-1R-1), Il1rap (proteína accesoria de IL-1R-1), Tnf y COX2. Se emplearon placas de 96 pocillos, lo que permitió analizar cada muestra por duplicado en la misma qPCR, así como la introducción de un control positivo (que expresaba todos los genes analizados), y un control negativo (pocillos sin ADNc). Para la amplificación de todos ellos se emplearon 2 μ l muestra por pocillo de reacción, salvo en el caso de la citoquina IL-10, que se emplearon 4 μ l.

En la tabla 2 se detallan los genes analizados, los *primers* y sondas empleados, y sus respectivas secuencias:

GENES	PRODUCTO	PRIMERS/ SONDAS	SECUENCIAS/ REFERENCIAS ENSAYOS PREDESEÑADOS
Rn18s	ARNr 18S	Directo	AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTC
		Reverso	GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA
		Sonda #55	Universal ProbeLibrary (Roche Diagnostics)
Il1b	IL-1 β	-	Mm.PT.58.42962427 (IDT®, Coralville, Iowa, EE.UU.)
Il10	IL-10	-	Mm.PT.58.13531087 (IDT®)
Il1r1	IL-1R-1	-	RealTime ready Single Assay #312175 (Roche Diagnostics)
Il1rn	IL-1RN	-	RealTime ready Single Assay #318527 (Roche Diagnostics)
Il1rap	IL-1RAcP	-	RealTime ready Single Assay #314358 (Roche Diagnostics)
Tnf	TNF α	Directo	GCCTATGTCTCAGCCTCTTCTCATT
		Reverso	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA
		Sonda	/56- FAM/CCATAGAAC/ZEN/TGATGAGAGGGA GGCCATTT/3IABkFQ/
COX2	COX2	Directo	TGACCCACTTCAAGGGAGTCT
		Reverso	CTGTCAATCAAATATGATCTGGATGTC
		Sonda	/56- FAMAACAACATC/ZEN/CCCTTCCTGCGAA GTT/3IABkFQ/

Tabla 2: Listado de genes analizados por qPCR. Se indica el nombre del gen, el nombre del producto codificado por el gen (ARN ribosómico o proteína), y la secuencia de los *primers*, sonda, o la referencia del kit comercial prediseñado de *primers*-sonda, según corresponda.

Los valores de ciclo umbral *Ct* se calcularon aplicando el método de análisis de Cuantificación por la Segunda Derivada Máxima, con el software *LightCycler*, versión

1.5 (Roche Diagnostics), y después, se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los valores *RQ* (*cuantificación relativa*), obtenidos como resultado final de la cuantificación relativa por el método mencionado, son los empleados para el análisis estadístico.

2.9. Cuantificación de AEA: espectrometría de masas (LC-MS/MS)

La espectrometría de masas es una técnica que permite la detección y cuantificación de moléculas previamente ionizadas en base a su relación masa/carga. No obstante, para ayudar en el proceso de separación de las diversas moléculas que se encuentran en una muestra biológica, el espectrómetro suele ir acoplado a un equipo cromatográfico, a través del cual se separan dichas moléculas, y según eluyen, se inyectan en el espectrómetro.

Para la extracción de la AEA, las muestras (tanto los sobrenadantes como las células, N=9 en cada caso) se dejaron descongelar en hielo. A continuación, se les añadió 1µl del estándar interno araquidonoil etanolamina-d8 (AEA-d8, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, EE.UU.), por lo que la concentración final de AEA-d8 fue de 10 pg/µl en células, y 1 pg/µl en medios. Después, se llevó a cabo la extracción de ECs en Cl_3CH : tampón formiato (0.026 M a pH 2.6) en una relación de 2:1, tanto en el *pellet* celular como en los medios, un total de dos veces. Tras la extracción, el medio orgánico se llevó a sequedad en el *SpeedVac* (Thermo Scientific) a una temperatura de 60°. Finalmente, las muestras se reconstituyeron en 50 µl de metanol para ser analizadas por LC-MS/MS, y en cada inyección se emplearon 5 µl.

Las muestras se analizaron mediante un sistema LC-MS/MS UPLC H class (Waters, Milford, Massachusetts, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masas QTrap 4500 (Sciex, Framingham, Massachusetts, EE.UU.). Tras la obtención de los picos correspondientes a la AEA presente en la muestra, las muestras fueron integradas mediante el *software* MultiQuant (Sciex), y normalizadas al área de AEA-d8. La concentración se calculó mediante calibración por regresión lineal y se normalizó con la concentración de proteína total.

Para conocer la descripción detallada del procedimiento de análisis y cuantificación, leer Anexo III.

2.10. Estudio de la actividad fagocítica de la glía *in vitro*: citometría de flujo

Para conocer la actividad fagocítica de la glía primaria, se empleó el péptido A β ₁₋₄₂ HiLyte™ Fluor 555 (AnaSpec), puesto que hacía posible relacionar directamente la cantidad de fluorescencia detectada con la cantidad de péptido fagocitado. Las células en suspensión (previamente expuestas al péptido A β ₁₋₄₂ HiLyte™ Fluor 555) se pasaron por el citómetro de flujo (MACSQuant, Miltenyi Biotec). La detección del péptido fluorescente se llevó a cabo a través canal B2 (PE, MACSQuant, Miltenyi Biotec), y posteriormente, la señal fluorescente se analizó con el *software* MACS Quantify (Miltenyi Biotec). Dicha señal se corrigió mediante la aproximación denominada *Flouescence minus one* (FMO), que consiste en usar muestras control marcadas con todos los marcadores o compuestos a analizar menos uno, con el objeto de detectar el rango de fluorescencia de dicho marcador o colorante en las muestras experimentales. En este caso, puesto que solo teníamos un marcaje a detectar (fluorescencia del A β), las muestras se corrigieron con respecto al control negativo (células sin exponer al péptido A β ₁₋₄₂ HiLyte™ Fluor 555). El *debris* y los agregados celulares se excluyeron del análisis en base a los parámetros de tamaño y complejidad (*Forward scatter* y *side scatter*, respectivamente), y por cada muestra, se analizaron aproximadamente 10.000 singletes.

3. METODOLOGÍA *IN VIVO*

3.1. Edad, genotipo, número de animales

Los experimentos se realizaron con ratones WT, FAAH^{-/-}, 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} de 6-7 meses de edad, ya que es a partir de entonces cuando se detectan déficits cognitivos en los ratones 5xFAD (Oakley *et al.*, 2006). El número de animales por grupo varía según el procedimiento experimental, siendo de 11-16 para la prueba de memoria espacial, 6-9 para la PCR en tiempo real (qPCR), de 5 para los experimentos de *Enzyme-Linked ImmunSorberent Assay* (ELISA) y de citometría de flujo, y de 3-4 para las inmunotinciones de placas neuríticas.

3.2. Protocolo del tratamiento farmacológico con minociclina

La minociclina es una tetraciclina de segunda generación a la que recientemente se le atribuyen efectos biológicos independientes de su actividad antibiótica, como los de carácter neuroprotector, ya que inhibe la activación microglial, y en particular, la activación de la IL-1 β (Garrido-Mesa *et al.*, 2013). El fundamento de este paradigma experimental es que la reducción de la respuesta inflamatoria en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, (lo que incluye la disminución de IL-1 β), provocará el empeoramiento a nivel cognitivo y patológico de estos animales, al sucederse un aumento de A β soluble y de placas neuríticas, a la vez que una pérdida de memoria espacial cuantificada mediante la prueba del Laberinto acuático de Morris (*Morris Water Maze*, MWM).

Los experimentos *in vivo* se realizaron con ratones de los cuatro genotipos descritos, distribuidos de la siguiente manera (tabla 3):

VEHÍCULO (VEH)	MINOCICLINA (MINO)
WT	WT
FAAH ^{-/-}	FAAH ^{-/-}
5xFAD	5xFAD
5xFAD/FAAH ^{-/-}	5xFAD/FAAH ^{-/-}

Tabla 3: Clasificación de los grupos experimentales empleados para el tratamiento con minociclina 10mg/kg.

La solución de minociclina (hidrocloruro de minociclina, Sigma-Aldrich) se obtuvo tras su reconstitución en NaCl al 0,9%, a una concentración de 1,5 mg/ml. Después, se ajustó el valor de pH a 7,4, y se almacenó a -80° C hasta su uso.

El protocolo experimental consistió en la administración de una dosis diaria, bien del vehículo o del fármaco, mediante inyección intraperitoneal (i.p.) durante 12 días consecutivos (figura 23). Los ratones tratados con minociclina recibieron una dosis de 10mg/kg, que equivalía a 200 μ l de solución por cada 30 g de peso del animal. Paralelamente, los ratones del grupo vehículo recibieron el volumen equivalente de NaCl al 0,9% correspondiente a su peso. Los animales eran pesados a diario previamente a la administración de la dosis, para poder calcular el volumen correcto de vehículo o minociclina a administrar, así como para detectar pérdidas de peso a consecuencia de la posible toxicidad del tratamiento.

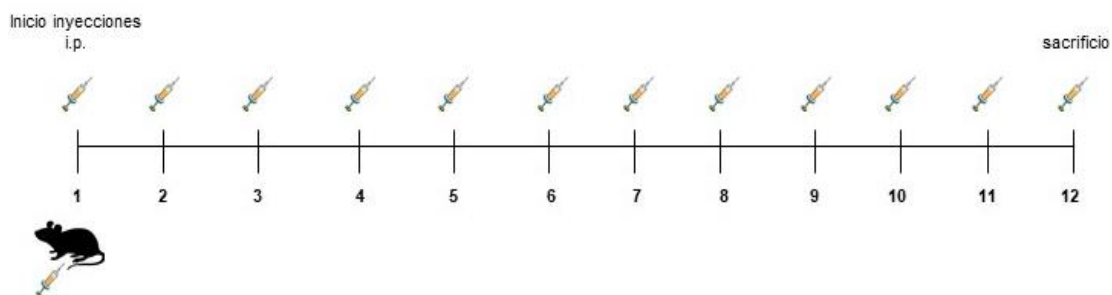


Figura 23: Esquema gráfico del protocolo de administración de tratamiento farmacológico.

3.3. Prueba de memoria espacial: Laberinto acuático de Morris (MWM)

Trascurridos los 7 primeros días de tratamiento, se comenzó la prueba del MWM, el cual se completa durante 4 días consecutivos (es decir, desde el día 8 hasta el día 11 de tratamiento, ambos incluidos). El MWM es definido por Charles V. Vorhees y Michael T. Williams (Vorhees & Williams, 2006) como una prueba de aprendizaje espacial para roedores, basada en la existencia de pistas visuales alrededor de un tanque, mediante las cuales el roedor se orienta para nadar en su superficie abierta, donde existe una plataforma de “escape”, sumergida e invisible para el animal (figura 25 imagen B). La prueba comienza dejando el animal sobre el agua, de cara a la pared de la piscina, desde la posición 1 del ensayo en cuestión. Se le deja nadar durante un minuto para permitirle que encuentre la plataforma sumergida, localizada siempre en el mismo cuadrante durante los 4 días de prueba. Si la encuentra durante ese minuto, se toma el tiempo de llegada – “tiempo de latencia” –, y se le deja descansar un minuto sobre la plataforma, mientras que, si no la encuentra durante el minuto de ensayo, se le coloca sobre la plataforma para que descanse y se oriente durante un minuto. Una vez cumplido el minuto sobre la plataforma, se procede con el resto de ensayos, de la misma manera, y de forma consecutiva, hasta un total de 4 por ratón y por día, cada uno comenzándose desde las posiciones 2, 3 y 4, respectivamente, y cumpliendo con los mismos tiempos de examen y descanso (figura 24).

Los días 2, 3 y 4 de MWM proceden de igual manera que el día 1 descrito, salvo por algunas diferencias:

- Cada día se comienza en una posición 1 diferente. Es decir, en el día 2, la posición 1 es la posición 2 establecida el día 1. En el día 3, la posición 1 es la 3

del día 1, y en el día 4, la posición 1 es la 4 del día 1. El resto de posiciones rotan ordenadamente en sentido de las agujas del reloj con respecto a la que se tiene como primera el día en cuestión (figura 24).

➤ Los tiempos de descanso en la plataforma, que se dan entre ensayo y ensayo, se reducen a 15 segundos.

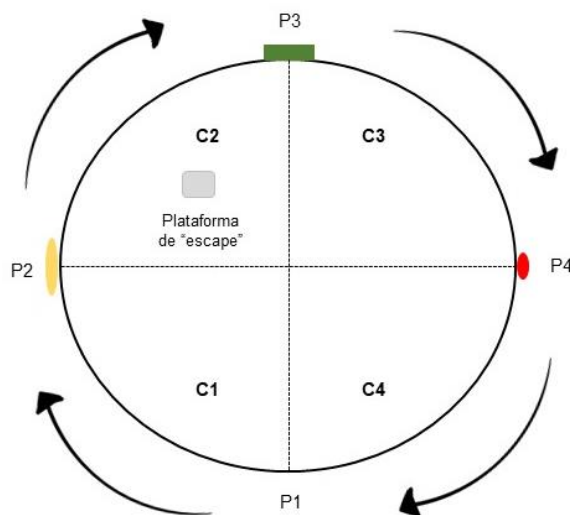


Figura 24: Representación gráfica de piscina MWM vista desde arriba, donde se indica la posición 1 (P1), y rotación del resto de posiciones, en el sentido de las flechas, cada día de prueba. P1, P2, P3, P4: Posición 1, 2, 3, 4, respectivamente. C1, C2, C3, C4: Cuadrante 1, 2, 3, 4, respectivamente.

Cabe destacar que los animales deben ser acostumbrados previamente al investigador que vaya a realizarles la prueba de memoria, puesto que, de lo contrario, pueden introducirse variaciones relacionadas con el estrés, que alteren los resultados de la prueba. En este caso particular, se aprovechó la manipulación de los animales durante la aplicación del tratamiento i.p. para acostumbrarles al contacto con el experimentador.

La prueba de MWM se llevó a cabo en una piscina circular (120 cm de diámetro y 20 cm de altura, imagen A figura 25). Las cuatro condiciones ambientales controladas y estabilizadas durante los 4 días que duró la prueba son: la temperatura del agua (19-21 °C), su opacidad (conseguida mediante tinción con pintura de dedos blanca para niños), el nivel del agua (9,5 cm), y la intensidad de luz. La prueba siempre se realizó en la franja horaria de 9:00-13:00, fase “de sueño” respecto al ritmo circadiano de los ratones. Todos los datos de cada ensayo fueron recogidos y procesados mediante el *software* Smart 3.0 (Panlab, Barcelona, España). Se tomó el tiempo de latencia como dato para el estudio de la memoria espacial.

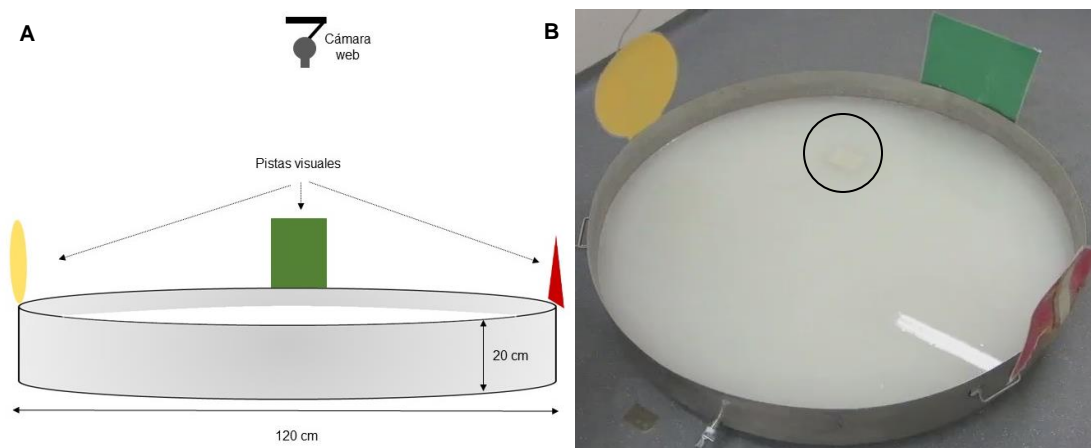


Figura 25 A: Dibujo esquemático de la piscina MWM, presentando sus medidas y la posición de las pistas y la cámara web. B: Imagen real piscina MWM. En ella, se destaca con un círculo negro la presencia de la plataforma de “escape” sumergida.

3.4. Recolección y procesamiento de muestras

A día 12 de tratamiento, pasadas dos horas tras haber recibido la última dosis del tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical seguida de decapitación. Se extrajeron los cerebros, y cada uno de ellos fue separado en dos hemisferios. Uno de los hemisferios se fijó en formaldehído al 4% (PanReac AppliChem), se deshidrató y se incluyó en parafina, mientras que el otro, se congeló en isopentano (PanReac AppliChem) y se guardó a -80°C .

3.5. Extracción de ARN y RT-qPCR

Para la extracción de ARN desde tejido, se partió de la corteza e hipocampo de los hemisferios cerebrales conservados a -80°C , y se empleó el reactivo de aislamiento TriPure (Roche Diagnostics), según las indicaciones del proveedor. Una vez obtenido el ARN, se resuspendió en $23\ \mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}_d\text{-DEPC}$, y se almacenó a -80°C hasta su uso. La comprobación de la calidad, cuantificación de la concentración de ARN, así como la retrotranscripción y las qPCRs se llevaron a cabo conforme a lo descrito en el apartado 2.8 de los Materiales y Métodos de esta tesis.

3.6. Cuantificación del péptido A β ₁₋₄₂ y de la proteína IL-1 β : técnica ELISA

Mediante el empleo de la técnica ELISA se llevó a cabo la cuantificación de A β ₁₋₄₂ total en muestras de corteza e hipocampo, así como la cuantificación de proteína IL-1 β total en corteza.

Para la cuantificación de A β ₁₋₄₂, se partió de las cortezas de hemisferios conservados a -80° C, las cuales fueron homogeneizadas en 10 volúmenes de tampón guanidina frío (5 M de guanidina-HCl / 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) completado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). Después, se cuantificó la concentración de proteína mediante el ensayo colorimétrico con BCA (*Pierce BCA Protein Assay Kit*). El *test Human A β 42 ELISA Kit* (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) se utilizó según las indicaciones del fabricante, empleando 1 μ g de proteína. La señal colorimétrica resultante se leyó en un lector de placas (Tecan, Männedorf, Suiza) a 450 nm. La concentración de A β ₁₋₄₂ se calculó mediante interpolación respecto a una recta patrón.

En cuanto a la cuantificación de la proteína IL-1 β , las cortezas mantenidas a -80° C se homogeneizaron en tampón de lisis frío [25 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% (vol/vol) IGEPAL CA-630, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA y 2% (vol/vol) glicerol] completado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). A continuación, las muestras se centrifugaron a 14.000x g durante 15 minutos a 4° C (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Scientific), y, posteriormente, se cuantificó la concentración de proteínas de cada muestra mediante ensayo de BCA (*Pierce BCA Protein Assay Kit*). El ELISA empleado fue el de *RayBio® Mouse IL-1 beta* (RayBiotech, Peachtree Corners, Georgia, EE.UU.), y el procedimiento seguido fue el que indicaba el fabricante, partiendo de 100 μ g de proteína. Finalmente, la señal colorimétrica se leyó a 450 nm en el lector de placas (Tecan), y las concentraciones fueron interpoladas a partir de una recta patrón.

3.7. Cuantificación de placas neuríticas: tinción con methoxy X04

El methoxy X04 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) es un colorante azul fluorescente que se caracteriza por tener la capacidad de unirse específicamente a los

depósitos de láminas β que existen en los núcleos de las placas neuríticas. Es una herramienta muy útil para el estudio de placas *in vivo*, ya que puede cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a ellas.

Para el análisis y cuantificación de la deposición de $A\beta_{1-42}$ en tejido cerebral, se partió de los hemisferios fijados e incluidos en parafina, los cuales fueron cortados de forma seriada en lonchas de 4 μm de grosor, y recogidos en portaobjetos tratados con Vectabond (Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.). Posteriormente, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina en secciones aleatorias, que sirvieron para seleccionar aquellas del mismo nivel de corte para cada una de las muestras a emplear. Tras dicha selección, las secciones de tejido se desparafinaron durante toda la noche en una estufa a 60° C, y al día siguiente se rehidrataron en diferentes alcoholes de gradación descendiente hasta sumergirlos en H_2O_d . Después, se equilibraron en tampón PBS 1X, y se incubaron con 100 μM de methoxy X04 (Tocris Bioscience) en etanol al 40%, durante 10 minutos, y en oscuridad. Posteriormente, se lavaron los tejidos abundantemente por inmersión en agua corriente, y se pasó a contrastar la tinción con una solución del 0,2% de NaOH en etanol al 80%, durante 4 minutos, en oscuridad. Finalmente, los tejidos se lavaron abundantemente en agua corriente, y se montaron en medio acuoso (Faramount, Dako, Santa Clara, California, EE.UU.).

Para la adquisición de imágenes se empleó la cámara DXM1200F acoplada a un microscopio de fluorescencia Nikon 90i (Nikon), utilizando el filtro UV-2A (Ex 330-380/Em 420). La cuantificación se realizó con el software ImageJ (NIH), transformando las imágenes a escala de grises de 8 bits, y después, se delimitó el área de interés ROI (*Region Of Interest*) a estudiar, empleando la herramienta de selección poligonal. A continuación, se estableció un valor umbral que resaltara las placas neuríticas con respecto al fondo inespecífico del tejido de la forma más fiel posible, y, finalmente, se cuantificó el área ocupada por la señal positiva correspondiente a las placas, la cual se relativizó al área de la región cerebral en cuestión.

3.8. Estudio del fenotipo microglial y de la fagocitosis: citometría de flujo

La caracterización de la actividad fagocítica en microglía aislada de cerebros de ratón comenzó con la inyección i.p. de 10mg/kg de methoxy X04 (Tocris Bioscience) a ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}. Pasadas 24 horas de la administración del colorante,

los animales se sacrificaron y se extrajeron los cerebros. Uno de los hemisferios se disgregó empleando un bisturí, y se digirió con tripsina-EDTA 170.000 U/l (Lonza). Después, la suspensión obtenida se homogeneizó mecánicamente mediante resuspensiones con micropipeta p1000, y a continuación, se pasó por una aguja de 23G, y seguidamente, por un filtro con un tamaño de poro de 70 μm . Posteriormente, se lisaron los eritrocitos de la suspensión con el tampón de lisis compuesto de 8,26g/l de NH_4Cl , 1g/l de KHCO_3 , y 0,037g/l de EDTA, pH 7,35, a lo que le siguió el aislamiento de las células microgliales mediante un gradiente de densidad con percoll (Fisher Scientific). Una vez recogido el halo de células, se lavaron con PBS 1X y se incubaron con solución de bloqueo (0,3% BSA en PBS 1X) durante 15 minutos, para proceder seguidamente con la incubación con los anticuerpos CD11b-PE y CD45-APC (Miltenyi Biotec) durante 30 minutos. Finalmente, tras el lavado de las células, se pasaron por el citómetro de flujo (MACSQuant, Miltenyi Biotec). La fluorescencia del methoxy X04 se recogió a través del canal V1 (Vioblue, Miltenyi Biotec) y se analizó con el *software* MACS Quantify (Miltenyi Biotec). Se empleó microglía (población de células $\text{CD11b}^+ \text{CD45}^{\text{lo}}$) aislada de un ratón WT pre-tratado con methoxy X04 para determinar el valor umbral de fluorescencia del compuesto para células que no hubieran fagocitado $\text{A}\beta$, así como microglía WT no tratada con methoxy X04 para determinar la fluorescencia inespecífica.

Para la caracterización del fenotipo microglial se requiere llevar a cabo el aislamiento de la microglía de manera algo diferente. En este caso, se partió de hemisferios en fresco de los cuatro genotipos de trabajo: WT, $\text{FAAH}^{-/-}$, 5xFAD, y 5xFAD/ $\text{FAAH}^{-/-}$. Estos se disgregaron, se digirieron con tripsina y se homogeneizaron mecánicamente, de manera que la suspensión obtenida se pasó por un filtro de 70 μm , tal y como se ha descrito previamente para el protocolo de cuantificación de actividad fagocítica microglial. Sin embargo, para la caracterización del fenotipo M1/M2, la suspensión de células recogida se incubó seguidamente con microesferas recubiertas con el anticuerpo CD11b (MicroBeads, Miltenyi Biotec), y se hicieron pasar por una columna de selección activada magnéticamente (Magnetic-activated cell sorting – MACS –), para separar las células CD11b positivas de las negativas (Miltenyi Biotec). Las células CD11b positivas recuperadas se incubaron con los anticuerpos CD11b-PE, CD45-APCvio770 (Miltenyi Biotec), CD16/32-PerCP-Cy5.5 y CD206-APC (Invitrogen). Tras 30 minutos de incubación, las muestras se pasaron directamente por el citómetro de flujo (MACSQuant, Miltenyi Biotec) y se analizaron con el *software* MACS Quantify (Miltenyi Biotec). Para el análisis, se utilizó una muestra de células no enriquecidas ni pasadas por las columnas MACS, en vez de esferas comerciales, para tener en cuenta la

autofluorescencia de las células mieloides. Tras la selección de la población microglial (células CD11b⁺ CD45^{lo}), la polarización de dicha población se determinó mediante la detección del marcador de fenotipo M1 (CD16/32) y el de M2 (CD206).

Para ajustar los valores de compensación de la fluorescencia y el voltaje, en todos los casos se emplearon controles negativos para cada anticuerpo o compuesto empleado (methoxy X04). La corrección de fluorescencias aplicada fue la denominada FMO (ver apartado 2.10). Tanto el *debris* como los agregados celulares se excluyeron del análisis en base a los parámetros de *Forward scatter* y *side scatter*, mientras que las células microgliales se identificaron por fluorescencia acoplada a los anticuerpos empleados. Por cada muestra se analizaron aproximadamente 10.000 singletes, que en el caso de la microglía *in vivo*, debían ser positivos para CD11b.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el *software* GraphPad Prism versión 6.0. Todos los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (*standard error of mean-SEM*). En aquellos casos donde existieran dos variables de estudio, se empleó el ANOVA bifactorial (*Two-way ANOVA*) con comparaciones múltiples, aplicando un post-hoc de Sidak. En aquellos donde solo se dieran comparaciones entre dos grupos experimentales, y una única variable, se empleó el t test paramétrico con corrección de Welch. La significación estadística se estableció en un valor de $p < 0,05$. En cada gráfica de resultados se detallará el estudio estadístico empleado en el pie de figura.

RESULTADOS

1. APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Basándonos en la observación de que la enzima FAAH se sobre-expresa de forma selectiva en astrocitos en la EA (Benito *et al.*, 2003), el estudio de la inactivación genética de FAAH en el contexto de la EA comenzó con el análisis de la respuesta inflamatoria, desarrollada por astrocitos primarios, tras la exposición al péptido A β ₁₋₄₂. Los resultados obtenidos mostraron una respuesta inflamatoria exacerbada de los astrocitos FAAH^{-/-} ante dicho estímulo, en contraposición a los astrocitos WT (Benito *et al.*, 2012). Hemos querido profundizar más en el fenotipo resultante de la inhibición genética de la FAAH en glía primaria, y para ello, estudiamos el perfil de expresión de genes pro-inflamatorios y componentes de la cascada de señalización de IL-1 β . Además, comprobamos si la exposición a A β daba lugar a cambios en los niveles de expresión en dichos genes, así como en la actividad HC y en los niveles de AEA y, finalmente, también analizamos las propiedades fagocíticas de la glía FAAH^{-/-}.

1.1. Caracterización de los cultivos primarios

En primer lugar, llevamos a cabo la cuantificación del número de células de microglía y astrocitos existentes en nuestros cultivos. Para ello, empleamos técnicas de inmunocitoquímica, que consistieron en el marcaje con Iba1 (para la detección de microglía) y con GFAP (para detectar astrocitos). También realizamos una tinción final con DAPI, para poder identificar las células como unidad, tras la co-localización de los núcleos con el marcaje correspondiente. Después de cuantificar cada tipo celular mediante análisis de imagen, se calcularon los porcentajes de cada población respecto del número total de células. La cuantificación se llevó a cabo empleando 6 lotes de células seleccionados aleatoriamente.

El análisis de las imágenes y posterior recuento celular reveló que nuestros cultivos tenían, aproximadamente, un 80% de astrocitos, mientras que el resto (un 20% aprox.) era microglía (figura 26). Por tanto, confirmamos que la proporción se encuentra en el rango descrito como el existente en el cerebro (Garman, 2011), y que pueden considerarse co-cultivos de glía primaria (de astrocitos y microglía).

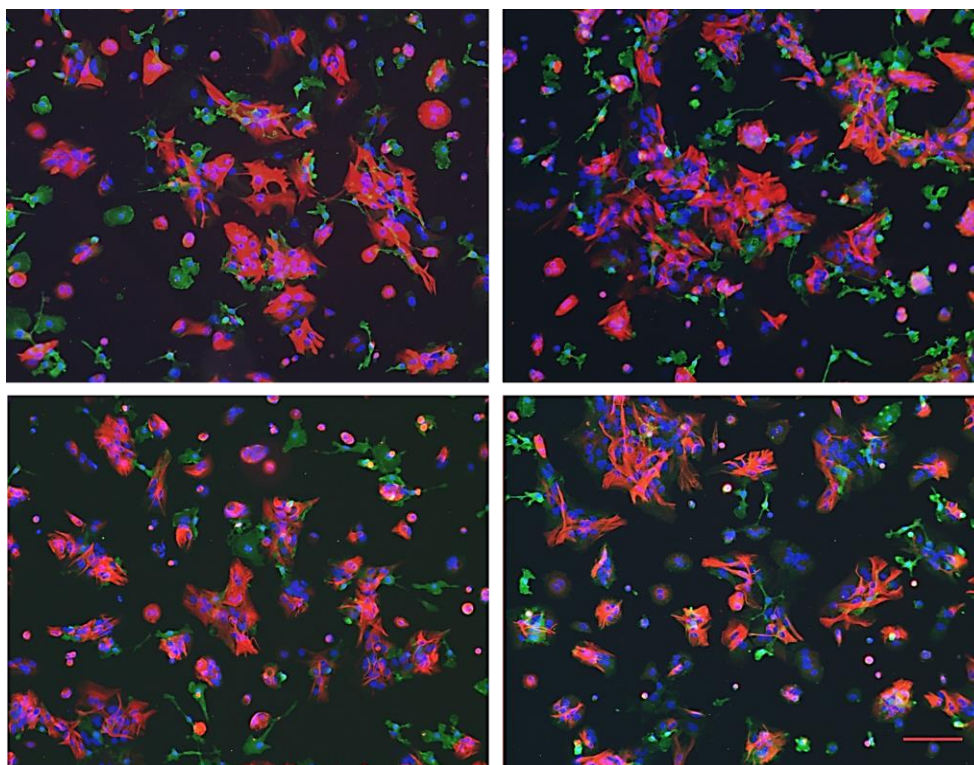


Figura 26: **Imágenes representativas de co-cultivos de astrocitos y microglía:** GFAP(rojo), Iba1 (verde), DAPI(azul). Fotos obtenidas de 4 lotes de células aleatorios. Barra de escalado: 300 μ m.

1.2. Expresión de los componentes de la cascada de señalización de IL-1 β y otras citoquinas

Para profundizar en la caracterización del perfil inflamatorio *in vitro* comenzada por nuestro grupo (Benito *et al.*, 2012), en el que la citoquina IL-1 β destacó por su aumento más temprano con respecto a otras citoquinas analizadas, cuantificamos la expresión de algunos componentes de la familia IL-1 en cultivos de glía. Dichos componentes fueron la citoquina IL-1 β , el receptor IL-1R-1, el antagonista del receptor (IL-1RN), y la proteína accesoria del receptor (IL-1RAcP). A su vez, también analizamos otros marcadores pro-inflamatorios, como TNF α y COX2, así como el marcador anti-inflamatorio IL-10. Estas cuantificaciones se hicieron tanto en condiciones basales, como tras exposición al péptido A β ₁₋₄₂.

Los resultados obtenidos trascurridas 8 horas de tratamiento muestran que en glía FAAH^{-/-} se produce un aumento significativo de la expresión de los componentes de la familia IL-1 analizados (figura 27) y de TNF α (gráfica A figura 28), en condiciones

basales. En el caso de COX2 (gráfica B figura 28), observamos que el aumento de expresión que se produce no es significativo, mientras que en IL-10 no se observan diferencias (gráfica C figura 28). En conjunto, estos resultados parecen mostrar que en glía $FAAH^{-/-}$ se encuentra en un estado basal de mayor actividad pro-inflamatoria que su homóloga WT.

Una vez que conocido el perfil inflamatorio del que partíamos, tanto de glía WT como de $FAAH^{-/-}$, analizamos el efecto producido en dicho perfil en presencia del péptido $A\beta_{1-42}$. Tras 8 horas de exposición al péptido, la cuantificación de la expresión de los genes de la familia IL-1 reveló que solo se producen cambios estadísticamente significativos en el caso de la IL-1 β , ya que se observa una bajada significativa de su expresión (gráfica A figura 27).

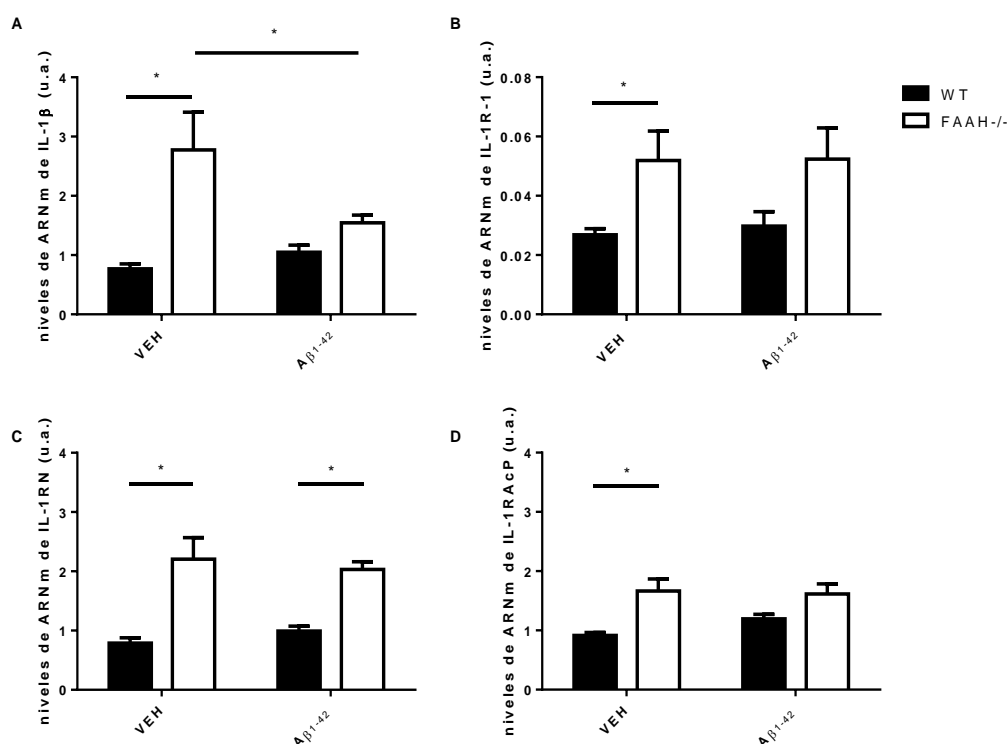


Figura 27: Representaciones gráficas de los niveles de ARNm en glía WT y $FAAH^{-/-}$ tras 8 horas de exposición a $A\beta_{1-42}$. La presencia del péptido en el medio celular durante 8 horas solo provoca cambios en la expresión de IL-1 β en glía $FAAH^{-/-}$ (A), puesto que se produce una reducción de los niveles de ARNm con respecto a los niveles observados en células expuestas a vehículo. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados a una muestra calibradora. A: IL-1 β , B: IL-1R-1, C: IL-1RN y D: IL-1RAcP. N=9 por grupo (3 experimentos por triplicado). Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

En cuanto al análisis del resto de marcadores inflamatorios (TNF α e IL-10) no se manifiestan cambios de expresión derivados de la exposición al péptido $A\beta$ durante 8 horas (figura 28). En el caso de COX2, los datos muestran que el péptido hace

significativa la diferencia de expresión existentes entre la glía WT y la FAAH^{-/-}, derivadas de la inactivación genética de la enzima (gráfica B figura 28).

En conjunto, estos resultados revelan que la exposición a A β ₁₋₄₂ durante 8 horas provoca un cambio en el perfil de expresión de IL-1 β en glía FAAH^{-/-}, que no viene acompañado por el resto de genes estudiados, ni siquiera por TNF α . De manera que todo parece indicar que existen mecanismos de regulación de la traducción subyacentes, diferentes a su vez para IL-1 β que para TNF α .

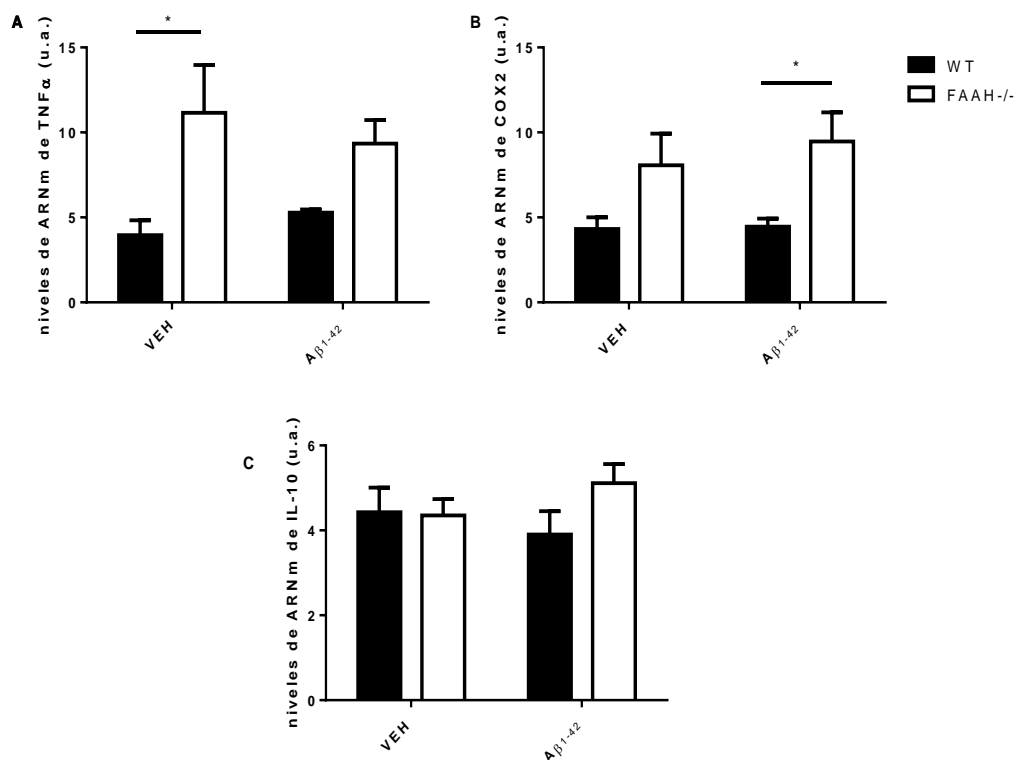


Figura 28: Representaciones gráficas de los niveles de ARNm en glía WT y FAAH^{-/-} tras 8 horas de exposición a A β ₁₋₄₂. Los niveles de expresión de TNF α (A) y COX2 (B) se mantienen elevados tras la exposición a A β ₁₋₄₂. En IL-10 (C) no se dan diferencias de expresión debidas al tratamiento. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados a una muestra calibradora. N=9 por grupo (3 experimentos por triplicado). Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

El análisis de los componentes de la familia IL-1 tras 24 horas de tratamiento con el péptido A β muestra que no se producen cambios significativos, puesto que los niveles de ARNm se mantienen en valores muy similares a los controles (figura 29). No obstante, comprobamos que la presencia del péptido durante este tiempo hace significativa la diferencia de expresión de IL-1RN existentes entre la glía WT y FAAH^{-/-}, debidas precisamente a la inactivación genética de la enzima FAAH (gráfica C figura 29).

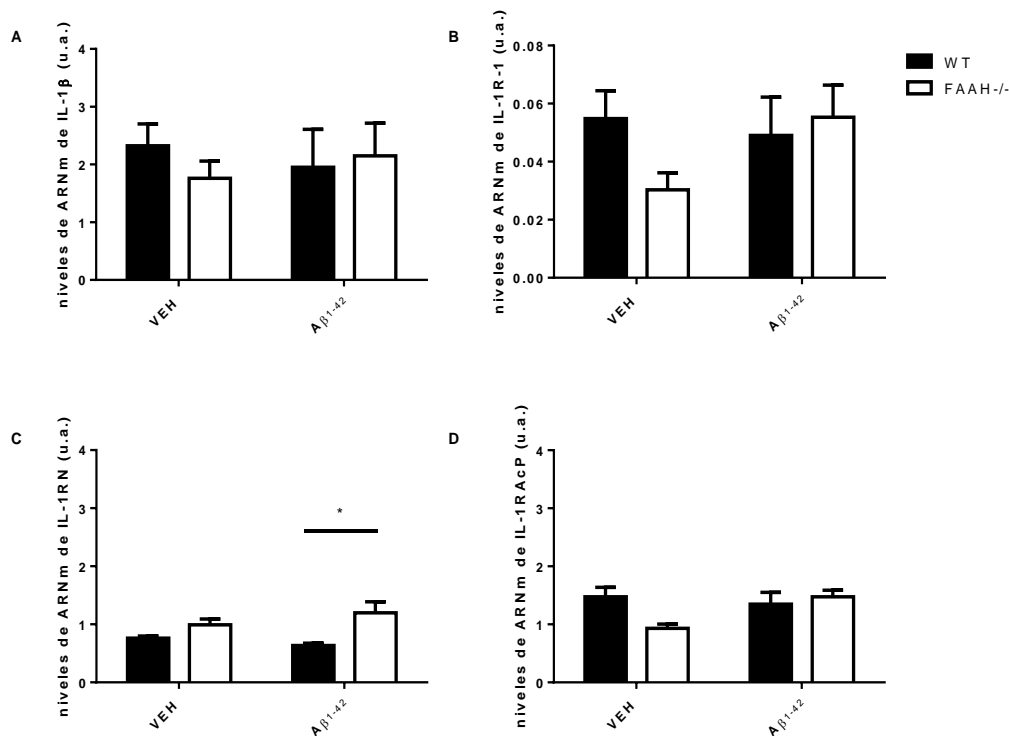


Figura 29: Representaciones gráficas de los niveles de ARNm en glía WT y FAAH^{-/-} tras 24 horas de exposición a Aβ₁₋₄₂. No se producen diferencias de expresión debida a la presencia del péptido Aβ₁₋₄₂. Sin embargo, las diferencias de ARNm de IL-1RN entre glía WT y FAAH^{-/-} se acentúan hasta alcanzar significación estadística bajo tratamiento con el péptido. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados a una muestra calibradora. N=9 por grupo (3 experimentos por triplicado). Representación de la media ± SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

En cuanto al resto de citoquinas estudiadas (TNFα, COX2 e IL-10), confirmamos que en ninguna de ellas se producen cambios de expresión estadísticamente significativos debida a la presencia del péptido durante 24 horas (figura 30).

En conjunto, el análisis de expresión de algunos componentes de la familia IL-1, así como de otros marcadores inflamatorios, revela que la inactivación genética de FAAH da lugar al establecimiento de un perfil de expresión pro-inflamatorio más temprano en la glía *in vitro*, el cual no se ve alterado por la presencia del péptido Aβ₁₋₄₂, salvo en el caso de IL-1β.

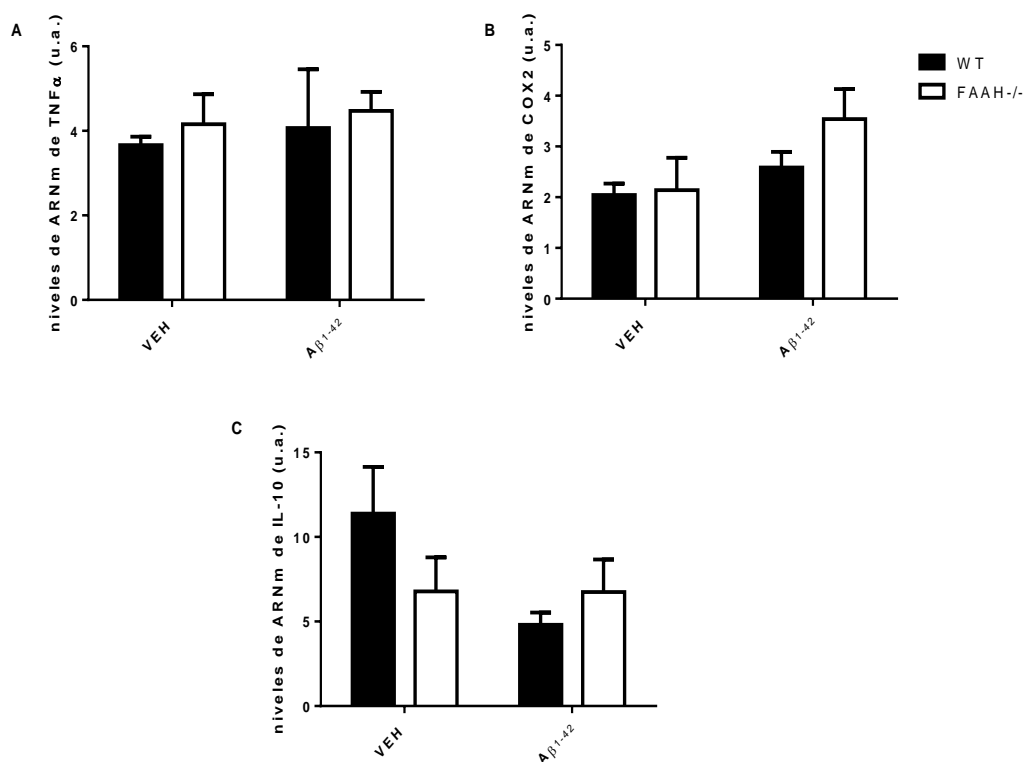


Figura 30: Representaciones gráficas de los niveles de ARNm en glía WT y FAAH^{-/-} tras 24 horas de exposición a Aβ₁₋₄₂. No se producen diferencias de expresión debida a la presencia del péptido Aβ₁₋₄₂ durante 24 horas. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados a una muestra calibradora. N=9 por grupo (3 experimentos por triplicado). Representación de la media ± SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

1.3. Estudio de los hemicanales de membrana

Tras conocer el perfil inflamatorio de la glía FAAH^{-/-}, quisimos profundizar en el estudio de los HC de membrana de Cx43 en cuanto a su relevancia en la función glial. Esto es debido a que en nuestro grupo describimos la implicación de este tipo de HC en una respuesta glial más rápida ante un daño, derivada de la inhibición genética de FAAH (Vázquez, Tolón, Pazos, *et al.*, 2015). Dicha implicación consistía en un aumento de la actividad de los HC de Cx43, la cual podía deberse a un aumento de la apertura de estos, a un aumento de su presencia en membrana, o a ambos.

Para conocer la causa del aumento de la actividad de los HC de Cx43 en la glía FAAH^{-/-}, así como si dicha actividad era dependiente del estímulo nocivo que se presentase, llevamos a cabo una serie de experimentos con los que pudimos responder a dichos interrogantes. En primer lugar, procedimos a la cuantificación, mediante WB, de la proteína Cx43 presente en membrana plasmática de glía WT y FAAH^{-/-}. Posteriormente, continuamos con los experimentos de exposición de la glía al péptido

A β ₁₋₄₂ durante 24 horas, para añadir a continuación el BrEt. Este compuesto, por ser capaz de entrar en las células por los HC de membrana, y emitir fluorescencia una vez dentro de ellas, se emplea como indicativo de la apertura (actividad) de los HC de membrana (Retamal *et al.*, 2007; Orellana *et al.*, 2011; Giaume *et al.*, 2013). Finalmente, realizamos el mismo experimento que acabamos de mencionar, salvo por el hecho de que en vez de exponer a las células al péptido A β ₁₋₄₂, fueron expuestas a un cóctel de citoquinas (IL-1 β + TNF α) durante 24 horas, para conocer si la actividad hemicanal era diferente según el estímulo inflamatorio presente.

1.3.1. Cuantificación de la proteína Cx43 en membrana plasmática.

Como comentábamos anteriormente, el aumento de la apertura de los HC de Cx43 que observamos en astrocitos FAAH^{-/-} (Vázquez, Tolón, Pazos, *et al.*, 2015) podía deberse tanto a un aumento de la actividad, como al aumento de los HC presentes en membrana plasmática, como a ambos fenómenos. Por ello, y con el objetivo de clarificarlo, llevamos a cabo la cuantificación de Cx43 presente en membrana celular de glía mediante WB.

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas, correspondientes a la proteína Cx43, nos mostró que existe una mayor cantidad de dicha proteína en membrana de glía FAAH^{-/-}, respecto de la WT (figura 31).

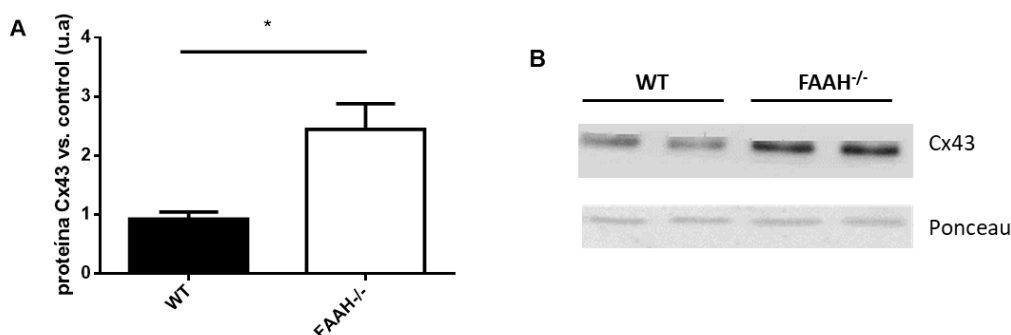


Figura 31: **Cuantificación de la intensidad de banda de Cx43 presente en membrana celular de glía WT y FAAH^{-/-} en condiciones basales.** Existe una mayor presencia de proteína Cx43 en membrana plasmática de glía FAAH^{-/-} respecto de la WT. A: representación gráfica de la cuantificación densitométrica de Cx43 por WB. Valores relativizados a una muestra calibradora B: Imagen representativa de las bandas de Cx43 obtenidas por WB, así como el control de carga (tinción con Ponceau) u.a.: unidades arbitrarias. N=8 por grupo (4 experimentos por duplicado). Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. t-test no emparejado seguido de la corrección de Welch.

1.3.2. Cuantificación de la actividad hemicanal tras exposición al péptido A β ₁₋₄₂

Posteriormente, llevamos a cabo experimentos de exposición de las células a vehículo o al A β ₁₋₄₂, durante 24 horas. Pasado el tiempo de exposición, aplicamos el BrEt para cuantificar la captación de este compuesto mediante la intensidad de fluorescencia que emite desde el interior celular. Por tanto, una mayor intensidad de fluorescencia indica una mayor actividad hemicanal.

El análisis de las imágenes de glía expuestas al péptido A β ₁₋₄₂ durante 24 horas revela, primeramente, que la glía FAAH^{-/-} control (vehículo) internaliza más BrEt que la correspondiente WT (gráfica A figura 32; imágenes B y C figura 32). Sin embargo, siendo expuestas al péptido, en comparación con su control vehículo, no se detectan cambios significativos en cuanto a la internalización del BrEt (gráfica A figura 32; imágenes D y E figura 32). Estos datos sugieren que la inactivación genética de FAAH influye en la regulación de la actividad hemicanal.

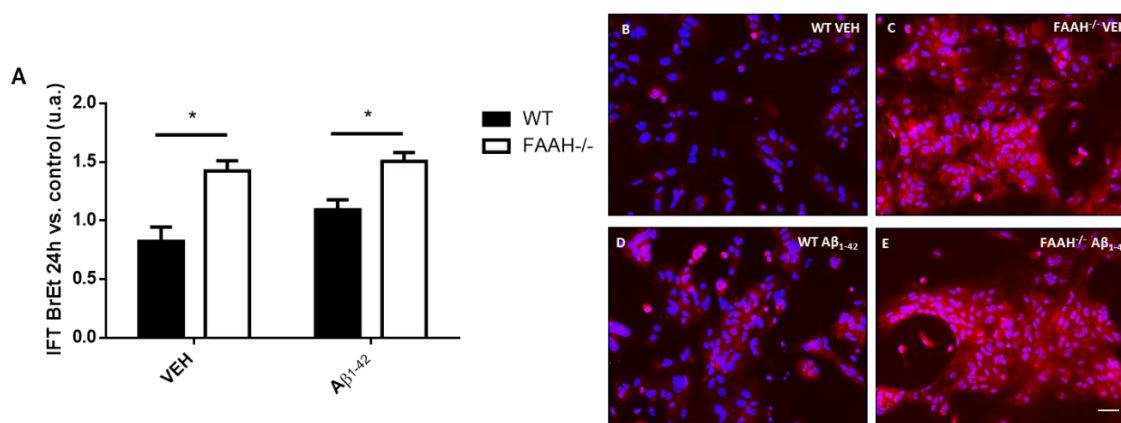


Figura 32: **Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total por célula (IFT) del BrEt internalizado a través de los HC de membrana tras 24 horas de tratamiento con A β ₁₋₄₂.** A: Representación gráfica de la cuantificación de la IFT del BrEt captado después de 24 horas de tratamiento. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados al grupo WT veh. N=9 por grupo (3 experimentos por triplicado). Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak. B: Imagen representativa de la fluorescencia del BrEt en glía WT expuesta a veh 24 horas. C: Imagen representativa de la fluorescencia del BrEt en glía FAAH^{-/-} expuesta a veh 24 horas. D: Igual que B, pero tras 24 horas exposición a A β ₁₋₄₂, E: Igual que C, pero tras 24 horas exposición a A β ₁₋₄₂. Barra de escalado: 100 μ m.

1.3.3. Cuantificación de la actividad hemicanal tras exposición a las citoquinas IL-1 β y TNF α

Una vez completados los experimentos dirigidos a la evaluación de la actividad hemicanal en glía WT y FAAH^{-/-} tras la exposición a A β ₁₋₄₂, se quiso conocer si dicha actividad era diferente en presencia de un estímulo distinto. Por ello, se llevó a cabo el estudio de las diferencias de la actividad hemicanal entre genotipos, exponiendo a las células durante 24 horas a un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias, conformado por la IL-1 β y TNF α .

El análisis de los resultados reveló que, de nuevo, reproducimos el aumento de la internalización del BrEt en la glía FAAH^{-/-} respecto a la WT tras ser expuestas al vehículo (gráfica A figura 33; imágenes B y C figura 33). Sin embargo, en esta ocasión, confirmamos un efecto del tratamiento pro-inflamatorio, pero solo en la glía FAAH^{-/-} (gráfica A figura 33; imágenes C y E figura 33). Concretamente, lo que observamos fue que la presencia de citoquinas durante 24 horas provoca una reducción de la actividad hemicanal en glía FAAH^{-/-}, mientras que en glía WT no se observa ningún efecto (gráfica A figura 33; imágenes B y D figura 33). Estos datos indican que la actividad de los HC de membrana de glía FAAH^{-/-} es más sensible al estímulo inflamatorio empleado que la glía WT.

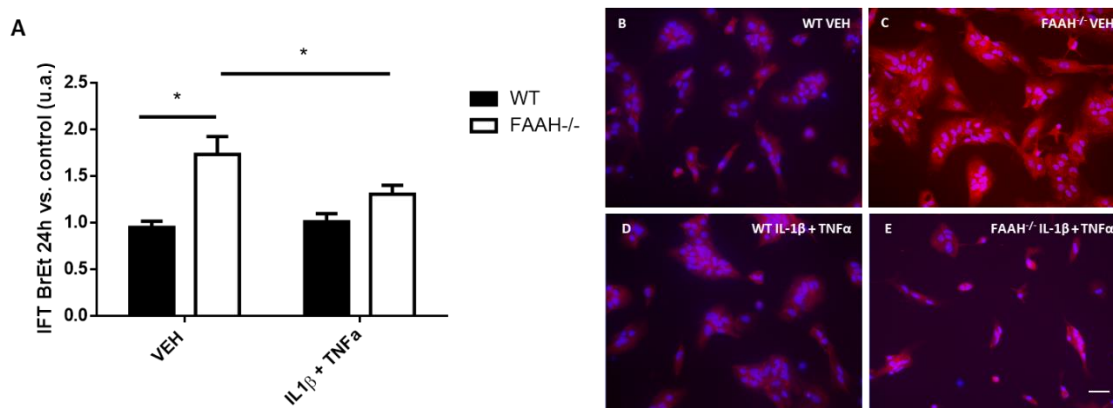


Figura 33: **Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total por célula (IFT) del BrEt internalizado a través de los HC de membrana tras 24 horas de tratamiento con citoquinas.** A: Representación gráfica de la cuantificación de la IFT del BrEt captado después de 24 horas de tratamiento. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados al grupo WT veh. N=9 por grupo (3 experimentos por triplicado). Representación de la media \pm SEM. * $p < 0,05$. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak. B: Imagen representativa de la fluorescencia de BrEt en glía WT expuesta a veh 24 horas. C: Imagen representativa de la fluorescencia de BrEt en glía FAAH^{-/-} expuesta a veh 24 horas. D: Igual que B, pero tras 24 horas exposición a citoquinas. E: Igual que C, pero tras 24 horas exposición a citoquinas. Barra de escalado: 100 μ m.

1.4. Cuantificación de la producción/ liberación de AEA

La consecuencia directa de la inhibición genética de FAAH es el aumento de los niveles de AEA y otras etanolaminas. Para conocer si se producen variaciones de dichos niveles en respuesta a la presencia del $A\beta_{1-42}$, tanto en el interior celular como en el medio de cultivo, se analizaron los niveles de AEA en los cultivos de glía a las 8 horas de exposición tanto a vehículo como al péptido $A\beta$.

Los resultados obtenidos muestran un patrón de los niveles de AEA diferente entre ambos genotipos (figura 34). En glía WT, observamos que se produce una disminución de los niveles de AEA en aquellas células que han sido expuestas al péptido (gráfica A figura 34). Esto se produce tanto en el interior celular como en el medio celular. En el caso de la glía $FAAH^{-/-}$, lo que se observa es que los niveles de AEA se mantienen constantes en presencia del péptido $A\beta_{1-42}$ tanto en células como en los medios celulares (gráfica B figura 34). Además, comprobamos que, en general, los niveles de AEA eran significativamente mayores en las fracciones de los medios celulares que en las propias células (figura 34), aunque en el caso de la glía $FAAH^{-/-}$, existe mayor proporción de AEA presente en los medios celulares respecto de las células, en comparación con el genotipo WT (figura 34).

En conjunto, estos datos indican que la AEA estaría implicada en la respuesta a la presencia del péptido $A\beta_{1-42}$, siendo los niveles endógenos de partida importantes en dicha respuesta.

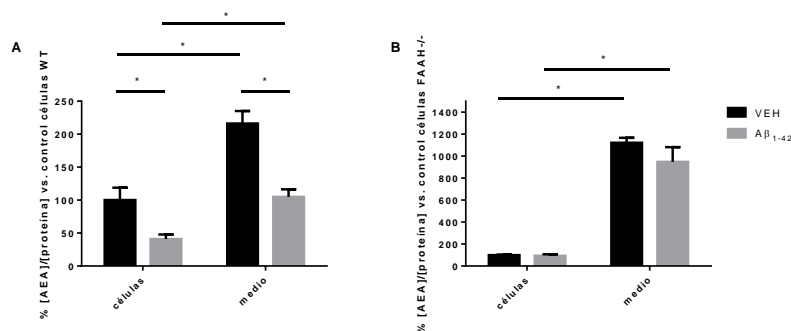


Figura 34: Gráficas de la cuantificación de los niveles de AEA detectados el interior celular y en medios, tras exposición a $A\beta_{1-42}$ durante 8 horas. En presencia del péptido, los niveles de AEA disminuyen en células y en los medios de las células WT expuestas al péptido respecto de su control vehículo (A), mientras que en $FAAH^{-/-}$ se mantienen constantes (B). A: porcentaje de la concentración de AEA/ concentración de proteína total en células y medios de glía WT, respecto de células WT vehículo, tras exposición a vehículo o al péptido. B: porcentaje de la concentración de AEA/ concentración de proteína total en células y medios de glía $FAAH^{-/-}$, respecto de las células $FAAH^{-/-}$ vehículo, tras exposición a vehículo o al péptido. N=9 por grupo (3 experimentos por triplicado). Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

1.5. Impacto de la inhibición genética de FAAH en la actividad fagocítica de A β ₁₋₄₂

Una de las características de la EA es la disfuncionalidad de la glía a la hora de fagocitar y eliminar los acúmulos de A β en el espacio extracelular. Por tanto, uno de los objetivos fue conocer si la inhibición genética de FAAH afectaba a las propiedades fagocíticas de la glía. Para ello, se llevó a cabo el tratamiento de las células gliales con el péptido A β ₁₋₄₂ HiLyte™ Fluor 555, y su posterior cuantificación en el interior celular mediante la detección de su fluorescencia por citometría de flujo.

Para conocer el porcentaje real de células que habían incorporado el péptido A β ₁₋₄₂ fluorescente, y descartar falsos positivos debido a una posible adhesión del péptido a la superficie celular, se empleó en todos los experimentos un control negativo (C-). Este control fue la citocalasina D (CitoD), que es un metabolito de origen fúngico capaz de inhibir la polimerización de los filamentos de actina, y consecuentemente, la capacidad de fagocitar elementos del medio. La citoD se añadió en las muestras correspondientes 30 minutos antes de la adición del vehículo o péptido.

Los resultados muestran que la inactivación genética de FAAH no afecta a las capacidades fagocíticas de la glía, puesto que no existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células gliales que han incorporado el péptido A β ₁₋₄₂ fluorescente, respecto de la glía WT (figura 35).

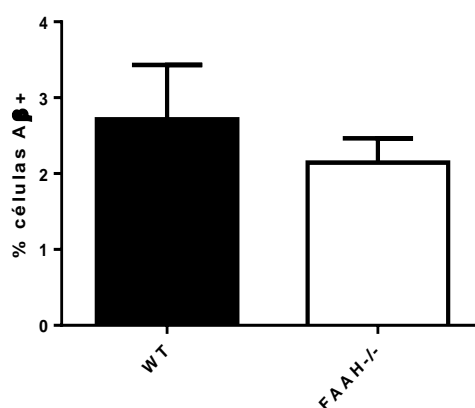


Figura 35: Representación gráfica del porcentaje de glía WT o FAAH^{-/-} positivas para la señal fluorescente del péptido A β ₁₋₄₂ HiLyte™ Fluor 555. La inactivación genética de FAAH no afecta a las capacidades fagocíticas de la glía. Exposición de las células al A β ₁₋₄₂ HiLyte™ Fluor 555 durante 4 horas. N=8 por grupo (4 experimentos por duplicado). A cada valor se le restó la señal de su C- previo análisis estadístico. Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. t-test no emparejado seguido de la corrección de Welch.

2. APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Datos previos obtenidos por nuestro grupo demuestran que la inhibición genética de FAAH provoca efectos opuestos en ratones 5xFAD. Así, en ratones 5xFAD se da un perfil anti-inflamatorio mediado por CB₁R, mientras en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, dicho perfil resulta ser pro-inflamatorio. Paradójicamente, este ambiente pro-inflamatorio se observa asociado a mejorías significativas en la patología amiloide, característica de este modelo animal. Estas mejorías se refieren tanto a aspectos moleculares (densidad de placas, producción del péptido amiloide, o gliosis), como comportamentales (memoria espacial) (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015).

Entre los incrementos en los niveles de expresión de algunas citoquinas que se habían observado, los de IL-1 β parecen ser los más relevantes a la hora de profundizar en el estudio de estos cambios. Ello es debido al reconocido papel que desempeña esta citoquina en la inflamación asociada a la EA, derivada de la acumulación de péptidos amiloides. Sin embargo, los datos existentes en la literatura acerca del papel de esta citoquina son contradictorios. Así, por regla general se acepta que el incremento mantenido en el tiempo de sus niveles en el cerebro afectado de EA provoca efectos deletéreos. Sin embargo, datos obtenidos por Shaftel y cols. (Shaftel *et al.*, 2007) y Matousek y cols. (Matousek *et al.*, 2012) demuestran que el aumento de los niveles de IL-1 β en hipocampo de forma crónica favorece la disminución de la presencia de placas neuríticas, debido al aumento de la fagocitosis microglial.

Los efectos contrapuestos descritos en nuestro grupo también se observaron en un modelo de lesión aguda en corteza cerebral. El antagonismo de CB₁R en ratones sin enzima FAAH funcional resultaba en una disminución de la migración de los procesos microgliales hacia el foco de lesión o, dicho de otra manera, la activación de CB₁R se asociaba a un aumento de la migración de los procesos microgliales (Vázquez, Tolón, Pazos, *et al.*, 2015). En conjunto, todos estos datos apuntan a un potencial beneficio del perfil pro-inflamatorio derivado de la inactivación genética de la enzima FAAH.

Para ahondar en el posible efecto beneficioso de la respuesta pro-inflamatoria dependiente de la inactivación genética de FAAH, así como para delimitar el potencial papel crítico de la citoquina IL-1 β , llevamos a cabo un tratamiento con hidroclicloruro de minociclina. La minociclina es una tetraciclina de segunda generación conocida por su carácter antibacteriano, pero que ha cobrado auge en los últimos años por su potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas que cursan con neuroinflamación

(Kim & Suh, 2009; Garrido-Mesa *et al.*, 2013). Una de sus principales actividades es la inhibición de la microglía, principal fuente de citoquinas durante el proceso neuroinflamatorio, y también es un agente inhibidor de la caspasa 1, responsable de la activación de IL-1 β (Daniels & Brough, 2017). Por tanto, esperamos que la reducción de las citoquinas pro-inflamatorias (en particular, de la IL-1 β) derivada del tratamiento con minociclina, provoque efectos perjudiciales en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, tanto en el aclaramiento de A β ₁₋₄₂ y placas neuríticas, como en los procesos de aprendizaje y memoria.

2.1. Expresión de citoquinas y de los componentes de la cascada de señalización de IL-1 β tras el tratamiento con minociclina

Como ya se ha mencionado, las mejorías descritas en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} se desarrollaron paralelamente a un incremento del perfil de expresión de citoquinas pro-inflamatorias, identificándose a la IL-1 β como potencial protagonista del proceso. Para conocer con mayor profundidad el perfil de expresión de citoquinas, no solo pro-inflamatorias, sino también, anti-inflamatorias, se analizaron los niveles de ARNm de IL-1 β y TNF α (citoquinas pro-inflamatorias), así como de IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) tras el tratamiento con vehículo y con minociclina. Además, dentro de los componentes de la familia IL-1 β , se estudiaron los niveles de ARNm del receptor de la IL-1 (IL-1R-1) y la proteína antagonista (IL-1RN).

2.1.1. Expresión de citoquinas

En primer lugar, se analizó el perfil de expresión de citoquinas, tanto en corteza como en hipocampo, de ratones WT y 5xFAD, con o sin enzima FAAH funcional.

La cuantificación de los niveles de expresión de citoquinas en hipocampo de ratones WT y FAAH^{-/-} muestra que no existen diferencias de expresión entre dichos genotipos sometidos a estudio, ni siquiera bajo tratamiento (figura 36). Esto nos ayudó a confirmar que la minociclina, a la dosis empleada, no provoca variaciones en el perfil de expresión de citoquinas en ratones sanos.

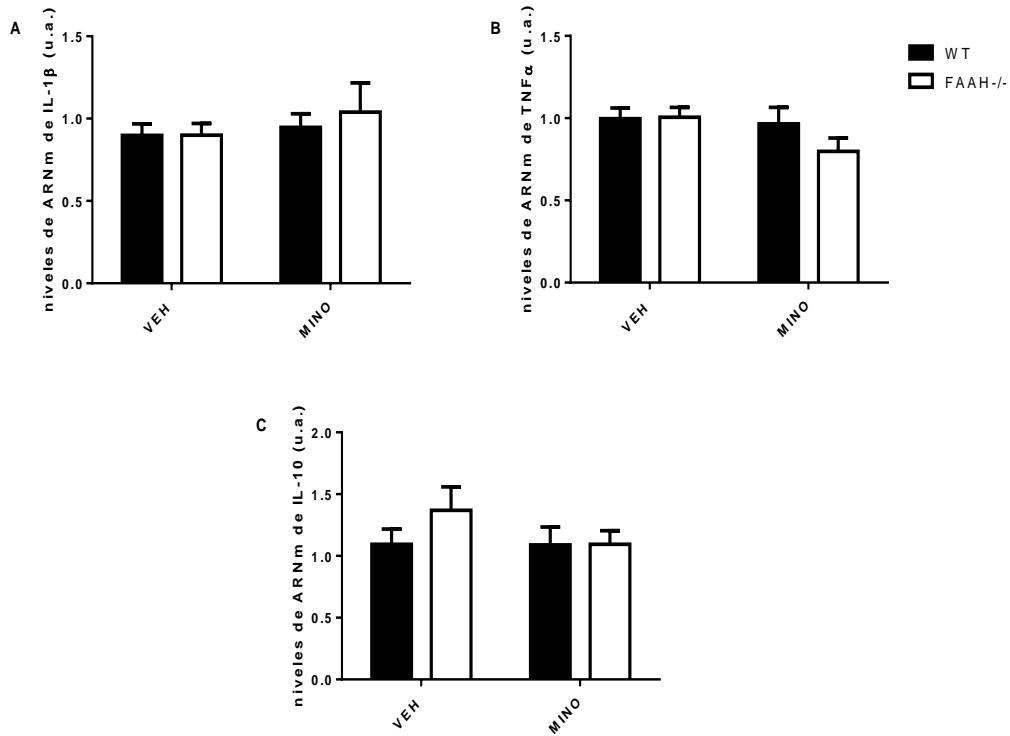


Figura 36: Representaciones gráficas de la expresión en hipocampo de IL-1 β (A), TNF α (B), IL-10 (C), en ratones WT y FAAH^{-/-} tratados con vehículo o con minociclina (10mg/kg). No se observaron diferencias de expresión derivadas de la inhibición genética de FAAH, o del tratamiento con minociclina. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados al grupo WT veh. N=5-8 por grupo. Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

En cuanto al análisis de expresión de las citoquinas en corteza cerebral de ratones WT y FAAH^{-/-}, tal y como se observó en hipocampo, no existen diferencias estadísticamente significativas debidas a la inhibición genética de FAAH, o al tratamiento con minociclina (figura 37).

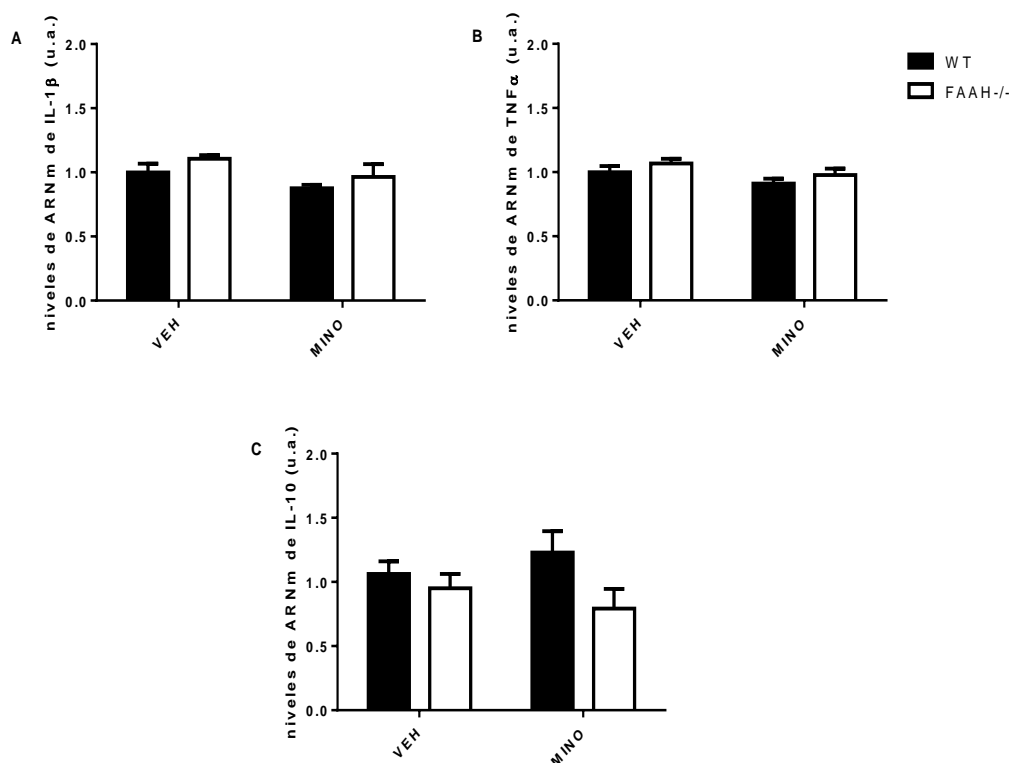


Figura 37: Representaciones gráficas de la expresión en corteza, de IL-1 β (A), TNF α (B), IL-10 (C), en ratones WT y FAAH^{-/-}, tratados con vehículo o con minociclina (10mg/kg). No se observaron diferencias de expresión consecuencia de la inhibición genética de FAAH, o del tratamiento con minociclina. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados al grupo WT veh. N=5-8 por grupo. Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

Una vez conocimos el perfil de expresión de citoquinas en ratones sin la patología amiloide, comparamos los resultados procedentes de muestras de hipocampo y corteza de ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}.

En hipocampo, lo que observamos fue que, si bien la inactivación genética de FAAH da lugar a un aumento de la expresión de IL-1 β en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, el tratamiento con minociclina reduce dicha expresión solo en este genotipo (gráfica A figura 38). La minociclina también reduce los niveles de TNF α en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre con IL-1 β , el aumento de expresión de TNF α en 5xFAD/FAAH^{-/-} no resulta ser estadísticamente significativo con respecto a su control 5xFAD (gráfica B figura 38). En cuanto a la IL-10, vemos una reducción en su expresión debido a la inhibición genética de FAAH, aunque no estadísticamente significativa, así como que el tratamiento con minociclina no da lugar a variaciones considerables en su expresión (gráfica C figura 38).

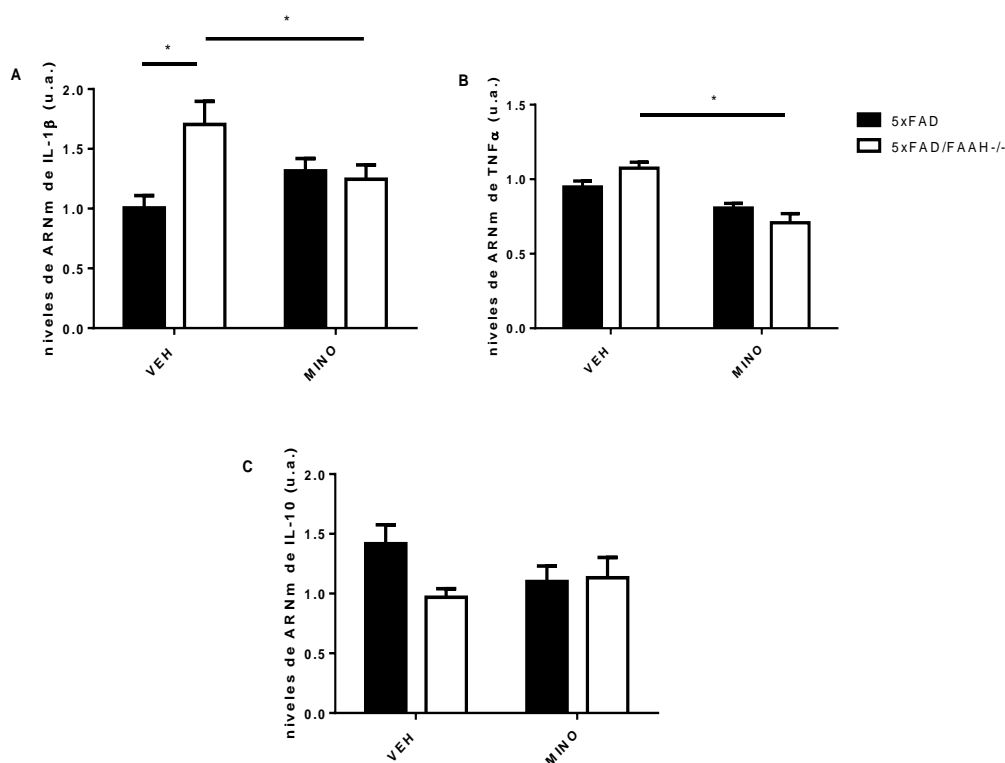


Figura 38: Representaciones gráficas de la expresión en hipocampo de IL-1 β (A), TNF α (B), IL-10 (C), en ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con vehículo o con minociclina (10mg/kg). Mientras que la inhibición genética de FAAH aumenta la expresión de IL-1 β significativamente, el tratamiento con minociclina reduce la expresión de IL-1 β y TNF α en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados al grupo 5xFAD veh. N=5-8 por grupo. Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

Los resultados derivados del análisis de expresión de IL-1 β en corteza muestran igual patrón que el obtenido en hipocampo, ya que observamos diferencias estadísticamente significativas entre ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con vehículo, así como entre ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con vehículo y con minociclina (gráfica A figura 39). Estos datos reafirman la importancia de esta citoquina en el contexto patológico amiloide en ausencia de la enzima FAAH funcional, así como su sensibilidad a la acción de la minociclina.

En cuanto a la citoquina TNF α en corteza, comprobamos que también existe una disminución de su expresión en la corteza de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con minociclina respecto de los controles vehículo, aunque no comprobamos que existieran diferencias de expresión debidas a la inactivación genética de FAAH (gráfica B figura 39). Estos resultados, además, son similares a los obtenidos en hipocampo.

Finalmente, en relación a la expresión de IL-10, comprobamos que en corteza sí que se dan diferencias de expresión entre ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con vehículo o con minociclina (gráfica C figura 39).

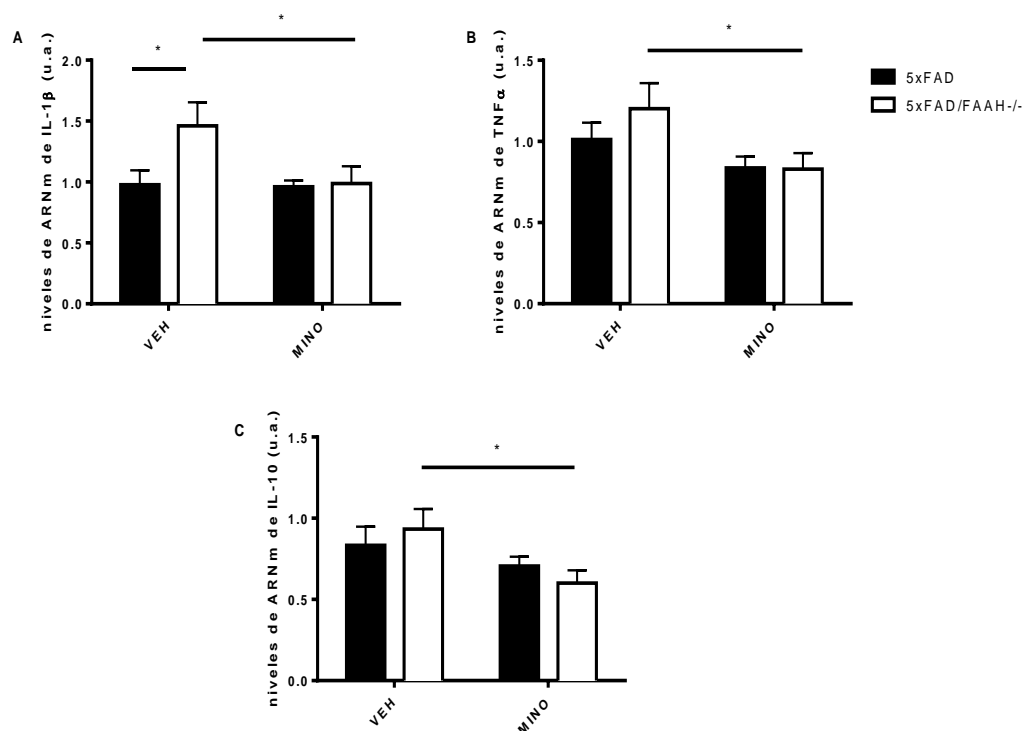


Figura 39: Representaciones gráficas de la expresión en corteza de IL-1 β (A), TNF α (B), IL-10 (C), en ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con vehículo o con minociclina (10mg/kg). Mientras que la inactivación genética de FAAH aumenta la expresión de IL-1 β significativamente, el tratamiento con minociclina reduce la expresión de IL-1 β , TNF α e IL-10 en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados al grupo 5xFAD veh. N=8 por grupo. Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

En conjunto, el análisis de la expresión de citoquinas, tanto pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF α) como anti-inflamatorias (IL-10), nos muestra que en ratones 5xFAD sin enzima FAAH funcional existe un marcado perfil pro-inflamatorio, que se ve atenuado bajo tratamiento con minociclina. No obstante, en IL-10 existen variaciones en su expresión en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, dependiendo del área cerebral de estudio.

2.1.2. Expresión de los componentes de la cascada de señalización de IL-1 β

El análisis de la expresión de las citoquinas estudiadas nos mostró que la IL-1 β es la citoquina más sensible a la inhibición genética de FAAH en ratones 5xFAD, ya que es en ella donde observamos diferencias de expresión estadísticamente significativas entre 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}, tanto en corteza como en hipocampo. Debido a ello, quisimos ahondar un poco más en el conocimiento del estado de algunos componentes responsables del inicio de la señalización dependiente de la IL-1 β . Para ello, realizamos

el análisis de la expresión de IL-1R-1 y de la IL-1RN, el cual se realizó solo en corteza, ya que los perfiles de expresión de IL-1 β en corteza e hipocampo son equivalentes.

Los resultados obtenidos nos mostraron que IL-1R-1 se encuentra sobre-expresado en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} respecto de sus homólogos 5xFAD, así como que el tratamiento con minociclina hace que disminuya su expresión, aunque esta no resulte ser estadísticamente significativa (gráfica A, figura 40). En cuanto a la IL-1RN, observamos también un incremento de su expresión en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} respecto de los 5xFAD cuando ambos son tratados con vehículo. Sin embargo, en este caso las diferencias no son estadísticamente significativas (gráfica B, figura 40).

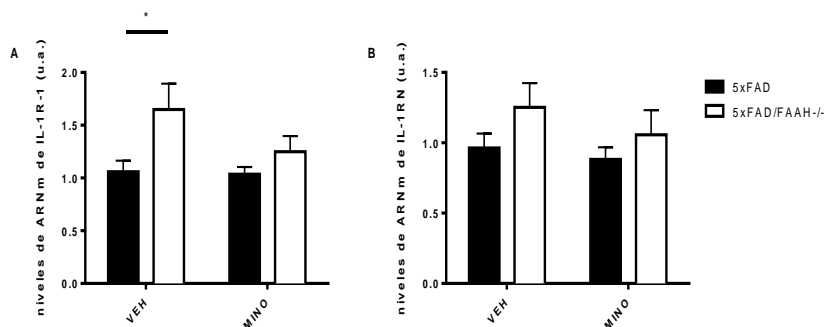


Figura 40: Representaciones gráficas de la expresión en corteza de IL-1R-1 (A) e IL-1RN (B), en ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con vehículo o con minociclina (10mg/kg). La inhibición genética de FAAH provoca el aumento de la expresión de IL-1R-1, mientras que la minociclina no provoca diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles vehículo. u.a.: unidades arbitrarias. Valores relativizados al grupo 5xFAD veh. N=8 por grupo. Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

En definitiva, el análisis de la expresión de los componentes de la cascada de señalización de IL-1 β reveló que solo el receptor, y no la proteína antagonista de este, se encuentra significativamente sobre-expresado en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. Junto con los resultados obtenidos del estudio del perfil de expresión de citoquinas, ayudan a sustentar la hipótesis de la sobre-activación de la cascada de señalización de la IL-1 β en estos ratones.

2.1.3. Cuantificación de la proteína IL-1 β

Está descrito que la IL-1 β , una vez se traduce el ARNm a proteína, esta requiere ser proteolizada para que cobre actividad biológica. Dicho proceso corre a cargo del inflammasoma NLRP3, y en particular, de la caspasa 1 (Daniels & Brough, 2017).

En base a esta premisa, llevamos a cabo la cuantificación de proteína total de IL-1 β en corteza cerebral, con el objeto de esclarecer hasta qué punto llegaba la influencia de la citoquina en los cambios patológicos descritos en ratones 5xFAD tras la inactivación genética de FAAH. El análisis de los resultados obtenidos tras la realización de un ELISA muestra que las diferencias obtenidas a nivel de ARNm entre ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} no se reflejan en los niveles de proteína total (que incluye tanto la pro-IL-1 β como la IL-1 β madura). Sin embargo, pudimos comprobar que el tratamiento con minociclina daba lugar a la disminución de proteína IL-1 β , esta vez en ambos genotipos (a diferencia de lo que ocurría a nivel de transcripción), puesto que disminuyen los niveles tanto en 5xFAD como en 5xFAD/FAAH^{-/-} (figura 41).

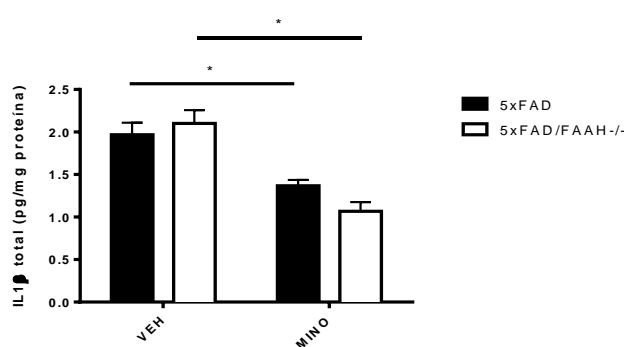


Figura 41: Representación gráfica de los niveles de proteína total de IL-1 β en corteza, de ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con vehículo o con minociclina (10mg/kg). La inhibición genética de FAAH no da lugar a un aumento de proteína total de IL-1 β , pero el tratamiento con minociclina reduce sus niveles en ambos genotipos. Valores relativizados a la proteína total. N=5 por grupo. Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. ANOVA bifactorial de comparaciones múltiples, seguido de un post-test de Sidak.

2.2. Patología amiloide

Paralelamente a las mediciones anteriores, quisimos llevar a cabo el análisis de los niveles del A β ₁₋₄₂ y placas neuríticas presentes en los ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} bajo tratamiento con minociclina. El objetivo fue el de conocer qué efecto tenía el tratamiento anti-inflamatorio, e inhibidor de la IL-1 β , sobre los niveles del péptido amiloide en el cerebro de los ratones 5xFAD sin actividad FAAH.

2.2.1. Cuantificación de A β ₁₋₄₂

En primer lugar, estudiamos las posibles diferencias existentes en cuanto a los niveles de A β ₁₋₄₂ entre ambos genotipos, tras el tratamiento con minociclina. Para ello,

llevamos a cabo una cuantificación del péptido, tanto en corteza como en hipocampo, de ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} bajo tratamiento, empleando la técnica ELISA. El análisis de los niveles de A β ₁₋₄₂ mostró que los animales 5xFAD carentes de enzima FAAH funcional, tanto tratados con vehículo como con minociclina, presentaban una menor cantidad de A β ₁₋₄₂ con respecto a los controles 5xFAD, en ambas áreas cerebrales. Sin embargo, el tratamiento con minociclina provocó efectos diferentes: mientras que en los 5xFAD apenas produce efecto, en los 5xFAD/FAAH^{-/-} se da un aumento significativo de la cantidad del péptido con respecto a los 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con vehículo (gráficas A y B figura 42).

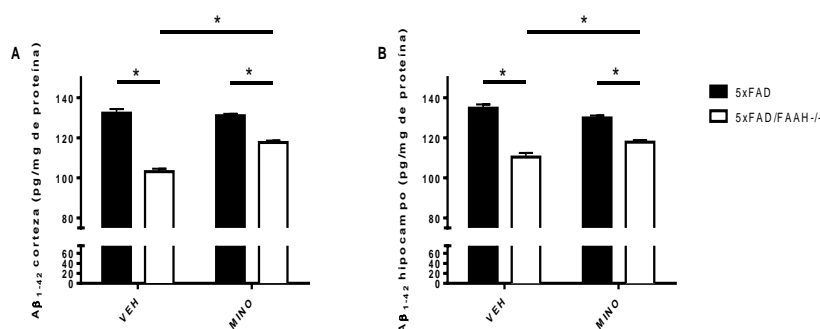


Figura 42: Representación gráfica de la cuantificación de A β ₁₋₄₂ en ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} en corteza (A), e hipocampo (B), tras el tratamiento con vehículo o minociclina (10mg/kg). La inhibición genética de FAAH provoca una disminución de los niveles del péptido en corteza e hipocampo, mientras que el tratamiento con minociclina solo altera los niveles de A β ₁₋₄₂ en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, provocando que aumenten respecto del control vehículo. Valores relativizados a la proteína total. N= 5 por grupo. *p < 0,05. ANOVA bifactorial seguido de un post-test de Sidak.

2.2.2. Cuantificación de placas neuríticas

Tras comprobar que los niveles de A β ₁₋₄₂ se veían modificados de igual manera tanto en corteza como en hipocampo de ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}, quisimos estudiar si el tratamiento con la tetraciclina revertía la bajada de los depósitos amiloides, observados ya en hipocampo de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015). La cuantificación de placas neuríticas se llevó a cabo mediante la tinción de secciones cerebrales con el colorante methoxy X04, y el posterior análisis de las imágenes tomadas. Las imágenes A, B, C y D de la figura 43 son representativas de las áreas de corteza e hipocampo, de los cuatro grupos experimentales.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación del área ocupada por el péptido depositado muestran que, en hipocampo, la inhibición genética de FAAH provoca una disminución de la deposición de placas, tal y como fue descrito por (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015). Sin embargo, la minociclina da lugar a una reducción del acúmulo

de placas en ratones 5xFAD, mientras que en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} se produce un aumento (gráfica A figura 44). No obstante, en corteza, no se reproducen dichas variaciones en la acumulación del péptido (gráfica B figura 44). Lo que observamos, en general, fue que las placas se concentraban mayoritariamente en el subículo, seguido del resto del hipocampo y de la capa más interna de la corteza (capa V).

Por tanto, y en conjunto con los resultados de la cuantificación del péptido por ELISA, comprobamos que la inactivación genética de FAAH da lugar a 1) una disminución de A β ₁₋₄₂ en corteza e hipocampo de ratones 5xFAD, y 2) una menor deposición en el hipocampo de estos ratones. Sin embargo, el tratamiento con minociclina aumenta los niveles del péptido en las áreas cerebrales de estudio, y su deposición en hipocampo.

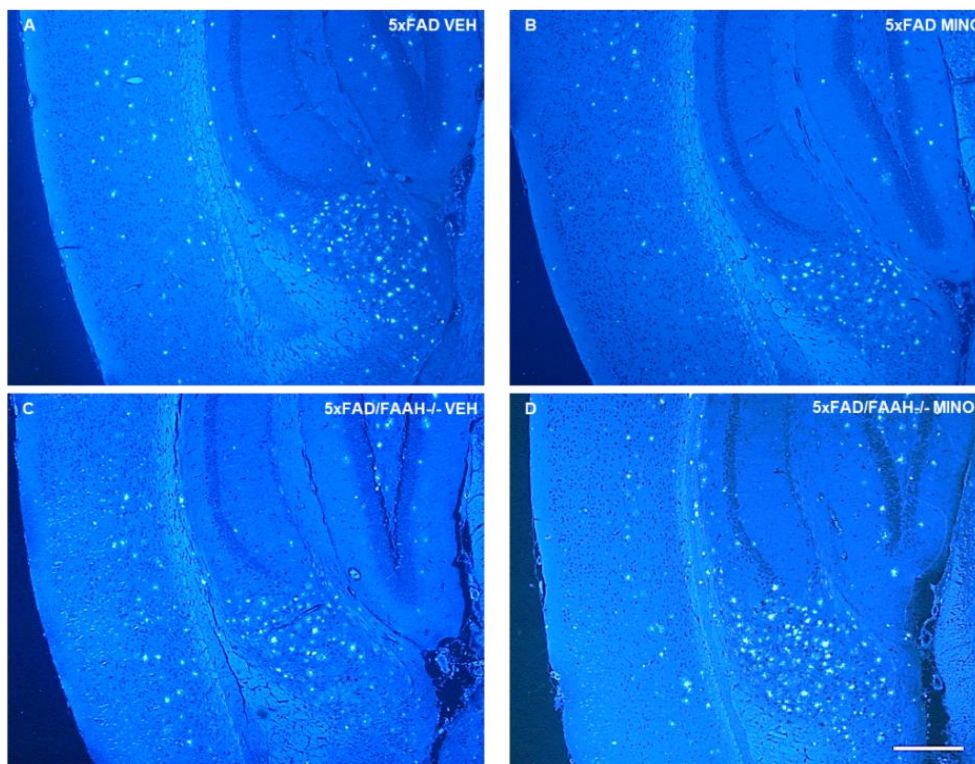


Figura 43: **Imágenes representativas de placas neuríticas en corteza e hipocampo.** La inhibición genética de FAAH provoca una menor deposición del péptido en hipocampo de ratones 5xFAD, mientras que la minociclina revierte dichos efectos. A: 5xFAD VEH, B: 5xFAD MINO, C: 5xFAD/FAAH^{-/-} VEH, D: 5xFAD/FAAH^{-/-} MINO. Barra de escalado: 300 μ m.

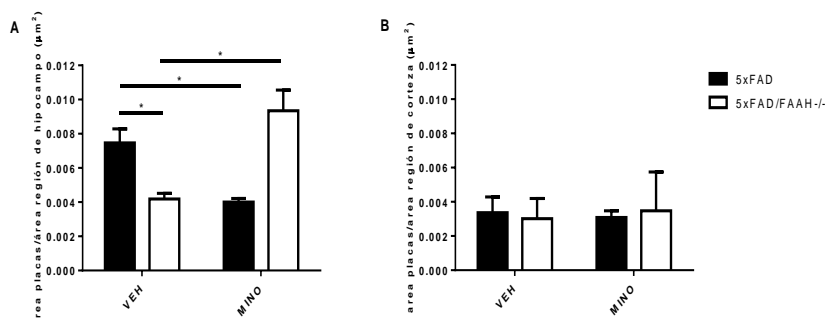


Figura 44: **Representaciones gráficas de la cuantificación de la superficie ocupada por los depósitos amiloide en corteza e hipocampo.** La inhibición genética de FAAH provoca una menor deposición del péptido en hipocampo de ratones 5xFAD, mientras que la minociclina revierte dichos efectos. A: representación gráfica de la superficie de hipocampo ocupado por las placas, respecto del área total del hipocampo (μm^2) y B: representación gráfica de la superficie de corteza ocupada por las placas, respecto del área total de corteza (μm^2). N= 3-4 por grupo. * $p < 0,05$. ANOVA bifactorial, seguido de un post-test de Sidak.

2.3. Fenotipo microglial

2.3.1. Índice M1/M2

A continuación, quisimos conocer la implicación de la microglía en todo este proceso. Para ello, procedimos a realizar la caracterización del fenotipo M1/M2 de la microglía de ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}, con el objetivo de comprobar, en primer lugar, si dicho fenotipo se correspondía con el perfil de citoquinas descrito en dichas condiciones (vehículo), y, en segundo lugar, si también lo hacía con respecto a los niveles de A β ₁₋₄₂ y a la cantidad de placas neuríticas cuantificadas. El interés de conocer el fenotipo microglial se debe a que está descrito que un fenotipo M1 se asocia con una respuesta iniciadora de la neuroinflamación (mediante liberación de citoquinas pro-inflamatorias) mientras que un fenotipo M2 se asocia más a procesos de resolución de la respuesta neuroinflamatoria, entre las que se encuentra la fagocitosis de elementos celulares o tóxicos causantes del proceso, como el péptido amiloide.

Para conocer el fenotipo microglial, procedimos a aislar microglía cerebral, en este caso no solo de ratones con patología amiloide, sino también de ratones WT y FAAH^{-/-}, para conocer los efectos debidos exclusivamente a la ausencia de la actividad de FAAH.

Los resultados derivados del análisis de la microglía por citometría de flujo muestran que el número de células microgliales existentes en ratones con la patología amiloide es mucho mayor que en ratones sanos, es decir, que existe una mayor microgliosis (gráfica A figura 45). Sin embargo, comparando entre ratones 5xFAD, se comprobó que

existía un menor número de estas células en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} (gráfica A figura 45). Yendo un paso más allá, la caracterización del fenotipo M1/M2 reveló que, además de ser mucho mayor en ratones enfermos, los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} presentaban este índice aumentado con respecto a los 5xFAD (gráfica B e histograma C, figura 45).

Por tanto, los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} tienen menor número de microglía, pero esta resulta tener un perfil más pro-inflamatorio que la presente en ratones 5xFAD.

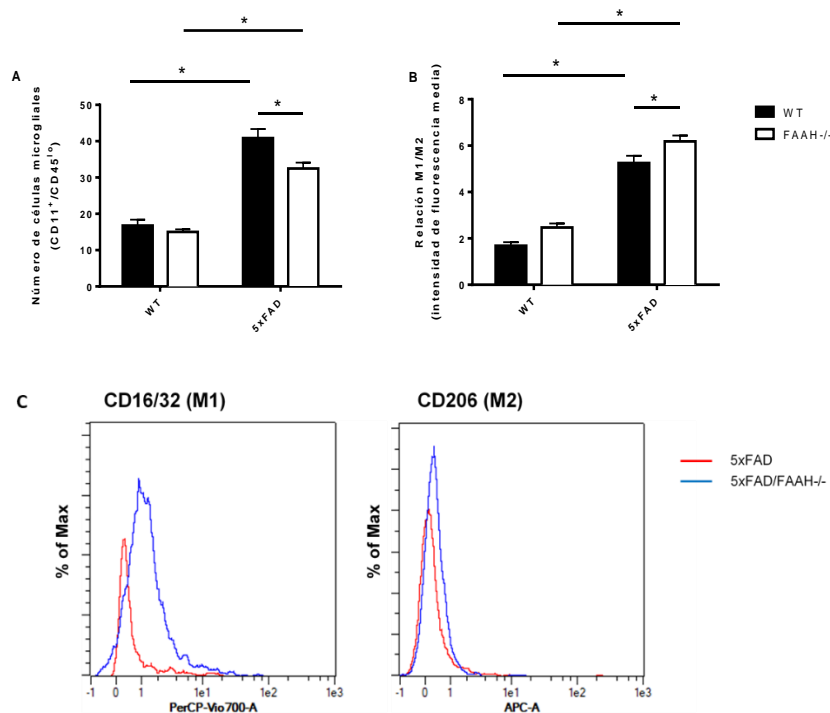


Figura 45: Representación del número de células totales de microglía en los cuatro genotipos (A), así como la relación del fenotipo M1/M2 en cada genotipo (B). Los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} tienen un menor número de células microgliales, con un fenotipo predominante M1, respecto de los ratones 5xFAD. C: histogramas donde se muestra la distribución de las poblaciones M1 (izquierdo) y M2 (derecho) en ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} N=5. *p < 0,05. ANOVA bifactorial seguido de un post-test de Sidak

2.3.2. Cuantificación de la actividad fagocítica microglial

Conociendo los datos de la cantidad de A β , los patrones de su deposición, y el fenotipo microglial predominante en ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}, quisimos conocer las propiedades fagocíticas de la microglía de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. El objetivo era conocer si esta microglía estaba implicada en la disminución del A β y de las placas en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. Para ello, a los ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} se les administró una dosis de methoxy X04 (10 mg/kg) 24 horas antes del aislamiento de

microglía cerebral. Posteriormente, se cuantificó la proporción de microglía que había incorporado el colorante, indicador directo de la cantidad de amiloide internalizado.

Los resultados obtenidos muestran que, partiendo de una menor microgliosis en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} respecto de los 5xFAD, como se mostraba en la gráfica A de la figura 45, la proporción de microglía que fagocita depósitos del péptido amiloide es mayor en los ratones 5xFAD sin enzima FAAH funcional que en sus respectivos 5xFAD (figura 46).

Por tanto, del estudio del fenotipo microglial se concluye que la inactivación genética de FAAH en ratones 5xFAD favorece que la microglía, bajo un fenotipo pro-inflamatorio, lleve a cabo el aclaramiento del péptido A β ₁₋₄₂ más eficazmente.

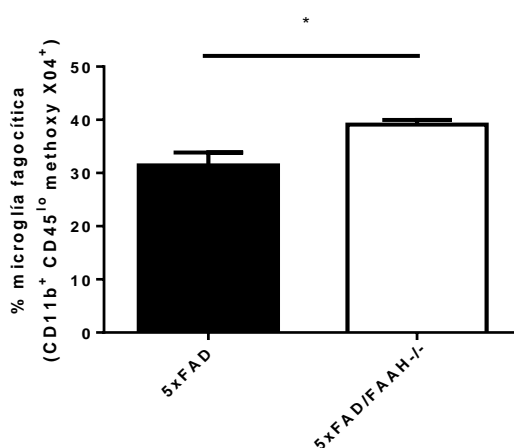


Figura 46: Representación del porcentaje de microglía que ha incorporado methoxy X04 de ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}. Existe una mayor incorporación del péptido depositado por parte de la microglía de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. N=4. Representación de la media \pm SEM. *p < 0,05. T-student no emparejado seguido de la corrección de Welch.

2.4. Evaluación de la memoria espacial: MWM

Los resultados obtenidos hasta este punto muestran que un perfil pro-inflamatorio derivado de la inactivación genética de FAAH, y protagonizado por la citoquina IL-1 β , da lugar a una mejoría en cuanto al proceso patológico de la EA. Sin embargo, puesto que la evolución patológica no tiene por qué ir en paralelo a la sintomatología de la enfermedad, quisimos llevar a cabo una evaluación de la memoria espacial mediante el *test* del laberinto acuático de Morris (MWM). En este caso, empleamos de nuevo ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}, tratados tanto con vehículo como con minociclina, para conocer si las reversiones patológicas asociadas a su efecto anti-inflamatorio en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} también resultaban en un empeoramiento cognitivo.

En la figura 47 se representan los tiempos de latencia de cada grupo experimental durante los 4 días de prueba. Como puede observarse, el tratamiento con minociclina afecta de forma diferente en el contexto de la patología amiloide, dependiendo de si se ha inactivado o no la enzima FAAH. Concretamente, los ratones 5xFAD muestran una mejoría en cuanto a su memoria espacial tras el tratamiento, mientras que los 5xFAD/FAAH^{-/-}, empeoran.

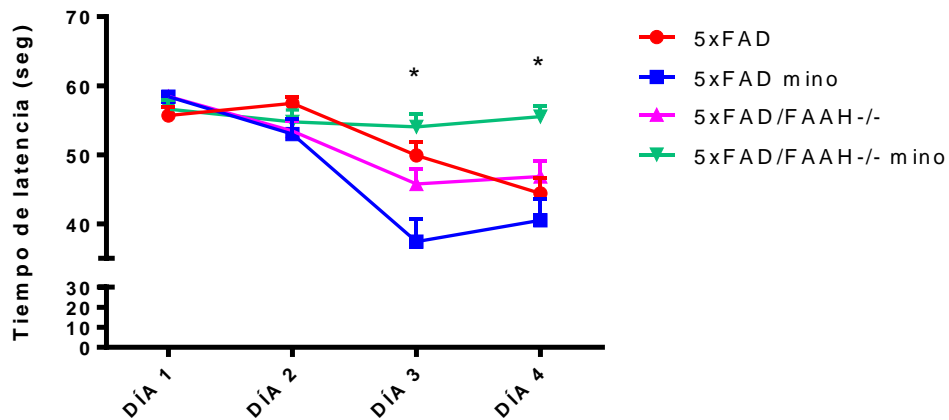


Figura 47: Representación de los tiempos de latencia (seg) correspondientes a cada grupo experimental, en cada uno de los días de prueba. Existe una mejoría estadísticamente significativa en los ratones 5xFAD a día 3 de prueba, mientras que los 5xFAD/FAAH^{-/-} empeoran en los días 3 y 4. N=8-11 ratones por grupo. *p < 0,05. ANOVA bifactorial seguido de un post-test de Sidak.

DISCUSIÓN

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la alteración de las capacidades cognitivas y conductuales, debido a la acumulación del péptido A β y de la proteína tau hiperfosforilada en forma de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares (respectivamente). Se trata de la variante de demencia más abundante en todo el mundo, y debido al incremento del envejecimiento de la población, el número de casos diagnosticados va en aumento (Duthey, 2013). Sin embargo, pese al exhaustivo conocimiento que tenemos sobre la patología, paradójicamente, no existe aún ninguna terapia capaz de curar la enfermedad.

Por otra parte, el SEC comprende al conjunto de ligandos endógenos, receptores específicos, y enzimas responsables de la síntesis y degradación de los ECs. Estos ligandos, al unirse a sus receptores, dan lugar a la activación de rutas de señalización implicadas en procesos biológicos de naturaleza muy diversa. La variedad de procesos en los que participa el SEC lo ha situado como nueva herramienta terapéutica a estudiar para el tratamiento de numerosas patologías, entre las que se encuentran las de tipo neurodegenerativo, como la EA. Esto se explica por la repercusión de dicho sistema en diversos procesos afectados durante la enfermedad, como es la neuroinflamación, la neurogénesis, la conectividad, los procesos de eliminación de restos celulares, la gliosis o el estrés oxidativo (Molina-Holgado & Molina-Holgado, 2019).

Desde no hace muchos años, la neuroinflamación ha cobrado protagonismo en el estudio de gran parte de las patologías neurodegenerativas conocidas a día de hoy. Se caracteriza principalmente por el aumento de la gliosis y del estrés oxidativo, lo que la postula como uno de los principales factores favorecedores del desarrollo de las patologías neurodegenerativas, así como en uno de los varios nexos de unión entre estas patologías y el SEC.

Diversos estudios centrados en las áreas cerebrales afectadas en la EA (hipocampo y corteza) han descrito cambios de expresión de diferentes componentes del SEC, relacionados con la neuroinflamación. Dos ejemplos descritos por nuestro grupo hasta la fecha han sido: el aumento de la presencia de CB₂R en microglía asociada a placas seniles (Benito *et al.*, 2003; López *et al.*, 2018), y el incremento de los niveles de la enzima FAAH en astrocitos asociados a placas (Benito *et al.*, 2003). Por un lado, el aumento de los niveles de CB₂R se asociaría a una respuesta de tipo anti-inflamatoria y neuroprotectora, mientras que el aumento de FAAH, al producir un incremento de los niveles de ácido araquidónico tras la degradación de la AEA, podría contribuir a la progresión de la neuroinflamación, y, por ende, a la de la enfermedad (Fernández-Ruiz *et al.*, 2015). Junto con evidencias de otros grupos de investigación, (Ramírez, 2005;

van der Stelt *et al.*, 2006; Aso & Ferrer, 2014), podríamos deducir que el SEC podría ser relevante como diana terapéutica para el desarrollo de futuros tratamientos con los que abordar la complejidad patológica de la EA.

Nuestro grupo de investigación, a partir del hallazgo del aumento de los niveles de FAAH en astrocitos asociados a placas, profundizó en sus estudios mediante el uso de ratones FAAH^{-/-} (Cravatt *et al.*, 2001). Estos ratones se caracterizan por tener deletado el exón 1 del gen *Faah*, dando lugar a una enzima disfuncional, y al aumento de los niveles de AEA endógenos. Estudios *in vitro* con astrocitos primarios revelaron que aquellos que carecían de actividad FAAH mostraban una respuesta pro-inflamatoria exacerbada respecto a sus equivalentes WT, tras ser expuestos al péptido Aβ₁₋₄₂. La presencia de dicho péptido daba lugar a 1) una mayor liberación de las citoquinas IL-1β y TNFα; 2) una mayor expresión de otros marcadores pro-inflamatorios, como las enzimas COX2 e iNOS; 3) un incremento en la activación de cascadas de señalización pro-inflamatorias, en las que se encontraban involucradas las proteínas ERK1/2, p38 MAPK, y NF-κB; y 4) una disminución de la expresión de receptores PPARα y γ en condiciones basales, relacionados con respuestas anti-inflamatorias (Benito *et al.*, 2012). Para continuar con el estudio de la relevancia de este perfil pro-inflamatorio tras el aumento de los niveles de AEA endógenos, se llevaron a cabo estudios *in vivo* con ratones 5xFAD cruzados con ratones FAAH^{-/-}. Al igual que lo descrito en astrocitos FAAH^{-/-}, la inhibición genética de FAAH daba lugar a un perfil pro-inflamatorio en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, en el que resaltaba la expresión exacerbada de la citoquina IL-1β, a la vez que se producía una disminución de los niveles de las proteínas APP, Aβ₁₋₄₂, Aβ₁₋₄₀. Consecuentemente, se observó una reducción del acúmulo de placas seniles, de la microgliosis y de la astrocitosis, que mostró ser mediado por la activación de CB₁R (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015). Además, el estudio *in vivo* realizado mediante microscopía intravital reveló que la ausencia de actividad FAAH provocaba mayor actividad de los hemicanales de Cx43 de membrana plasmática de astrocitos, lo que parecía influir en la mayor rapidez de la microglía para dirigir sus procesos y encapsular una lesión parenquimal por una quemadura láser (lesión aguda). De nuevo, todo este proceso se vio mediado por la activación del CB₁R (Vázquez, Tolón, Pazos, *et al.*, 2015).

Partiendo de estas premisas, con las que se evidencia la estrecha relación existente entre el SEC (en particular, el aumento del tono endocannabinoide) y el proceso neuroinflamatorio contextualizado en la patología amiloide, se planteó la siguiente hipótesis: el aumento de la expresión de la citoquina IL-1β, favorecido por el incremento de los niveles de AEA tras la inactivación genética de FAAH, es responsable de una

mayor intensidad en la respuesta inflamatoria ante la presencia de A β (como se observa en astrocitos *in vitro*), así como del aumento de la actividad de los hemicanales de Cx43 de membrana plasmática, (observados en astrocitos FAAH^{-/-} *in vivo*), y de la mejora patológica observada en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}.

El objetivo de la presente tesis doctoral fue dilucidar el papel de la IL-1 β en la modulación glial durante el proceso patológico de la EA, tras la inactivación genética de FAAH. Para ello, se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales, una *in vitro*, y otra *in vivo*. Con la realización de experimentos *in vitro*, se estudió a) el perfil inflamatorio de la glía FAAH^{-/-} (microglía y astrocitos en co-cultivo), y en particular, a la IL-1 β , así como el de los componentes del inicio de su cascada de señalización; b) la actividad y cantidad de hemicanales de Cx43; c) la modulación de los niveles de AEA, y; d) la actividad fagocítica. En cuanto a la aproximación *in vivo*, se abordó el estudio de la implicación de la IL-1 β en la mejora patológica de los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. Para ello, se realizó un tratamiento con minociclina, que inhibe la actividad caspasa 1, y con ello, la activación de la IL-1 β .

Estudio *in vitro* de la glía FAAH^{-/-}

La experimentación con células primarias *in vitro* ofrece la gran ventaja de poder conocer y diseccionar los diferentes procesos implicados en los paradigmas experimentales de interés. Es bien conocida la estrecha interrelación funcional entre la microglía y los astrocitos durante un proceso neuroinflamatorio que, en nuestro caso concreto, quedó acreditada en los experimentos *in vivo* de lesión aguda (Vázquez, Tolón, Pazos, *et al.*, 2015). Por ejemplo, los astrocitos influyen en la capacidad de adhesión de la microglía, en la modulación de su activación, y en la producción de citoquinas (Welser & Milner, 2012). Por ello, y con el fin de conocer el grado de influencia de la inactivación genética de FAAH^{-/-} en la respuesta glial ante un estímulo inflamatorio, se emplearon co-cultivos de microglía-astrocitos, los cuales permiten conocer la regulación recíproca que ejercen entre sí, principalmente tras un estímulo pro-inflamatorio.

La inactivación genética de FAAH se asocia a una mayor sensibilidad inflamatoria, protagonizada por IL-1 β

En primer lugar, nos propusimos ahondar en la relación entre el perfil pro-inflamatorio de la glía FAAH^{-/-} (incluyendo la familia IL-1), y el aumento crónico de los niveles de AEA por la inactivación genética de FAAH. Los resultados obtenidos *in vitro*, y en condiciones basales, mostraron que la glía FAAH^{-/-}, respecto de la WT, sobre-expresa la citoquina IL-1 β , su receptor (IL-1R-1), la proteína accesoria del receptor de la citoquina (IL-1RAcP), y la proteína antagonista del receptor (IL-1RN). Otros marcadores pro-inflamatorios analizados fueron TNF α y COX2, los cuales también se encuentran sobre-expresados en células FAAH^{-/-}, e IL10, de la que no observamos diferencias entre ambos genotipos de estudio.

En el año 2015, Ativie y cols. publicaron un artículo en el que se describe el perfil pro-inflamatorio de la glía FAAH^{-/-}, destacando la mayor producción de IL-1 β por parte de microglía de ratones jóvenes (Ativie *et al.*, 2015). Estos datos apoyarían lo que observamos en nuestros co-cultivos de glía FAAH^{-/-}, puesto que en ellos se reproduce la existencia de un perfil pro-inflamatorio basal protagonizado por la IL-1 β , respecto de la glía WT. Además, el hecho de que observemos un mayor aumento del resto de los componentes de la familia IL-1 analizados, da mayor sustento a la relación de esta cascada de señalización con el aumento de los niveles de AEA. Resulta especialmente llamativo que la IL-1RN se encuentre también sobre-expresada en glía FAAH^{-/-}. Esto sugiere que la IL-1RN podría estar desempeñando un papel compensatorio sobre la respuesta pro-inflamatoria dependiente de IL-1 β . Dicha glía estaría preparada para proporcionar una respuesta más eficiente ante un estímulo dañino respecto de la glía WT, debido a una mayor expresión de IL-1 β , IL-1R-1, IL-1RAcP ya en condiciones basales. Sin embargo, la señalización no sería efectiva por la presencia de IL-1RN.

Además del estudio del perfil inflamatorio basal de la glía FAAH^{-/-}, quisimos estudiar la evolución de este ante la presencia del péptido A β ₁₋₄₂, bien durante 8 horas o 24. En concreto, lo abordamos mediante el análisis de la expresión de la familia IL-1, así como de TNF α , COX2, e IL-10, tal y como hicimos en condiciones basales. La exposición de las células al péptido A β ₁₋₄₂ durante 8 horas dio lugar a cambios de expresión de IL-1 β en células FAAH^{-/-} únicamente, en las que se observó una disminución de dicha expresión. En cuanto al resto de genes analizados, no se observaron cambios significativos por la presencia de A β ₁₋₄₂ en ninguno de los genotipos de interés, a ninguno de los tiempos estudiados (8 y 24 horas).

La IL-1 β se regula de forma diferente tanto a nivel transcripcional como traduccional, con respecto a otras citoquinas (como el TNF α) (Dinarello, 2009; Schott *et al.*, 2014). En cuanto a la transcripción, se ha visto que en macrófagos activados con LPS se produce un aumento de la expresión de IL-1 β , pero, a pesar de que el ARNm se une a los ribosomas, no se detecta proteína en el medio celular (Schott *et al.*, 2014). Esto se debe a que la IL-1 β necesita ser activada tras su traducción para adquirir actividad biológica. De dicha activación se encarga el inflammasoma NLRP3, el cual requiere de un estímulo previo para su ensamblado (Dinarello *et al.*, 2012; Heneka *et al.*, 2013; Afonina *et al.*, 2015; Gustin *et al.*, 2015; Daniels & Brough, 2017). El ensamblaje del NLRP3, tras dicho estímulo (como por ejemplo el ATP) da lugar a la activación de la caspasa 1, la cual actúa sobre la pro-IL-1 β para dar lugar a la IL-1 β madura. Esto quiere decir, en último término, que los niveles de ARNm que detectamos de IL-1 β no tienen por qué corresponderse con los de proteína, ya que dependen de una concatenación de estímulos diferentes entre sí, los cuales actúan como puntos de control.

Un ejemplo sobre la regulación del mecanismo de expresión y activación de la IL-1 β podrían ser las PGEs (Zasłona *et al.*, 2017). Se ha descrito que la PGE₂ aumenta la transcripción y producción de la pro-IL-1 β en macrófagos, pero inhibe su maduración mediante la inhibición del NLRP3. Sin embargo, la llegada del estímulo (ATP) que activa el inflammasoma termina la inhibición de las PGEs sobre el NLRP3, y, en consecuencia, provoca la activación de la citoquina (Zasłona *et al.*, 2017). Observamos que la glía FAAH^{-/-} expresa mayores niveles de COX2 que la WT, tanto en condiciones basales como tras la exposición al péptido A β ₁₋₄₂. COX2 degrada la AEA en PGEs, por lo que podríamos estar observando en glía FAAH^{-/-} un mecanismo por el que se estuviera favoreciendo la sobre-expresión de IL-1 β en condiciones basales, y en presencia de A β ₁₋₄₂, se diera la activación de la citoquina. Por tanto, la degradación de AEA por parte de COX2, resultando en la producción de prostaglandinas, podría ser la responsable del perfil pro-inflamatorio basal de la glía FAAH^{-/-}.

En resumen, podríamos plantear la siguiente hipótesis: la inactivación genética de FAAH favorecería el procesamiento de la AEA hacia PGEs por parte de la COX2 (Zasłona *et al.*, 2017), dando lugar a la sobre-expresión de IL-1 β en condiciones basales. Sin embargo, la activación de la proteína no se produciría (Dinarello, 2009; Schott *et al.*, 2014), hasta la aparición de un segundo estímulo, como el A β ₁₋₄₂, que demande la necesidad de su activación. La presencia del péptido provocaría la liberación de ATP (Koulakoff *et al.*, 2012) y por ello, el ensamblado del inflammasoma NLRP3 (Heneka *et al.*, 2015; Zasłona *et al.*, 2017), lo que daría lugar a la activación de la IL-1 β (figura 48).

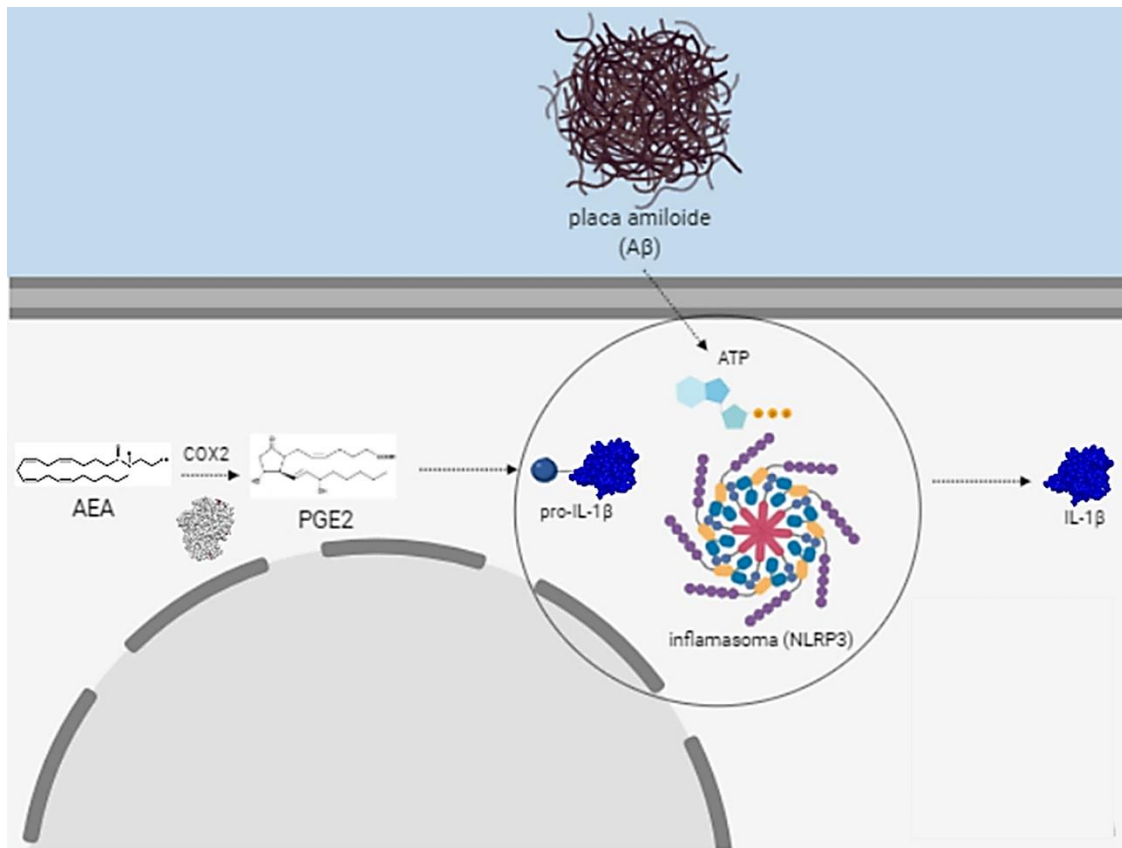


Figura 48: Ilustración de la hipótesis de la ruta metabólica de la AEA responsable del aumento de la IL-1β tras la inactivación genética de FAAH.

Resultados previos de nuestro grupo, derivados del estudio de cultivos de astrocitos FAAH^{-/-} primarios, confirman la liberación de IL-1β al medio celular tras 8 horas de exposición al Aβ₁₋₄₂ (Benito *et al.*, 2012). Sin embargo, nuestros resultados actuales derivados de glía FAAH^{-/-} muestran una disminución de la expresión de IL-1β a las 8 horas de exposición a Aβ₁₋₄₂. Estos datos, aparentemente contradictorios entre sí, podrían indicar que se está llevando a cabo un proceso de regulación de la expresión de IL-1β, el cual tendría como protagonista a la IL-1RN. Hemos observado que, en glía FAAH^{-/-}, esta proteína mantiene altos niveles de expresión en presencia del péptido. Por lo tanto, antagonizando el receptor IL-1R-1, interrumpiría la retroalimentación de la IL-1β sobre su propia expresión (autorregulación), y favorecería la gestión más eficiente de la respuesta inflamatoria ante el Aβ₁₋₄₂ (Dinarello, 2009).

En cuanto a TNFα, observamos que se encuentra sobre-expresada en condiciones basales, pero a diferencia de IL-1β, no se producen cambios en su expresión tras 8 horas de exposición a Aβ₁₋₄₂. Por ello, en combinación con los resultados anteriores, podríamos plantear que, en células con la enzima FAAH inactivada genéticamente, se potencia la cascada de señalización de IL-1β, acelerando la respuesta inflamatoria ante

la llegada de un estímulo dañino, en la que la citoquina TNF α tiene un papel secundario a la acción de la IL-1 β .

Resulta interesante comprobar que no observemos efecto pro-inflamatorio por parte del péptido A β ₁₋₄₂ en glía WT. Aunque llamativo, podría tener su explicación en el “carácter” tóxico de este. En concreto, nuestro péptido A β ₁₋₄₂ es uno de los menos agresivos a emplear por su tendencia a agregar (las formas oligoméricas resultan más tóxicas que las fibrillas de A β (Sengupta *et al.*, 2016)). Además, para su reconstitución, empleamos NH₃ al 0,1% en H₂O destilada, lo que favorece su disolución y el aumento de los sitios de nucleación. Si a todo ello le sumamos que incubamos la disolución a 37°C durante 7 días, el resultado es que aumentamos la proporción de fibrillas de A β respecto de las formas oligoméricas, lo que explicaría la menor toxicidad de nuestro péptido (Broersen *et al.*, 2011; Benito *et al.*, 2012). No obstante, observamos que la expresión de IL-1 β es modificada por la presencia de A β ₁₋₄₂ solo en en glía FAAH^{-/-}, lo que confirma las diferencias observadas entre ambos genotipos, y en concreto, la sensibilidad de la glía FAAH^{-/-}.

En conjunto, y a modo de resumen, proponemos que la glía FAAH^{-/-} se encuentra en un estado de preparación (*priming*) como consecuencia de la inactivación genética de FAAH, dando lugar a que el inicio de la respuesta inflamatoria en la glía FAAH^{-/-}, protagonizado por la IL-1 β , se produzca de forma más temprana a lo que lo hace en la glía WT. Esto podría suponer, consecuentemente, una ventaja para la resolución de un daño que curse con neuroinflamación.

La inactivación genética de FAAH favorece el aumento de proteína Cx43 en membrana

Los hemicanales de membrana son muy importantes para la comunicación intercelular y para el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Giaume *et al.*, 2013). Los más abundantes en astrocitos son los formados por Cx43, aunque, en menor cantidad, la microglía también expresa este tipo de hemicanal (Koulakoff *et al.*, 2012; Giaume *et al.*, 2013). Se ha descrito su implicación en diferentes aspectos de la EA (Orellana *et al.*, 2011; Kajiwara *et al.*, 2018). En particular, se les atribuye un papel deletéreo asociado a un aumento de su actividad y/o expresión, lo cual favorecería el incremento de la liberación de moléculas perjudiciales para la estabilidad neuronal (citoquinas, glutamato, PGEs etc.). Sin embargo, datos obtenidos en nuestro grupo relacionan el aumento de la actividad de los hemicanales Cx43 con una respuesta

microglial más eficiente tras una lesión cerebral en ratones FAAH^{-/-} (Vázquez, Tolón, Pazos, *et al.*, 2015).

Dado que se conoce la influencia de la AEA, citoquinas pro-inflamatorias (Retamal *et al.*, 2007), y de A β (Orellana *et al.*, 2011) en la actividad de los hemicanales de Cx43, quisimos estudiar el comportamiento de estos en la glía FAAH^{-/-} ante dichos estímulos. En primer lugar, cuantificamos la proteína Cx43 en membrana plasmática de glía en condiciones basales. El análisis de los WB realizados reveló que existía mayor cantidad de Cx43 en la membrana de glía FAAH^{-/-} respecto de la WT, lo que concuerda con datos previos de nuestro grupo (Vázquez, Tolón, Pazos, *et al.*, 2015), que mostraban que se producía una mayor internalización de BrEt (compuesto catiónico capaz de entrar en el interior celular a través de los HC de membrana) en astrocitos FAAH^{-/-}, a través de HC de Cx43.

Existen publicaciones sobre la caracterización de los hemicanales de Cx43 en diversos contextos (Retamal *et al.*, 2007; Orellana *et al.*, 2011). En primer lugar, resalta el hecho de que se detecte BrEt dentro de las células en condiciones fisiológicas (o basales), ya que los HC de Cx43 tienen una baja probabilidad de apertura a concentraciones estándar de iones divalentes en el medio celular (Giaume *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha descrito previamente la entrada de BrEt a través de los HC de Cx43 en presencia de Ca²⁺ extracelular (Hansen *et al.*, 2014), por lo que su apertura no depende exclusivamente de cambios de voltaje de membrana, sino de otros puntos de control, como la fosforilación/ des-fosforilación de sus extremos C-terminal, fuerzas mecánicas, señales extracelulares etc. (Giaume *et al.*, 2013). Cuando no se conocía que los HC podían ejercer funciones por sí mismos, se pensaba que, hasta formar las uniones en hendidura (*gap junctions*), debían estar completamente cerrados para evitar “fugas” de iones o moléculas de pequeño tamaño desde el interior celular. Sin embargo, tras el descubrimiento de que los hemicanales desempeñan funciones intrínsecas, se llegó a la conclusión de que las aperturas esporádicas en condiciones fisiológicas no eran perjudiciales, sino necesarias, y con sentido biológico (Sáez *et al.*, 2005). Esto explica que sea posible la internalización del BrEt en condiciones fisiológicas, y, por tanto, que detectemos su fluorescencia.

El siguiente paso fue conocer el comportamiento de los HC de Cx43 ante diferentes estímulos extracelulares. Tras 24 horas de exposición a dichos estímulos, observamos que el A β ₁₋₄₂ no tenía efecto sobre la actividad hemicanal, mientras que el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF α) producía una disminución en dicha actividad, pero solo en glía FAAH^{-/-}.

Se ha descrito que el péptido A β ₂₅₋₃₅ es capaz de inducir la apertura de hemicanales de Cx43 a las 72 horas de ser aplicado en cultivos de astrocitos primarios (Orellana *et al.*, 2011), e igualmente, dicha apertura se produce cuando se exponen a citoquinas pro-inflamatorias durante 24 horas (Retamal *et al.*, 2007). La falta de efecto del A β ₁₋₄₂ que observamos en nuestro modelo experimental contrasta con los resultados de Orellana y cols. (Orellana *et al.*, 2011). Hay varios aspectos que pueden explicar esta discrepancia: 1) el péptido A β empleado; 2) la concentración a la que este fue utilizado; y 3) la duración del tratamiento. Orellana y cols. (Orellana *et al.*, 2011) describen al péptido A β ₂₅₋₃₅ como la secuencia más reactiva y tóxica, y, además, lo emplean al doble de la concentración que la empleada en los presentes trabajos, y que es bastante más elevada que la descrita en cerebros de pacientes con EA (Nielsen *et al.*, 2017). A ello hay que unir la baja toxicidad de nuestro péptido A β ₁₋₄₂ en nuestros experimentos (recordemos, más fibrilado que el A β ₂₅₋₃₅ por el empleo de NH₃ y la incubación a 37° C). Será recomendable que experimentos futuros empleen metodologías comunes para esclarecer definitivamente si, por tanto, el A β es capaz de provocar la apertura de HC.

En relación con el experimento de exposición al cóctel de citoquinas pro-inflamatorias, lo que observamos fue que se producía una disminución de la entrada de BrEt en la glía FAAH^{-/-}, en contraposición a lo descrito previamente (Retamal *et al.*, 2007). Tras observar una mayor entrada de BrEt en condiciones basales y un aumento de Cx43 de membrana en estas células, la disminución de BrEt ante la presencia de citoquinas pro-inflamatorias podría deberse a un cierre permanente de los hemicanales, o quizá, a un proceso de internalización de estos, como mecanismo de defensa ante un ambiente excesivamente pro-inflamatorio. Serán necesarios futuros experimentos que ayuden a comprobar tal hipótesis.

La inactivación genética de FAAH previene el descenso de AEA en presencia de A β ₁₋₄₂

Para continuar nuestro estudio sobre la caracterización de la glía FAAH^{-/-}, quisimos conocer cómo variaban los niveles de AEA en presencia de A β ₁₋₄₂. Nuestros resultados indican que la exposición al péptido da lugar a una disminución de los niveles de AEA, tanto en el medio como en el interior celular, en glía WT. Por el contrario, observamos que la glía FAAH^{-/-} fue insensible a la presencia del péptido. Estos resultados concuerdan con datos previos que describían una disminución significativa de los niveles de AEA en pacientes con EA, en relación con los controles sanos (Jung *et al.*, 2012). Más concretamente, la disminución de los niveles de AEA de cerebro de

pacientes enfermos se correlacionaba con una menor velocidad de procesamiento de la información y de facilidad lingüística. Sin embargo, la relación de los niveles del EC con los del péptido $A\beta_{1-42}$ resultaba ser inversamente proporcional, tanto en cerebro de pacientes con EA como en células APPSWE/Neuro-2a. Además, es reseñable que no se detectaran variaciones en los niveles de 2-AG ni en otros lípidos analizados, ni que tampoco existiera correlación entre las variaciones de los niveles de AEA con los del péptido $A\beta_{1-40}$, la deposición de placas neuríticas, o la fosforilación de la proteína tau (Jung *et al.*, 2012).

Nuestros resultados también se relacionan con datos previos en nuestro grupo de investigación, que describieron un aumento de la expresión de FAAH en astrocitos asociados a placas neuríticas de pacientes con EA, así como un aumento de la actividad de la enzima en regiones periféricas a dichas placas (Benito *et al.*, 2003).

Como mencionamos anteriormente, en glía FAAH^{-/-} se previene la reducción de los niveles de AEA en presencia del péptido $A\beta$, lo que concuerda con el hecho de que la enzima FAAH en estas células no es funcional. Los niveles elevados de AEA podrían explicar el fenotipo pro-inflamatorio que adquieren las células gliales FAAH^{-/-} tras el aumento del tono de la AEA principalmente, como venimos describiendo en nuestro grupo de investigación ((Benito *et al.*, 2012); datos *in vitro* presentados en esta tesis). En concreto, parecen corroborar el papel pro-inflamatorio de la AEA en nuestro modelo experimental, ya que sugieren que la disminución de AEA en glía WT ante la presencia del péptido $A\beta_{1-42}$ podría ser parcialmente responsable de la ausencia de respuesta inflamatoria en presencia del péptido. Sin embargo, en glía FAAH^{-/-}, la ausencia de diferencias en los niveles de AEA tras su exposición al péptido, podría estar favoreciendo una mayor disposición del EC para su degradación vía COX2, responsable de la producción de PGs. Así, se favorecería la activación de la IL-1 β por parte del NLRP3, y la señalización a través de IL-1R-1.

En conjunto, nuestros resultados parecen confirmar la relevancia de la AEA en el contexto patológico de la EA. A día de hoy, se describe al SEC en general, y a la AEA en particular, como importantes neuromoduladores del SNC, tanto en condiciones fisiológicas, como patológicas (Fernández-Ruiz *et al.*, 2015; Molina-Holgado & Molina-Holgado, 2019). Se ha descrito previamente que el aumento del tono endocannabinoide da lugar a propiedades anti-inflamatorias (Fernández-Ruiz *et al.*, 2015; Turcotte *et al.*, 2015), justificando el potencial terapéutico de las enzimas degradativas de los ECs como dianas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas con componente neuroinflamatorio. Sin embargo, el conjunto de datos de nuestro grupo parece sustentar

otras vías (pro-inflamatorias) de actuación, que parecen desembocar en efectos igualmente beneficiosos.

La inactivación genética de FAAH no afecta a la fagocitosis del péptido A β ₁₋₄₂

Uno de los procesos más importantes durante la neuroinflamación es la retirada de los elementos tóxicos responsables del daño, así como de los elementos celulares (*debris*) resultantes de la evolución de la respuesta inflamatoria. En el SNC, el tipo celular predominante en esta tarea es la microglía, aunque se ha descrito que los astrocitos también pueden llevar a cabo dicha función (Alarcón *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014). Por ello, quisimos comprobar si el perfil pro-inflamatorio que hemos descrito hasta ahora influía de algún modo en la actividad fagocítica de la glía FAAH^{-/-}. Los resultados que obtuvimos mostraron que la inactivación genética de FAAH no afectaba a las propiedades fagocíticas de la glía.

En los últimos años se ha profundizado en la investigación de los distintos fenotipos que puede adquirir la microglía durante el proceso neuroinflamatorio. Aunque más complejo, se definen dos estadios principales en la microglía activada: el M1, también denominado “activación clásica”, y el M2, conocido también como “activación alternativa”. El fenotipo M1 se asocia al inicio de la respuesta neuroinflamatoria mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF α), ROS y otras moléculas típicas de este proceso de neuroinflamación. Sin embargo, el M2 se relaciona con una actividad más resolutoria, dirigida a la reparación del tejido, restablecimiento de la matriz extracelular, liberación de citoquinas anti-inflamatorias y fagocitosis (Mecha *et al.*, 2016; Tang & Le, 2016). No obstante, dicha clasificación puede resultar más compleja, puesto que existen estadios intermedios en los que se puede dar una combinación de funciones. Un ejemplo sería el hecho de que la sobre-expresión de IL-1 β en hipocampo promueve el aclaramiento de placas neuríticas (Shaftel *et al.*, 2007; Matousek *et al.*, 2012), pero la confirmación viene de la mano de recientes estudios que describen la existencia de subpoblaciones de microglía dependientes de la región cerebral, del tiempo (edad del individuo) y de la homeostasis cerebral (presencia o ausencia de alguna patología) (Grabert *et al.*, 2016; Masuda *et al.*, 2019; Stratoulis *et al.*, 2019). Estas subpoblaciones se distinguen entre ellas en base al perfil de expresión génica, lo que las confiere propiedades intrínsecas y funciones únicas.

En armonía con los datos derivados de la cuantificación de la actividad fagocítica, y con los resultados obtenidos de la expresión de citoquinas, confirmamos que la glía $FAAH^{-/-}$ se asemeja al perfil M1 de la microglía *in vivo*, debido a que los astrocitos y microglía $FAAH^{-/-}$ en co-cultivo mantienen una expresión predominante de citoquinas pro-inflamatorias, y no así de anti-inflamatorias (IL-10) durante las primeras horas de exposición a $A\beta$. Sin embargo, dicho fenotipo no altera la actividad fagocítica de la glía $FAAH^{-/-}$ durante las primeras horas de acción contra el péptido, lo que concuerda con el estado denominado como *priming* que hemos mencionado anteriormente (Heneka *et al.*, 2015).

A continuación, se presenta un resumen ilustrativo de los cambios descritos en glía primaria $FAAH^{-/-}$ (figura 49):

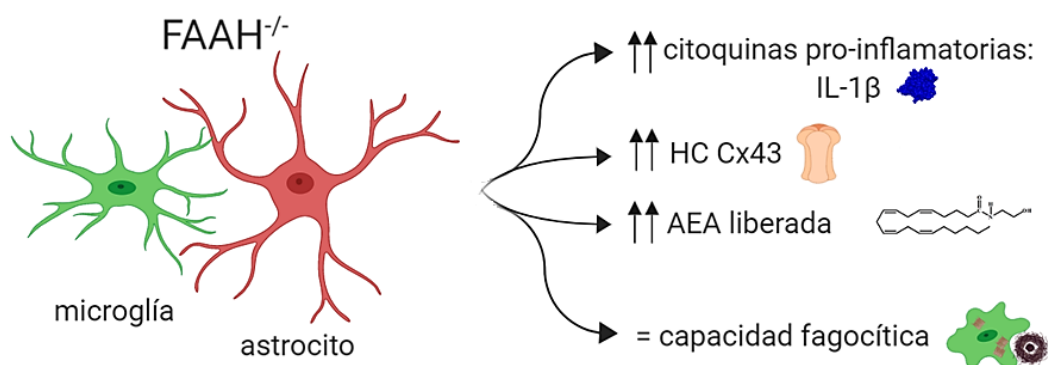


Figura 49: representación esquemática de los cambios producidos en glía primaria tras la inactivación genética de FAAH.

Estudio *in vivo* de la neuroinflamación asociada a la EA

El estudio de la neuroinflamación asociada a la patología amiloide *in vivo* fue llevado a cabo gracias al empleo del modelo transgénico 5xFAD, el cual se caracteriza por presentar 5 mutaciones genéticas humanas de la EA hereditaria, o familiar (Oakley *et al.*, 2006). Dichas mutaciones dan lugar al desarrollo de la patología con cierta celeridad con respecto a otros modelos animales, ya que los primeros depósitos de $A\beta$, así como la gliosis e inflamación, comienzan a aparecer aproximadamente a los dos meses de edad del animal (Boza-Serrano *et al.*, 2018). No obstante, los primeros síntomas de alteración de la memoria y aprendizaje no son detectables hasta los 6 meses (Oakley *et al.*, 2006; Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015).

Datos publicados por nuestro grupo muestran que el aumento de los niveles de AEA, de forma prolongada y mantenida en el tiempo en ratones 5xFAD/ $FAAH^{-/-}$, causa la reducción de los niveles de APP y $A\beta$, así como de los acúmulos de placas neuríticas y

de gliosis. Sin embargo, se produce paralelamente una mayor respuesta inflamatoria, en la que la citoquina IL-1 β cobra protagonismo por mantenerse, a nivel de proteína, en valores similares a los de los ratones 5xFAD (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015). Estas premisas, junto con los datos *in vitro* ya discutidos anteriormente, sentaron las bases para continuar con la caracterización de la importancia de la IL-1 β en la mejora patológica de los ratones 5xFAD tras la inhibición genética de FAAH.

El procedimiento experimental consistió en el tratamiento de los ratones con minociclina, durante 12 días consecutivos, a una dosis de 10mg/kg. Este derivado de las tetraciclinas de segunda generación se caracteriza por sus propiedades anti-inflamatorias, destacando la inhibición de la maduración de la proteína IL-1 β por parte de la caspasa 1 (Kim & Suh, 2009; Garrido-Mesa *et al.*, 2013). Decidimos emplear este fármaco para actuar sobre la señalización dependiente de IL-1 β debido a que no existen antagonistas del receptor IL-1R-1 capaces de traspasar la barrera hematoencefálica. Por tanto, la hipótesis de trabajo fue que la reducción de la inflamación, y consecuentemente, la de la producción de IL-1 β , resultaría en un empeoramiento cognitivo y patológico de los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}.

El tratamiento con minociclina reduce los niveles de IL-1 β en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}

En primer lugar, quisimos profundizar en la caracterización del perfil inflamatorio de los ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}. Para ello, llevamos a cabo la cuantificación de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, tanto en condiciones basales como en tratados con minociclina. Dicho análisis reveló que, en condiciones basales, a la vez que se producía un aumento de la expresión de IL-1 β en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} con respecto a sus controles 5xFAD, tanto en corteza como en hipocampo, paralelamente se daba una disminución de la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en hipocampo, aunque, en corteza, esta disminución no se ve reflejada.

Como venimos destacando desde el inicio del presente trabajo, existen evidencias, tanto de nuestro grupo de investigación (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015), como de otros, (Shaftel *et al.*, 2007; Matousek *et al.*, 2012) del papel potencialmente beneficioso que adquiere la IL-1 β en la respuesta inflamatoria asociada a la EA, que en nuestro paradigma experimental, se encuentra ligado a la inhibición genética de la enzima FAAH. Sin embargo, hasta que no concluimos los análisis de los experimentos

realizados en el contexto *in vivo*, no pudimos comprender el alcance de dicho rol beneficioso en el contexto neuroinflamatorio asociado a la patología amiloide.

Shaftel y cols. (Shaftel *et al.*, 2007) estudiaron la sobre-expresión de IL-1 β localizada en hipocampo (giro dentado) mediante un modelo murino que permitía la expresión de la citoquina de manera controlada tanto espacial, como temporalmente. La inducción de la expresión de IL-1 β durante un mes, en ratones APP/PS1 de 6 meses de edad, se correlacionó con una disminución de placas y formas insolubles de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂, responsabilizando de ello a la acción de la microglía tras su activación por parte de la citoquina. Posteriormente, Matousek y cols. (Matousek *et al.*, 2012) demostraron que el mantenimiento de la expresión de IL-1 β durante 5 meses resultó incluso favorecedor en cuanto a las mejoras patológicas descritas en los ratones APP/PS1.

Paralelamente, existen a su vez varias referencias en las que se demuestra el papel perjudicial que juega la citoquina IL-10 en la patología de la EA. Chakrabarty y cols. (Chakrabarty *et al.*, 2015) sobre-expresaron la citoquina IL-10 en dos modelos animales de la EA (TgCRND8 y Tg2576). Los resultados de dicha sobre-expresión se correspondían con un aumento de la producción de A β , que provocaba el incremento del acúmulo de placas en corteza e hipocampo, así como una mayor gliosis, deficiencias sinápticas, y daños cognitivos. Por otro lado, Guillot-Sestier y cols. (Guillot-Sestier *et al.*, 2015), mediante el empleo de ratones APP/PS1/IL10^{-/-} demostraron que la delección de IL-10 daba lugar a una disminución de la presencia de placas neuríticas en corteza e hipocampo, así como a la reducción de los niveles de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ en hasta un 85%.

Además, Guillot-Sestier y cols. (Guillot-Sestier *et al.*, 2015) comprobaron que la fuente principal de la citoquina IL-10 es la microglía asociada a placas. Nuestros datos revelaron que existen diferencias de expresión de esta citoquina entre corteza e hipocampo de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, lo que, en conjunto, puede deberse a 1) la menor acumulación de placas en corteza con respecto a hipocampo (figura 44); y 2) la existencia de mayor ratio de microglía M1 en estos ratones (gráfica B figura 45). Ambos sucesos podrían explicar que en corteza no se observen diferencias en cuanto a la expresión de IL-10 en condiciones basales, pero sí que sean detectables en hipocampo, ya que, en corteza, al observar menos placas respecto de hipocampo, existe una menor microgliosis asociada a placas en esta región. Sumado al fenotipo pro-inflamatorio de la microglía en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, se dificulta la detección de cambios en IL-10, puesto que esta microglía no expresa citoquinas anti-inflamatorias prioritariamente. Por el contrario, el mayor número de placas en hipocampo respecto de corteza, sí ayudaría a visibilizar la disminución de expresión en IL-10. No obstante, existe un tercer elemento

que podría explicar las diferencias de expresión regionales de IL-10, que es la existencia de subtipos de microglía dependientes de la región cerebral, homeostasis y tiempo del individuo, como ya mencionamos anteriormente (Grabert *et al.*, 2016; Masuda *et al.*, 2019; Stratoulis *et al.*, 2019).

Todo ello, en conjunto, permite proponer que el perfil pro-inflamatorio neto de los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} resulta beneficioso en el contexto de la patología amiloide. Además, el tratamiento con minociclina de este genotipo, tal y como se esperaba, da lugar a la reducción de la expresión de IL-1 β tanto en corteza como en hipocampo, mientras que en IL-10 los cambios vuelven a ser variables según qué área cerebral se estudie.

Nuestro interés en dilucidar la relevancia de la IL-1 β en el contexto patológico de la EA, en ausencia de la enzima FAAH funcional, se extendió al resto de componentes de la familia IL-1, tal y como hicimos en experimentos *in vitro*. En este caso, se llevó a cabo la cuantificación de la expresión de IL-1R-1 y de IL-1RN, (el receptor de IL-1 y el antagonista del receptor, respectivamente). Dicho análisis mostró que, en corteza, existe un aumento de la expresión de IL-1R-1 en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} respecto de los ratones 5xFAD. No obstante, el tratamiento con minociclina reduce dichas diferencias en el caso de IL-1R-1, mientras que en IL-1RN apenas existe variación. Estos resultados apoyan, una vez más, la premisa del papel relevante de la señalización vía IL-1 β , mediante su unión a su receptor.

Conociendo la complejidad del mecanismo de regulación de la expresión de IL-1 β , quisimos realizar una cuantificación de la proteína total de IL-1 β presente en corteza. Ya comprobamos que los niveles de proteína IL-1 β total en hipocampo eran similares entre ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015). Por tanto, la cuantificación de la citoquina en corteza mediante ELISA nos ayudó a confirmar, por un lado, que los niveles de proteína de IL-1 β eran similares entre ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} (controles vehículo), y, por otro lado, que el tratamiento con minociclina producía una disminución de IL-1 β , no solo en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, sino también en los 5xFAD. No obstante, la reducción de la proteína IL-1 β fue mayor en animales 5xFAD/FAAH^{-/-}.

En conjunto, los resultados de la cuantificación de la expresión de citoquinas, componentes de la familia IL-1, y de los niveles de proteína IL-1 β total, ratifican la existencia de un perfil pro-inflamatorio neto en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, en el que destaca la sobre-expresión de la citoquina IL-1 β , así como la de su receptor. Sin embargo, no podemos confirmar un aumento de su producción, puesto que los niveles de proteína

no difieren en ratones 5xFAD, tengan o no la enzima FAAH. Sería interesante corroborar la ausencia de diferencias en los niveles de proteína empleando otras técnicas complementarias, como WB.

El tratamiento con minociclina revierte la bajada de los niveles de A β ₁₋₄₂ y placas neuríticas en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}

Partiendo del hecho de que los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} acumulan menos A β y placas neuríticas en hipocampo con respecto a sus controles 5xFAD (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015), se comprobó también la influencia de la atenuación de la inflamación en general, y de la expresión de IL-1 β en particular, sobre los niveles de A β ₁₋₄₂ y placas neuríticas. Los resultados que obtuvimos muestran que el tratamiento con minociclina producía efectos opuestos a los conseguidos con la inhibición genética de FAAH. En ratones 5xFAD tratados con minociclina, se produjo un descenso del acúmulo de placas en hipocampo, mientras que en los 5xFAD/FAAH^{-/-} se revirtió la bajada del acúmulo de placas, así como el de los niveles de A β ₁₋₄₂ conseguidas por la inhibición genética de FAAH en esta misma región cerebral. Además, los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} resultaron ser sensibles al bloqueo de IL-1 β por parte de la minociclina, ya que el tratamiento provocó que solo en ellos aumentaran los niveles de A β ₁₋₄₂, tanto en corteza como en hipocampo. El empeoramiento de la patología amiloide tras un tratamiento anti-inflamatorio en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} parece indicar que los elevados niveles de AEA en dichos ratones influyen en el incremento de niveles de expresión de IL-1 β , favorecedores en la resolución de la patología. No obstante, la deposición de placas en corteza no se correlaciona con la ocurrida en hipocampo, ya que en corteza no existen diferencias entre ninguno de los grupos de estudio. No tenemos explicación biológica para dichas diferencias. Sin embargo, durante la cuantificación mediante análisis de imagen, ya observamos repetidamente un menor número de placas en corteza respecto de hipocampo, en todos los grupos, de manera que las diferencias entre áreas cerebrales en cuanto a la deposición amiloide puede que sustenten algunos efectos observados, como las diferencias de expresión de IL-10 entre corteza e hipocampo, posiblemente dependiente del fenotipo, o subtipo microglial, mencionado con anterioridad.

Existen referencias en las que se demuestra el carácter neuroprotector de la minociclina en el contexto de la EA, ya que su acción anti-inflamatoria, anti-oxidativa y anti-apoptótica, se ve directamente relacionada con la prevención de la deposición de A β . Ferretti y cols. (Ferretti *et al.*, 2012), empleando el modelo murino de EA, McGill-Thy1-APP, demostraron que la minociclina reducía la producción de A β mediante el

bloqueo de la activación de NF- κ B, y en consecuencia, el de la actividad de BACE1. No obstante, también observaron una reducción de los niveles de APP, lo que podría contribuir al descenso de A β . Además, cada vez hay más datos que sustentan la importancia de la respuesta inflamatoria en el contexto de la patología amiloide (Krstic & Knuesel, 2012; Heppner *et al.*, 2015; Zhang & Jiang, 2015), como por ejemplo, que el A β es un inductor de la activación del NLRP3, responsable de la activación de la IL-1 β (Heneka *et al.*, 2013). Los datos publicados por Ferreti y cols. (Ferretti *et al.*, 2012) apoyarían los efectos beneficiosos que hemos observado en ratones 5xFAD bajo tratamiento con minociclina, ya que en ellos se produce una disminución de la deposición de A β en hipocampo asociada a la reducción en la activación de la IL-1 β . Sin embargo, dichas evidencias se contraponen a lo que hemos observado en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. Tras el tratamiento con minociclina, detectamos en estos ratones una disminución de la proteína IL-1 β mucho más pronunciada, e incluso de la propia expresión, pero, por el contrario, observamos un empeoramiento en la evolución patológica de estos animales, al darse un aumento de placas en hipocampo, y de niveles de A β ₁₋₄₂ totales tanto en hipocampo como corteza. De nuevo, podemos recurrir a los trabajos de Shaftel y cols. (Shaftel *et al.*, 2007), así como los de Matousek y cols. (Matousek *et al.*, 2012), para resaltar la importancia de la IL-1 β en el fomento de la actividad microglial promotora de la eliminación de placas, e incluso a nuestros resultados obtenidos tras la caracterización del fenotipo microglial, y de las propiedades fagocíticas de los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} (explicado en el siguiente apartado). No obstante, Tachida y cols. (Tachida *et al.*, 2008) describieron otra posible vía de actuación de la IL-1 β , por la cual, tras dar lugar a un aumento de la actividad de la enzima convertidora de la TNF α (TACE), se favorecía el procesamiento proteolítico de APP por la ruta no amiloidogénica, en células de neuroblastoma humanas SK-N-SH. Queda por demostrar, sin embargo, si esta última vía de actuación de la IL-1 β se reproduce en *in vivo*.

La inhibición genética de FAAH favorece un fenotipo microglial pro-inflamatorio con mayor actividad fagocítica en el contexto de la patología amiloide

Tal y como mencionamos previamente (ver resultados *in vitro*), el tipo celular con mayor capacidad fagocítica en el SNC es la microglía (Zhang *et al.*, 2014; Heneka *et al.*, 2015). La fagocitosis es un proceso muy importante en el contexto de la patología amiloide, puesto que favorece la retirada de los depósitos de A β ₁₋₄₂ del parénquima

celular, así como de *debris* celular y elementos que favorezcan el mantenimiento de la respuesta neuroinflamatoria. Por tanto, con el objetivo de conocer los mecanismos que llevan a la disminución del A β ₁₋₄₂ en corteza e hipocampo, así como a la disminución de placas en hipocampo en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, se caracterizó el fenotipo microglial y la actividad fagocítica de la microglía de estos ratones.

Los resultados derivados de la cuantificación de la microglía existente en cerebros de ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}, así como la proporción de células M1 y M2 existentes en la población microglial, reveló que los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} tenían menor número de células, aunque de fenotipo M1 mayoritariamente. Estos resultados concuerdan con resultados previos obtenidos en nuestro grupo, donde se describió mediante técnicas de inmunohistoquímica que existía una menor microgliosis, aunque de fenotipo más “reactivo”, en hipocampo de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} respecto de sus homólogos 5xFAD (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015).

Cuando evaluamos la actividad fagocítica de la microglía, pudimos comprobar que en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} existía un mayor número de células de microglía con methoxy X04 en su interior (indicativo de la fagocitosis de péptido A β depositado), respecto de microglía procedente de ratones 5xFAD.

Estos resultados nos presentan de nuevo la relación paradójica existente entre el perfil pro-inflamatorio y los efectos beneficiosos en cuanto a la resolución de la patología amiloide, descrita hasta la fecha por nuestro grupo de investigación (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015). Como ya hemos mencionado anteriormente, la clasificación del fenotipo microglial en M1 y M2 resulta ser más compleja, puesto que existen estadios intermedios, así como subtipos microgliales según la región, tiempo, y homeostasis cerebral, que disponen de funciones específicas para cada subtipo microglial (Grabert *et al.*, 2016; Mecha *et al.*, 2016; Tang & Le, 2016; Masuda *et al.*, 2019; Stratoulis *et al.*, 2019). Sin embargo, un estadio microglial que recoge las propiedades que hemos descrito en la (micro)glía FAAH^{-/-} es el denominado “estado de preparación” o *priming*, el cual hemos introducido anteriormente (ver discusión de datos *in vitro*). Las células en dicho estado se caracterizan por mostrar un fenotipo pro-inflamatorio, a la vez que sus capacidades fagocíticas se encuentran intactas, favoreciendo así un estado de alerta que permita una respuesta más eficiente ante la presencia de un estímulo nocivo (Heneka *et al.*, 2015).

En la actividad fagocítica de la microglía se han descrito varios receptores importantes en el proceso, encargados de detectar la presencia del péptido A β para iniciar el proceso de fagocitosis. Entre estos receptores se encuentra el CD200, CD33,

los receptores “scavenger”, o el TREM-2. Este último ha cobrado gran importancia en el contexto de la EA, puesto que algunas variaciones genéticas de este gen han sido relacionadas con la disminución de la actividad fagocítica de la microglía, y en consecuencia, con una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad (Heneka *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2018). De manera similar a lo que ocurre con TREM-2, un SNP en el gen condificante para el receptor CD33 se relaciona con la disfunción fagocítica de la microglía, la cual favorece la evolución de la EA en caso de darse en las personas que lo porten (Heneka *et al.*, 2015). Por ello, sería interesante tener en cuenta el estudio de algunos de estos receptores a la hora de profundizar en la caracterización de las propiedades fagocíticas de la microglía FAAH^{-/-} en futuros experimentos.

El tratamiento con minociclina disminuye la capacidad de adquisición de memoria espacial en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}

Hasta este punto, nuestros datos sustentan la hipótesis de partida de que un tratamiento anti-inflamatorio que inhiba la expresión y producción de IL-1 β , revierte los efectos beneficiosos logrados en la evolución de la patología amiloide cuando existe un aumento del tono endocannabinoide, y concretamente, de la AEA. Sin embargo, es sabido que la acumulación del A β en cerebro es necesaria, pero no suficiente, para dar lugar a un deterioro cognitivo (Sperling *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2014). Por ello, llevamos a cabo la evaluación de la memoria espacial de los ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}, tratados con vehículo o con minociclina. El objetivo fue conocer si, tal y como vienen apuntando los resultados de las distintas pruebas bioquímicas presentadas y discutidas hasta ahora, la inhibición de la expresión y producción de IL-1 β da pie a efectos deletéreos en la memoria espacial de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, así como a efectos beneficiosos en los 5xFAD. Los resultados obtenidos muestran que, efectivamente, los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} realizan peor la prueba de memoria espacial del MWM cuando son tratados con minociclina, mientras que ocurre lo contrario en el grupo 5xFAD tratado con el fármaco. Una vez más, estos datos apoyan nuestra hipótesis de partida, confirmando la importancia del contexto pro-inflamatorio, y en particular, de la IL-1 β , en un pronóstico favorable de la EA gracias al aumento de los niveles de la AEA. No obstante, es reseñable que, en esta ocasión, no pudimos confirmar las mejoras cognitivas en los 5xFAD/FAAH^{-/-} con respecto a los 5xFAD debido a la inactivación genética de FAAH, como ya se describió anteriormente en nuestro grupo (Vázquez, Tolón, Grande, *et al.*, 2015). Estas discrepancias entre ambos grupos de datos pueden deberse a cambios en factores críticos a controlar en esta prueba de

memoria, como la temperatura del agua, o alteraciones puntuales del ruido durante los días de evaluación. Temperaturas del agua que causen un descenso o ascenso importante de la temperatura corporal del animal pueden influir considerablemente en el aprendizaje durante la prueba de MWM, de manera que suele establecerse como rango aceptable una temperatura de entre 20 y 22° C (Vorhees & Williams, 2014). Para los datos presentados en esta tesis, la temperatura del agua se mantuvo en un rango de 19-21° C, mientras que los datos presentados anteriormente por nuestro grupo fueron obtenidos trabajando con un rango de temperatura de entre 22-24° C. Es difícil evaluar cuán influyente pueden llegar a ser estas diferencias de 1-3 °C, pero, en cualquier caso, y debido a la diferencia entre ambos lotes de datos, es un aspecto a tener en cuenta para futuras evaluaciones. A pesar de esto, los cuatro grupos experimentales empleados para la realización de la prueba de MWM (5xFAD vehículo, 5xFAD/FAAH^{-/-} vehículo, 5xFAD tratados con minociclina y 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con minociclina), fueron evaluados exactamente con los mismos parámetros de temperatura y luz. Esto quiere decir que los datos derivados de esta prueba de memoria espacial resultan esclarecedores en cuanto a la importancia de la pro-inflamación en ratones 5xFAD sin actividad FAAH.

En la figura 50 se presenta un resumen ilustrativo de los cambios descritos en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con minociclina.

En resumen, los resultados obtenidos y presentados en esta tesis demuestran una vez más, aunque a pequeña escala, la compleja participación del SEC en diversos procesos fisiopatológicos. Actualmente no existen terapias ni tratamientos eficaces para curar la EA, debido en gran parte a la complejidad de su patología, que se caracteriza no solo por la existencia de la deposición de proteínas tóxicas en el cerebro, sino también, por una respuesta inflamatoria, oxidativa y excitotóxica. Precisamente por su amplia participación en diferentes procesos, el SEC se presenta como un potente candidato a explorar para el abordaje del tratamiento de la EA y otras patologías neurodegenerativas, ya que se ve involucrado en los procesos afectados durante el proceso patológico. Los resultados presentados en esta tesis doctoral sugieren la necesidad de estudiar el SEC, con el objetivo de ir desgranando cada una de sus funciones y, quizá en un futuro no muy lejano, poder emplearlo como diana terapéutica para el tratamiento de la EA.

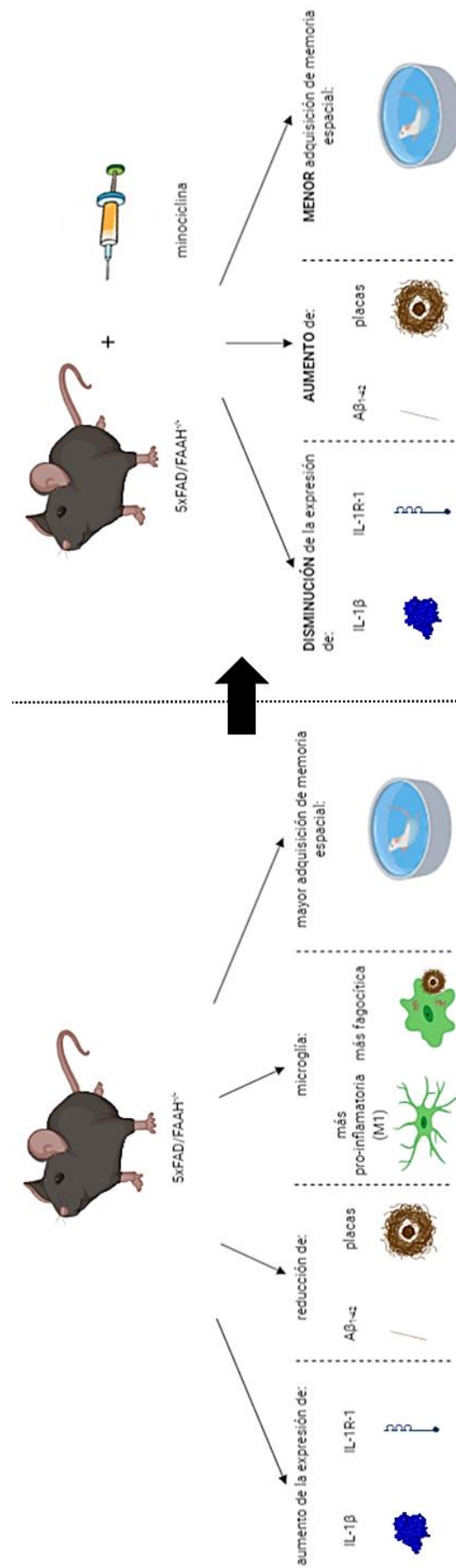


Figura 50: Representación ilustrativa de los cambios producidos en ratones 5xFAD tras la inactivación genética de FAAH

CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados obtenidos en la aproximación *in vitro*, pudimos establecer las siguientes conclusiones:

1. La inhibición genética de FAAH modifica el perfil inflamatorio de la glía, al inducir la sobre-expresión de IL-1 β y otros componentes relacionados con su sistema de transmisión.
2. La inactivación genética de FAAH da lugar a una mayor expresión de HC de Cx43 en la membrana plasmática de la glía.
3. La disminución de los niveles de AEA inducida por A β ₁₋₄₂ es prevenida en la ausencia de actividad FAAH.

Los resultados derivados de la aproximación *in vivo* nos permiten concluir lo siguiente:

1. La inactivación genética de FAAH en el modelo animal 5xFAD da lugar a la sobre-expresión de la citoquina IL-1 β y otros componentes relacionados con su sistema de transmisión.
2. La inactivación genética de FAAH se relaciona con una disminución de la microgliosis y con un aumento del fenotipo pro-inflamatorio de dicha microglía (M1). Además, su actividad fagocítica resulta ser más eficaz.
3. El tratamiento con minociclina bloquea la producción de la IL-1 β con efectos opuestos en ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}. Así, mientras que en ratones 5xFAD produce una bajada de los niveles de A β ₁₋₄₂ y de su deposición, con la consiguiente mejoría comportamental, en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} la minociclina produce efectos antagónicos.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Afonina, I.S., Müller, C., Martin, S.J., & Beyaert, R. (2015) Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, **42**, 991–1004.
- Ahn, K., Johnson, D.S., & Cravatt, B.F. (2009) Fatty acid amide hydrolase as a potential therapeutic target for the treatment of pain and CNS disorders. *Expert Opin. Drug Discov.*, **4**, 763–784.
- Ahn, K., McKinney, M.K., & Cravatt, B.F. (2008) Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem. Rev.*, **108**, 1687–1707.
- Alarcón, R., Fuenzalida, C., Santibáñez, M., & Von Bernhardi, R. (2005) Expression of scavenger receptors in glial cells: Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound β -amyloid. *J. Biol. Chem.*, **280**, 30406–30415.
- Alzforum (2015) Brain Banks for Alzheimer's, Parkinson's Remain Underused [WWW Document]. URL <https://www.alzforum.org/news/community-news/brain-banks-alzheimers-parkinsons-remain-underused>
- Antibodies Incorporated (2019) Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) [WWW Document]. URL <https://www.antibodiesinc.com/products/glial-fibrillary-acidic-protein-gfap>
- Aso, E. & Ferrer, I. (2014) Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Front. Pharmacol.*, **5**.
- Ativie, F., Albayram, O., Bach, K., Pradier, B., Zimmer, A., & Bilkei-Gorzo, A. (2015) Enhanced microglial activity in FAAH^{-/-} animals. *Life Sci.*, **138**, 52–56.
- Atri, A. (2019) The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum. *Med. Clin. North Am.*, **103**, 263–293.
- Baggelaar, M.P., Maccarrone, M., & van der Stelt, M. (2018) 2-Arachidonoylglycerol: A signaling lipid with manifold actions in the brain. *Prog. Lipid Res.*, **71**, 1–17.
- Barber, R.C. (2012) The genetics of Alzheimer's disease. *Sci.*, **2012**, 246210.
- Basavarajappa, B.S., Shivakumar, M., Joshi, V., & Subbanna, S. (2017) Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *J. Neurochem.*, **142**, 624–648.
- Beaudoin, G.M.J., Lee, S.-H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y.-G., Reichardt, L.F., & Arikath, J. (2012) Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat. Protoc.*, **7**, 1741–1754.
- Bedse, G., Romano, A., Lavecchia, A.M., Cassano, T., & Gaetani, S. (2014) The role of endocannabinoid signaling in the molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.*, **43**, 1115–1136.
- Benito, C., Núñez, E., Tolón, R.M., Carrier, E.J., Rábano, A., Hillard, C.J., & Romero, J. (2003) Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J. Neurosci.*, **23**, 11136–11141.
- Benito, C., Tolón, R.M., Castillo, A.I., Ruiz-Valdepeñas, L., Martínez-Orgado, J.A., Fernández-Sánchez, F.J., Vázquez, C., Cravatt, B.F., & Romero, J. (2012) β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB 1 or CB 2 receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **166**, 1474–1489.
-

- Bilkei-Gorzo, A., Albayram, O., Draffehn, A., Michel, K., Piyanova, A., Oppenheimer, H., Dvir-Ginzberg, M., Rácz, I., Ulas, T., Imbeault, S., Bab, I., Schultze, J.L., & Zimmer, A. (2017) A chronic low dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat. Med.*, **23**, 782–787.
- Biocare Medical (2019) Microglia Antibody [WWW Document]. URL <https://biocare.net/product/microglia-antibody/>
- Bosch, M. & Kielian, T. (2014) Hemichannels in neurodegenerative diseases: is there a link to pathology? *Front. Cell. Neurosci.*, **8**.
- Boza-Serrano, A., Yang, Y., Paulus, A., & Deierborg, T. (2018) Innate immune alterations are elicited in microglial cells before plaque deposition in the Alzheimer's disease mouse model 5xFAD. *Sci. Rep.*, **8**, 1550.
- Broersen, K., Jonckheere, W., Rozenski, J., Vandersteen, A., Pauwels, K., Pastore, A., Rousseau, F., & Schymkowitz, J. (2011) A standardized and biocompatible preparation of aggregate-free amyloid beta peptide for biophysical and biological studies of Alzheimer's disease. *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 743–750.
- Brown, M.R.D. & Farquhar-Smith, W.P. (2018) Cannabinoids and cancer pain: A new hope or a false dawn? *Eur. J. Intern. Med.*, **49**, 30–36.
- Burt, P. & Adelson, E. (1983) The Laplacian Pyramid as a Compact Image Code. *IEEE Trans. Commun.*, **31**, 532–540.
- Calsolaro, V. & Edison, P. (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's Dement.*, **12**, 719–732.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., & Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816–824.
- Chakrabarty, P., Herring, A., Ceballos-Diaz, C., Das, P., & Golde, T.E. (2011) Hippocampal expression of murine TNF α results in attenuation of amyloid deposition in vivo. *Mol. Neurodegener.*, **6**, 16.
- Chakrabarty, P., Li, A., Ceballos-Diaz, C., Eddy, J.A., Funk, C.C., Moore, B., Dinunno, N., Rosario, A.M., Cruz, P.E., Verbeeck, C., Sacino, A., Nix, S., Janus, C., Price, N.D., Das, P., & Golde, T.E. (2015) IL-10 Alters Immunoproteostasis in APP mice, Increasing Plaque Burden and Worsening Cognitive Behavior. *Neuron*, **85**, 519–533.
- Chen, G.-F., Xu, T.-H., Yan, Y., Zhou, Y.-R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, E. (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sin.*, **38**, 1205–1235.
- Christina Patterson (2018) Informe mundial sobre el Alzheimer 2018.
- Coman, H. & Nemeş, B. (2017) New Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease. *Int. J. Gerontol.*, **11**, 2–6.
- Cousty, J., Bertrand, G., Najman, L., & Couprie, M. (2009) Watershed Cuts: Minimum Spanning Forests and the Drop of Water Principle. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, **31**, 1362–1374.
- Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., & Lichtman, A.H. (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *PNAS*, **98**, 9371–9376.

-
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., & Gilula, N.B. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, **384**, 83–87.
- Dahm, R. (2006) Alzheimer's discovery. *Curr. Biol.*, **16**, R906–R910.
- Daniels, M.J.D. & Brough, D. (2017) Unconventional Pathways of Secretion Contribute to Inflammation. *Int J. Mol. Sci.*, **18**, 102.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., & Howlett, A.C. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.*, **34**, 605–613.
- Devane, W.A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., 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 (80-.)*, **258**, 1946–1949.
- Di Marzo, V., Stella, N., & Zimmer, A. (2015) Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat Rev. Neurosci.*, **16**, 30–42.
- Dinarello, C.A. (2009) Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.*, **27**, 519–550.
- Dinarello, C.A., Simon, A., & Van Der Meer, J.W.M. (2012) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 633–652.
- Du, X., Wang, X., & Geng, M. (2018) Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl. Neurodegener.*, **7**, 1–7.
- Duthey, B. (2013) Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias, World Health Organization.
- Felzenszwalb, P.F. & Huttenlocher, D.P. (2012) Distance Transforms of Sampled Functions. *Theory Comput.*, **8**, 415–428.
- Fernández-Ruiz, J., Romero, J., & Ramos, J.A. (2015) Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. pp. 233–259.
- Ferretti, M.T., Allard, S., Partridge, V., Ducatenzeiler, A., & Cuello, A.C. (2012) Minocycline corrects early, pre-plaque neuroinflammation and inhibits BACE-1 in a transgenic model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology. *J. Neuroinflammation*, **9**, 62.
- Freitas-Andrade, M. & Naus, C.C. (2016) Astrocytes in neuroprotection and neurodegeneration: The role of connexin43 and pannexin1. *Neuroscience*, **323**, 207–221.
- Froger, N., Orellana, J.A., Cohen-Salmon, M., Ezan, P., Amigou, E., Sáez, J.C., & Giaume, C. (2009) Cannabinoids prevent the opposite regulation of astroglial connexin43 hemichannels and gap junction channels induced by pro-inflammatory treatments. *J. Neurochem.*, **111**, 1383–1397.
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Fur, G., & Casellas, P. (1995) Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 54–61.
-

- Gaoni, Y. & Mechoulam, R. (1964) Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1646–1647.
- García, M.C., Cinquina, V., Palomo-Garo, C., Rábano, A., & Fernández-Ruiz, J. (2015) Identification of CB2 receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, **587**, 1–4.
- Garman, R.H. (2011) Histology of the Central Nervous System. *Toxicol. Pathol.*,.
- Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A., & Gálvez, J. (2013) Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br. J. Pharmacol.*, **169**, 337–352.
- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C.C., & Sáez, J.C. (2013) Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: Properties, pharmacology, and roles. *Front. Pharmacol.*, **4**.
- Gonzalez, R.C. & Woods, R.E. (2008) *Digital Image Processing Third Edition*, Third Edit. edn. Pearson.
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M.H., Clohisey, S., Kenneth Baillie, J., Stevens, M.P., Freeman, T.C., Summers, K.M., & McColl, B.W. (2016) Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat. Neurosci.*, **19**, 504–516.
- Guedes, J.R., Lao, T., Cardoso, A.L., & El Khoury, J. (2018) Roles of Microglial and Monocyte Chemokines and Their Receptors in Regulating Alzheimer's Disease-Associated Amyloid- β and Tau Pathologies. *Front. Neurol.*, **9**, 549.
- Guillot-Sestier, M.-V., Doty, K.R., Gate, D., Rodriguez, J., Pak, B., Leung, Y., Rezai-Zadeh, K., & Town, T. (2015) Il10 deficiency re-balances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron*, **85**, 534–548.
- Gustin, A., Kirchmeyer, M., Koncina, E., Felten, P., Losciuto, S., Heurtaux, T., Tardivel, A., Heuschling, P., & Dostert, C. (2015) NLRP3 inflammasome is expressed and functional in mouse brain microglia but not in astrocytes. *PLoS One*, **10**, e0130624.
- Hansen, D.B., Ye, Z.C., Calloe, K., Braunstein, T.H., Hofgaard, J.P., Ransom, B.R., Nielsen, M.S., & MacAulay, N. (2014) Activation, permeability, and inhibition of astrocytic and neuronal large pore (Hemi)channels. *J. Biol. Chem.*, **289**, 26058–26073.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J. El, Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., & Kummer, M.P. (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's Disease HHS Public Access. *Lancet Neurol*, **14**, 388–405.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. (2013) NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice HHS Public Access. *Nature*, **493**, 674–678.
- Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., & Becher, B. (2015) Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**, 358–372.

- Hippius, H. & Neundörfer, G. (2003) The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.*, **5**, 101–108.
- Hoshino, M. (2017) Fibril formation from the amyloid- β peptide is governed by a dynamic equilibrium involving association and dissociation of the monomer. *Biophys. Rev.*, **9**, 9–16.
- Howlett, A.C. (1984) Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sci.*, **35**, 1803–1810.
- Hu, S.S.J. & Mackie, K. (2015) Distribution of the endocannabinoid system in the central nervous system. In *Endocannabinoids*. pp.59–93.
- Jara-Oseguera, A., Simon, S., & Rosenbaum, T. (2010) TRPV1: On the Road to Pain Relief. *Curr. Mol. Pharmacol.*, **1**, 255–269.
- Jung, K.M., Astarita, G., Yasar, S., Vasilevko, V., Cribbs, D.H., Head, E., Cotman, C.W., & Piomelli, D. (2012) An amyloid β 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, **33**, 1522–1532.
- Justinová, Z., Yasar, S., Redhi, G.H., & Goldberg, S.R. (2011) The Endogenous Cannabinoid 2-Arachidonoylglycerol Is Intravenously Self-Administered by Squirrel Monkeys. *J. Neurosci.*, **31**, 7043–7048.
- Kajiwara, Y., Wang, E., Wang, M., Sin, W.C., Brennand, K.J., Schadt, E., Naus, C.C., Buxbaum, J., & Zhang, B. (2018) GJA1 (connexin43) is a key regulator of Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol. Commun.*, **6**, 144.
- Kim, H.-S. & Suh, Y.-H. (2009) Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav. Brain Res.*, **196**, 168–179.
- Kinney, J.W., Bemiller, S.M., Murtishaw, A.S., Leisgang, A.M., Salazar, A.M., & Lamb, B.T. (2018) Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.*, **4**, 575–590.
- Koulakoff, A., Mei, X., Orellana, J.A., Sáez, J.C., & Giaume, C. (2012) Glial connexin expression and function in the context of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, **1818**, 2048–2057.
- Krstic, D. & Knuesel, I. (2012) Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev. J. Neurol.*, **9**, 25–34.
- Kuruva, C.S. & Reddy, P.H. (2017) Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Drug Discov. Today*, **22**, 223–233.
- La planta (2019) La historia del cannabis en la China [WWW Document]. URL <https://laplantacannabis.ca/cannabis-en-la-china>
- Lafaye, G., Karila, L., Blecha, L., & Benyamina, A. (2017) Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues Clin. Neurosci.*, **19**, 309–316.
- Lane, C.A., Hardy, J., & Schott, J.M. (2018) Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.*, **25**, 59–70.
- Li, Y. & Kim, J. (2015) Neuronal Expression of CB2 Cannabinoid Receptor mRNAs in the Mouse

- Hippocampus HHS Public Access. *Neuroscience*, **311**, 253–267.
- López, A., Aparicio, N., Pazos, M.R., Grande, M.T., Barreda-Manso, M.A., Benito-Cuesta, I., Vázquez, C., Amores, M., Ruiz-Pérez, G., García-García, E., Beatka, M., Tolón, R.M., Dittel, B.N., Hillard, C.J., & Romero, J. (2018) Cannabinoid CB2 receptors in the mouse brain: Relevance for Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation*, **15**, 158.
- Lu, H.C. & MacKie, K. (2016) An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry*, **79**, 516–525.
- Maccarrone, M. (2017) Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front. Mol. Neurosci.*, **10**.
- Mackie, K. (2008) Cannabinoid receptors: Where they are and what they do. *J. Neuroendocrinol.*, **20**, 10–14.
- Mandelkow, E.M. & Mandelkow, E. (2012) Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a006247.
- Manoharan, S., Guillemín, G.J., Abiramasundari, R.S., Essa, M.M., Akbar, M., & Akbar, M.D. (2016) The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 1–15.
- Marsicano, G. & Lutz, B. (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 4213–4225.
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Böttcher, C., Amann, L., Scheiwe, C., Nessler, S., Kunz, P., van Loo, G., Coenen, V.A., Reinacher, P.C., Michel, A., Sure, U., Gold, R., Priller, J., Stadelmann, C., & Prinz, M. (2019) Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature*, **566**, 388–392.
- Matousek, S.B., Ghosh, S., Shaftel, S.S., Kyrkanides, S., Olschowka, J.A., & Kerry O'banion, M. (2012) Chronic IL-1 β -mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol.*, **7**, 156–164.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., & Bonner, T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**, 561–564.
- Mccoy, M.K. & Tansey, M.G. (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation*, **5**, 45.
- Mecha, M. (2011) An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protoc. Exch.*,.
- Mecha, M., Carrillo-Salinas, F.J., Feliú, A., Mestre, L., & Guaza, C. (2016) Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.*, **166**, 40–55.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., & Vogel, Z. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid

- receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 83–90.
- Mechoulam, R., Braun, P., & Gaoni, Y. (1967) A stereospecific synthesis of (-)-delta 1- and (-)-delta 1(6)-tetrahydrocannabinols. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4552–4554.
- Mechoulam, R. & Parker, L. (2013) The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu. Rev. Psychol.*, **64**, 21–47.
- Mohandas, E., Rajmohan, V., & Raghunath, B. (2009) Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J. Psychiatry*, **51**, 55–61.
- Molina-Holgado, F. & Molina-Holgado, E. (2019) El sistema endocannabinoide cerebral en la enfermedad de Alzheimer | Fundación CANNA: Investigación y análisis de Cannabis [WWW Document]. URL <https://www.fundacion-canna.es/el-sistema-endocannabinoide-cerebral-en-la-enfermedad-de-alzheimer>
- Morris, G.P., Clark, I.A., & Vissel, B. (2014) Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease **2**, 135.
- Muccioli, G.G., Xu, C., Odah, E., Cudaback, E., Cisneros, J.A., Lambert, D.M., Lopez Rodriguez, M.L., Bajjalieh, S., & Stella, N. (2007) Identification of a Novel Endocannabinoid-Hydrolyzing Enzyme Expressed by Microglial Cells. *J. Neurosci.*, **27**, 2883–2889.
- Munro, S., Thomas, K.L., & Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**, 61–65.
- Murphy, P.M. & LeVine, H.I. (2010) Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *J. Alzheimers Dis.*, **19**, 311.
- Navarrete, M. & Araque, A. (2014) The Cajal school and the physiological role of astrocytes: a way of thinking. *Front. Neuroanat.*, **8**.
- Navarrete, M., Díez, A., & Araque, A. (2014) Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Astrocytes endocannabinoid signalling. Phil. Trans. R. Soc. B*, **369**, 20130599.
- Navarro, V., Sanchez-Mejias, E., Jimenez, S., Muñoz-Castro, C., Sanchez-Varo, R., Davila, J.C., Vizuete, M., Gutierrez, A., & Vitorica, J. (2018) Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Front. Aging Neurosci.*, **10**, 140.
- Nielsen, B.S., Hansen, D.B., Ransom, B.R., Nielsen, M.S., & MacAulay, N. (2017) Connexin Hemichannels in Astrocytes: An Assessment of Controversies Regarding Their Functional Characteristics. *Neurochem. Res.*, **42**, 2537–2550.
- Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017) Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*, **32**, 523–532.
- O'Sullivan, S.E. (2016) An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.*, **173**, 1899–1910.
- Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006) Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J. Neurosci.*, **26**, 10129–10140.

- Office for National Statistics (2017) Deaths registered in England and Wales (series DR) - Office for National Statistics [WWW Document]. URL <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/birthsdeathsandmarriages/deaths/bulletins/deathsregisteredinenglandandwalesseriesdr/2017>
- Orellana, J.A., Shoji, K.F., Abudara, V., Ezan, P., Amigou, E., Saez, P.J., Jiang, J.X., Naus, C.C., Saez, J.C., & Giaume, C. (2011) Amyloid b -Induced Death in Neurons Involves Glial and Neuronal Hemichannels. *J. Neurosci.*, **31**, 4962–4977.
- Parzen, E. (1962) On Estimation of a Probability Density Function and Mode. *Ann. Math. Stat.*, **33**, 1065–1076.
- Perez-Nievas, B.G. & Serrano-Pozo, A. (2018) Deciphering the Astrocyte Reaction in Alzheimer’s Disease. *Front. Aging Neurosci.*, **10**, 114.
- Pul, R., Chittappen, K.P., & Stangel, M. (2013) Quantification of Microglial Phagocytosis by a Flow Cytometer-Based Assay. pp. 121–127.
- Querfurth, H.W. & LaFerla, F.M. (2010) Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.*, **362**, 329–344.
- Ramirez, B.G. (2005) Prevention of Alzheimer’s Disease Pathology by Cannabinoids: Neuroprotection Mediated by Blockade of Microglial Activation. *J. Neurosci.*, **25**, 1904–1913.
- Ranchordas, A., Pereira, J.M., Araújo, H.J., & Tavares, J.M.R.S. (2009) Computer Vision, Imaging and Computer Graphics. Theory and Applications. In Ranchordas, A., Pereira, J.M., Araújo, H.J., & Tavares, J.M.R.S. (eds), *Communications in Computer and Information Science, Communications in Computer and Information Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Ransohoff, R.M. & Brown, M.A. (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J. Clin. Invest.*, **122**, 1164–1171.
- Retamal, M.A., Froger, N., Palacios-Prado, N., Ezan, P., Sáez, P.J., Sáez, J.C., & Giaume, C. (2007) Cx43 Hemichannels and Gap Junction Channels in Astrocytes Are Regulated Oppositely by Proinflammatory Cytokines Released from Activated Microglia. *J. Neurosci.*, **27**, 13781–13792.
- Romero, J., Hillard, C.J., Calero, M., & Rábano, A. (2002) Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: An immunohistochemical study. *Mol. Brain Res.*, **100**, 85–93.
- Rosenbaum, T. & Simon, S.A. (2007) *TRPV1 Receptors and Signal Transduction*, TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. CRC Press/Taylor & Francis.
- Sáez, J.C., Retamal, M.A., Basilio, D., Bukauskas, F.F., & Bennett, M.V.L. (2005) Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, **1711**, 215–224.
- Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., & Monge-Bonilla, C. (2017) Molecular Pathogenesis of Alzheimer’s Disease: An Update. *Ann Neurosci*, **24**, 46–54.
- Scheller, A. & Kirchhoff, F. (2016) Endocannabinoids and Heterogeneity of Glial Cells in Brain Function. *Front. Integr. Neurosci.*, **10**, 24.
- Schott, J., Reitter, S., Philipp, J., Haneke, K., Schäfer, H., & Stoeklin, G. (2014) Translational Regulation of Specific mRNAs Controls Feedback Inhibition and Survival during Macrophage Activation. *PLoS*

- Genet*, **10**, e1004368.
- Sengupta, U., Nilson, A.N., & Kaye, R. (2016) The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*, **6**, 42–49.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., & Hyman, B.T. (2011) Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Prospect Med*, **1**, a006189.
- Shaftel, S.S., Kyrkanides, S., Olschowka, J.A., Miller, J.-N.H., Johnson, R.E., & Kerry O'Banion, M. (2007) Sustained hippocampal IL-1 β overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J. Clin. Invest.*, **117**, 1595–1604.
- Simi, A., Lerouet, D., Pinteaux, E., & Brough, D. (2007) Mechanisms of regulation for interleukin-1 β in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, **52**, 1563–1569.
- Sims, J.E. & Smith, D.E. (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 89–102.
- Soille, P. (2013) *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack Jr, C.R., Kaye, J., Montine, T.J., Park, D.C., Reiman, E.M., Rowe, C.C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M.C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M. V., & Phelps, C.H. (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging - Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease NIH Public Access Author Manuscript. *Alzheimers Dement*, **7**, 280–292.
- Stratoulis, V., Venero, J.L., Tremblay, M., & Joseph, B. (2019) Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J.*, **38**, e101997.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., & Waku, K. (1995) 2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 89–97.
- Svíženská, I., Dubový, P., & Šulcová, A. (2008) Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - A short review. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **90**, 501–511.
- Tachida, Y., Nakagawa, K., Saito, T., Saido, T.C., Honda, T., Saito, Y., Murayama, S., Endo, T., Sakaguchi, G., Kato, A., Kitazume, S., & Hashimoto, Y. (2008) Interleukin-1 β up-regulates TACE to enhance α -cleavage of APP in neurons: Resulting decrease in A β production. *J. Neurochem.*, **104**, 1387–1393.
- Tang, Y. & Le, W. (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.*, **53**, 1181–1194.
- Tham, C.S., Whitaker, J., Luo, L., & Webb, M. (2007) Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Lett.*, **581**, 2899–2904.
- Tudurí, E., Imbernon, M., Hernández-Bautista, R.J., Tojo, M., Fernø, J., Diéguez, C., & Nogueiras, R. (2017) GPR55: a new promising target for metabolism? *J. Mol. Endocrinol.*, **58**, R191–R202.
- Turcotte, C., Chouinard, F., Lefebvre, J.S., & Flamand, N. (2015) Regulation of inflammation by

- cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl-glycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites. *J. Leukoc. Biol.*, **97**, 1049–1070.
- van der Stelt, M., Mazzola, C., Esposito, G., Matias, I., Petrosino, S., Filippis, D. De, Micale, V., Steardo, L., Drago, F., Iuvone, T., & Marzo, V. Di (2006) Endocannabinoids and β -amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cell. Mol. Life Sci. C.*, **63**, 1410–1424.
- Vázquez, C., Tolón, R.M., Grande, M.T., Caraza, M., Moreno, M., Koester, E.C., Villaescusa, B., Ruiz-Valdepeñas, L., Fernández-Sánchez, F.J., Cravatt, B.F., Hillard, C.J., & Romero, J. (2015) Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation. *Neurobiol. Aging*, **36**, 3008–3019.
- Vázquez, C., Tolón, R.M., Pazos, M.R., Moreno, M., Koester, E.C., Cravatt, B.F., Hillard, C.J., & Romero, J. (2015) Endocannabinoids regulate the activity of astrocytic hemichannels and the microglial response against an injury: In vivo studies. *Neurobiol. Dis.*, **79**, 41–50.
- Vorhees, C. V. & Williams, M.T. (2006) Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.*, **1**, 848–858.
- Vorhees, C. V. & Williams, M.T. (2014) Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.*, **55**, 310–332.
- Welser, J. V. & Milner, R. (2012) Use of astrocyte-microglial cocultures to examine the regulatory influence of astrocytes on microglial activation. *Methods Mol. Biol.*, **814**, 367–380.
- White, C.S., Lawrence, C.B., Brough, D., & Rivers-Auty, J. (2017) Inflammasomes as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Brain Pathol.*, **27**, 223–234.
- Witkamp, R. (2016) Fatty acids, endocannabinoids and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, **785**, 96–107.
- Zaslona, Z., Pålsson-McDermott, E.M., Menon, D., Haneklaus, M., Flis, E., Prendeville, H., Corcoran, S.E., Peters-Golden, M., & O'Neill, L.A.J. (2017) The Induction of Pro-IL-1 β by Lipopolysaccharide Requires Endogenous Prostaglandin E₂ Production. *J. Immunol.*, **198**, 3558–3564.
- Zhang, F. & Jiang, L. (2015) Neuropsychiatric Disease and Treatment Dovepress Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **11**, 243–256.
- Zhang, H.-Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G.-H., Yang, H.-J., Liu, Q.-R., Wu, J., Gardner, E.L., Bonci, A., & Xi, Z.-X. (2017) Expression of Functional Cannabinoid CB₂ Receptor in VTA Dopamine Neurons in Rats HHS Public Access. *Addict Biol*, **22**, 752–765.
- Zhang, H., Su, Y.J., Zhou, W.W., Wang, S.W., Xu, P.X., Yu, X.L., & Liu, R.T. (2014) Activated scavenger receptor promotes glial internalization of A β . *PLoS One*, **9**, 94197.
- Zou, S. & Kumar, U. (2018) Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1–23.

ANEXOS

Anexo I: Cuantificación de la proporción microglía/astrocitos en los cultivos de trabajo

El recuento del número de células de microglía (marcadas por inmunocitoquímica con Iba1- α -rabbit-alexa-488: canal verde) y de astrocitos (marcados con GFAP-Cy3: canal rojo) se llevó a cabo con el programa *Wolfram Mathematica*, aplicando el algoritmo descrito a continuación:

1. En primer lugar, se importaron las imágenes (en extensión .tif), y se seleccionaron según el canal de interés para cada marcaje (anticuerpo-fluoróforo). Es decir, el canal rojo se seleccionó para las imágenes de astrocitos (GFAP-Cy3), el canal verde, para las imágenes de microglía (Iba1- α -rabbit-alexa-488), y el canal azul, para las de los núcleos celulares (DAPI).

2. A continuación, se eliminó el ruido y los píxeles muertos del detector mediante una operación de apertura (*Image Opening*), que consistió en una convolución de la imagen, en cada canal, con una matriz discoidal de 2 píxeles de radio (paso A figuras 1 y 2) (Gonzalez & Woods, 2008).

3. Después, se aplicó un algoritmo de detección de trazos multiescala piramidal (*Pyramid Multiscale Feature Detection*) (paso B figura 1; paso A figura 2), basado en un sub-muestreo gaussiano (*downsampling*) y en un re-muestreo (*upsampling*) laplaciano (Burt & Adelson, 1983). Este algoritmo permite detectar de manera más eficiente los contornos celulares, y minimiza la pérdida de información de las intensidades de fluorescencia capturadas en los distintos planos celulares. Las imágenes obtenidas tras la aplicación de este algoritmo complementarán posteriormente a las imágenes originales.

4. El siguiente paso consistió en la detección de los núcleos correspondientes a la microglía (canal verde). Para ello, se partió de una imagen reconstruida con la operación matemática: $(\text{CanalVerde}-\text{CanalRojo})\times\text{CanalAzul}$. Esta operación permite seleccionar la fluorescencia de aquellos núcleos que, en el Canal Azul, están únicamente sobre un fondo verde, no contaminados con fluorescencia “parásita” del Canal Rojo. Sobre esta imagen, se aplica un binarizado (todo pixel distinto de cero, se iguala a la unidad) basado en el gradiente morfológico de la imagen (Soille, 2013), con un *threshold* doble (superior e inferior). Los valores del *threshold* superior e inferior se calculan a partir de un algoritmo estándar de obtención de *clusters* denominado *K-means* (algoritmo que tiene como objeto dividir n observaciones en k *clusters*, en los que cada observación pertenece al *cluster* con

la media más cercana, sirviendo, por tanto, como prototipo de *cluster*) (Ranchordas *et al.*, 2009). A partir de este binarizado, se cuentan los componentes morfológicos (los núcleos detectados) cuya circularidad sea mayor que 0.2, descartando así los núcleos amontonados (paso C figura 2).

5. Para la segmentación de los núcleos correspondientes a los astrocitos (canal rojo), se comenzó, en este caso, con la reconstrucción de la imagen en dicho canal, aumentada con su detección multiescala: (CanalRojo+Pyramid[CanalRojo])x CanalAzul (paso C figura 1). En el binarizado posterior, se seleccionaron los componentes con circularidad mayor a 0.1 (paso D figura 1).

6. El aglutinamiento de los astrocitos no permite un recuento directo de los núcleos por conteo de componentes morfológicos, como en el caso de la microglía (binarizado morfológico, punto 4). Por este motivo, se recurrió a una transformada de la distancia (Felzenszwalb & Huttenlocher, 2012), con el fin de detectar los centroides nucleares. A partir de estos, se reconstruyó el contorno nuclear con un algoritmo de transformación divisoria de óptima expansión (*watershed cuts*) (Cousty *et al.*, 2009). Cada contorno detectado (con tamaño superior 25 píxeles) se asoció a un núcleo celular (paso E figura 1).

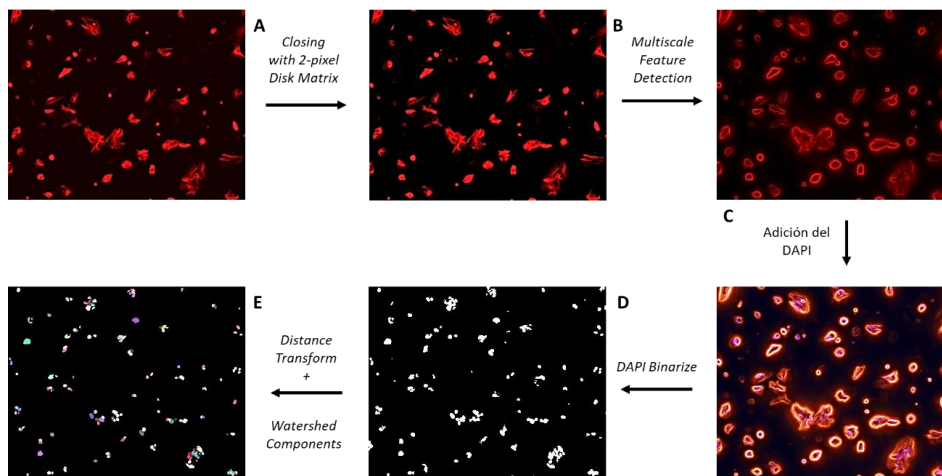


Figura 1: Esquema ilustrado del proceso por el cual, a partir de la imagen original obtenida en el canal rojo (astrocitos marcados con GFAP-Cy3), se cuantifica el número de astrocitos existentes en cada imagen (representación de los puntos 2, 3, 5 y 6).

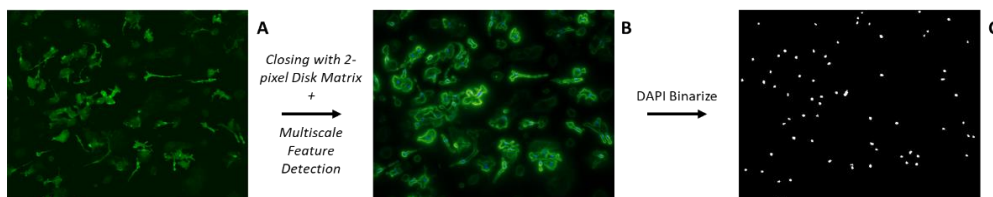


Figura 2: Esquema ilustrado del proceso por el cual, a partir de la imagen original obtenida en el canal verde (microglía marcada con Iba1- α -rabbit-alexa-488), se cuantifica el número de microglía existente en cada imagen (representación de los puntos 2, 3 y 4).

Anexo II: Cuantificación de la captación de BrEt mediante la intensidad de fluorescencia total emitida por célula.

1. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total (IFT)

El proceso llevado a cabo para la cuantificación de la IFT emitida por el BrEt desde el interior de las células fue el siguiente (figura 3):

1. En primer lugar, se extrajo el canal rojo de la imagen, para analizar únicamente la fluorescencia en ese canal.
2. A continuación, se realizó un binarizado basado en el gradiente morfológico de la imagen (igual que el descrito en el punto 4 del anexo I).
3. Después, se multiplica la imagen resultante del binarizado por la imagen original, de manera que los puntos correspondientes al fondo se hacen "cero".
4. Finalmente, se calcula la IFT en el canal rojo, como la suma de intensidades de cada pixel en la imagen del punto 3.

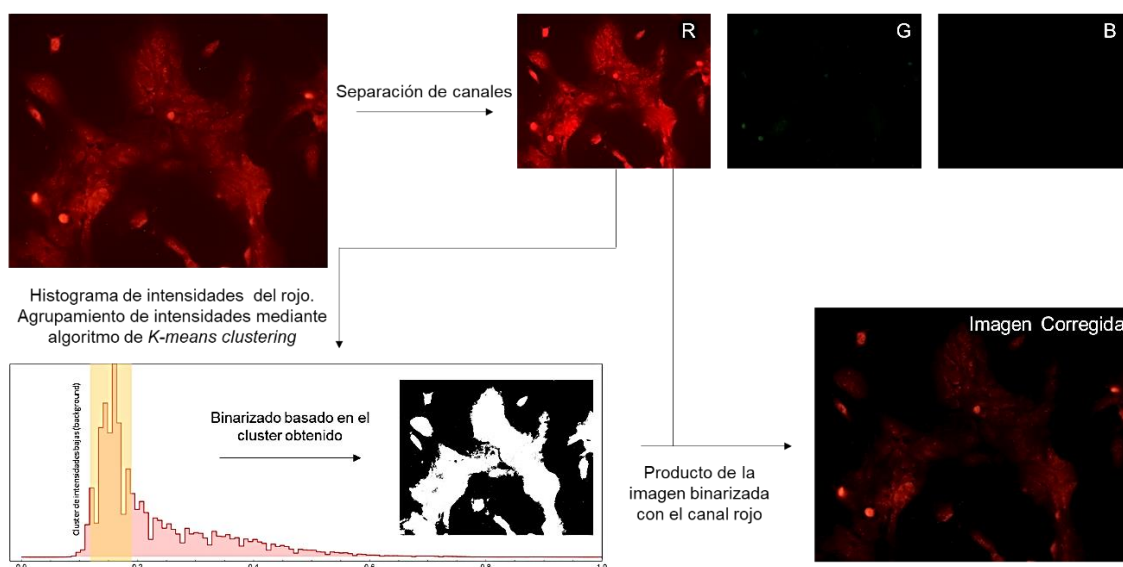


Figura 3: Esquema ilustrado del proceso de cuantificación de la IFT en el canal rojo.

2. Recuento de núcleos.

El primer paso en el cálculo del número de células consistió en la eliminación del fondo de la imagen en el canal azul (DAPI, figura 4A). Para ello, se aplicó un filtro basado en la densidad de intensidad de fluorescencia local (figura 4B). Este método es mucho

más general que aquellos basados en la intensidad de fluorescencia global (contraste y/o saturación de la imagen), ya que diferencian mejor la señal del ruido y no son tan sensibles al umbral de intensidad elegido.

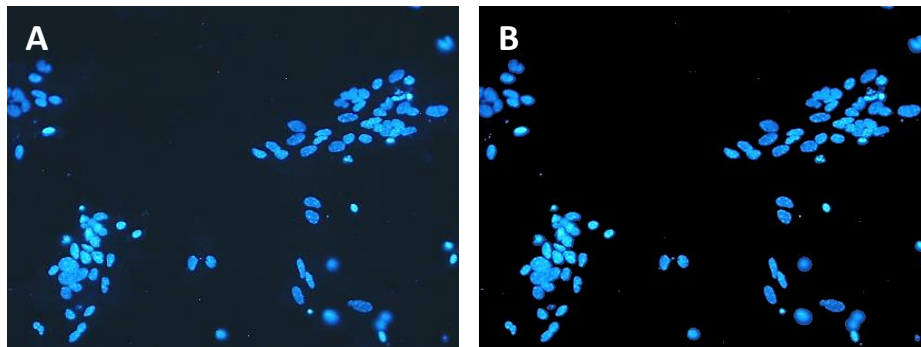


Figura 4: imagen representativa de las imágenes originales de partida (A), y de la resultante tras la eliminación del fondo en el canal azul, mediante el filtro basado en la densidad de intensidad de fluorescencia local (B).

En el segundo paso, se aplicó un binarizado directo de la imagen, junto con un proceso de rellenado de huecos internos (eliminación de píxeles de intensidad cero rodeado de píxeles de intensidad). Además, se eliminan aquellos elementos de la imagen con un tamaño inferior a 4 píxeles, con el fin de evitar los "puntos muertos" del detector (figura 5).

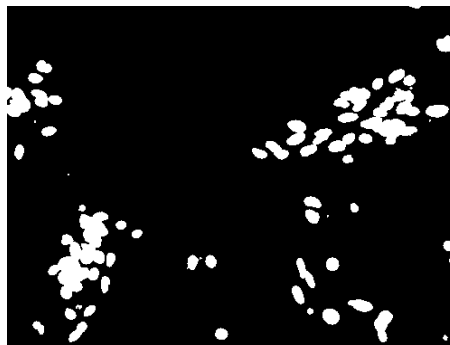


Figura 5: imagen representativa resultante de la aplicación del binarizado directo, seguido del rellenado de huecos internos y la eliminación de los elementos de la imagen inferiores a 4 píxeles.

El siguiente paso consistió en llevar a cabo una erosión progresiva de los contornos de intensidad unidad, (zonas blancas de la imagen) no conectados entre sí, hasta reducirlos a un único punto, que sería asociado al centro de la célula detectada. Si dos puntos están más próximos de 10 píxeles entre sí, se hace la media entre ambos para obtener un único punto. A partir de los puntos reducidos, se realiza de nuevo un proceso de dilatación de aquel pixel que representa el centro celular, hasta recuperar la imagen binarizada inicial. Los componentes resultantes de dicha dilatación son los perfiles nucleares detectados (figura 6A y 6B).

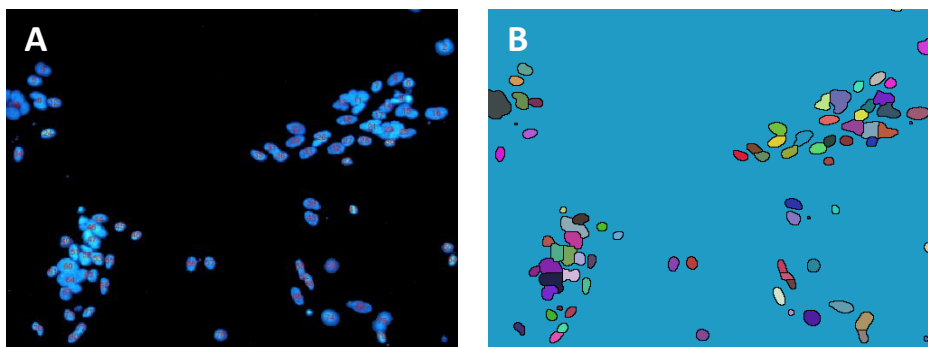


Figura 6: imágenes representativas de los perfiles nucleares detectados tras el proceso de erosión, dilatación, y recuperación de la imagen binarizada inicial.

Como puede observarse, los perfiles no son del todo satisfactorios, ya que puede darse el caso en el que varias células estén solapadas y estén siendo contabilizadas como una única célula de mayor tamaño. Por este motivo se recurre, en una segunda etapa, a una estimación del número de células (que no un recuento) basada en la intensidad de fluorescencia DAPI, en lugar de la morfología de los elementos que emiten fluorescencia. Para ello se determina la cantidad de fluorescencia total para cada uno de los perfiles detectados en los pasos anteriores (figura 7). Mediante una estimación no paramétrica de tipo núcleo gaussiano (*kernel density estimation*) (Parzen, 1962) se calcula la distribución de probabilidad de intensidades. Esta distribución presenta un pico bien diferenciado a una cierta cantidad de fluorescencia, que representa la intensidad de fluorescencia más probable para un núcleo teñido.

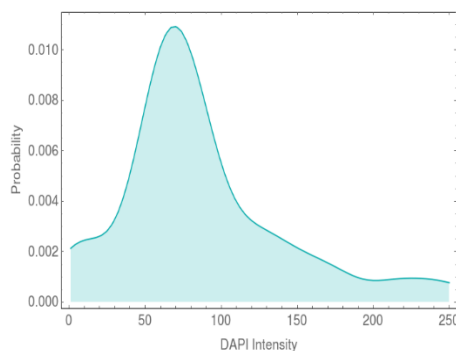


Figura 7: Cálculo de la distribución de probabilidades de intensidades de los núcleos detectados, donde se detecta la más probable (la del pico más pronunciado) para un núcleo teñido.

El número final de células estimado se calcula como la intensidad total de fluorescencia de los perfiles detectados, dividida entre la intensidad más probable para un núcleo.

Anexo III: Análisis y cuantificación de AEA por LC-MS/MS

Los 5 μl de muestra se inyectaron en una precolumna (*Acquity HSS T3 1.8 μM Vanguard Pre-Co*) en línea con una columna de fase reversa (*Acquity UPLC HSS T3 1.8 μm , 2.1x100mm, Waters*), a una temperatura de 30°C. La separación se realizó a un flujo de 0.2 ml/min, con una fase móvil A (0.1% ácido fórmico) y una fase móvil B (acetronitrilo -ACN-). El gradiente de ACN (fase móvil B) fue el siguiente: 0% durante 3 min, 0-95% durante 1 min, 95-99% durante 1 min, y 99% durante otro minuto, tras los cuales, durante 50 segundos el sistema vuelve a sus condiciones iniciales manteniéndose durante 3,5 min en dichas condiciones. El espectrómetro de masas operaba en modo positivo con un voltaje de 5500V, temperatura de 500°C y *ion source gas* 1 y 2,50. Los fragmentos fueron optimizados en un análisis previo con los estándares comerciales, así como sus voltajes correspondientes, estableciéndose para AEA una m/z 348.3-62. Las condiciones fueron: DP 70V, CE35 V, EP 10V y CXP 4 V, mientras que las del estándar interno AEA-d8 (m/z 356.4-62), las condiciones fueron: DP 30V, CE 60V, EP 10V y CXP 4 V. Todas las muestras y el calibrado fueron analizados en las mismas condiciones.

Para la cuantificación de AEA, puesto que las concentraciones de este endocannabinoide difieren considerablemente entre el genotipo WT y FAAH^{-/-}, se necesitaron emplear dos rectas de calibrado. Ambas rectas disponían de 7 niveles: la de las muestras FAAH^{-/-} tenía un rango de concentraciones de entre 2 y 25 pg/ μl de AEA (*Cayman Chemical*), mientras que el de la recta de las muestras WT, dicho rango se situaba entre $8,2 \times 10^{-9}$ y 2 pg/ μL . Para poder interpolar los valores de las muestras a la recta de calibrado, se añadió a cada muestra de las rectas 5 μL del estándar interno AEA-d8.

Bibliografía Anexos

- Burt, P. & Adelson, E. (1983) The Laplacian Pyramid as a Compact Image Code. *IEEE Trans. Commun.*, **31**, 532–540.
- Cousty, J., Bertrand, G., Najman, L., & Couprie, M. (2009) Watershed Cuts: Minimum Spanning Forests and the Drop of Water Principle. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, **31**, 1362–1374.
- Felzenszwalb, P.F. & Huttenlocher, D.P. (2012) Distance Transforms of Sampled Functions. *Theory Comput.*, **8**, 415–428.
- Gonzalez, R.C. & Woods, R.E. (2008) *Digital Image Processing Third Edition*, Third Edit. edn. Pearson.

Parzen, E. (1962) On Estimation of a Probability Density Function and Mode. *Ann. Math. Stat.*, **33**, 1065–1076.

Ranchordas, A., Pereira, J.M., Araújo, H.J., & Tavares, J.M.R.S. (2009) Computer Vision, Imaging and Computer Graphics. Theory and Applications. In Ranchordas, A., Pereira, J.M., Araújo, H.J., & Tavares, J.M.R.S. (eds), *Communications in Computer and Information Science, Communications in Computer and Information Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Soille, P. (2013) *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Springer Science & Business Media.



Role of interleukin 1-beta in the inflammatory response in a fatty acid amide hydrolase-knockout mouse model of Alzheimer's disease

Noelia Aparicio^a, M. Teresa Grande^a, Samuel Ruiz de Martín Esteban^a, Alicia López^b, Gonzalo Ruiz-Pérez^a, Mario Amores^b, Carmen Vázquez^b, Ana M. Martínez-Relimpio^a, M. Ruth Pazos^{a,b}, Benjamin F. Cravatt^c, Rosa M. Tolón^a, Julián Romero^{a,*}

^a Faculty of Experimental Sciences, Universidad Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain

^b Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, C/Budapest 1, 28922, Alcorcón, Madrid, Spain

^c The Skaggs Institute for Chemical Biology and Departments of Cell Biology and Chemistry, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Fatty acid amide hydrolase
Transgenic mice
Amyloid
Microglia
Interleukin-1beta

ABSTRACT

The search for novel therapies for the treatment of Alzheimer's disease is an urgent need, due to the current paucity of available pharmacological tools and the recent failures obtained in clinical trials. Among other strategies, the modulation of amyloid-triggered neuroinflammation by the endocannabinoid system seems of relevance. Previous data indicate that the enhancement of the endocannabinoid tone through the inhibition of the enzymes responsible for the degradation of their main endogenous ligands may render beneficial effects. Based on previously reported data, in which we described a paradoxical effect of the genetic deletion of the fatty acid amide hydrolase, we here aimed to expand our knowledge on the role of the endocannabinoid system in the context of Alzheimer's disease. To that end, we inhibited the production of interleukin-1 β , one of the main inflammatory cytokines involved in the neuroinflammation triggered by amyloid peptides, in a transgenic mouse model of this disease by using minocycline, a drug known to impair the synthesis of this cytokine. Our data suggest that interleukin-1 β may be instrumental in order to achieve the beneficial effects derived of fatty acid amide hydrolase genetic inactivation. This could be appreciated at the molecular (cytokine expression, amyloid production, plaque deposition) as well as behavioral levels (memory impairment). We here describe a previously unknown link between the endocannabinoid system and interleukin-1 β in the context of Alzheimer's disease that open new possibilities for the development of novel therapeutics.

1. Introduction

The role of neuroinflammation in Alzheimer's disease (AD) is a subject of intense debate and analysis. The classical view dictates that the appearance of beta amyloid (A β) oligomers and the formation of amyloid-enriched neuritic plaques in the brain parenchyma trigger a myriad of deleterious effects and, among them, a powerful inflammatory response in which glial cells (and, remarkably, microglia) play a crucial role by secreting cytokines, activating membrane hemichannels, phagocytosing amyloid and cell debris, etc [1]. As this inflammatory process extends in time, the neuronal damage in surrounding areas gets increased and inflammation perpetuates the process [2]. In this context, the use of antiinflammatory drugs has been postulated, but clinical and preclinical data have not been conclusive so far [3].

Under this conceptual paradigm, the activation of neuroprotective

endogenous mechanisms, such as the endocannabinoid system (ECS), seems of great interest. The ECS is comprised of receptors, endogenous ligands and synthetic and degradative enzymes that has been shown to provide neuroprotection under different types of brain insult [4]. Among other possible approaches, the enhancement of the EC tone through the inhibition of the main degrading enzymes for these endogenous ligands is presently considered a promising approach in AD, as several recent studies have shown the beneficial effects derived of the genetic or pharmacological inhibition of monoacylglycerol lipase (MAGL, the main degradative enzyme for 2-arachidonoylglycerol) or fatty acid amide hydrolase (FAAH, for *N*-arachidonoyl ethanolamine, AEA) [5–7].

Regarding FAAH, we recently reported that its genetic inactivation led to a pro-inflammatory phenotype in the context of AD, both in vitro as well as in vivo [7,8]. Astrocytes in primary culture obtained from neonatal FAAH^{-/-} mice exhibited an enhanced secretion of

* Corresponding author.

E-mail address: j.romero.prof@ufv.es (J. Romero).

inflammatory cytokines (IL1 β , IL6, CCL-2, etc) that was accompanied by an increased expression of COX-2, iNOS or TNF α when exposed to the pathological form of the beta amyloid peptide. Further, several signaling cascades known to be directly involved in amyloid-triggered neuroinflammation (p38 MAPK, ERK 1/2 and NF κ B) were also proved to be earlier, and more intensely, activated in FAAH^{-/-} than in WT astrocytes after exposure to A β . Interestingly, this exacerbated pro-inflammatory response was only evident in FAAH-lacking astrocytes, but not present when this enzyme was subjected to pharmacological inhibition with the well-described irreversible inhibitor, URB597 [8].

These data were subsequently confirmed and expanded by using an animal model of AD [7]. Thus, samples from cortices and hippocampi of 5xFAD/FAAH^{-/-} brains showed increased mRNA levels of several key cytokines (IL1 β , IL6, and TNF α) that were associated to a significant decrease in APP, in amyloid-enriched neuritic plaques as well as in A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ levels. Finally, this enhanced inflammatory milieu was paradoxically accompanied by decreased astro- and micro-gliosis and by an improved memory-related behavioral performance. Altogether, these data led us to conclude that FAAH gene deletion had a profound effect in the cerebral inflammatory status in the context of AD, involving several cytokines known to play a critical role in this disease, including IL1 β [7].

IL1 β is a cytosolic cytokine with pleiotropic functions in the brain, including neuronal proliferation, differentiation, apoptosis, and long-term potentiation [9]. The canonical synthetic route for this cytokine shows that it is synthesized in a precursor, biologically inactive form (pro-IL1 β) that will be subsequently cleaved by an intracellular enzyme (IL1 β -converting enzyme, also identified as caspase-1) to generate the mature, fully active peptide [10]. The mechanisms controlling the release of IL1 β from cells in the CNS are still a matter of controversy, ranging from plasma membrane translocation, exosomes or other forms of secretory microvesicles, and being microglia the main source of this cytokine in the context of neuroinflammation [9,11]. Importantly, previous *in vitro* reports pointed out to a direct interaction between the ECS and the IL1 β signaling pathways in the control of cell damage [12] and, more recently, neurogenesis [13].

The present study was designed to deeper explore the exacerbated inflammatory phenotype observed in the absence of FAAH as well as the interplay between the ECS and IL1 β in the context of A β -induced neuroinflammation. To that end, we used minocycline to impair IL1 β synthesis in a mouse model of AD and analyzed the molecular changes that could differentially develop in WT vs FAAH-lacking mice.

2. Materials and methods

2.1. Mice and minocycline treatments

Mice used in these studies were described in our previous study [7] and were housed and bred in the animal facilities of Universidad Rey Juan Carlos (Alcorc3n, Madrid, Spain). Experimental protocols met the European and Spanish regulations for protection of experimental animals (86/609/EEC and RD 1201/2005 and 53/2013). 6-month old WT and 5xFAD mice (B6SJL-Tg (APP^{Swe}/L^{on}, PSEN1*^{M146L}*^{L286V}) 6799Vas/Mmjax; Jackson Laboratories; Bar Harbor, ME, USA; [14]) were used for the present studies. 5xFAD mice overexpress the human APP gene with 3 Familiar Alzheimer's Disease (FAD) mutations, as well as the human PS1 gene containing two FAD mutations, both of them under the control of mouse *Thy1* promoter. 5xFAD mice were backcrossed with FAAH^{-/-} mice (which have replaced the first FAAH exon; [15]) for at least 10 generations, so that to obtain the 5xFAD/FAAH^{-/-} counterparts. Mice of each genotype were sub-divided in two groups: 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} vehicle (veh), treated with NaCl 0,9%, and 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} minocycline (mino), treated with 10 mg/kg/day of minocycline hydrochloride (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), as described by [16]. The experimental protocol consisted of injecting intraperitoneally either the drug or the vehicle once a day

during 12 consecutively days. Two hours after the last dose, mice were sacrificed by cervical dislocation, and brains were quickly removed, and divided in hemispheres: one of them was embedded in paraffin for staining, and the other one was frozen in isopentane, and stored at -80 °C.

The procedure followed to prepare the minocycline solution comprise the reconstitution of the minocycline hydrochloride in NaCl 0,9% at a concentration of 1,5 mg/mL, and the resulted fresh solution was later adjusted at a pH of 7,4, and stored at -80 °C until use. Minocycline-treated mice received a dose of 200 μ L per 30 g weight, while vehicle animals were treated with the corresponding volume of NaCl 0,9%. Weight of animals was measured every day in order to inject the correct volume and dose, and for the detection of any symptom of toxicity [17].

2.2. Behavioral determinations

Memory performance was evaluated as described in our previous work [7] and based on the Morris water maze test (MWM) method described by Vorhees and Williams [18]. On day 8 of treatment with minocycline or vehicle (N = 9–11 per group), spatial memory acquisition was tested for four consecutive days, four trials per day. Mice were released into opaque water facing the tank wall starting from different positions each day and were allowed to swim for a maximum of 60 s in order to reach a hidden platform. The parameter analysed in the present experiments was the time spent in finding the hidden platform (escape latency). Data were analysed by using the Smart 3.0 software (Panlab, Barcelona, Spain).

2.3. Isolation of microglial cells and flow cytometry

To facilitate the separation of microglia, brains were dissected and enzymatically digested. Then, the resulting suspension was mechanically dissociated and filtered through a 70- μ m cell strainer. Cells were incubated immediately with CD11b MicroBeads and were separated in a magnetic field using MACS Column (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain). Both CD11b-negative and CD11b-positive effluent fractions were collected for further characterization. Additionally, cells were stained with CD11bPE (Miltenyi), CD45-APCVio770 (Miltenyi), CD16/32-PerCP-Cy5.5 and CD206-APC (both from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) antibodies. Samples were read on a MACSQuant Flow Cytometer and analysed with MACS Quantify (Miltenyi Biotec).

Fluorescence spillover compensation values were generated using pooled unseparated/enriched cell preparations rather than commercially available beads to account for the high autofluorescence of myeloid cells. Debris and aggregates were eliminated from the analysis by forward and side scatter characteristics, then microglia was identified as CD11b⁺ CD45^{lo}. Polarization states of CD11b⁺ CD45^{lo} microglia were evaluated by expression of the M1 marker CD16/32 and the M2 marker CD206 with gates established by fluorescence minus one (FMO) controls. For each hemisphere, approximately ten thousand CD11b⁺ singlets were analyzed.

2.4. mRNA isolation and RT-qPCR

One frozen hemisphere of each minocycline and vehicle-treated animal was dissected so that to recover the cortex and hippocampus areas. Then, Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was used so as to isolate total RNA for further qPCRs assays. After RNA isolation, its quality was ensured by a 1% agarose gel electrophoresis, while its quantity was measured by spectrophotometry at 260 nm. Single-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μ g of total RNA with the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). The amount of expression of the different genes and cytokines of interest was quantified by qPCR assays in a LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche). PCR primers and TaqMan

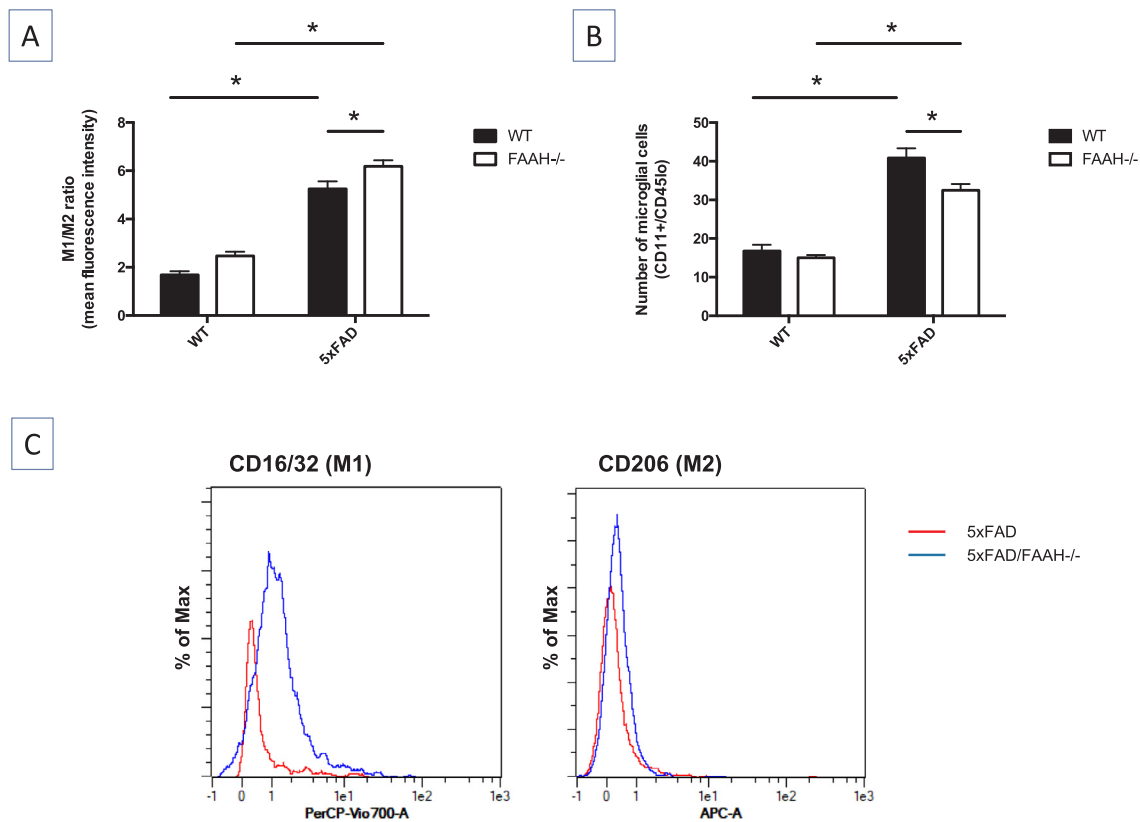


Fig. 1. Flow cytometry data reveal the pro-inflammatory status of the FAAH-lacking microglia cells and a decreased number of these cells as a consequence of FAAH gene deletion. Ratio of M1 (defined as CD11 + CD45lo/CD16/32+) to M2 (defined as CD11 + CD45lo/CD206+) in Mean Fluorescence Intensity (MFI) units (A) was elevated in 5xFAD mice and significantly increased in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice. Measured by flow cytometry analysis. Quantification of microglial cells (B) (expressed as the percentage of total singlet cells that are CD11 + CD45lo cells) increased significantly in 5xFAD mice while this number were significantly lower in the brains of FAAH-lacking AD mice. (C) Histogram comparing expression by MFI in microglia (CD11 + CD45low gate) from mice 5xFAD (red line) or 5xFAD/FAAH^{-/-} (magenta line) representative of 5 independent experiments. N = 5 mice per group. *p < 0.05 (2-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

probes for TNF α and COX2 were designed by Tib Molbiol (Berlin, Germany), and were all employed at 0.5 μ M. IL1r and IL1ra were analysed by using a RealTime ready Single Assays (assay IDs: 312,175 and 318527, correspondingly, Roche), while IL1 β , IL10 and IL4 were quantified by employing Predesigned qPCR Assays (assay IDs: Mm.PT.58.42962427, Mm.PT.58.13531087 and Mm.58.7882098, respectively, IDT[®], Coralville, IA, USA). 18S was chosen for normalization. PCR assays were performed using LightCycler[®] TaqMan[®] Master (Roche) and Quantimix Easy Probes Kit (Biotools, Madrid, Spain). All assays, except the corresponding to IL10 and IL4, were carry out with 2 μ L of cDNA, whereas IL10 and IL4 assays needed 4 μ L. Because of the use of a 96-well plate, the qPCR reaction was run in duplicates for each sample, including the positive (a sample known for showing high expression of all the genes tested) and negative control (no-template wells). The transcript amounts were calculated using the second derivative maximum mode of LC-software, version 1.5 (Roche), and later analysed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ algorithm, so that to obtain the Relative Quantification (RQ) values. Further calculations and statistical analysis were done with these RQ values.

2.5. Neuritic plaque quantification

Paraffin-embedded tissues (N = 3–4 per group) were cut in 4 μ m slices and transferred to slides coated with Vectabond (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Once deparaffined and rehydrated, amyloid aggregates were labelled with methoxy-X04 staining, as described [19]. Slides were studied and photographed with an upright microscope (Nikon 90i, Nikon, Tokyo, Japan) and using a

DXM1200F camera. Quantification of the slides was performed with Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and ImageJ (NIH, Baltimore, MD, USA) software. Images were converted to 8-bit grayscale for analysis. Next, a threshold value was set (to highlight the signal corresponding to stained cells only) and the region of interest outlined by using the polygon selection tool (ROI tools). The area occupied by methoxy-X04-labelled plaques, was quantified and divided by the total area of the selected region.

2.6. A β_{1-42} quantification by ELISA

To determine A β_{1-42} levels in brain tissue, hippocampus and cortex were homogenized in 10 volumes of ice-cold guanidine buffer (5.0M guanidine-HCl/50 mM Tris-Cl, pH 8.0) containing protease inhibitor cocktail (Roche). Protein concentrations were determined by BCA assay (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Human ELISA kits (Invitrogen) were used according to manufacturer's specifications. Optical signals at 450 nm were read on a Sunrise microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) and sample concentrations were determined by comparison with the respective standard curves.

2.7. IL1 β quantification by ELISA

Brain cortex was homogenized with ice-cold lysis buffer [25 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% (vol/vol) IGEPAL CA-630, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 2% (vol/vol) glycerol] containing protease inhibitor cocktail (Roche), and clarified by centrifugation at 14,000g at 4 $^{\circ}$ C for 15 min. Protein concentrations were determined by BCA assay

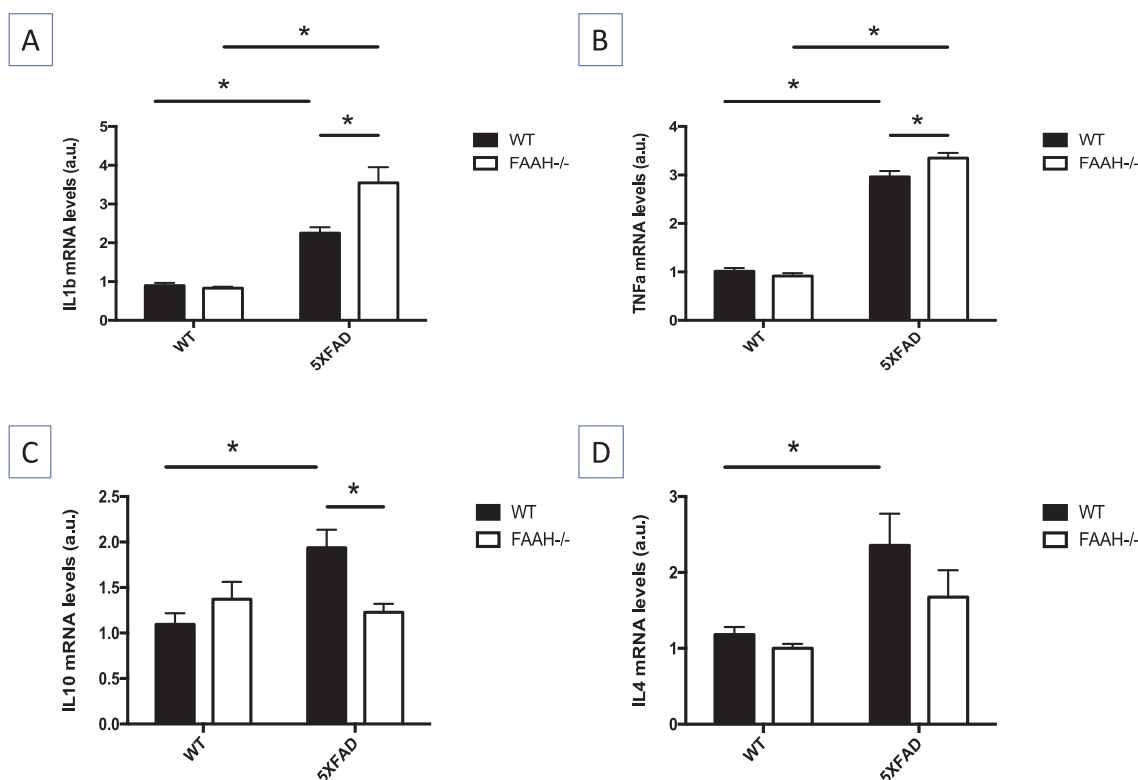


Fig. 2. The genetic deletion of FAAH increases the expression of pro-inflammatory cytokines while decreases that of anti-inflammatory cytokines in the context of AD. IL1 β and TNF α mRNA levels (**A and B**) were significantly elevated as a consequence of the amyloid pathology; in addition, 5xFAD/FAAH^{-/-} mice showed an exacerbation in the increased levels in respect to 5xFAD mice. The mRNA levels of the anti-inflammatory cytokines IL10 (**C**) and IL4 (**D**) were differentially regulated, with significant increases in 5xFAD mice but non-significant in the case of 5xFAD/FAAH^{-/-} mice. Further, IL10 were significantly lower in the brains of FAAH-lacking AD mice. A.u. stands for “arbitrary units”. N = 8 mice per group. *p < 0.05 (2-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test).

(ThermoFisher). IL1 β levels in the tissue lysates were measured using the RayBio® Mouse IL-1 beta ELISA kit (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA) following the manufacturer’s protocol. Optical signals at 450 nm were read on a Sunrise microplate reader (Tecan) and sample concentrations were determined by comparison with the respective standard curves.

2.8. Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis were made using 2-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni’s post-test for multiple comparisons. A p value < 0.05 was considered as statistically significant. Data were analysed with Graph Pad Prism software version 6.0 (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. The phenotype associated to FAAH^{-/-} mice is proinflammatory and affects microglial cells

We analyzed the M1/M2 profile of microglial cells in the brains of WT and FAAH-lacking mice by flow cytometry (Fig. 1). As expected, we found a significant increase in the M1 to M2 ratio in AD brain samples as compared to non-pathological ones, both in WT and FAAH^{-/-} mice. Importantly, there was a significant difference in this ratio among 5xFAD vs 5xFAD/FAAH^{-/-} mice (Fig. 1A), indicating an exacerbated pro-inflammatory state associated to FAAH gene deletion. Surprisingly, this increase in the M1/M2 ratio was also accompanied by a significant decrease in the number of microglial cells isolated from samples obtained from FAAH-lacking mice, suggestive of decreased microgliosis (Fig. 1B). We must then conclude that the absence of FAAH partially

prevents the microgliosis that is prototypical of amyloid pathology but also triggers an imbalance of the microglial phenotype towards an exacerbated pro-inflammatory state, as revealed by the increased M1 over M2 markers.

In addition, we focused on the pattern of expression of several pro- and anti-inflammatory cytokines known to play a relevant role in the pathogenesis of AD and produced mostly by glial cells, including IL1 β , TNF α , IL10 and IL4 (Fig. 2). Our data show that the genetic deletion of FAAH has a differential effect on the expression levels of these cytokines, by promoting the expression of pro-inflammatory cytokines (IL1 β and TNF α) while inducing a decrease in that of anti-inflammatory ones (IL10 and IL4). Thus, as expected, both IL1 β and TNF α mRNA levels were significantly elevated in the brains of AD mice but were further increased in samples from 5xFAD/FAAH^{-/-} mice as compared to 5xFAD mice (Fig. 2A and B). On the other hand, IL10 and IL4 were also increased as a consequence of the pathology, but only in 5xFAD, not in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice (Fig. 2C and D). IL10 mRNA levels were significantly lower in the absence of FAAH as compared to 5xFAD. These data show that the genetic deletion of FAAH alters the expression pattern of glial cytokines and promotes inflammation.

3.2. IL1 β system is altered in FAAH^{-/-} mice and is partially normalized by minocycline exposure

We next studied the status of the IL1 β system in the brains of FAAH-lacking mice and analyzed the impact of the treatment with the IL1 β synthesis inhibitor, minocycline. We thus quantified the expression levels of several elements of this system, including IL1 β , IL1 β r and IL1 β ra (Fig. 3). We found that mRNA levels of IL1 β and IL1 β r were significantly elevated in brain samples of 5xFAD/FAAH^{-/-} mice as compared to 5xFAD mice (Fig. 3A and B), while those of the IL1 β ra

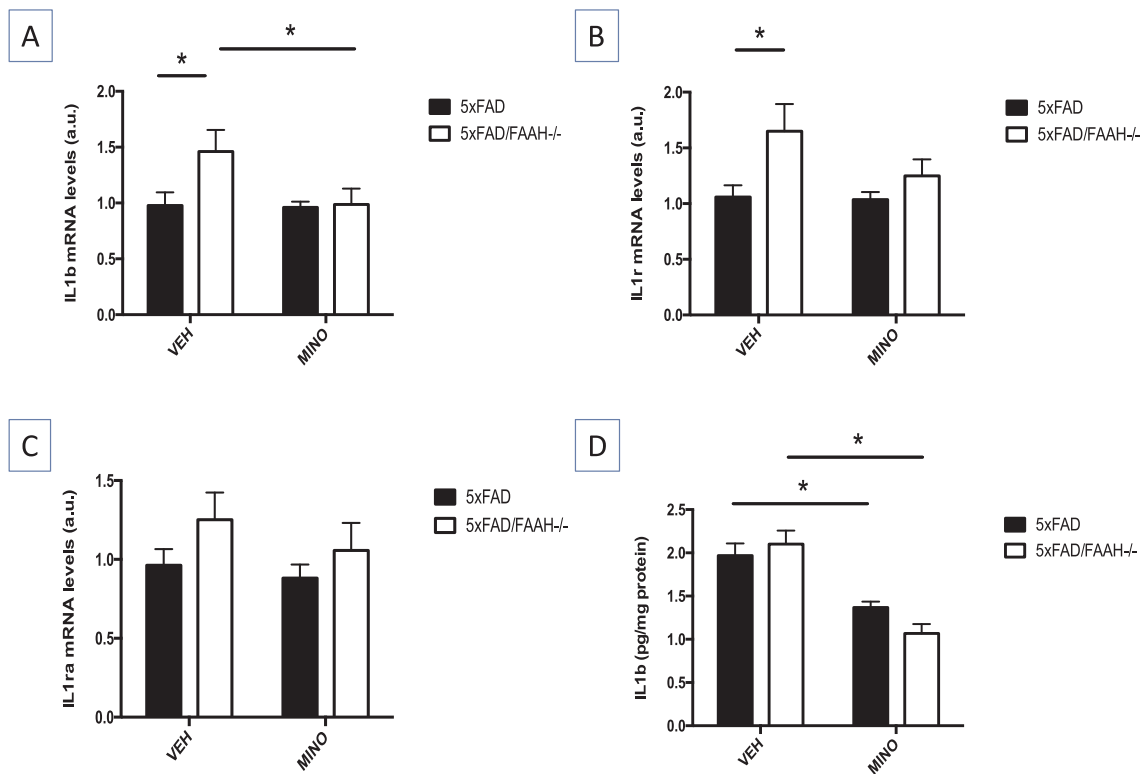


Fig. 3. Effects of the genetic deletion of FAAH and of the treatment with minocycline on several elements of the IL1 β signaling system in the context of AD. IL1 β (A) and IL1 β r (B) mRNA levels were significantly higher in 5xFAD/FAAH^{-/-} than in 5xFAD mice. Minocycline treatment decreased mRNA levels. IL1 β ra mRNA levels (C) remained unchanged. (D) The levels of IL1 β protein were significantly decreased by the minocycline treatment. A.u. stands for “arbitrary units”. N = 8 (A to C) or N = 5 (D) mice per group. *p < 0.05 (2-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test).

showed no difference (Fig. 3C). Finally, IL1 β protein levels were not modified by FAAH gene deletion (Fig. 3D). These data confirm previous observations indicating that the genetic deletion of FAAH leads to an exacerbated expression of some elements of the IL1 β transmission system without reflect in protein levels.

In addition, we also measured the impact that the exposure to minocycline, a compound known to impair IL1 β synthesis, may have on these observations. We found that increased IL1 β mRNA levels were normalized after treatment with minocycline (Fig. 3A) while those of IL1 β r also showed similar levels to those observed in 5xFAD mice (Fig. 3B). IL1 β ra mRNA levels did not change after minocycline treatment (Fig. 3C). Finally, IL1 β protein levels were significantly decreased after the treatment, confirming the efficacy of minocycline regarding the inhibition of IL1 β synthesis (Fig. 3D).

3.3. Minocycline treatment triggers opposite effects in 5xFAD vs 5xFAD/FAAH^{-/-} mice

We also studied the effects of the treatment with minocycline at the behavioral and molecular levels in respect to the amyloid pathology. Our data show that, in concordance with previous reports, minocycline treatment improved memory in 5xFAD mice (Fig. 4A) as showed in the MWM test. In contrast, 5xFAD/FAAH^{-/-} mice showed a worsening in memory-related behavior in the same test after exposure to minocycline (Fig. 4A).

In addition, minocycline treatment induced a significant decrease in amyloid plaques (Fig. 4B) in 5xFAD but had the opposite effect on 5xFAD/FAAH^{-/-} mice. In addition, cortical and hippocampal soluble A β ₁₋₄₂ levels in 5xFAD mice were significantly higher in 5xFAD as compared to 5xFAD/FAAH^{-/-} mice and remained unchanged under minocycline treatment (Fig. 4C and D). Finally, the same treatment regime led to significant increases in amyloid soluble levels in 5xFAD/

FAAH^{-/-} mice (Fig. 4B to D).

4. Discussion

The present data confirm previous reports showing that the genetic inactivation of FAAH leads to a pro-inflammatory, yet beneficial, state in the context of AD and suggesting that IL1 β may be instrumental in this phenomenon [7,20]. We first confirmed the exacerbated inflammatory status associated to the genetic deletion of FAAH in a mouse model of AD (5xFAD mice) by studying: i) the phenotypic profile of microglial cells by flow cytometry; and ii) the expression levels of pro- and anti-inflammatory cytokines. We then used the highly lipophilic derivative of tetracycline, minocycline, to interfere the synthesis of IL1 β and analyzed the effects of this impairment on the effects associated to the genetic deletion of FAAH. The present results confirm that the blockade of IL1 β synthesis prevents the beneficial effects observed in FAAH-lacking mice in terms of cytokine expression, amyloid deposition, and behavior.

Firstly, we found that FAAH-lacking mice exhibited a significantly higher M1/M2 ratio of microglial cells as compared to their WT counterparts. This observation is in agreement with previous data from our group [7,21] and from others [20] and confirm the exacerbated inflammatory state derived of the genetic inactivation of FAAH. Furthermore, microglial cells were found to be significantly less abundant in the brains of 5xFAD/FAAH^{-/-} mice than in 5xFAD mice. This decreased microgliosis was quantified by flow cytometry and confirms our previous observation by means of Iba1⁺ cell densitometry [7], though is in contrast with another paper in which an increased microgliosis in FAAH-lacking mice was reported [20]. This paradoxical observation (less number of microglial cells but exacerbated inflammatory M1 phenotype) matches with our previously suggested hypothesis that FAAH gene deletion has a profound, long-term effect on microglial-

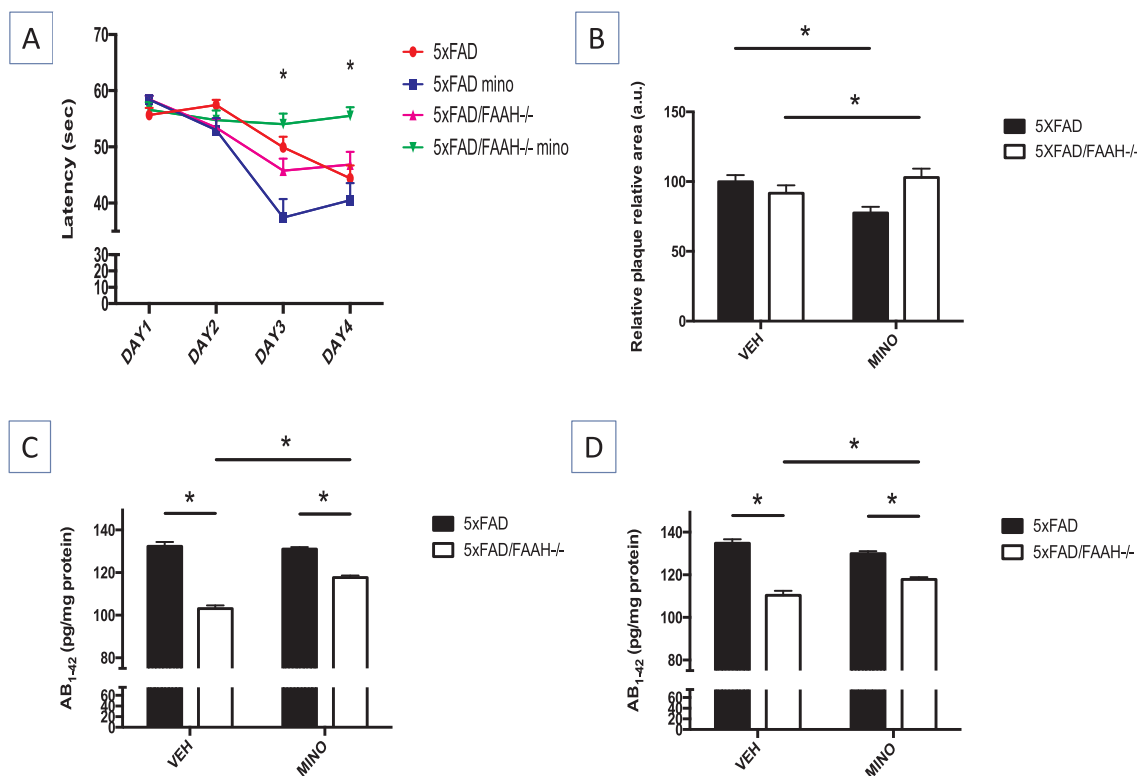


Fig. 4. Exposure to minocycline induces opposite effects in AD mice, depending on FAAH activity. **(A)** MWM data reflect a significant improvement in 5xFAD mice treated with minocycline on day 3 of test while showing a significant worsening in memory performance in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice on days 3 and 4. **(B)** Relative amyloid plaque area was significantly reduced in 5xFAD mice and significantly increased in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice. Cortical **(C)** and hippocampal **(D)** soluble amyloid levels were significantly lower in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice and experienced a significant increase as a consequence of the treatment with minocycline. A.u. stands for “arbitrary units”. N = 8–11 (A) or N = 5 (B to D) mice per group. *p < 0.05 (2-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test).

mediated neuroinflammation, and that the FAAH-lacking brain has a net pro-inflammatory status that is evidenced when an acute as well as chronic challenge takes place [7,21].

Furthermore, we here report changes in the cytokine and amyloid levels of the AD-inflamed brain that can be associated to the absence of FAAH activity. Thus, while mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines IL1 β and TNF α were significantly elevated in FAAH-lacking mice, those of anti-inflammatory cytokines were decreased (IL10), or at least not elevated (IL4), as a consequence of the amyloid pathology in these mice. These changes were also accompanied by modifications in the expression pattern of another element of the IL1 β system (IL1 β r). Taken together, these data clearly point out to a pro-inflammatory milieu in the brains of FAAH^{-/-} mice in the context of AD. It is of special relevance to note that IL10 has been recently attributed a critical role in amyloid pathology [22–24]. Surprisingly, these reports indicated that increasing IL10 levels had a significant negative impact on amyloid pathology in terms of behavior, amyloid plaques formation or A β phagocytosis [22]; in line with this, IL10 deficiency had a significant positive influence on amyloid pathology in APP/PS1 mice [23]. These observations allow us to speculate that the relative decrease in IL10 mRNA levels in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice herein reported may be one of the causes of the decreased amyloid pathology observed in these mice.

The role of inflammation, and specifically of IL1 β , in the context of AD is a subject of intense debate [25]. Though the classic perspective pointed out to a neuroprotective role of the early inflammatory response, and attributed deleterious effects to the sustainably increased production of pro-inflammatory cytokines [2,26], recent findings have paved the way for new approaches to this topic. Elegant studies by Shaftel et al. [27] and Matousek et al. [28] showed that the hippocampal overexpression of IL1 β in the brains of APPswe/PS1dE9 mice

drives a beneficial effect, reflected mainly at the molecular level. Paradoxically, the same group reported a COX-1-mediated impairment of memory in this paradigm of exacerbated IL1 β hippocampal activity [29].

Our present data show that IL1 β mRNA levels were significantly higher in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice while those of the protein remained unaltered, as already observed in our previous study [7]. We do not have a plausible explanation for this discrepancy, other than differences in the sensitivity of the methods employed or the existence of putative post-translational mechanisms that might dampen the increase in the expression levels of the cytokine. It is worth to mention that IL1 β concentration has been shown critical in order to enhance or inhibit hippocampal LTP through NMDARs, having an impact on memory processing [30]. It can thus be speculated that the increase in mRNA levels observed in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice could lead to a subtle increase in IL1 β protein at the synaptic level (though not significant when measured in tissue samples), that in turn could enhance LTP in these mice. The putative increase in IL1 β r could also collaborate in this effect. Preliminary data obtained in our laboratory suggest a recovery of LTP in the CA1 region of 5xFAD/FAAH^{-/-} mice as compared to 5xFAD mice (Ruiz-Pérez et al, in preparation).

The interaction between the ECS and IL1 β has been studied for the last few years in *in vitro* experiments [12] as well as in the context of multiple sclerosis [31–33] and point to an intimate interplay between the ECS and the IL1 β transmission system in the CNS. Cannabinoid CB₁ and TRPV1 receptors have been involved in this interaction that has been mainly observed by electrophysiological and behavioral methods. In addition, blockade of cannabinoid CB₁ receptors was shown to prevent the beneficial effects of minocycline in a mouse model of brain edema [34]. Due to the paucity of available pharmacological tools capable of modifying the activity of the IL1 β -controlled transmission

and, more specifically, the inability of current IL1r antagonists to cross the BBB when administered systemically, we decided to explore the putative consequences of impairing IL1 β synthesis by using the well-known drug minocycline [35]. This compound is widely used in different experimental paradigms because of its neuroprotectant properties; in the context of AD, minocycline has been shown to provide neuroprotection, prevent A β deposition, and improve cognitive functions in mice models of AD [17,36]. Importantly, minocycline has been also shown to block the activity of the caspase-1, also called IL1 β -converting enzyme, that plays a key role in the process of maturation of this cytokine from its precursor form (pro-IL1 β) to its fully functional, mature, variant (IL1 β) [16]. Thus, minocycline is capable of decreasing the levels of mature IL1 β . Our data showed that minocycline was effective in impairing IL1 β synthesis in both 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} mice and that this effect was also accompanied by an improvement in 5xFAD mice and a worsening in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice in the WM memory test. These observations match with previously published data [37] and suggest that mice lacking FAAH exhibit an exacerbated sensitivity to minocycline treatment and, more importantly, that this impairment is detrimental in the context of AD.

In summary, our present findings corroborate that the genetic deletion of FAAH has a pro-inflammatory effect in the brain of a transgenic mouse model of AD that, paradoxically, has beneficial consequences. In addition, we describe a putative link between IL1 β and the ECS in the mediation of these effects. Further experiments should unveil the precise role of IL1 β signaling in the effects triggered by an enhancement of the endocannabinoid tone in the inflamed mouse brain.

Acknowledgements

A.L.V. (BES-2014-070233) and C.V. (BES-2011-043393) are recipients of FPI predoctoral fellowships from the Ministerio de Economía y Competitividad. N.A. and G.R.-P. are recipients of predoctoral fellowships from Universidad Francisco de Vitoria. This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER (SAF2016/75959-R, JR), Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2308, JR), and Universidad Francisco de Vitoria (2017, JR).

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interests.

References

- H.W. Querfurth, F.M. LaFerla, Alzheimer's disease, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 329–344, <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>.
- R.E. Mrak, W.S.T. Griffin, Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration, *Neurobiol. Aging* 26 (2005) 349–354, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.05.010>.
- T. Umar, N. Hoda, Alzheimer's disease: a systemic review of substantial therapeutic targets and the leading multi-functional molecules, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2018) 3370–3389, <https://doi.org/10.2174/1568026618666180112161024>.
- J. Fernández-Ruiz, J. Romero, J.A. Ramos, Endocannabinoids and neurodegenerative disorders: Parkinson's disease, Huntington's chorea, Alzheimer's disease, and others, *Handb. Exp. Pharmacol.* 231 (2015) 233–259, https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_8.
- J.R. Piro, D.I. Benjamin, J.M. Duerr, Y. Pi, C. Gonzales, K.M. Wood, et al., A dysregulated endocannabinoid-eicosanoid network supports pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease, *Cell Rep.* 1 (2012) 617–623, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.001>.
- R. Chen, J. Zhang, Y. Wu, D. Wang, G. Feng, Y.-P. Tang, et al., Monoacylglycerol lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease, *Cell Rep.* 2 (2012) 1329–1339, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.030>.
- C. Vázquez, R.M. Tolón, M.T. Grande, M. Caraza, M. Moreno, E.C. Koester, et al., Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation, *Neurobiol. Aging* 36 (2015) 3008–3019, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.003>.
- C. Benito, R.M. Tolón, A.I. Castillo, L. Ruiz-Valdepeñas, J.A. Martínez-Orgado, F.J. Fernández-Sánchez, et al., β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB₁ or CB₂ receptors, *Br. J. Pharmacol.* 166 (2012) 1474–1489, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01889.x>.
- A.S. Mendiola, A.E. Cardona, The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases, *J. Neural Trans.* 125 (2018) 781–795, <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1732-9>.
- C. Garlanda, C.A. Dinarello, A. Mantovani, The interleukin-1 family: back to the future, *Immunity* 39 (2013) 1003–1018, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>.
- F. Ng, B.L. Tang, Unconventional protein secretion in animal cells, *Methods Mol. Biol.* 131–46, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9_2.
- F. Molina-Holgado, E. Pinteaux, J.D. Moore, E. Molina-Holgado, C. Guaza, R.M. Gibson, et al., Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia, *J. Neurosci.* 23 (2003) 6470–6474 (accessed June 20, 2018).
- D. García-Ovejero, Á. Arévalo-Martín, B. Navarro-Galve, E. Pinteaux, E. Molina-Holgado, F. Molina-Holgado, Neuroimmune interactions of cannabinoids in neurogenesis: focus on interleukin-1 β (IL-1 β) signalling, *Biochem. Soc. Trans.* 41 (2013) 1577–1582, <https://doi.org/10.1042/BST20130198>.
- H. Oakley, S.L. Cole, S. Logan, E. Maus, P. Shao, J. Craft, et al., Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation, *J. Neurosci.* 26 (2006) 10129–10140, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>.
- B.F. Cravatt, K. Demarest, M.P. Patricelli, M.H. Bracey, D.K. Giang, B.R. Martin, et al., Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 9371–9376, <https://doi.org/10.1073/pnas.161191698>.
- X. Wang, S. Zhu, M. Drozda, W. Zhang, I.G. Stavrovskaya, E. Cattaneo, et al., Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 10483–10487, <https://doi.org/10.1073/pnas.1832501100>.
- M.T. Ferretti, S. Allard, V. Partridge, A. Ducatenzeiler, A.C. Cuello, Minocycline corrects early, pre-plaque neuroinflammation and inhibits BACE-1 in a transgenic model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology, *J. Neuroinflammation* 9 (2012) 62, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-62>.
- C.V. Vorhees, M.T. Williams, Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 848–858, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>.
- J.F. McCarter, S. Liebscher, T. Bachhuber, C. Abou-Ajram, M. Hübener, B.T. Hyman, et al., Clustering of plaques contributes to plaque growth in a mouse model of Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol.* 126 (2013) 179–188, <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1137-2>.
- F. Ativie, O. Albayram, K. Bach, B. Pradier, A. Zimmer, A. Bilkei-Gorzo, Enhanced microglial activity in FAAH^{-/-} animals, *Life Sci.* 138 (2015) 52–56, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.016>.
- C. Vázquez, R.M. Tolón, M.R. Pazos, M. Moreno, E.C. Koester, B.F. Cravatt, et al., Endocannabinoids regulate the activity of astrocytic hemichannels and the microglial response against an injury: in vivo studies, *Neurobiol. Dis.* 79 (2015) 41–50, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.005>.
- P. Chakrabarty, A. Li, C. Ceballos-Diaz, J.A. Eddy, C.C. Funk, B. Moore, et al., IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior, *Neuron* 85 (2015) 519–533, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.020>.
- M.-V. Guillot-Sestier, K.R. Doty, D. Gate, J. Rodriguez, B.P. Leung, K. Rezaei-Zadeh, et al., IL10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology, *Neuron* 85 (2015) 534–548, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.068>.
- J.-P. Michaud, S. Rivest, Anti-inflammatory signaling in microglia exacerbates Alzheimer's disease-related pathology, *Neuron* 85 (2015) 450–452, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.021>.
- S.S. Shaftel, W.S.T. Griffin, M.K. O'Banion, The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective, *J. Neuroinflammation* 5 (2008) 7, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-7>.
- R.E. Mrak, W.S. Griffin, Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 22 (2001) 903–908.
- S.S. Shaftel, S. Kyrkanides, J.A. Olschowka, J.H. Miller, R.E. Johnson, M.K. O'Banion, Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1595–1604, <https://doi.org/10.1172/JCI31450>.
- S.B. Matousek, S. Ghosh, S.S. Shaftel, S. Kyrkanides, J.A. Olschowka, M.K. O'Banion, Chronic IL-1 β -mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration, *J. Neuroimmune Pharmacol.* 7 (2012) 156–164, <https://doi.org/10.1007/s11481-011-9331-2>.
- S.B. Matousek, A.M. Hein, S.S. Shaftel, J.A. Olschowka, S. Kyrkanides, M.K. O'Banion, Cyclooxygenase-1 mediates prostaglandin E(2) elevation and contextual memory impairment in a model of sustained hippocampal interleukin-1beta expression, *J. Neurochem.* 114 (2010) 247–258, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06759.x>.
- F.R. Rizzo, A. Musella, F. De Vito, D. Fresegna, S. Bullitta, V. Vanni, et al., Tumor necrosis factor and interleukin-1 β modulate synaptic plasticity during neuroinflammation, *Neural Plast.* 2018 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1155/2018/8430123>.
- A. Gentile, D. Fresegna, A. Musella, H. Sepman, S. Bullitta, F. De Vito, et al., Interaction between interleukin-1 β and type-1 cannabinoid receptor is involved in anxiety-like behavior in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroinflammation* 13 (2016) 231, <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0682-8>.
- S. Rossi, L. Sacchetti, F. Napolitano, V. De Chiara, C. Motta, V. Studer, et al.,

- Interleukin-1 β causes anxiety by interacting with the endocannabinoid system, *J. Neurosci.* 32 (2012) 13896–13905, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1515-12.2012>.
- [33] V. De Chiara, C. Motta, S. Rossi, V. Studer, F. Barbieri, D. Lauro, et al., Interleukin-1 β alters the sensitivity of cannabinoid CB1 receptors controlling glutamate transmission in the striatum, *Neuroscience* 250 (2013) 232–239, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.069>.
- [34] A.B. Lopez-Rodriguez, E. Siopi, D.P. Finn, C. Marchand-Leroux, L.M. Garcia-Segura, M. Jafarian-Tehrani, et al., CB1 and CB2 cannabinoid receptor antagonists prevent minocycline-induced neuroprotection following traumatic brain injury in mice, *Cereb. Cortex.* 25 (2015) 35–45, <https://doi.org/10.1093/cercor/bht202>.
- [35] N. Garrido-Mesa, A. Zarzuelo, J. Gálvez, Minocycline: far beyond an antibiotic, *Br. J. Pharmacol.* 169 (2013) 337–352, <https://doi.org/10.1111/bph.12139>.
- [36] S. Cheng, J. Hou, C. Zhang, C. Xu, L. Wang, X. Zou, et al., Minocycline reduces neuroinflammation but does not ameliorate neuron loss in a mouse model of neurodegeneration, *Sci. Rep.* 5 (2015) 10535, <https://doi.org/10.1038/srep10535>.
- [37] C.L. Hunter, D. Bachman, A.-C. Granholm, Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome, *Ann. Neurol.* 56 (2004) 675–688, <https://doi.org/10.1002/ana.20250>.