



ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Biotecnología, Medicina y Ciencias Biosanitarias

TESIS DOCTORAL

Modulación del sistema endocannabinoide como diana terapéutica en un modelo animal de amiloidosis cerebral

Autora:

Dña. María Andrea Arnanz Paredes

Directores:

Dra. Ana María Martínez Relimpio

Dr. Julián Romero Paredes

Pozuelo de Alarcón (Madrid), 2024

*Dedicado a la memoria de Nicolás Arnanz de las Heras
y Gloria Ayuso Torrecilla
A.M.D.G.*

*"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota."*

Santa Teresa de Calcuta

Agradecimientos

El 22 de agosto de 2017 falleció el empresario talaverano Nicolás Arnanz de las Heras tras padecer la enfermedad de Alzheimer. Casado, padre de 10 hijos y abuelo de 31 nietos, Nicolás Arnanz fue un hombre profundamente religioso y familiar, además de un excelente profesional. Junto con sus hermanos y cuñados creó e impulsó Arnanz S.A. y S.A. de Muebles, que incluían firmas dedicadas a la moda, confección, textiles, muebles y decoración, como Mary, el Prado, MAS y Muebles de Talavera. Aglutinó empresas de referencia en el ámbito nacional, que crearon cientos de puestos de trabajo de manera directa o indirecta.

Recuerdo la vitalidad que caracterizaba a mi abuelo Nicolás. Verle postrado en la cama y convaleciente en el hospital me hizo conocer de cerca la vulnerabilidad de los pacientes con enfermedad de Alzheimer y el sufrimiento de quienes los acompañan. Su mujer, mi abuela Gloria Ayuso Torrecilla, fue un gran ejemplo de Amor hasta el extremo. ¡Cuánto he aprendido de ver a mi abuela amando a mi abuelo en la enfermedad! La realidad que vivían mis abuelos propició que descubriera mi vocación por la investigación, concretamente, aportando mi granito de arena en el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Por este motivo, esta tesis doctoral va dedicada a ellos.

Todo cuanto se recoge en esta tesis doctoral es fruto de la entrega generosa de muchas personas. El tiempo y apoyo que me han brindado todos cuantos me han acompañado a lo largo de este camino han posibilitado que mi esfuerzo diario se haya traducido en esta tesis doctoral. Quiero aprovechar esta oportunidad para echar la vista atrás y agradecer de corazón todos los regalos recibidos a lo largo de estos años.

Hace un tiempo, escuché a un investigador dirigir unas palabras a sus alumnos sobre la belleza de trabajar en la frontera del conocimiento científico. Estas palabras del Dr. Julián Romero Paredes calaron tan hondo en mí que me alentaron a investigar allí donde nadie había profundizado, sin seguridades y con miedos, pero con la certeza de que serviría para arrojar un rayito de luz en un territorio inexplorado. Julián, gracias por darme la oportunidad de concretar mi vocación en este grupo de investigación, por dirigir esta tesis doctoral y apostar por mi formación, por animarme siempre a salir de mi zona de confort y por ser ejemplo de excelencia tanto profesional como personal.

También me gustaría agradecer a la Dra. Ana M^a Martínez Relimpio, quien ha sido más que una directora de tesis y siempre ha permanecido a mi lado en las buenas y en las no tan buenas. Recuerdo cuando estábamos en un congreso en el extranjero y me llegó la noticia de que mi abuela Gloria había fallecido. Ana, no te imaginas lo importante que fue para mí tu

compañía en ese y otros momentos de dificultad. Gracias por compartir conmigo también tantas alegrías como si tuyas se trataran. Gracias por tu sinceridad y transparencia, y por corregirme siempre con cariño para que no me estancara en mi desarrollo profesional y personal. Gracias por enseñarme el verdadero significado del compañerismo y que "sin mata no hay patata", es decir, que sin esfuerzo diario y constante no se pueden obtener grandes resultados.

Otro pilar fundamental ha sido la Dra. M^a Teresa Grande, que ha contribuido enormemente en mi formación a lo largo de estos años. Maite, gracias por dedicarme tu tiempo siempre que lo he necesitado y por todos tus consejos, que tanto me han ayudado en la toma de decisiones importantes estos años. Gracias por enseñarme a priorizar, relativizar y que con un buen chubasquero se puede llegar lejos. Gracias por ser ejemplo de humildad y perseverancia. Jamás me imaginé que las escalas largas en los aeropuertos podrían ser tan provechosas. Gracias por cogerme de la mano desde el principio y, con paciencia, enseñarme todo cuanto sabes.

Gracias al Dr. Samuel Ruiz de Martín Esteban, por cada conversación, por tu ayuda constante y por guiar mis pasos en esta andadura. Gracias al Dr. Iván Rodríguez, por tu gran empatía y tus palabras de ánimo siempre que lo he necesitado. Gracias a Laura y Almudena. Ha sido un regalo poder compartir con vosotras tantos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Gracias a todos mis compañeros con los que tanto he compartido a lo largo de estos años, porque sin vosotros nada habría sido igual.

Gracias a la Universidad Francisco de Vitoria y al Colegio Mayor Francisco de Vitoria por ser mi hogar en Madrid, por apostar por mi formación, por brindarme siempre infinitud de oportunidades y por posibilitar que haya podido vivir esta etapa de formación en plenitud.

Gracias a mis padres, Nacho y Mayte, a mis hermanos, Nacho, Alberto, Pablo, Carlos, Mayte y Esther, y a mi marido, Javi, por confiar y creer siempre en mí, por vuestro apoyo y entrega diaria, y por vuestro amor incondicional. Sois mi mayor regalo. Gracias a mis suegros, a mis cuñados, a toda mi gran familia y amigos por vuestras palabras de aliento y por acompañarme en cada paso que doy.

Por último, y no menos importante, me gustaría agradecer a quien me lo ha dado todo, a quien da sentido a mi vida y me cuida con su mano providente cada día. Gracias, Señor. ¡Que todo sea siempre para mayor gloria de Dios!

Abreviaturas

Δ^9-THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
2-AG	2-araquidonoilglicerol
2PE	Microscopía de excitación 2 fotones (<i>two-photon excitation microscopy</i>)
AC	Adenilato Ciclasa
ADNc	ADN complementario
AEA	N-araquidonoiletanolamina
AICD	Dominio intracelular de la proteína precursora del péptido amiloide (<i>Amyloid-β Precursor Protein Intracellular Domain</i>)
AMPARs	Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor</i>)
AP	Microglía Asociada a Placa
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora del péptido amiloide (<i>Amyloid precursor protein</i>)
AUC	Área bajo la curva (<i>Area Under the Curve</i>)
Aβ	Péptido β -amiloide
Aβ₁₋₄₀	A β de 40 aminoácidos
Aβ₁₋₄₂	A β de 42 aminoácidos
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
BHE	Barrera Hematoencefálica
BM	Laberinto de Barnes (<i>Barnes Maze</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C1q	Componente 1q del Complemento
C83	C-terminal de 83 aminoácidos
C99	C-terminal de 99 aminoácidos
CASP1	Caspasa 1
CB₁R	Receptor cannabinoide tipo 1 (<i>Cannabinoid Receptor type 1</i>)
CB₂R	Receptor cannabinoide tipo 2 (<i>Cannabinoid Receptor type 2</i>)
CBC	Cannabicromeno
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
CD45	Cluster de Diferenciación 45
CSF1R	Receptor del factor estimulante de colonias 1 (<i>Colony Stimulation Factor 1 Receptor</i>)
CX3CL1	Fractalkina (<i>C-X3-C motif ligand 1</i>)

Abreviaturas

CX3CR1	Receptor 1 de quimiocinas fractalkina (<i>C-X3-C motif chemokine receptor 1</i>)
D0	Día 0
D28	Día 28
D37	Día 37
DAG	Diacilglicerol
DAGLα	Diacilglicerol lipasa alfa
DAM	Microglía asociada a enfermedades (<i>Disease-Associated Microglia</i>)
DEG	Genes diferencialmente expresados (<i>Differentially Expressed Genes</i>)
EA	Enfermedad de Alzheimer
eCBs	Endocannabinoides
EMT	Transportador de membrana de endocannabinoides (<i>Endocannabinoid Membrane Transporter</i>)
EPM	Laberinto en cruz elevado (<i>Elevated Plus Maze</i>)
ERK1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>)
FAAH	Amida hidrolasa de ácidos grasos (<i>Fatty Acid Amide Hydrolase</i>)
FAD	Enfermedad de Alzheimer Familiar (<i>Familial Alzheimer's Disease</i>)
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FDR	Tasa de falsos descubrimientos (<i>False Discovery Rate</i>)
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GPRs	Receptores acoplados a proteínas G (<i>G-Protein Coupled Receptors</i>)
GSEA	Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>)
GSH	Glutación (<i>Glutathione</i>)
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (<i>Genome-Wide Association Study</i>)
HAM	Microglía humana asociada a la enfermedad de Alzheimer Humana (<i>Human Alzheimer's Microglia</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
I.p.	Intraperitoneal
IL1α	Interleuquina 1 alfa
IL1β	Interleuquina 1 beta
IL34	Interleuquina 34
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
MAGL	Monoacilglicerol lipasa (<i>Monoacylglycerol Lipase</i>)
MAP	Proteína quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein</i>)
MAPT	Proteína tau asociada a microtúbulos (<i>Microtubule-Associated Protein Tau</i>)

Abreviaturas

MeO-X04	1,4-bis(4'-hidroxiestiril)-2-metoxibenceno (<i>1,4-bis(4'-hydroxystyryl)-2-methoxybenzene</i>)
MGnD	Microglía neurodegenerativa (<i>Microglial Neurodegenerative Phenotype</i>)
MHCII	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II (<i>Class II Major Histocompatibility Complex Molecules</i>)
MLB	Buffer de Lisis con Magnesio (<i>Magnesium Lysis Buffer</i>)
MSigDB	Base de datos de firmas moleculares (<i>Molecular Signatures Database</i>)
NAEs	N-acetiletanolaminas (<i>N-acetylethanolamines</i>)
NAP	Microglía no asociada a placa
NAPE-PLD	N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipasa D (<i>N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D-like hydrolase</i>)
NArPE	N-aracidonoil fosfatidiletanolamina (<i>N-arachidonoyl phosphatidyl ethanolamine</i>)
NAT	N-aciltransferasa (<i>N-acyltransferase</i>)
NFκB	Factor nuclear kappa B (<i>Nuclear Factor kappa B</i>)
NMDARs	Receptores N-metil-D-aspartato (<i>N-methyl-d-aspartate Receptors</i>)
OEA	Oleoil-etanolamina
OF	Prueba de campo abierto (<i>Open-Field test</i>)
P2Y12R	Receptor P2Y12
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEA	Palmitoiletanolamida
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa (<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>)
PLC	Fosfolipasa C (<i>Phospholipase C</i>)
PLX	PLX5622
Ps1	Presenilina 1
Ps2	Presenilina 2
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (<i>Polyvinylidene Difluoride</i>)
qPCRs	PCR cuantitativa (<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RAGE	Receptor para los compuestos de glicosilación avanzada (<i>Receptor for Advanced Glycation End products</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
Rpm	Revoluciones por minuto
RR	Rotarod
RT	Temperatura ambiente (<i>Room Temperature</i>)

RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción reversa (<i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
SAD	Enfermedad de Alzheimer esporádica (<i>Sporadic Alzheimer's Disease</i>)
SALL1	Factor de transcripción similar a spalt 1 (<i>Spalt like transcription factor 1</i>)
sAPPα	Fragmento N-terminal soluble de APP alfa (<i>Soluble Amyloid Precursor Protein Alpha</i>)
sAPPβ	Fragmento N-terminal soluble de APP beta (<i>Soluble Amyloid Precursor Protein Beta</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEC	Sistema Endocannabinoide
SEM	Error estándar de la media (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SNC	Sistema Nervioso Central
SR-A1	Receptor scavenger clase A1 (<i>Class A1 scavenger receptors</i>)
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>)
Tg	Ratones transgénicos
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)
TLRs	Receptores tipo Toll (<i>Toll Like Receptors</i>)
TMEM119	Proteína transmembrana 119 (<i>Transmembrane protein 119</i>)
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>)
TREM2	Receptor de activación expresado en células mieloides 2 (<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2</i>)
TS	Prueba de suspensión por cola (<i>Tail Suspension test</i>)
U.a	Unidades arbitrarias
UFV	Universidad Francisco de Vitoria
VEH	Vehículo
WB	<i>Western-blot</i>
WT	Tipo salvaje (<i>Wild-type</i>)

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	9
1. Enfermedad de Alzheimer	11
1.1. Aspectos generales.....	11
1.2. Etiología	13
1.3. Fisiopatología de la enfermedad	14
1.3.1. Hipótesis amiloidogénica.....	15
1.3.1.1. Síntesis del péptido A β	15
1.3.1.2. Dinámica de las placas de A β	18
1.3.2. Hipótesis de la propagación de tau	20
1.3.3. Hipótesis neuroinflamatoria.....	21
1.4. Clínica y diagnóstico	22
1.5. Tratamiento de la EA.....	24
1.6. Interacción glía-neurona	26
1.6.1. Neurona	26
1.6.2. Astrocito.....	27
1.6.3. Microglía.....	28
1.6.3.1. Activación microglial.....	30
1.6.3.2. Morfología microglial	34
1.7. Modelos murinos de la EA	36
2. Sistema endocannabinoide.....	38
2.1. Generalidades del SEC.....	38
2.2. Cannabinoides	40
2.2.1. Fitocannabinoides	40
2.2.2. Endocannabinoides.....	41
2.3. Receptores cannabinoides.....	42

2.4. Metabolismo de los cannabinoides	44
3. Alteraciones del SEC en el contexto de la EA	47
4. Modulación del SEC como estrategia terapéutica para la EA.....	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. Aproximaciones experimentales.....	57
1.1. Diseño experimental I	58
1.2. Diseño experimental II	58
2. Animales de experimentación	59
2.1. WT.....	60
2.2. 5xFAD	60
2.3. FAAH ^{-/-}	61
2.4. CX3CR1 ^{+/GFP}	62
3. Genotipado	63
4. Tratamientos farmacológicos.....	65
4.1. Cannabinoides	65
4.2. PLX5622	66
5. Pruebas comportamentales	67
5.1. Barnes Maze	67
5.2. Elevated Plus Maze.....	69
5.3. Tail Suspension Test.....	69
5.4. Rotarod	70
5.5. Open-Field test	71
6. Transcriptómica.....	72
7. Análisis moleculares.....	73
7.1. Obtención de las muestras	73
7.2. RT-qPCR.....	73
7.3. Western-blot.....	76

7.4. ELISA para cuantificar el péptido A β ₁₋₄₂	78
8. Imagen <i>in vivo</i> 2PE.....	79
8.1. Cirugía de ventana craneal.....	80
8.2. Adquisición de imágenes por microscopía 2PE	82
8.3. Reconstrucción 3D y análisis de las imágenes.....	85
9. Análisis estadísticos	89
RESULTADOS	91
1. Evaluación del potencial efecto antiinflamatorio y neuroprotector del CBD, THC y una combinación de ambos sobre la patología amiloide	93
1.1. Datos comportamentales	93
1.1.1. Memoria espacial	93
1.1.2. Ansiedad	95
1.1.3. Depresión	96
1.1.4. Coordinación motora	97
1.1.5. Actividad locomotora	97
1.2. Caracterización molecular	99
1.2.1. Expresión de receptores cannabinoideos y marcadores inflamatorios	99
1.2.2. Activación glial y daño neuronal	101
1.2.3. Niveles de A β ₁₋₄₂	103
2. Estudio del impacto de la inactivación genética de la enzima FAAH en el contexto de la EA.....	104
2.1. Datos comportamentales	105
2.1.1. Memoria espacial	105
2.2. Perfil transcriptómico	106
2.3. Caracterización molecular	108
2.3.1. Inflamasoma canónico NLRP3	108
2.3.2. Citoquinas proinflamatorias.....	111
2.3.3. Componentes del SEC.....	113

2.3.4. Señalización vía CSF1R	116
3. Dinámica <i>in vivo</i> de las células microgliales y placas amiloides	119
DISCUSIÓN	125
CONCLUSIONES	139
CONCLUSIONS	143
BIBLIOGRAFÍA	147
ANEXO I	189
ANEXO II	195
ANEXO III	199
ANEXO IV	205
ANEXO V	215
ANEXO VI	219
ANEXO VII	235

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa crónica considerada la forma más común de demencia en todo el mundo. Esta patología sigue una progresión gradual, culminando en la manifestación de la demencia, que compromete significativamente el grado de autonomía del paciente. Mientras que la EA familiar tiene un origen hereditario, existen factores de riesgo, como la edad o el estilo de vida, que favorecen el desarrollo de la EA esporádica (>90 % de los casos). Algunas características patológicas del parénquima cerebral de los pacientes con EA son los ovillos neurofibrilares y las placas compuestas, principalmente, por el péptido β -amiloide ($A\beta$). En paralelo, se desencadena un proceso neuroinflamatorio que favorece la pérdida neuronal y la atrofia cerebral del paciente. Entre las terapias emergentes para la EA se encuentra la modulación de la respuesta inflamatoria a través del sistema endocannabinoide (SEC). Este complejo sistema participa en procesos biológicos como la regulación de la homeostasis del SNC, por lo que, en los últimos años, la modulación de los componentes del SEC ha surgido como una estrategia terapéutica y diagnóstica potencial en las enfermedades neurodegenerativas, como la EA. Entre las aproximaciones terapéuticas, la exposición a fitocannabinoides ha demostrado atenuar la neuroinflamación asociada a la EA en estudios preclínicos. Además, el desarrollo de inhibidores de las enzimas catabólicas de los eCBs, como FAAH o MAGL, han demostrado aumentar su efecto biológico, produciendo efectos beneficiosos en el organismo.

Para explorar el potencial terapéutico de la modulación del SEC en la EA, en la presente tesis se llevó a cabo la administración crónica de dosis bajas de cannabinoides y la evaluación de los efectos de la inactivación genética de FAAH en ratones 5xFAD. Para ello se emplearon diferentes metodologías que incluyen tanto estudios comportamentales, como técnicas de biología molecular (qPCR, WB o ELISA) y microscopía intravital dos fotones.

Respecto a la administración crónica de THC y CBD, se observó que el tratamiento crónico con dosis bajas de THC, CBD o CBD:THC afectaba significativamente al comportamiento de los ratones 5xFAD. Concretamente, el tratamiento con THC indujo un fenotipo ansioso-depresivo en este modelo de amiloidosis. Además, los efectos del CBD y THC sobre la memoria espacial del modelo 5xFAD fueron diferentes, dependiendo de si los cannabinoides se administraban en combinación o como dosis independientes. A nivel molecular, el tratamiento con cannabinoides aumentó los niveles de la forma insoluble del péptido $A\beta_{1-42}$ en la corteza cerebral de ratones 5xFAD, pero sin alterar la expresión de parámetros inflamatorios.

Por otro lado, la elevación crónica del tono endocannabinoide en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} condujo a un contexto neuroinflamatorio exacerbado que, paradójicamente, estaba acompañado de efectos neuroprotectores. Los resultados demostraron que la inactivación

genética de FAAH inducía un perfil génico y morfológico diferente en la microglía, a pesar de que FAAH no se expresa prácticamente en este tipo celular. La ablación microglial tras el tratamiento con PLX5622 reveló cambios importantes en la morfología de la microglía, dependientes de su localización respecto a la placa amiloide. Concretamente, la microglía 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} asociada a placa mostró una morfología más estable tras el tratamiento con PLX5622 en comparación con el modelo 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+}, que presentó procesos más cortos, más esféricos y menos ramificados. Además, se observó un incremento del porcentaje de la microglía MeO-X04⁺ y un volumen estable de las placas amiloides por la inactivación genética de FAAH en el contexto patológico de ablación microglial.

Gracias a estas dos aproximaciones experimentales, y a pesar de que existen mecanismos moleculares subyacentes por esclarecer aún, hemos aportado datos relevantes sobre el potencial terapéutico que podría tener la administración de cannabinoides en la patología amiloide, así como el papel regulador de la enzima FAAH en la función microglial en este contexto patológico. Estos hallazgos podrían contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con un valor traslacional significativo.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative pathology considered the most common form of dementia worldwide. This pathology follows a gradual progression, leading to the manifestation of dementia, which significantly compromises the patient's autonomy. While familial AD has a hereditary basis, factors such as age and lifestyle contribute to the development of sporadic AD (>90% of cases). Pathological hallmarks of the AD brain include neurofibrillary tangles and neuritic plaques composed primarily of β -amyloid peptide ($A\beta$). In parallel, a neuroinflammatory process is triggered that accelerates neuronal loss and cerebral atrophy. One of the emerging therapies for AD consists in the modulation of the inflammatory response through the endocannabinoid system (ECS). This complex system participates in several biological processes including the regulation of the central nervous system homeostasis. Therefore, ECS modulation has emerged as a potential therapeutic and diagnostic strategy for neurodegenerative diseases like AD. Preclinical studies have demonstrated that phytocannabinoids can attenuate AD-associated neuroinflammation. Furthermore, the development of inhibitors for ECS-related catabolic enzymes, like FAAH or MAGL, has shown to enhance the biological effect of eCBs, offering potential therapeutic benefits.

To explore the therapeutic potential of ECS modulation in AD, this thesis examined the chronic administration of low-dose CBD, THC and a combination of both and the effects of FAAH genetic inactivation in 5xFAD mice. To that end, different methodologies were used, including behavioral studies, molecular techniques (qPCR, WB or ELISA) and two-photon intravital microscopy.

Regarding the administration of THC and CBD, it was observed that chronic treatment with low-dose THC, CBD, or CBD:THC significantly altered the behavior of 5xFAD mice. Specifically, THC induced an anxious-depressive phenotype in this amyloidosis mouse model. In addition, the effects of CBD and THC on the spatial memory of 5xFAD mice were different, depending on whether the cannabinoids were administered in combination or as independent doses. At the molecular level, cannabinoids treatment increased insoluble $A\beta_{1-42}$ levels in the cerebral cortex of 5xFAD mice without affecting inflammatory-related markers.

On the other hand, the chronic elevation of the endocannabinoid tone in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice exacerbated neuroinflammation, paradoxically accompanied by neuroprotective effects. The results showed that the genetic inactivation of FAAH induced a different gene and morphological profile in microglia, even though FAAH is barely expressed in this cell type. Microglial ablation using PLX5622 revealed significant alterations in microglial morphology, dependent on their proximity to amyloid plaques. Specifically, microglia associated with

plaques in 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} mice exhibited a more stable morphology after PLX5622 treatment compared to 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+} mice, which displayed shorter, more spherical, and less branched processes. Additionally, the percentage of MeO-XO4⁺ microglia increased, and amyloid plaque volume remained stable in 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} mice following microglial ablation.

These findings underscore the therapeutic potential of CBD and THC administration in amyloid pathology and highlight the regulatory role of FAAH in microglial function in pathological context. While further investigation is needed to elucidate the underlying molecular mechanisms, these results could contribute to the development of novel therapeutic strategies with relevant translational value.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Alzheimer

1.1. Aspectos generales

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa crónica considerada la forma más común de demencia en todo el mundo, representando entre un 60 y un 70 % de los casos (1). También existen otros tipos de demencia entre los que se encuentran: la derivada de las patologías vasculares, la degeneración frontotemporal, los cuerpos de Lewy, etc. (figura 1) (2). Presentan una sintomatología similar y, a menudo, coexisten en el paciente formas mixtas, por lo que el diagnóstico de cada tipo de demencia y, por ende, el estudio de su epidemiología resulta complejo.

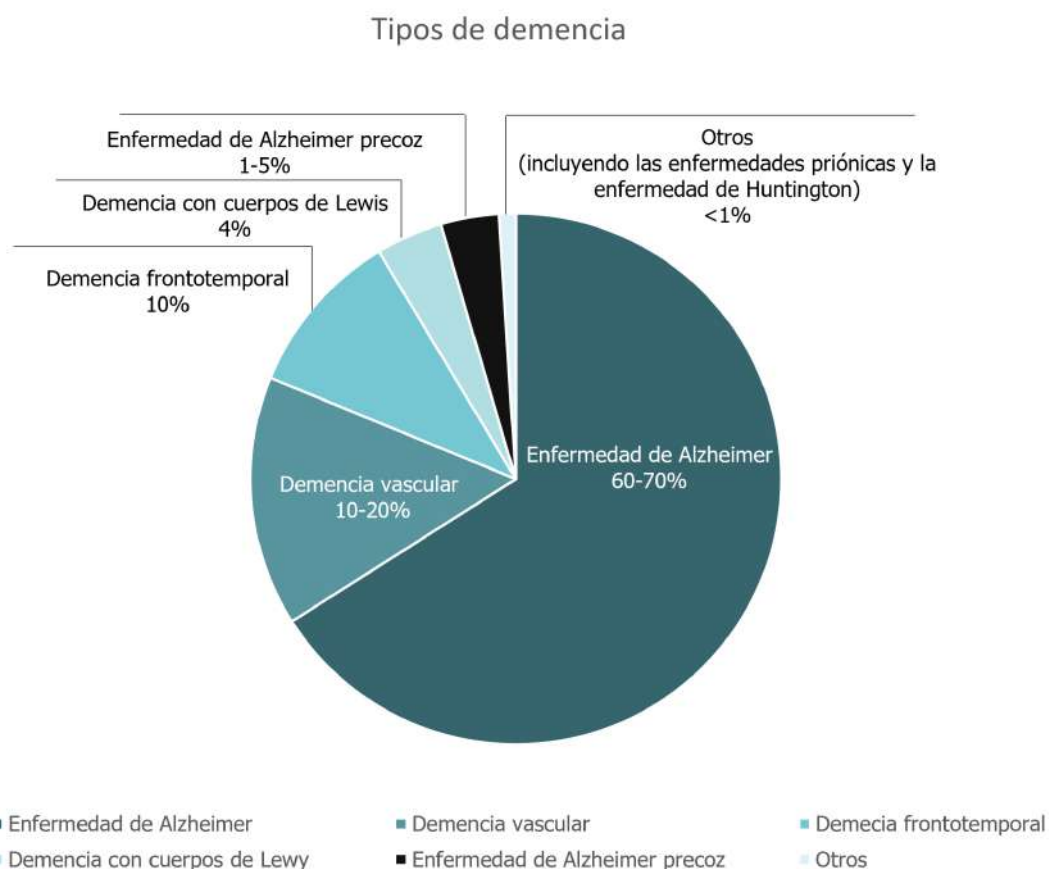


Figura 1: Formas más comunes de demencia en todo el mundo. La manifestación predominante de demencia es la enfermedad de Alzheimer (60-70 %), seguida de la demencia vascular (10-20 %), la demencia frontotemporal (10 %), la demencia con cuerpos de Lewis (4 %), la enfermedad de Alzheimer precoz (1-5 %) y otras variantes (<1 %), que incluyen las enfermedades priónicas y la enfermedad de Huntington. Imagen adaptada de (2).

Uno de los criterios clínicos para el diagnóstico de la EA es la presencia de cambios estructurales, tanto macroscópicos como microscópicos, en el parénquima cerebral del paciente (figura 2). El estudio *postmortem* de muestras cerebrales de pacientes con EA ha permitido realizar un diagnóstico definitivo de la patología en un 85 % de los casos examinados de personas que presentaban deterioro cognitivo (3). A nivel macroscópico, se produce una dilatación ventricular y una atrofia de la amígdala, el hipocampo y la corteza como consecuencia de la muerte neuronal que tiene lugar en estas áreas cerebrales. A nivel microscópico, se aprecian, principalmente, ovillos neurofibrilares intraneuronales de la proteína tau hiperfosforilada y acúmulos extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) en forma de placa (4). El depósito de los ovillos neurofibrilares resulta en una alteración de las funciones fisiológicas, apoptosis y pérdida neuronal, que desencadena el deterioro cognitivo y la progresión de la enfermedad (5).

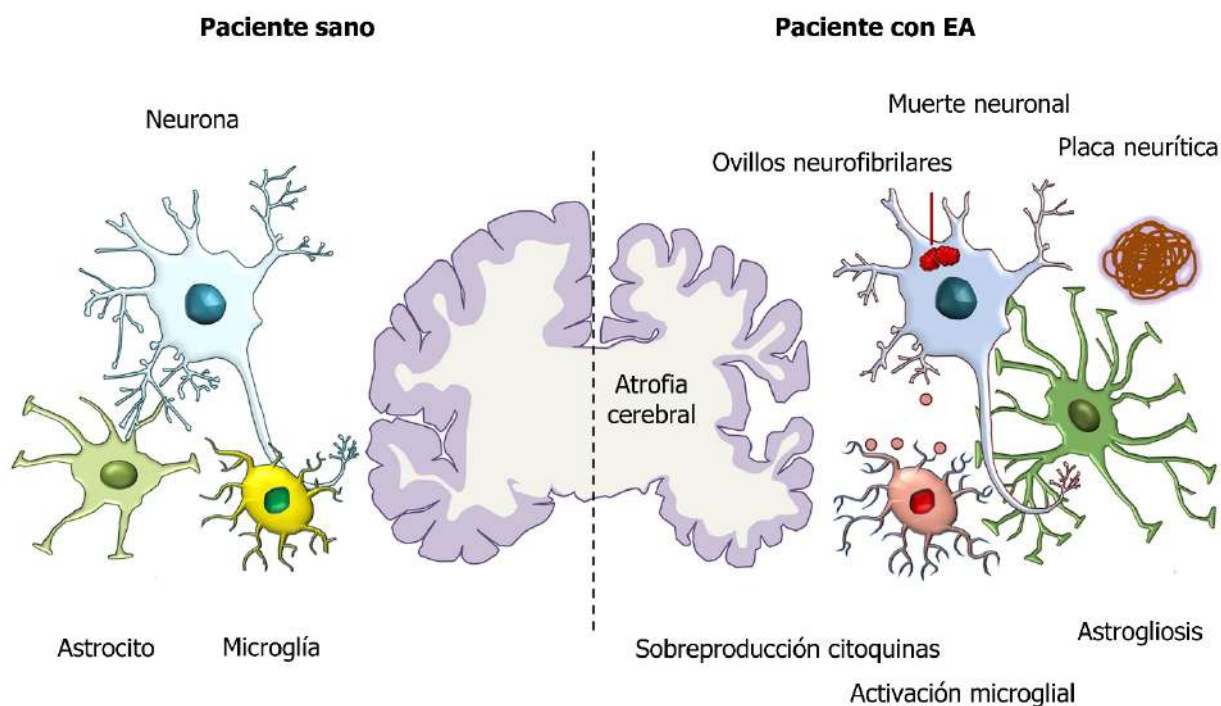


Figura 2: Principales características patológicas de la EA. Esquema de los cambios patológicos del parénquima cerebral de un paciente con EA en comparación con otro sano. A nivel macroscópico, se aprecia la atrofia cerebral resultante de la pérdida neuronal en el contexto de la EA. A nivel microscópico, cabe destacar los depósitos de $A\beta$ extracelulares, los ovillos neurofibrilares intraneuronales de tau hiperfosforilada, la pérdida sináptica, la activación microglial, la astrogliosis, la sobreproducción de citoquinas y la distrofia neurítica. Imagen adaptada de (6).

Las primeras observaciones de estos cambios patológicos las realizó Aloysius "Alois" Alzheimer, psiquiatra y patólogo alemán que diagnosticó un nuevo subtipo de demencia presenil en la paciente Auguste Deter en 1906. Un año después, estos hallazgos fueron publicados bajo el título *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde* (del alemán, "Sobre una extraña enfermedad de la corteza cerebral") en *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* (del alemán, "Revista general de Psiquiatría y Medicina Psiquiátrica Forense") (7,8). No fue hasta 1910 cuando Emil Kraepelin, director de tesis de Alois Alzheimer, empleó por primera vez el término "enfermedad de Alzheimer" en honor a sus observaciones (9).

La EA ocupa el séptimo lugar entre las principales causas de mortalidad y representa una de las principales fuentes de discapacidad y dependencia entre las personas de edad avanzada en todo el mundo (1). En España, actualmente, más de 700.000 personas padecen esta enfermedad y se estima que, en 2050, esta cifra se vea ampliamente duplicada, rondando los 2 millones de personas (10). La prevalencia de la EA es:

En cuanto al sexo (11):

- 11,1 % en mujeres.
- 7,5 % en hombres.

En cuanto a la edad (11):

- 4,2 % en personas de 65 a 74 años.
- 12,5 % en personas de 75 a 84 años.
- 27,7 % en personas con más de 85 años.

1.2. Etiología

Existen dos subtipos de EA conocidos como demencia presenil o FAD (del inglés, Familial Alzheimer's Disease) y demencia senil o SAD (del inglés, Sporadic Alzheimer's Disease) (12). La FAD es de aparición temprana, es decir, se manifiesta en personas menores de 65 años quienes presentan mutaciones autosómicas dominantes en alguno de estos tres genes, principalmente implicados en la síntesis del péptido A β (13):

- **App**, en el cromosoma 21, que codifica para la proteína precursora del péptido A β .
- **Ps1**, en el cromosoma 14, que codifica para la presenilina 1.
- **Ps2**, en el cromosoma 1, que codifica para la presenilina 2.

Aunque la FAD representa tan solo el 5 % de los casos, su estudio ha permitido profundizar en la patogénesis de la SAD, ya que ambos subtipos de EA presentan características comunes entre sí (13–15).

La SAD, por el contrario, es la manifestación más común y tardía de la EA, afectando a personas mayores de 65 años. Además de la edad y el sexo, otros factores de riesgo que favorecen el desarrollo de esta enfermedad son (16):

- Factores genéticos: se han identificado más de 20 locus de riesgo genético para el desarrollo de la EA mediante estudios de asociación de genoma (GWAS, del inglés Genome-wide association studies) (17,18). Uno de los más destacados es la presencia de polimorfismos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) en la apolipoproteína E (APOE), siendo $\epsilon 4$ la que conlleva un mayor riesgo de desarrollar SAD (19).
- Factores psicosociales: el bajo nivel académico (20), la poca actividad cognitiva (21), el aislamiento social (22), la depresión (23) y el estrés (24).
- Otras enfermedades concomitantes: tales como la diabetes (25), la hipertensión (26), la dislipidemia (27), la obesidad (28), las enfermedades cardiovasculares (29) y el daño traumático cerebral (30).
- Estilos de vida: la inactividad física (31), la alteración del sueño (32), el tabaco (33), el consumo de alcohol (34) y la contaminación ambiental (35).

1.3. Fisiopatología de la enfermedad

La EA se caracteriza, principalmente, por la formación extracelular de depósitos de amiloide y la presencia de ovillos neurofibrilares intraneuronales en el parénquima cerebral de los pacientes (36). Junto a la aparición de estos acúmulos proteicos, se desencadena la respuesta inflamatoria, acentuada por la activación exacerbada de las células gliales, el estrés oxidativo, la alteración de los vasos sanguíneos, la disfunción mitocondrial, la degeneración axonal y la disfunción sináptica. Todos estos procesos patológicos favorecen la pérdida neuronal y la consecuente atrofia del parénquima cerebral del paciente (37).

Atendiendo a la complejidad de la EA, se han postulado diversos modelos patológicos para tratar de esclarecer los mecanismos moleculares que subyacen al origen y la progresión de la enfermedad. Caben ser mencionadas la hipótesis amiloidogénica, la propagación de tau y la

inflamatoria, entre otras, tales como la alteración de la transmisión colinérgica, de la cascada mitocondrial, de la homeostasis del calcio, de la función neurovascular, etc. (38).

1.3.1. Hipótesis amiloidogénica

La hipótesis de la cascada amiloide (figura 3), postulada por John Hardy y David Allsop en 1991, identifica al A β como el agente desencadenante de la neurodegeneración y del consiguiente deterioro cognitivo progresivo en el paciente con EA (39,40). Particularmente, los depósitos de la isoforma insoluble del A β provocarían la agregación de tau hiperfosforilada, formando ovillos neurofibrilares (41). Esta teoría es la más aceptada en la actualidad y sirve de guía para el desarrollo de potenciales tratamientos para la enfermedad (42).

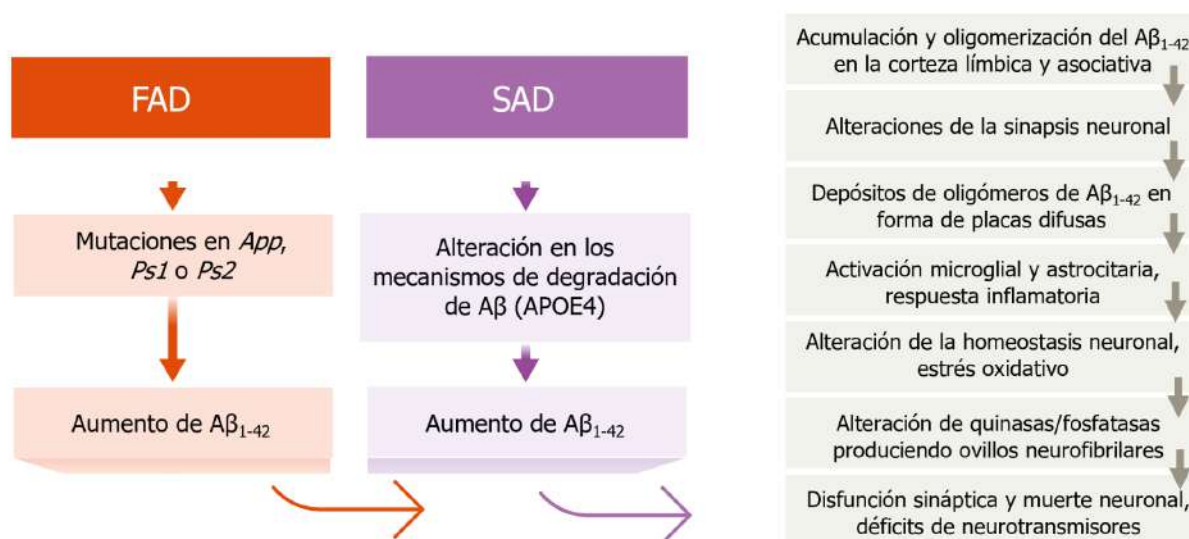


Figura 3: Hipótesis de la cascada amiloide. Secuencia de los principales eventos patológicos que conducen a la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar (FAD) o esporádico (SAD). Imagen adaptada de (42).

1.3.1.1. Síntesis del péptido A β

La proteína precursora del amiloide o APP (del inglés, amyloid precursor protein) es una glicoproteína transmembrana que tiene 8 isoformas diferentes. Las 3 más comunes son la isoforma compuesta por 695 aminoácidos, que se expresa predominantemente en el sistema nervioso central (SNC), y las que contienen 751 y 770 aminoácidos, cuya expresión es ubicua. Aunque su función fisiológica se desconoce con exactitud, APP se localiza, principalmente, en la sinapsis neuronal (43). Esta proteína presenta diversas vías de proteólisis conocidas como

ruta amiloidogénica o no amiloidogénica, en función de si se obtiene entre sus productos el péptido β -amiloide o no (figura 4):

- En el procesamiento no amiloidogénico de APP (44):
 - Primeramente, APP es proteolizada por una α -secretasa (ADAM). Los productos que se obtienen son un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos (C83) y un fragmento N-terminal soluble (sAPP α). sAPP α , al liberarse al medio extracelular, es capaz de modular la transmisión sináptica a través de los receptores GABA, mientras que C83 permanece anclado a la membrana celular.
 - Posteriormente, una γ -secretasa actúa sobre C83, liberando el dominio intracelular de APP (AICD) y el péptido p3 al medio extracelular.
- En el procesamiento amiloidogénico de APP (44):
 - En esta ocasión, una β -secretasa (BACE) actúa sobre APP produciendo un fragmento N-terminal soluble (sAPP β) y otro C-terminal (C99), que quedará en la membrana.
 - A continuación, C99 actúa como sustrato de una γ -secretasa y, como productos finales de esta reacción enzimática, se obtienen el dominio intracelular de APP (AICD) y el péptido A β .

El péptido amiloide es secretado como un monómero al exterior celular con una longitud que comprende desde los 27 hasta los 43 aminoácidos. En condiciones fisiológicas, el A β desempeña un papel relevante en procesos tales como la liberación hormonal, la pigmentación de la piel y la memoria (45–49). Sin embargo, se desconoce el motivo por el cual algunas isoformas del amiloide son patológicas. Concretamente, el A β de 40 (A β ₁₋₄₀) y 42 aminoácidos (A β ₁₋₄₂) son las isoformas del péptido predominantes en la EA. Aunque el A β ₁₋₄₀ es más abundante en su isoforma soluble, el A β ₁₋₄₂ es el principal componente de las placas neuríticas, ya que tiene mayor tendencia a formar agregados en función de su concentración por ser una isoforma con menor solubilidad (50). Estudios previos han demostrado que la ratio A β ₁₋₄₀:A β ₁₋₄₂ es determinante en la agregación, la toxicidad y la distribución patológica del amiloide (51). El A β presenta diferentes estados de agregación (dímeros, trímeros, oligómeros solubles y protofibrillas) hasta que, finalmente, alcanza la conformación de fibrilla insoluble en forma de placa de A β (figura 5) (44).

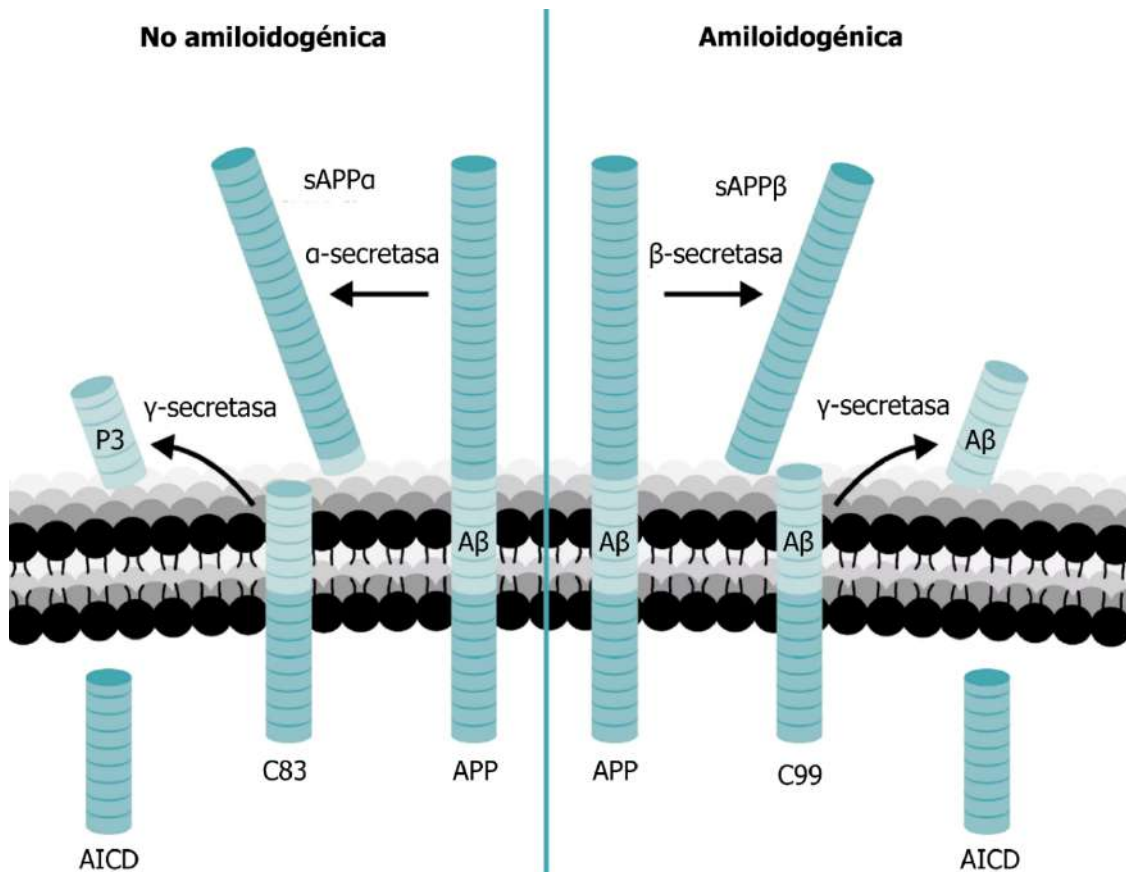


Figura 4: Procesamiento de APP. (A) Ruta no amiloidogénica en la que se obtienen como productos C83 y sAPPα. (B) Ruta amiloidogénica que resulta en la síntesis de AICD y el péptido Aβ. Imagen adaptada de (52).

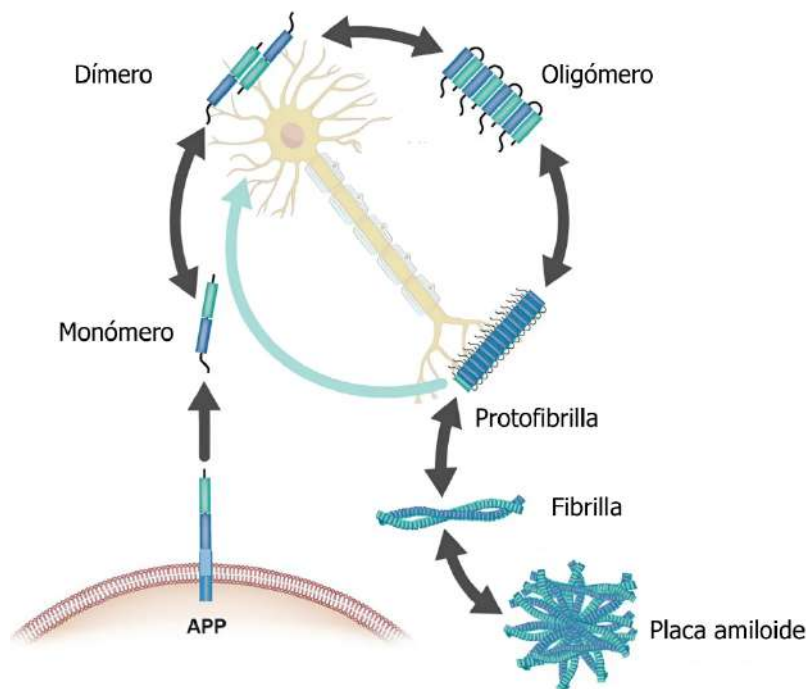


Figura 5: Estados de agregación del Aβ. Las especies de Aβ existen como monómeros, dímeros, oligómeros, protofibrillas, fibrillas y placas de amiloide. Imagen adaptada de (44).

1.3.1.2. Dinámica de las placas de A β

El término "placa de A β " se emplea comúnmente para referirse a los depósitos de amiloide en el tejido. Estudios de proteómica han especulado con que los depósitos de A β actúan como base para favorecer que otras proteínas se acumulen en las placas y, en consecuencia, se induzca la aparición de neuritas distróficas y la neurodegeneración durante el transcurso de la EA (53). Cuando las placas de A β se encuentran rodeadas por neuritas distróficas, generalmente, se usa el término "placas neuríticas" para nombrar a estos depósitos.

Existen diferentes técnicas de tinción para detectar las placas de A β y profundizar en el estudio de su morfología, incluyendo sondas fluorescentes de luz infrarroja cercana, como NIAD-4, CRANAD-2, BAP-1 y 1,4-bis(4'-hidroxiestiril)-2-metoxibenceno (MeO-X04) (54,55). Entre estas sondas cabe destacar el MeO-X04, que es un derivado del rojo Congo y la crisamina-G, caracterizado por su alta especificidad por el péptido amiloide, su gran capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y su mayor penetración en el tejido, minimizando, a su vez, la fototoxicidad y el fotoblanqueo (56,57). El MeO-X04 se emplea profusamente en combinación con la microscopía intravital de dos fotones para la realización de estudios *in vivo* en la investigación preclínica. Esta novedosa técnica de microscopía evita la dispersión de la luz, proporciona imágenes de mayor resolución al excitar únicamente en el punto focal y evita la fototoxicidad y el fotoblanqueo, empleando dos fotones de menor energía (58,59). Como ejemplo de agente de marcaje con aplicación clínica, cabe destacar el Pittsburgh B, que es un derivado de la tioflavina T. Este compuesto es capaz de unirse a la conformación fibrilar del péptido A β , lo que permite visualizar los depósitos de amiloide *in situ* en el parénquima cerebral de pacientes con EA mediante tomografía por emisión de positrones (60–62).

Estas nuevas técnicas de tinción y de microscopía han permitido identificar y describir una gran diversidad de morfologías asociadas a las placas de A β . Los 3 subtipos principales son: el difuso (figura 6 A1), el compacto (figura 6 A2) y el núcleo denso (figura 6 A3) (63).

Estudios previos han sugerido una estrecha relación entre las diferentes conformaciones del péptido A β y la morfología de la placa (64–66). Por ejemplo:

- Las placas difusas se caracterizan por estar compuestas, mayoritariamente, por bajas concentraciones de A β con una conformación oligomérica y protofibrilar (figura 6 B1).
- Las placas compactas constituyen un grupo heterogéneo formado por fibrillas de A β (figura 6 B2).

- Las placas con núcleo denso presentan mayores concentraciones de A β en comparación con las compactas (figura 6 B3) (63).

Existe controversia respecto a cómo tiene lugar el proceso de formación de las placas amiloides. Algunas hipótesis sostienen que las placas difusas desencadenan el desarrollo de una nueva placa, mientras que otras destacan la relevancia de la participación celular en el desarrollo de la placa de núcleo denso. Esta última teoría se postula tras observarse contenido lipídico en los núcleos densos, que podría provenir de neuritas localizadas en torno a la placa, de microglía activada o de procesos que integrarían el contenido de la membrana celular al núcleo de la placa (63). Mayoritariamente, las placas neuríticas contienen neuritas distróficas positivas para tau y presentan una fuerte activación local del sistema inmune, en particular de las células de microglía (67).

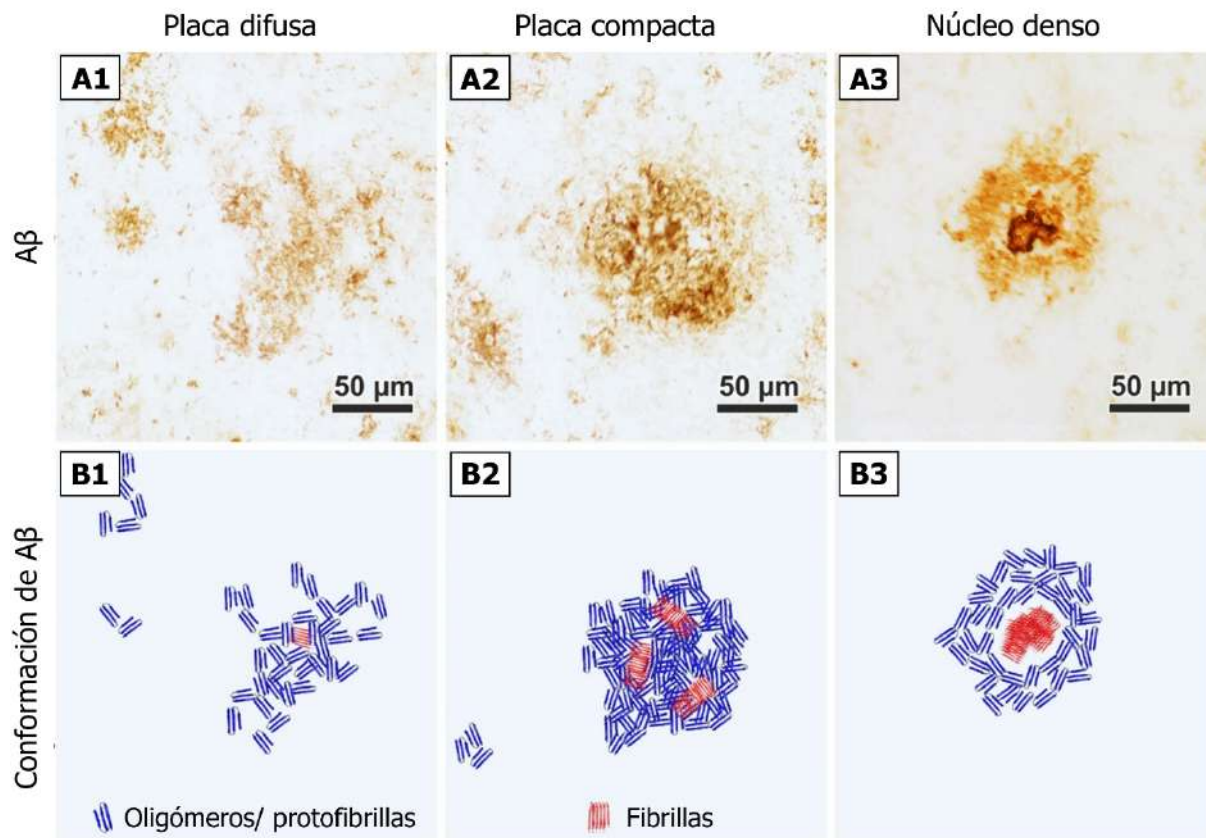


Figura 6: Principales tipos de placas amiloides presentes en el tejido cerebral humano. Imágenes representativas de una placa difusa (A1), compacta (A2) y núcleo denso (A3) obtenidas por inmunohistoquímica. B) Propuesta de la composición de cada tipo de placa atendiendo a los diferentes estados de agregación del péptido A β . Imagen adaptada de (63).

1.3.2. Hipótesis de la propagación de tau

La hipótesis de la propagación de tau, postulada en 2009, sostiene que la taupatía en la EA comienza en áreas localizadas del cerebro y, posteriormente, se extiende por el parénquima cerebral de los pacientes (68). Estudios previos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la inoculación de tau de forma exógena favorece el desarrollo de la patología, sugiriendo que tau podría comportarse como un patógeno endógeno responsable de desencadenar el proceso neurodegenerativo de la EA (69).

Tau es una fosfoproteína compuesta por 16 exones cuya expresión es elevada en el SNC. Su fosforilación regula la afinidad de unión de esta proteína a los microtúbulos y participa en procesos como la regulación de la distribución subcelular y el transporte axonal de las células neuronales (70–72). Tau contiene ciertos residuos (treonina, serina y tirosina) susceptibles de ser fosforilados (73). La hiperfosforilación de esta proteína desencadena el desensamble de los microtúbulos y altera la organización del citoesqueleto neuronal. En consecuencia, tau fosforilada se acumula en el citoplasma neuronal e induce la formación de oligómeros solubles. Estos se agregan formando filamentos insolubles helicoidales pareados y, finalmente, constituyen los ovillos neurofibrilares característicos de la EA (figura 7) (74,75).

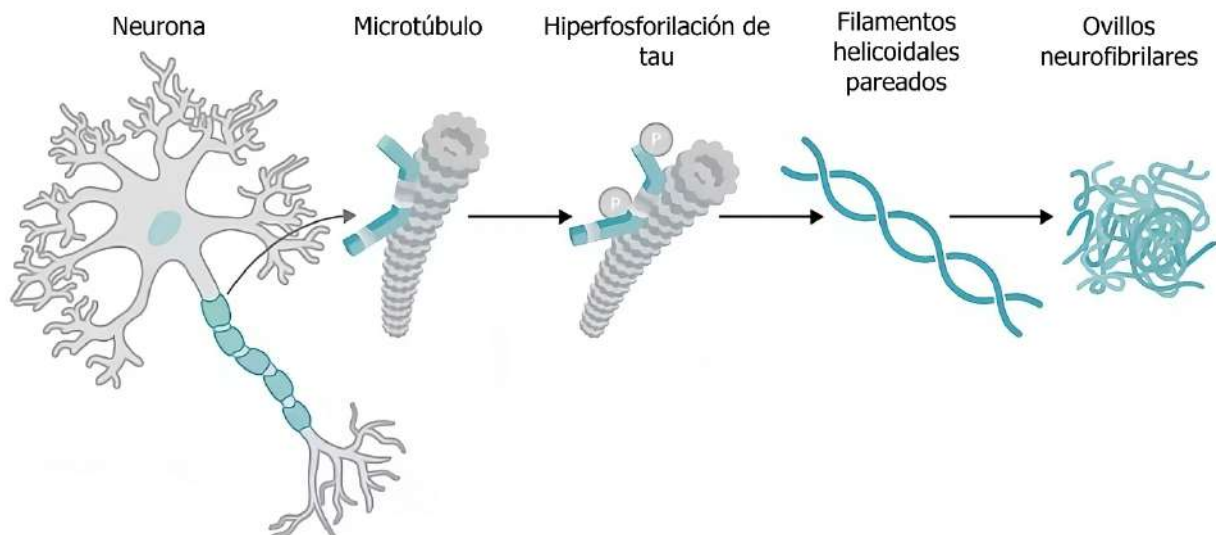


Figura 7: Formación de ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada en taupatías. En condiciones patológicas, tau se hiperfosforila y se desensambla de los microtúbulos, lo que resulta en su agregación formando filamentos helicoidales pareados y ovillos neurofibrilares. Imagen adaptada de (52).

Con frecuencia, el número de ovillos de tau se asocia al grado de severidad de demencia en los pacientes que sufren la EA (76). Se ha observado que la patología de tau comienza al menos una década antes de la formación de las placas de A β y que la disfunción sináptica y el deterioro cognitivo del paciente anteceden a la aparición de los ovillos neurofibrilares. Por tanto, se ha propuesto que los oligómeros solubles de tau sean posibles desencadenantes de la neurodegeneración (77).

1.3.3. Hipótesis neuroinflamatoria

El término "neuroinflamación" hace referencia a la respuesta inflamatoria que tiene lugar en el SNC por la acumulación de células gliales en respuesta a un daño (78). En pacientes con EA, se ha observado un acúmulo de astrocitos reactivos en torno a las placas neuríticas, aunque el modo de contribución de este tipo celular a la formación de las placas está aún por esclarecer (79). También, se ha detectado un incremento de la actividad de las células microgliales y una mayor concentración de este tipo celular en torno a las placas de A β y a neuronas con ovillos neurofibrilares (38,80). Por este motivo, la neuroinflamación mediada, principalmente, por la activación microglial se ha convertido en el foco de las investigaciones relativas a la EA (81).

Según la hipótesis neuroinflamatoria, la patología se desarrolla debido a la reacción de las células gliales ante la presencia de los oligómeros de tau o los depósitos de A β en el contexto de la EA (38,82).

En los primeros estadios de la enfermedad, las células inmunes desempeñan un papel neuroprotector. Sin embargo, a medida que progresa la EA, la activación crónica de las células gliales desencadena una respuesta inflamatoria exacerbada y neurotóxica (78). En consecuencia, se induce la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias asociadas al estrés oxidativo, que puede agravar la patología amiloide y la taupatía mediante diferentes mecanismos. Un ejemplo es la activación de receptores neuronales, que desencadena la hiperfosforilación y agregación patológica de tau (83).

Algunos investigadores consideran la muerte neuronal, con la consiguiente liberación de su contenido citoplásmico, como el principal desencadenante de la activación de la microglía, la cual se agrupa formando las placas neuríticas (84). Sin embargo, existen diversas opiniones con relación a la aparición de las placas neuríticas. Otras investigaciones sugieren que la

microglía se activa en torno a las placas debido a la neurotoxicidad de los oligómeros de A β , que provocan distrofia axonal (67).

El empleo de inhibidores de CSF1R (del inglés, colony stimulation factor 1 receptor), que eliminan las células de microglía, ha mostrado un descenso de las neuritas distróficas en torno a las placas de A β en modelos murinos, sugiriendo que la presencia de la microglía es necesaria para la formación de las neuritas distróficas (85). La microglía tiene receptores, como TREM2 (del inglés, triggering receptor expressed on myeloid cells 2), implicados en la fagocitosis de patógenos y agentes extraños presentes en el organismo. TREM2 se considera un factor genético relevante en la EA, puesto que es el primer receptor microglial cuya mutación se ha asociado a una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad (86). Se ha observado que la inactivación de TREM2 favorece el desarrollo de neuritas distróficas positivas para tau fosforilada en torno a las placas de amiloide (87). A su vez, la activación crónica de TREM2, paradójicamente, reproduce los mismos efectos (88). Por tanto, tal y como refleja la ejemplificación previa con TREM2, la función de la microglia en la EA es objeto de debate en la actualidad, ya que sus efectos dependen del contexto y el estadio de progresión de la enfermedad.

1.4. Clínica y diagnóstico

La EA se desarrolla de forma progresiva en el paciente. Se caracteriza por una primera fase preclínica asintomática, con biomarcadores propios de la enfermedad, una segunda fase, donde se producen las alteraciones cognitivas y/o comportamentales leves, y una tercera fase, en la que el paciente desarrolla la demencia propia de la EA (89).

- La fase preclínica: es de aparición más temprana. Aunque el paciente presenta algunas características patológicas de la EA, esta fase es asintomática y no afecta a su vida diaria (89). La duración oscila entre 6 y 10 años, dependiendo de la edad a la que se inicie esta fase (90,91). Algunos estudios han demostrado que solo el 20-30 % de los pacientes con EA preclínica desarrolla alteraciones cognitivas debido a la patología (91,92). Algunos factores de riesgo, como la edad, el sexo o APOE, favorecen la progresión hacia la siguiente fase.
- La fase de alteraciones cognitivas y/o comportamentales: los síntomas iniciales incluyen la pérdida leve de la memoria a corto plazo y de otras funciones, como el lenguaje. Además, algunos casos desarrollan alteraciones comportamentales leves

(93). Se ha descrito que el 43,4 % de los pacientes con este tipo de deterioro desarrollan la demencia asociada a la EA (92).

- La fase de demencia característica de la EA: los pacientes que se encuentran en esta fase de la enfermedad tienen una sintomatología que repercute negativamente en el grado de independencia del paciente (94).

Algunas características clínicas de la EA son la pérdida progresiva de la memoria, alteraciones del lenguaje (afasia), imposibilidad de identificar los estímulos percibidos a través de los sentidos (agnosia) y trastornos locomotores (apraxia). La enfermedad también puede manifestarse en el paciente a través de síntomas psicológicos, como las alucinaciones, alteraciones de la ansiedad, la depresión e incluso cambios de la personalidad. El 50 % de los pacientes presentan síntomas depresivos (anhedonia, disforia, culpa, disminución del apetito, pérdida de peso y dificultad para concentrarse), tendencia a gritar y síntomas psicóticos (alucinaciones, delirio y paranoia). Además, se ha reportado una conducta agresiva y violenta asociada a la EA en el 20 % de los casos (95). La prevalencia y severidad de las alteraciones del comportamiento varían en cada paciente y depende de la localización y severidad del daño cerebral, la personalidad premórbida, el ambiente y la relación con otras personas (96).

En 1984, el consorcio NINCDS-ADRDA (del inglés, National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) estableció una serie de criterios para el diagnóstico de la EA. Inicialmente, el diagnóstico clínico se realizaba en el estadio de demencia del paciente. Sin embargo, el pronóstico definitivo de la enfermedad tenía lugar tras la realización de análisis histopatológicos a biopsias o autopsias (97).

Actualmente, la valoración clínica de la EA se ha reforzado gracias al desarrollo de nuevas técnicas de imagen y detección, como la resonancia magnética, que permite analizar la atrofia tisular, y la fluorodesoxiglucosa, para estudiar alteraciones del metabolismo celular. Además, la detección y el descubrimiento de nuevos biomarcadores, tales como el péptido β -amiloide y la proteína tau hiperfosforilada en el líquido cefalorraquídeo, han permitido diferenciar la EA de otras formas de demencia e, incluso, diagnosticar la enfermedad en la fase preclínica (37,98).

1.5. Tratamiento de la EA

Se han desarrollado diversos fármacos para tratar la EA, aunque aún no se ha encontrado una terapia efectiva que cure la enfermedad. En enero de 2024, se registraron 164 ensayos clínicos para analizar los efectos de 127 fármacos en pacientes con la EA. 96 de estas terapias se centran en la modificación de los mecanismos patológicos, mientras que 31 de ellas se focalizan en el tratamiento de la sintomatología de los pacientes con EA, incluyendo el deterioro cognitivo, las alteraciones comportamentales y los trastornos psiquiátricos (99).

Los fármacos clásicos, empleados por excelencia, pertenecen a la familia de los inhibidores de la colinesterasa (donepezilo, galantamina y rivastigmina) y los antagonistas de NMDA (memantina). Se caracterizan por tratar el deterioro cognitivo de la enfermedad sin modificar los mecanismos moleculares responsables de la patología. Se han identificado posibles efectos secundarios asociados a este tipo de fármacos, tales como náuseas o dolores de cabeza (100).

Además, se ha aprobado el uso del brexpiprazol y el suvorexant para el tratamiento de las alteraciones comportamentales del paciente. Por un lado, el brexpiprazol se emplea para tratar la agitación asociada a la EA, gracias a su capacidad de interacción con los receptores de dopamina y serotonina. Es un antipsicótico atípico cuyo uso se restringe a aquellos casos en los que no haya funcionado otro tipo de intervención no farmacológica, puesto que se ha observado un aumento del riesgo de infarto y de la mortalidad en personas de edad avanzada (101,102). Por otro lado, el suvorexant se utiliza para tratar el insomnio asociado a la enfermedad, ya que inhibe la actividad de las orexinas (103). Entre los posibles efectos secundarios de este tratamiento se encuentran la alteración de la coordinación motora, que impide al paciente conducir, así como la parálisis del sueño y los trastornos respiratorios (100).

Actualmente, ha incrementado la diversidad de las estrategias terapéuticas centradas en la modificación de los mecanismos moleculares subyacentes a la patología (tabla 1). Un ejemplo es el empleo de anticuerpos, como aducanumab y lecanemab, para la eliminación de las placas y de las protofibrillas del péptido A β (100).

Tabla 1: Estrategias terapéuticas para la EA. Resumen de las diferentes terapias propuestas en la actualidad, mencionando el mecanismo de acción correspondiente y algunos ejemplos de cada una de ellas.

Tabla modificada de (104).

Terapia	Mecanismo de acción	Ejemplos
Pequeñas moléculas multidiana	Inhibir enzimas (colinesterasas y BACE-1), quelar iones metálicos e inhibir la agregación del péptido A β	Derivados de tacrina, deferiprona y derivados de triazina
	Modular la expresión, la agregación y la modificación postraducciona de tau, y estabilizar los microtúbulos	Derivados de tacrina, derivados de metiltioninio, memantina, salsalato, MK-8719, TPI 287 y BPN14770
	Controlar el estrés oxidativo (neurodegeneración y disfunción mitocondria)	Luteolina, epigallocatequina-3-galato, melatonina, coenzima Q10, berberina, edaravona, hiperósido, vitamina E, curcumina, resveratrol, quercetina y ácido rosmarínico
Anticuerpos	Especificidad de unión por tau	Gosuranemab, tilavonemab, semorinemab y zagotenemab
	Especificidad de unión por agregados de A β .	Solanezumab, gantenerumab, crenezumab, aducanumab y lecanemab
Nanopartículas	Liberar de forma dirigida el fármaco o actuar como biosensores para el diagnóstico temprano y el seguimiento no invasivo de la progresión de la patología	Nanopartículas magnéticas de oro y plata
Vacunas	Desencadenar una respuesta inmunitaria activa para tau	AADvac1 y ACI-35
Terapia génica	Inducir la expresión de moléculas terapéuticas y anticuerpos, y editar el genoma	Vectores virales o no virales, CRISPR-Cas9, microRNAs y siRNA

Agonistas y antagonistas	Regular la eliminación de oligómeros tóxicos de A β mediante la interacción con receptores (como el receptor sigma 2)	CT1812
Terapia senolítica	Inducir la apoptosis en células senescentes para evitar la disfunción cognitiva y reducir la inflamación	Dasatinib y quercetina
Terapia celular	Aplicar células, como las células madre mesenquimales, para prevenir la muerte neuronal, reducir la neuroinflamación y mejorar la función cognitiva	Lomecel-B

1.6. Interacción glía-neurona

Para lograr una mejor comprensión de los mecanismos patológicos de la EA no solo es importante considerar el comportamiento de cada tipo celular de forma aislada, sino también cómo la microglía y el astrocito se comunican entre sí y, en paralelo, con la neurona (105). Se ha descrito que las interacciones entre las células gliales y neuronales contribuyen al mantenimiento de la homeostasis cerebral (106). Por ejemplo, los astrocitos proporcionan soporte metabólico y nutricional a las neuronas, mientras que las células microgliales regulan la actividad sináptica neuronal mediante la liberación de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento en respuesta a un daño (107).

1.6.1. Neurona

Las neuronas son células excitables, capaces de propagar señales a través de sus potenciales de membrana y de comunicarse con otras células mediante la liberación de neurotransmisores. Existe una gran diversidad de tipos neuronales con 4 regiones morfológicamente y funcionalmente diferentes entre sí: el cuerpo celular, las dendritas, el axón y los terminales presinápticos. Se calcula que el cerebro humano contiene más de 100 billones de neuronas y que cada una es capaz de establecer miles de conexiones sinápticas con otras células (108).

En etapas iniciales de la enfermedad, tiene lugar un proceso de muerte neuronal localizado en áreas cerebrales específicas y, a medida que avanza la patología, se extiende por un gran número de estructuras del cerebro del paciente con EA (109). Se ha identificado una estrecha

relación entre la pérdida neuronal en la región CA1 del hipocampo y la corteza entorrinal con la severidad del deterioro cognitivo (110). Aunque se desconoce el mecanismo responsable del proceso de muerte neuronal, se ha observado que los depósitos de amiloide alteran la liberación de algunos neurotransmisores y, por ende, se ha propuesto al A β como posible agente causante (111). A nivel presináptico, se ha descrito que el A β disminuye la liberación de glutamato y aumenta la secreción de GABA, produciendo un incremento del tono inhibitorio neuronal y alteraciones en el transporte axonal. Mientras que, a nivel postsináptico, el A β desencadena la endocitosis y degradación de los receptores NMDARs (del inglés, N-methyl-d-aspartate receptors) y AMPARs (del inglés, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor), originando una depresión postsináptica y una reducción de la transcripción de genes asociados a la plasticidad sináptica (112).

Los neurotransmisores, además de transmitir señales entre las neuronas, intervienen en la comunicación entre la neurona y la glía, ya que este tipo de células expresa receptores, recaptadores para neurotransmisores y componentes neuroactivos. La presencia de los depósitos de A β , característicos de la EA, desencadena alteraciones en el diálogo neuronaglía (113). En la neurona, favorece la liberación de glutamato y ATP, activando receptores neuronales, como el NMDA, y receptores microgliales, como el purinérgico. En la microglía, induce la síntesis de algunas moléculas implicadas en la señalización glutamatérgica, como, por ejemplo, el ácido quinolínico, que posee efectos excitotóxicos. Simultáneamente, la microglía secreta factores neurotróficos como el BDNF (del inglés, brain-derived neurotrophic factor) y se estimula la liberación neuronal de CX3CL1 (del inglés, C-X3-C motif ligand 1), que es un ligando microglial (113). En el astrocito, desencadena la secreción exacerbada de GABA, que inhibe la plasticidad sináptica (114).

1.6.2. Astrocito

Los astrocitos son células gliales que pueden encontrarse en una conformación fibrosa en la materia blanca y en conformación protoplasmática en la materia gris del SNC (115). Entre sus funciones cabe destacar la regulación de la barrera hematoencefálica (BHE), la neurogénesis, la sinaptogénesis, el mantenimiento de la homeostasis de los neurotransmisores y fluidos, y la formación de canales perivasculares en el sistema glinfático para la eliminación de residuos neurotóxicos, tales como A β o tau (78,116).

Constituyen una población celular muy heterogénea con múltiples perfiles reactivos, entre los que se encuentran la subpoblación proinflamatoria y la antiinflamatoria (117). Por un lado, los

astrocitos adquieren un perfil proinflamatorio o neurotóxico al estar expuestos a mediadores proinflamatorios microgliales, tales como IL1 α , IL1 β (del inglés, interleukin 1-alpha and beta), TNF α (del inglés, tumor necrosis factor-alpha) y C1q (del inglés, complement component 1q), esfingolípidos y neurotrofinas (116,118,119). Este perfil astrocitario sobreexpresa diversos genes, como, por ejemplo, los asociados a la cascada del complemento (117,120). Se ha observado que la unión de IL17 con su receptor astrocitario favorece el reclutamiento de NF κ B (del inglés, nuclear factor kappa B) y la síntesis de factores proinflamatorios como IL1 β , TNF α y NO (121). Por otro lado, algunas citoquinas responsables de la activación del perfil antiinflamatorio o neuroprotector son IL4, IL13 e IL10. Este fenotipo astrocitario se induce por la activación de STAT3 (del inglés, signal transducer and activator of transcription 3) y se caracteriza por la sobreexpresión de factores neurotróficos, trombospondinas y la secreción de IL4, IL10 y TGF β (del inglés, transforming growth factor β) (117,122,123).

Los astrocitos del parénquima cerebral de los pacientes con la EA sufren una serie de cambios conformacionales, transcripcionales y funcionales. Este tipo de astrocito, denominado "reactivo", se caracteriza por la presencia de procesos hipertróficos y la sobreexpresión de las proteínas GFAP (del inglés, glial fibrillary acidic protein), nestina y vimentina (115,124–128). La conformación patológica del amiloide aumenta la sensibilidad de los astrocitos en respuesta a ATP y glutamato, incrementa los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y reduce los de GSH (del inglés, glutathione), alterando el mecanismo de defensa celular contra el estrés oxidativo. Estudios previos han demostrado que la activación crónica de los astrocitos contribuye al proceso neurodegenerativo y a la progresión de la EA (129–132).

1.6.3. Microglía

La microglía son células del sistema inmune innato del SNC. Entre sus principales funciones se encuentran el mantenimiento de la homeostasis cerebral a través de sus procesos, la remodelación sináptica, la liberación de mediadores inflamatorios y la fagocitosis de restos celulares. Además, interacciona con diversos tipos celulares en otros procesos biológicos, como, por ejemplo, la conexión neuronal, la neurogénesis a partir de las células madre neurales, la remielinización y la mielinización realizada por los oligodendrocitos, la vasculogénesis y la revascularización mediadas por las células endoteliales, y la permeabilidad de la BHE regulada por los astrocitos (106,133,134).

El origen de la microglía en el cerebro humano fue estudiado, en primer lugar, por John Kershan, quien observó la infiltración de la microglía durante el desarrollo embrionario y

describió los puntos de migración celular (135). En los seres humanos, los precursores microgliales invaden el primordio cerebral entre las semanas 4,5 y 5,5 de gestación (136,137). La población microglial representa entre el 0,5-16 % del total celular y se mantiene en equilibrio gracias a la regulación de la proliferación local y la apoptosis, sin contribución de progenitores periféricos. La cantidad de las células de microglía varía en función de su localización cerebral, siendo más abundante en el hipocampo, los ganglios basales y la sustancia negra.

Dado que la microglía completa su maduración en el SNC, presenta un perfil génico específico y diferente respecto a los macrófagos residentes en otros tejidos. Particularmente, se caracteriza por una expresión reducida de algunas proteínas de la superficie celular, como CD45 (del inglés, cluster of differentiation 45) y MHCII (del inglés, class II major histocompatibility complex molecules), y un incremento de los niveles de TMEM119 (del inglés, transmembrane protein 119), P2Y12R (del inglés, P2Y12 receptor) y SALL1 (del inglés, spalt like transcription factor 1), entre otras proteínas (138–141).

El desarrollo, la diferenciación y el mantenimiento microglial en el SNC está mediado por múltiples interacciones celulares. Se ha observado que algunas citoquinas secretadas por los astrocitos, como CCL2 y CXCL10, son responsables del reclutamiento de la microglía hacia las zonas dañadas (142,143). En cuanto a la interacción neuronal, se ha descrito que el receptor microglial CSF1R (del inglés, colony stimulating factor 1 receptor) interacciona con IL34 y CSF1L, que son ligandos eminentemente neuronales, para promover el desarrollo y la supervivencia microglial (144–146). Además, el receptor CX3CR1 (del inglés C-X3-C motif chemokine receptor 1), cuya expresión en el cerebro es específica en las células de microglía, interacciona con el ligando neuronal CX3CL1 para regular la proliferación y activación microglial (147,148).

La activación de la microglía media procesos de migración, presentación antigénica y fagocitosis (142,149). En términos morfológicos, la microglía es una población muy heterogénea que presenta múltiples formas intermedias. Sin embargo, se desconoce la relación existente entre la morfología y la actividad de este tipo celular, de ahí la necesidad de continuar profundizando en esta cuestión (137).

1.6.3.1. Activación microglial

Tradicionalmente, se ha empleado la terminología M1 y M2 para clasificar la activación de los macrófagos. El término "M0" se empleó para referirse a la microglía no activada. En función de su polarización hacia uno de los dos fenotipos de activación, se denominó M1 a la activación clásica considerada proinflamatoria y neurotóxica, y M2 a la activación alternativa asociada a la antiinflamación y la neuroprotección (150).

Actualmente, los términos M1 y M2 han quedado obsoletos, por tratarse de una categorización reduccionista de la realidad. El desarrollo de nuevas técnicas, como el análisis *single-cell*, ha permitido concluir que la microglía es capaz de coexpresar marcadores asociados a ambos fenotipos de activación microglial. Esto parece indicar que la microglía *in vivo* no polariza exclusivamente hacia estas categorías, sino que existen diversos fenotipos intermedios (142,151).

Las células de microglía presentan dos modos de respuesta en función del estadio de la patología amiloide. En etapas tempranas, previas a los depósitos de A β en el parénquima cerebral, la activación de la microglía es moderada y neuroprotectora, ya que interviene en la eliminación del A β , la supresión de la hiperfosforilación de la proteína tau y la liberación de factores neurotróficos. Sin embargo, durante la fase clínica de la EA, la activación crónica de la microglía favorece el proceso neurodegenerativo (142,152–156).

El péptido amiloide activa el inflammasoma canónico microglial NLRP3, que es un complejo intracelular compuesto por NLRP3, la proteína adaptadora ASC y la proteína efectora caspasa-1. Su activación aumenta la producción de IL1 β , induce neurotoxicidad e interviene en la fagocitosis microglial. Además, se ha observado que la secreción de la proteína ASC por la microglía activada puede desencadenar la formación de placas neuríticas, favoreciendo la oligomerización y agregación insoluble del amiloide (figura 8) (142,157–159).

No existe un consenso en la actualidad sobre los efectos, beneficiosos o perjudiciales, de la respuesta microglial en la progresión de la EA (160–165). Se ha observado una mayor microgliosis en torno a las placas neuríticas, lo que sugiere que la microglía podría actuar secretando enzimas proteolíticas para degradar el péptido A β y expresando receptores específicos de la actividad fagocítica (154,165–168). En este contexto, la fagocitosis se activa tras la interacción del péptido amiloide con los receptores microgliales TREM2, TLRs (del inglés, toll like receptors), CD36, SR-A1 (del inglés, class A1 scavenger receptors) y RAGE (del inglés, receptor for advanced glycation end products). Dependiendo del receptor activado y de la forma estructural del A β , se inducen diferentes rutas inflamatorias responsables de la

secreción de citoquinas proinflamatorias, ROS y RNS (169,170). Por ejemplo, el complejo CD36/TLR4/TLR6 activa la respuesta microglial proinflamatoria, mientras que RAGE promueve el estrés oxidativo neuronal, además de la respuesta microglial (171,172).

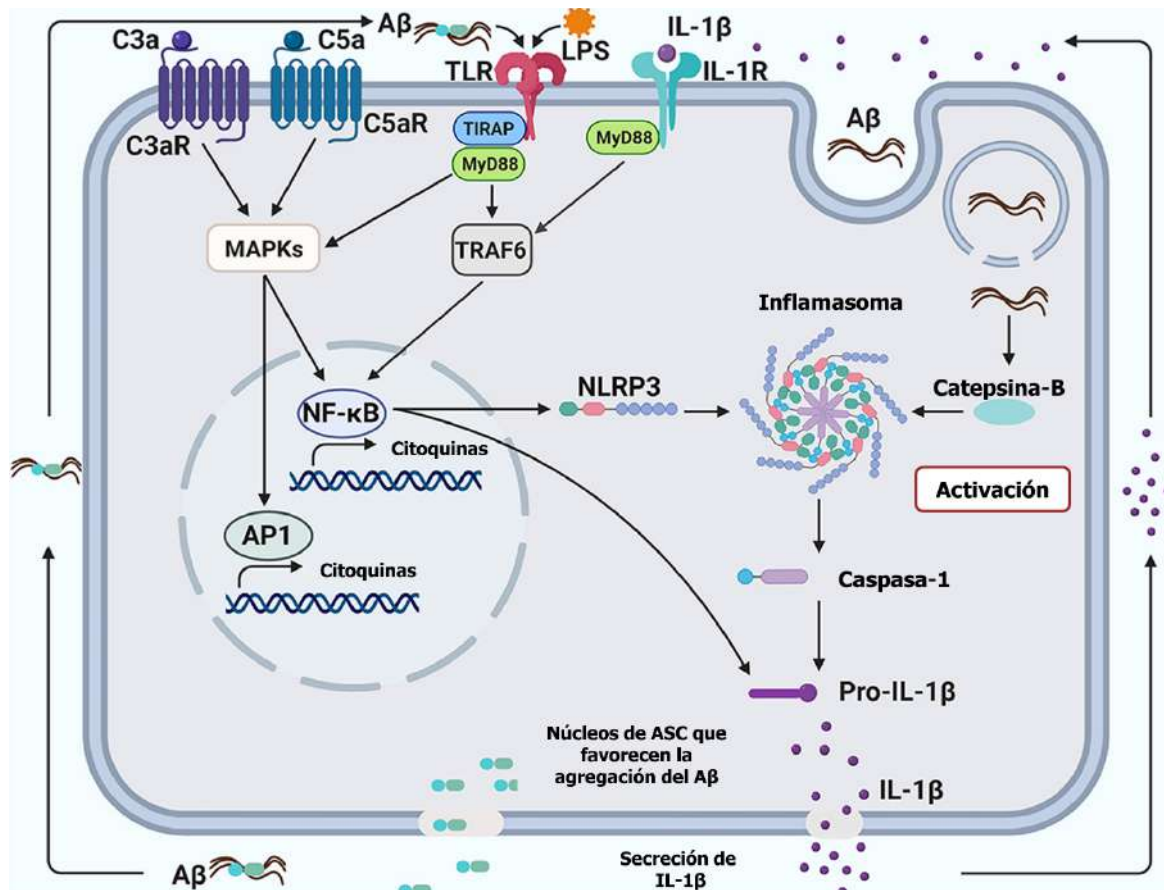


Figura 8: Activación del inflammasoma NLRP3. La interacción entre TLR4, el inflammasoma NLRP3 y el complemento conduce a la neuroinflamación en la EA. El descenso de los iones potasio y cloro, la liberación al citoplasma del A β fagocitado por la microglía y la activación de NF κ B participan en la activación del inflammasoma. Como resultado, se secreta IL1 β y núcleos de ASC, que favorecen la agregación del A β . Imagen adaptada de (173).

Aunque se ha descrito que la microglía actúa sobre las placas de A β , aún se desconoce el mecanismo responsable de este proceso. Los inhibidores de CSF1R han surgido como una herramienta potencial para esclarecer la función de la microglía en los procesos neurodegenerativos (174). Tras la activación de CSF1R por sus ligandos, IL34 y CSF1L, se produce la dimerización del receptor y la fosforilación de sus residuos tirosina. Dependiendo del sitio de fosforilación, se activan diferentes rutas de señalización. Los residuos T-721/T-559 activan PI3K (del inglés, phosphoinositide 3-kinase)/Akt, JNK (del inglés, c-Jun N-terminal

kinase) y ERK1/2 (del inglés, Extracellular signal-regulated kinase 1/2), que producen la activación y translocación de factores de transcripción al núcleo responsables de promover la proliferación y la supervivencia microglial (figura 9) (174).

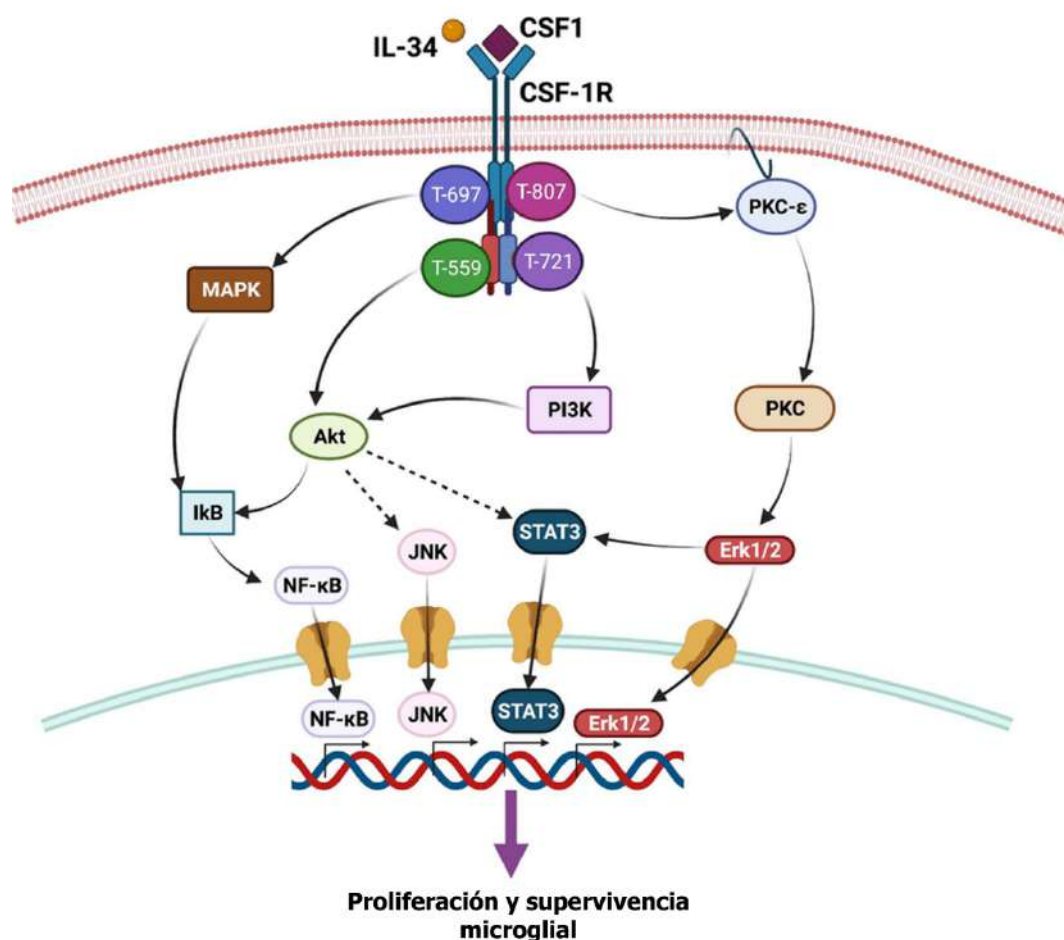


Figura 9: Señalización mediada por CSF1R para la regulación de la proliferación y supervivencia microglial. Tras la activación de CSF1R por la interacción con CSF1L o IL34, se produce la dimerización y fosforilación de los residuos tirosina. Dependiendo del sitio de fosforilación, se activan diferentes rutas de señalización y, en consecuencia, se translocan factores de transcripción al núcleo para promover la supervivencia y la proliferación microglial. Imagen adaptada de (174).

Un inhibidor de CSF1R ampliamente empleado en estudios preclínicos es PLX5622. El tratamiento de modelos murinos de la EA con este compuesto ha revelado efectos contradictorios. Por un lado, se ha visto que la eliminación de las células de microglía con este inhibidor de CSF1R reduce la formación de placas neuríticas en el hipocampo y la expresión de genes antiinflamatorios (175,176). Por otro lado, otros estudios han destacado el papel neuroprotector de la microglía, ya que, al eliminar este tipo celular con PLX5622, se ha observado un incremento de las neuríticas distróficas y del número de placas de A β . Con

respecto a tau, otra característica patológica de la EA, otros autores han indicado que el tratamiento con PLX5622 no detiene su propagación (177,178). La dosis y la duración del tratamiento con inhibidores de CSF1R podrían explicar la disparidad de los resultados obtenidos en los modelos de las enfermedades neurodegenerativas. Además de la optimización del tratamiento, es importante profundizar en el estudio del impacto de la eliminación microglial sobre los astrocitos y las neuronas, dado que la microglía interactúa con estos tipos celulares. Los inhibidores de CSF1R han permitido abordar el estudio de la microglía y su activación en el contexto patológico (174).

Los análisis de transcriptómica han identificado un nuevo fenotipo microglial denominado DAM (del inglés, disease associated microglía), presente no solo en la EA, sino también en otras enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (179). En 2017, Keren-Shaul y colaboradores realizaron estudios *in vivo* empleando el modelo murino 5xFAD e identificaron que la microglía asociada a las placas amiloides presentaba un perfil génico DAM, el cual difería del observado en la microglía en condiciones fisiológicas (167). En 2021, Grubman y colaboradores analizaron el perfil transcriptómico de la microglía que contenía amiloide y de aquella que no lo contenía, observando diferencias funcionales entre ambas (180).

La activación del fenotipo DAM comprende dos pasos secuenciales:

- El primero da lugar a un estado intermedio y presenta una reducción de la expresión de marcadores homeostáticos, como P2RY12, por una vía independiente de TREM2.
- El segundo es dependiente de TREM2 y muestra un incremento de la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico y en la actividad fagocítica (167).

Algunos autores establecen una estrecha relación entre el perfil DAM, el incremento de la actividad fagocítica y el papel neuroprotector de este fenotipo microglial (142). Sin embargo, otros estudios apuntan que la microglía DAM es perjudicial, debido a las similitudes de su perfil transcriptómico con la microglía neurodegenerativa MGnD (del inglés, microglial neurodegenerative phenotype) (181).

En humanos, se han identificado 9 subpoblaciones microgliales enriquecidas en genes asociados a la enfermedad, denominadas microglía HAM (del inglés, human Alzheimer's microglia) (182). Algunos estudios han destacado similitudes entre el perfil génico de la subpoblación HAM en humanos y DAM en ratones, específicamente en genes asociados con el transporte lipídico y lisosomal, como APOE, CLU y PLCG2 (182,183). Sin embargo, otros

estudios han mostrado resultados contradictorios al revelar claras diferencias transcriptómicas entre HAM y DAM (142,184–186).

1.6.3.2. Morfología microglial

La microglía es un tipo celular muy dinámico que presenta múltiples perfiles según su ontogenia, motilidad, morfología, transcriptómica y metabolismo. La morfología de la microglía se ha empleado frecuentemente como una medida indirecta de su estado funcional. Tras años de estudio, se han realizado esfuerzos para unificar la gran variedad de morfologías descritas en la microglía y establecer una clasificación más estandarizada (tabla 2) (187). Esta nueva tipificación más genérica incluye la microglía homeostática (figura 10A), reactiva (figura 10B), ameboide (figura 10C), hiperramificada (figura 10D) y alargada (figura 10E) (188,189).

Tabla 2: Términos definidos por Paolicelli y colaboradores, en relación con la nomenclatura tradicional de los diferentes morfotipos microgliales (187).

Términos definidos por Paolicelli y colaboradores	Otros nombres
Homeostática	En reposo
	Ramificada
	No activa
	En vigilancia
	M0
Hiperramificada	Froncosa o <i>bushy</i>
Reactiva	Activa
	Inflamatoria
	M1/M2
	Hipertrófica
	Desramificada
	DAM
Ameboide	Completamente activa
	Fagocítica

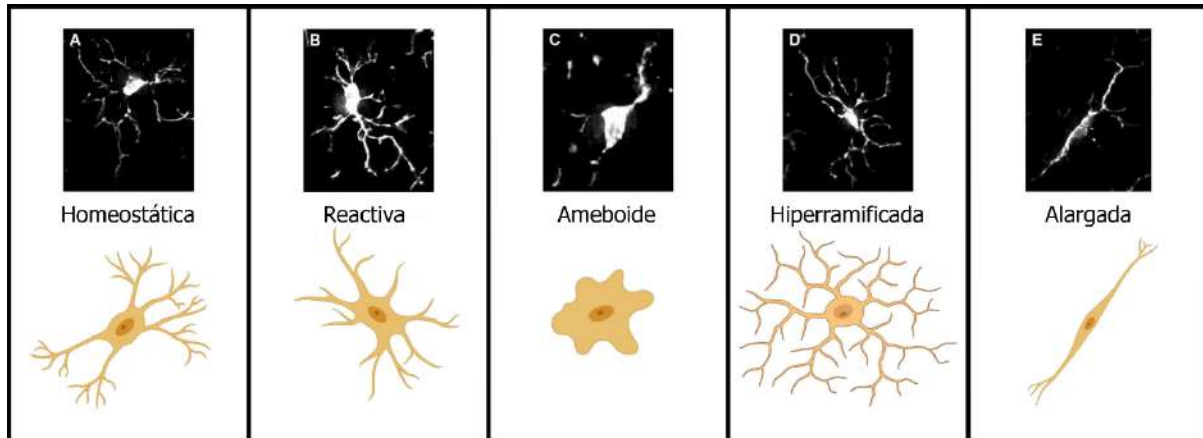


Figura 10: Categorización de la morfología microglial. A) Microglía homeostática caracterizada por la complejidad de sus procesos y el tamaño pequeño del soma. B) Microglía reactiva, con procesos retraídos y somas más grandes y redondeados. C) Microglía ameboide, carente de procesos. D) Microglía hiperramificada, que es una morfología intermedia entre la homeostática y la reactiva, caracterizada por tener procesos retraídos y engrosados. E) Microglía alargada, con somas finos y alargados, y procesos largos y extendidos. Imagen adaptada de (187).

Tradicionalmente, la microglía del parénquima cerebral sano se clasificaba como “en reposo” o *resting*. Hoy en día, este término ha quedado obsoleto, ya que se conoce que la microglía interviene en múltiples procesos en este contexto, como el mantenimiento de la homeostasis del SNC y el control del ambiente para detectar la presencia de patógenos, células necróticas o apoptóticas, ovillos neurofibrilares y depósitos de A β (190–192). En condiciones fisiológicas, la microglía presenta, mayoritariamente, una morfología homeostática, es decir, su soma es pequeño y sus procesos largos y muy ramificados para poder abarcar un área mayor donde detectar la presencia de agentes extraños o estructuras anómalas. Concretamente, cada célula ocupa un área de entre 200 y 8000 μm^2 y tiene una longitud en el rango de 200-350 μm (187,193,194).

Tras detectar un daño, la célula reorganiza su citoesqueleto para adoptar una morfología microglial reactiva, que se caracteriza por tener un soma más grande y procesos menos ramificados y más finos (195). Este tipo microglial es capaz de responder ante la secreción de citoquinas proinflamatorias, de fagocitar restos celulares y de migrar a las zonas dañadas. La microglía reactiva tiene un área entre 200-400 μm^2 y una longitud de 100-300 μm (187). Este fenotipo microglial engloba diversos términos, tales como la microglía M1/M2, activada y DAM (tabla 2). Aunque describen una morfología microglial común, estos términos han ido surgiendo por falta de consenso entre los diferentes autores.

Además, se han identificado morfologías intermedias entre la microglía homeostática y la reactiva, como, por ejemplo, la hiperramificada o *bushy*, que presenta procesos más largos, voluminosos y complejos (187,196,197). También, se han descrito otras formas intermedias como la senescente o distrófica, la satélite, la de tipo celular brillante y la microglía oscura (198–201).

En el contexto neuroinflamatorio de la EA, la microglía reactiva retrae sus procesos adquiriendo un fenotipo ameboide. Esta morfología celular tiene un soma grande y redondeado, carece de procesos, ocupa un área de 50-150 μm^2 y tiene una longitud de 25-50 μm (187,194,202). También, la microglía puede adoptar una morfología muy polarizada con pocas ramificaciones y un soma fino y alargado. Ocupa un área de 300-700 μm^2 y tiene una longitud de 200-350 μm (187,203). Esta tipología microglial se ha observado cerca de neuronas dañadas, por lo que se ha sugerido que podría facilitar la reparación neuronal o promover su eliminación (204).

1.7. Modelos murinos de la EA

Los modelos animales se han convertido en una herramienta experimental necesaria para entender los mecanismos subyacentes a las diferentes patologías humanas, identificar dianas terapéuticas y realizar ensayos preclínicos.

Actualmente, Alzforum tiene 221 modelos de ratón reconocidos para el estudio de la EA (205). Este gran número de modelos se debe a la necesidad de complementar unos modelos con otros, ya que uno solo no logra reproducir todas las características de la patología.

Dado que los ratones sanos o *wild-type* (WT) no presentan ni placas neuríticas ni ovillos neurofibrilares asociados a la edad, surge la necesidad de desarrollar ratones transgénicos (Tg). Los primeros modelos se caracterizaban por la incorporación de mutaciones hereditarias asociadas a la FAD en genes como *App*, para abordar el estudio de la amiloidosis y procesos relacionados, como la formación de placas, la respuesta glial, las neuritis distróficas, el daño sináptico, la muerte neuronal y la alteración de la memoria (206–209). Respecto a tau, aunque estos modelos presentaban cierta hiperfosforilación de la proteína, no desencadenaba la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares. Por este motivo, para estudiar la taupatía característica de la EA, surgieron nuevos modelos murinos que introdujeron mutaciones en el gen *Mapt* (del inglés, microtubule-associated protein) (210).

La identificación de nuevas mutaciones génicas asociadas a la FAD ha permitido ampliar el diseño de modelos murinos Tg para replicar, con la mayor exactitud posible, los mecanismos subyacentes a la FAD *in vivo* (211–214). Algunos modelos de la EA son más agresivos, ya que la amiloidogénesis y/o la taupatía, en función de las mutaciones que contenga, la pérdida neuronal y el deterioro cognitivo ocurren con anterioridad en comparación con otros modelos (tabla 3). Un ejemplo de amiloidosis más agresiva es el modelo 5xFAD, el cual muestra depósitos de A β a los 2 meses de edad y alcanza el máximo número de placas entre los 6-9 meses de edad, acompañado de una gliosis exacerbada y un deterioro cognitivo (214).

Tabla 3: Modelos murinos representativos de la patología amiloide y/o la taupatía asociada a la EA (214).

Modelo	Mutación génica	Amiloidosis	Taupatía	Pérdida neuronal	Deterioro cognitivo
5xFAD	<i>App</i> (KM670/671NL, I716V, V717I) <i>Ps1</i> (M146L, L286V)	2 meses	-	6 meses	4 meses
APP/PS1	<i>App</i> (KM670/671NL) <i>Ps1</i> (delta9)	6 meses	-	8 meses	12 meses
APP23	<i>App</i> (KM670/671NL)	6 meses	-	12 meses	3 meses
JNPL3	<i>Mapt</i> 0N4R (P301L)	-	5 meses	5 meses	Se desconoce
rTg4510	<i>Mapt</i> 0N4R (P301L)	-	4 meses	6 meses	6 meses
3xTg	<i>App</i> (KM670/671NL) <i>Mapt</i> 0N4R (P301L) <i>Ps1</i> (M146V <i>knock-in</i>)	6 meses	12 meses	Se desconoce	4 meses

2. Sistema endocannabinoide

2.1. Generalidades del SEC

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema complejo compuesto principalmente por receptores cannabinoides, cannabinoides endógenos o endocannabinoides (eCBs), y proteínas responsables de su transporte, síntesis y degradación (figura 11) (215,216). La señalización a través de este sistema participa en varios procesos fisiológicos como la regulación celular y tisular, el mantenimiento de la homeostasis del organismo, el desarrollo cerebral, la memoria, la liberación de neurotransmisores, la plasticidad sináptica, la percepción del dolor, el apetito, la motilidad gastrointestinal y la secreción de citoquinas por parte de la microglía (217).

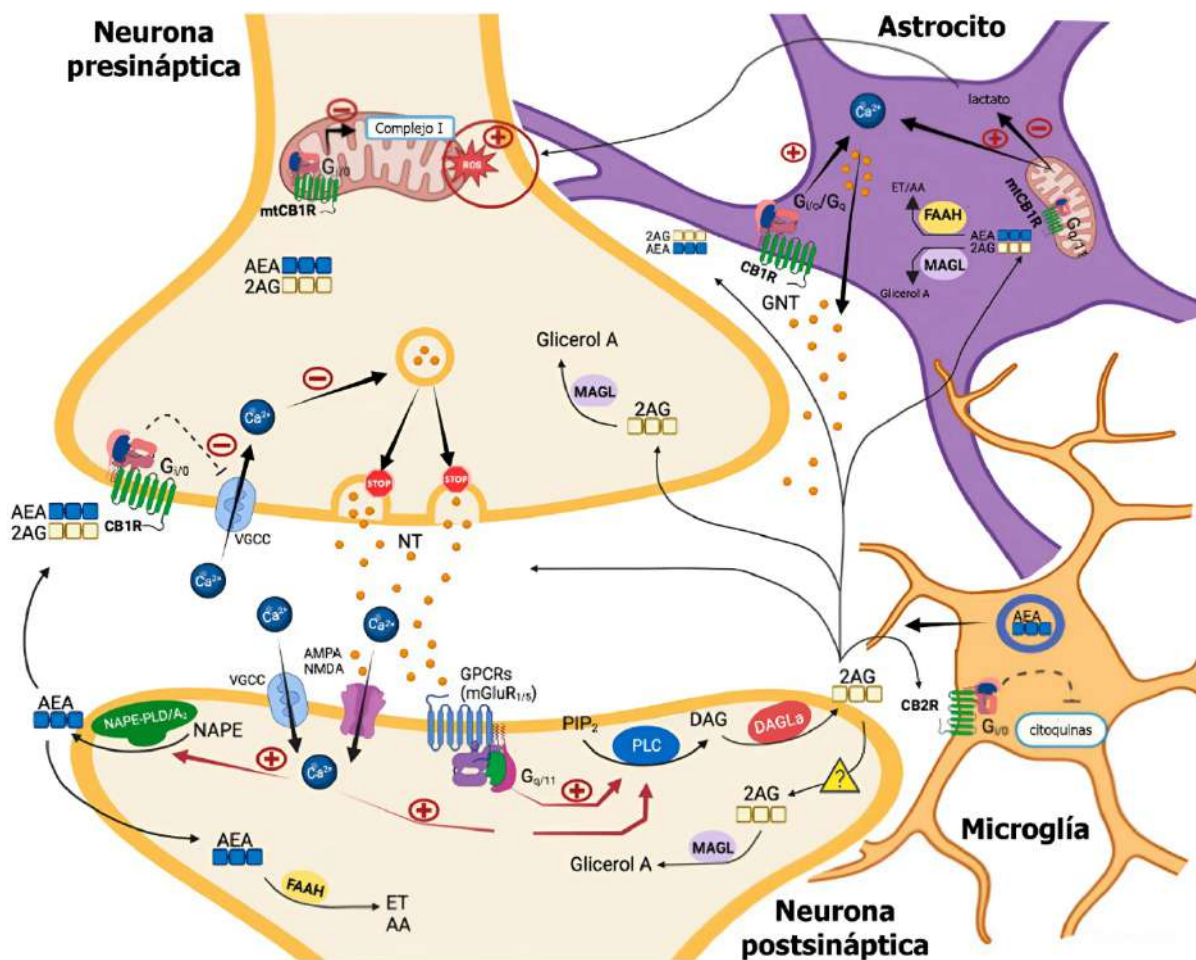


Figura 11: Señalización eCBs en la sinapsis y en la comunicación glía-neurona. Imagen adaptada de (218).

La planta *Cannabis Sativa* contiene una variedad de compuestos, incluyendo fenoles cannabinoides y no cannabinoides, flavonoides, terpenoides, alcoholes, aldehídos y alcaloides (219–223). Entre los más de 120 terpenos o fitocannabinoides que tiene, cabe destacar el cannabidiol (CBD) y el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). Además, se han descrito cannabinoides en otras especies vegetales como *Echinacea*, *Helichrysum umbraculigerum* y *Radula* (224).

En 1963, Raphael Mechoulam caracterizó el CBD. Al ser un compuesto no psicoactivo, ha ganado interés terapéutico para tratar enfermedades como la psicosis. Un año después, Raphael Mechoulam y Yechiel Gaoni identificaron el THC, que es el principal compuesto psicotrópico del cannabis (216,225–228). Durante miles de años, la planta *Cannabis Sativa* se ha empleado para uso recreacional o terapéutico, entre otros fines (219–223). Actualmente, las autoridades sanitarias han restringido el uso terapéutico del cannabis al alivio del dolor crónico en adultos, y el uso de cannabinoides orales como antieméticos durante el proceso de la quimioterapia y para el tratamiento de la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple (216).

El empleo de análogos radiactivos de THC permitió la caracterización del primer receptor cannabinoide CB₁R (del inglés, cannabinoid receptor type 1) (229). Este receptor está acoplado a proteínas G (GPRs) y su expresión es abundante en el cerebro. Gracias a la homología con CB₁R, se identificó el receptor CB₂R (del inglés, cannabinoid receptor type 2), cuya expresión es abundante en el sistema inmune (217,230). El descubrimiento de los receptores cannabinoides permitió la detección de sus ligandos endógenos, como, por ejemplo, la anandamida (AEA, del inglés N-arachidonylethanolamine) y 2-araquidonilglicerol (2-AG, del inglés, 2-arachidonoyglycerol) (231,232). Posteriormente, se identificaron las enzimas responsables de la síntesis y degradación de estos eCBs. Respecto a AEA, su síntesis está mediada por NAPE-PLD (del inglés, N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D-like hydrolase) y su hidrolización está catalizada por FAAH (del inglés, fatty acid amide hydrolase) (233,234). En cuanto a 2-AG, DAGL α (del inglés, diacylglycerol lipase α) y DAGL β son responsables de su biosíntesis, mientras que MAGL (del inglés, monoacylglycerol lipase) participa en su degradación (235,236).

La modulación del SEC se ha propuesto como posible estrategia terapéutica para el daño crónico, náuseas, esclerosis múltiple, epilepsia, ansiedad, EA, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington, ya que se han descrito diversas alteraciones de este complejo sistema tanto en modelos experimentales como en pacientes con este tipo de patologías (237–239).

2.2. Cannabinoides

Los cannabinoides son una clase de compuestos químicos con capacidad de interactuar con los receptores cannabinoides, como CB₁R y CB₂R, los receptores no cannabinoides, como GPR55 y GPR3, y los canales iónicos (240). Originalmente, el término cannabinoide hacía referencia únicamente a los fitocannabinoides (241). Actualmente, se han descrito los siguientes tipos de cannabinoides atendiendo a su origen:

- Los fitocannabinoides son de origen vegetal. Algunos tienen propiedades psicotrópicas, como el THC, el cannabinoil (CBN) y el Δ 8-THC, mientras que otros son no psicotrópicos, como el CBD, el cannabicromeno (CBC) y el cannabigerol (CBG) (220,224).
- Los eCBs se sintetizan de forma natural en el organismo de los mamíferos. Los principales endocannabinoides son AEA y 2-AG (217).
- Los cannabinoides sintéticos, también conocidos como cannabinoides miméticos, son un grupo de compuestos desarrollados mediante la modificación de la especificidad de unión de este tipo de cannabinoides por un receptor concreto. Originalmente, surgieron para potenciar la actividad terapéutica y reducir los posibles efectos secundarios asociados a su consumo. Este tipo de cannabinoides también incluye aquellas drogas de abuso desarrolladas de forma ilegal por laboratorios clandestinos, como el Spice/K2, que es un análogo sintético del THC (242).

2.2.1. Fitocannabinoides

Los fitocannabinoides son los principales compuestos del *Cannabis*, siendo el THC y el CBD los más abundantes (242).

- El THC es el principal componente psicoactivo y su consumo se asocia al deterioro cognitivo, la paranoia, el incremento del riesgo de padecer trastornos psicóticos, el aumento de la dependencia al cannabis y el desarrollo del trastorno por consumo del cannabis (243–245). No obstante, también posee propiedades neuroprotectoras, antiespasmódicas y antiinflamatorias (246).
- El CBD presenta propiedades antieméticas, antiinflamatorias, ansiolíticas y antipsicóticas (247). Además, el tratamiento con CBD se ha aprobado para niños con epilepsia refractaria (248).

El THC y el CBD producen efectos diferentes en el organismo dependiendo de su interacción con determinados receptores (tabla 4 y 5). Por ejemplo, el THC es un agonista parcial de los CBRs, mientras que el CBD es un modulador alostérico negativo de estos receptores, es decir, reduce la activación de los CBRs por THC y otros eCBs. Estas observaciones sugieren que el CBD podría contrarrestar los efectos adversos del tratamiento con THC (218,249).

Tabla 4: Efectos del THC sobre receptores cannabinoides y no cannabinoides (218).

Cannabinoide	Agonista parcial	Agonista	Antagonista
THC	CB ₁ R y CB ₂ R	PPAR α - γ , GPR55, GPR18, TRPV2-4 y TRPA1	TRPM8 y 5-HT3A

Tabla 5: Efectos del CBD sobre receptores cannabinoides y no cannabinoides (218).

Cannabinoide	Modulador alostérico negativo	Agonista	Antagonista	Agonista inverso
CBD	CB ₁ R y CB ₂ R	TRPA1, TRPV1-3, PPAR γ , 5-HT1A y A ₁₋₂	GPR55, GPR18 y 5-HT3A	GPR3, GPR6 y GPR12

Debido a la capacidad de interacción de los fitocannabinoides con múltiples dianas farmacológicas, surge la necesidad de profundizar en los mecanismos subyacentes para poder esclarecer las propiedades terapéuticas del CBD y THC en el contexto patológico (218).

2.2.2. Endocannabinoides

Los endocannabinoides son ligandos cannabinoides endógenos compuestos, principalmente, por derivados del ácido araquidónico conjugados con etanolamina o glicerol, que se encuentran presentes en el plasma, los tejidos periféricos y el cerebro (250). Se caracterizan por actuar como mensajeros retrógrados en la sinapsis neuronal, es decir, su síntesis tiene lugar en neuronas postsinápticas en respuesta a diversos estímulos para, posteriormente,

activar los receptores cannabinoides de las neuronas presinápticas e inhibir la liberación de los neurotransmisores (251).

Los primeros endocannabinoides en ser identificados fueron AEA, que se forma como producto final de la escisión de fosfolípidos de la membrana, y 2-AG, que es un intermediario metabólico de la degradación lipídica (252). En condiciones fisiológicas, el nivel de AEA en el cerebro es aproximadamente 200 veces inferior a los de 2-AG, cuya síntesis es dependiente de la concentración de calcio e independiente de la producción y secreción de AEA (252–254). Se ha descrito que la interacción de ambos endocannabinoides con los CBRs produce analgesia, catalepsia, hipolocomoción e hipotermia. Concretamente, AEA es un agonista parcial de CB₁R, mientras que 2-AG es un agonista completo de CB₁R y CB₂R (255). Además, actúan como ligandos de otros receptores, tales como los GPCRs, los receptores nucleares y los canales iónicos (256).

También se han identificado otras N-acetiletanolaminas (NAEs) denominadas no cannabinoides, ya que interactúan con otros tipos de receptores que no son los CBRs. Algunos ejemplos son PEA (del inglés, palmitoylethanolamide) y OEA (del inglés, oleoyl-ethanolamide). OEA produce sensación de saciedad y favorece la pérdida de peso, mientras que PEA tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antiepilépticas y neuroprotectoras, por lo que se ha empleado para el tratamiento del eczema, el dolor y la neurodegeneración (257–260).

2.3. Receptores cannabinoides

Los principales receptores cannabinoides son CB₁R y CB₂R, que están codificados por los genes *Cnr1* y *Cnr2*, respectivamente. Ambos receptores están acoplados a las proteínas G y se componen de 7 dominios transmembrana, un extremo N-terminal extracelular y otro C-terminal intracelular (261). La activación de los CBRs inhibe los canales de calcio sensibles al voltaje y la adenilato ciclasa (AC) y, en paralelo, estimula las quinasas MAP (ERK1/2, JNK y p38), que regulan la proliferación, el ciclo y la muerte celular (figura 12) (226).

La funcionalidad de este tipo de receptores es selectiva, ya que se pueden inducir distintas rutas de señalización dependiendo del ligando con el que interactúe (262). Por ejemplo, como se ha descrito previamente, experimentos *in vitro* han demostrado que CBD es un modulador alostérico negativo de CB₁R, lo que explicaría por qué la coadministración de CBD y THC podría reducir los efectos psicoactivos (263,264).

Además, los receptores cannabinoides pueden formar dímeros con otros GPCRs, como, por ejemplo, CB₁R que puede asociarse con los receptores de dopamina D₂, orexina A, adenosina 2A y delta opioides, entre otros (265,266).

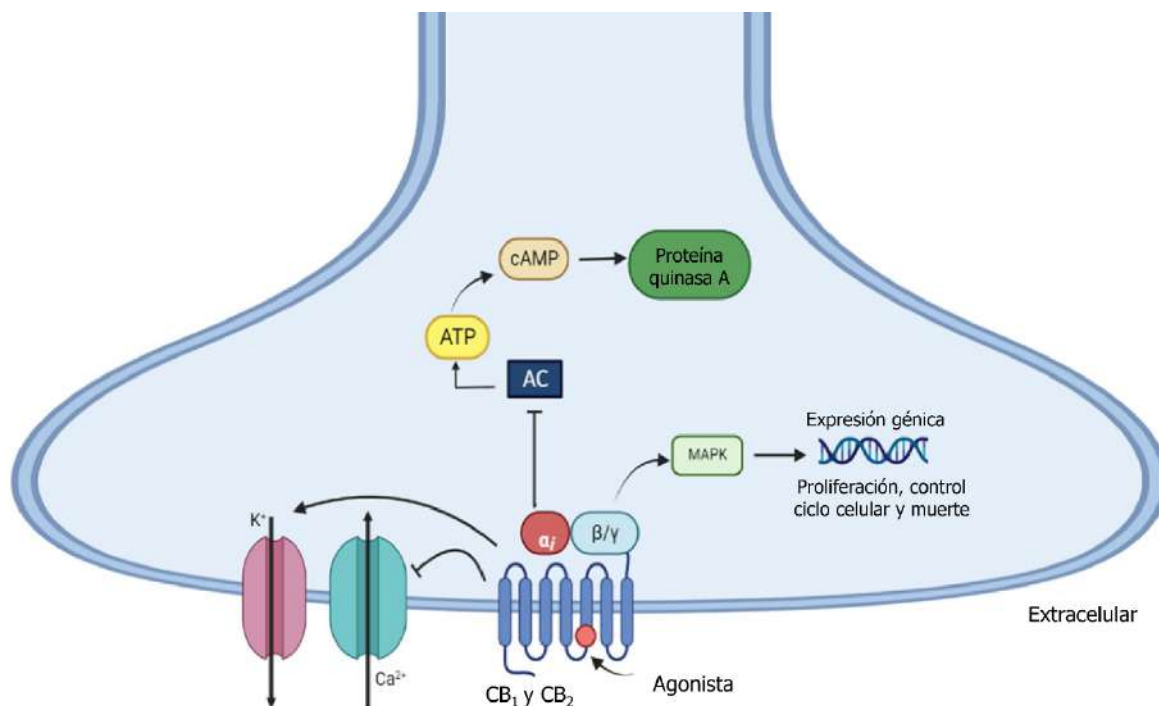


Figura 12: Mecanismo de señalización intracelular mediado por CB₁R y CB₂R. Imagen adaptada de (226).

CB₁R y CB₂R difieren entre sí en la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica y en su distribución tisular (figura 13) (267–270). CB₁R se expresa, mayoritariamente, en el SNC. Este receptor abunda en las neuronas, concretamente en el soma, las dendritas, los terminales sinápticos, para modular la transmisión sináptica, e incluso se ha descrito la expresión de este receptor a nivel mitocondrial (271–275). Se ha observado una expresión leve de CB₁R en otros tipos celulares, como los astrocitos, los oligodendrocitos y la microglía (276,277). Respecto a CB₂R, originalmente se consideraba un receptor exclusivamente periférico. Sin embargo, diversos estudios han reportado la expresión de este receptor en el parénquima cerebral en condiciones fisiológicas, aunque a unas concentraciones inferiores al umbral de detección de la mayoría de los métodos convencionales. En condiciones patológicas, como la neuroinflamación de la EA, se ha descrito una inducción de la expresión de CB₂R en las células microgliales (228).

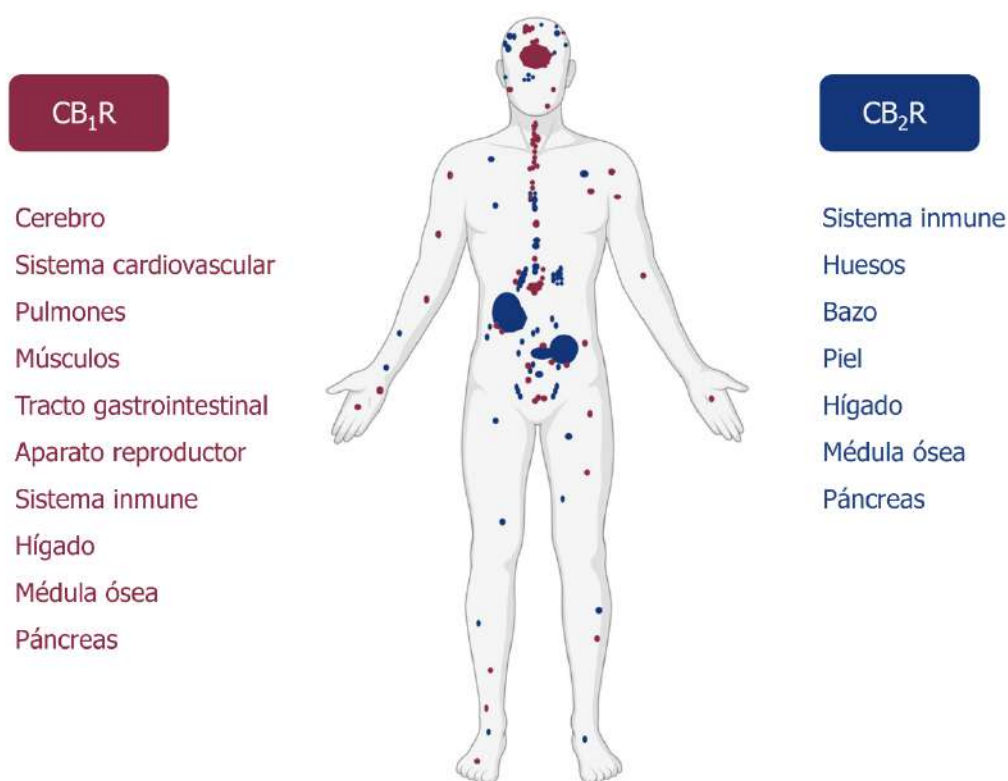


Figura 13: Distribución de CB₁R y CB₂R en el cuerpo humano. Imagen adaptada de (226).

Existen otros receptores que no pertenecen al SEC canónico y que pueden interactuar con los eCBs, los fitocannabinoides y otros mediadores lipídicos. Algunos de estos receptores son PPAR α , PPAR γ , GPR18, GPR55, GPR119, los canales iónicos que participan en la nocicepción (TRPV1 y TRPV2) y algunos transportadores (HTR1A, ADORA2A y ADGRF1) (278,279).

2.4. Metabolismo de los cannabinoides

Los endocannabinoides se sintetizan "bajo demanda" a partir de los precursores localizados en la membrana lipídica. A diferencia de los neurotransmisores, no se almacenan en las vesículas, sino que se liberan en un lugar y momento precisos tras la activación de enzimas por señales específicas, como el aumento de los niveles intracelulares de calcio (276,280). En el proceso de síntesis de 2-AG y AEA intervienen las siguientes reacciones enzimáticas (figura 14):

- Respecto a la síntesis de 2-AG, PLC (del inglés, phospholipase C) actúa sobre un fosfolípido de la membrana obteniéndose DAG (del inglés, 1,2-diacylglycerol), que es esterificado por DAGL para formar 2-AG. Esta última enzima consta de dos isoformas

(DAGLa y DAGLβ) abundantes en el cerebro: DAGLa participa en la producción sináptica de 2-AG, mientras que DAGLβ es importante en la síntesis microglial de este eCB (281).

- La síntesis canónica de AEA comprende: 1) la liberación de los fosfolípidos de la membrana celular, que siguen la ruta NAT (del inglés, N-acyltransferase) dependiente o independiente de Ca^{2+} , 2) la formación de NArPE (del inglés, N-arachidonoyl phosphatidyl ethanolamine) y 3) la activación de NAPE-PLD para obtener AEA (282).

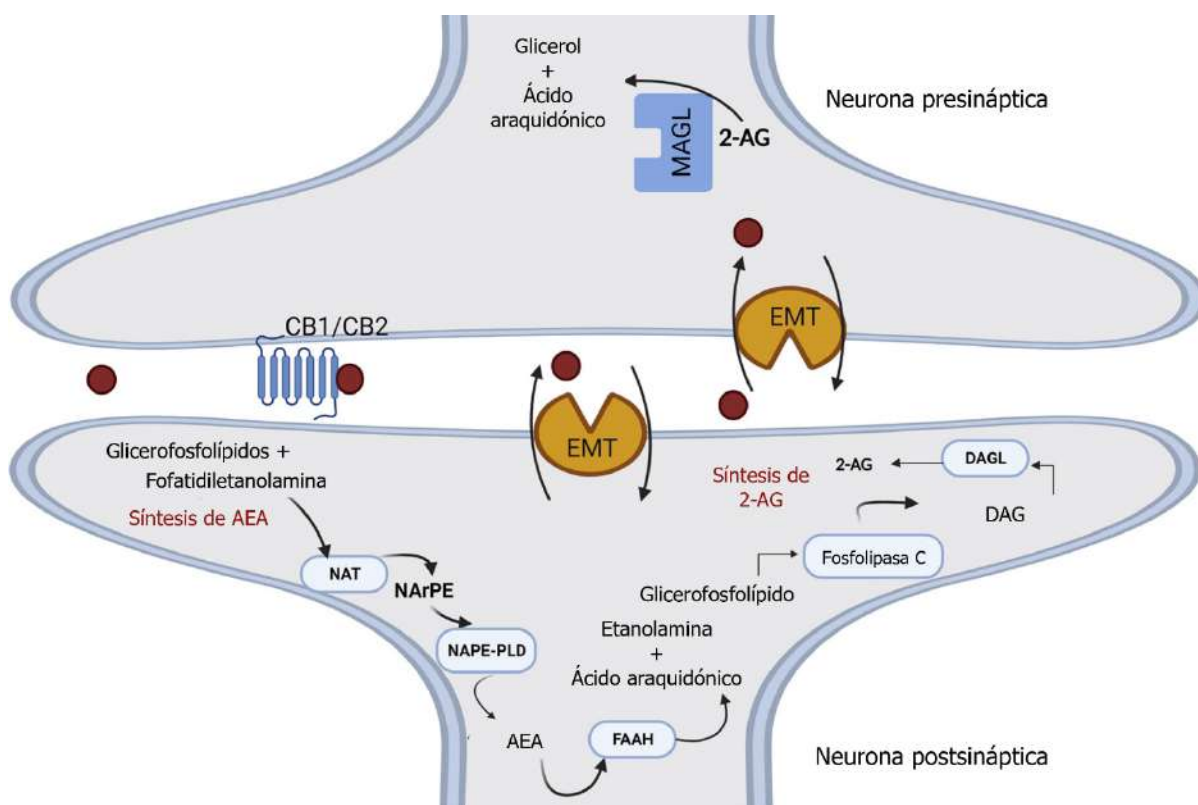


Figura 14: Metabolismo de AEA y 2-AG. Principales rutas metabólicas involucradas en la síntesis y degradación de AEA y 2-AG. Imagen adaptada de (226).

Los eCBs se sintetizan en el interior celular y se secretan al exterior a través de los transportadores EMT (del inglés, endocannabinoid membrane transporter) para poder actuar sobre las células adyacentes (283). Además, se ha especulado sobre la existencia de recaptadores de eCBs en el organismo. Actualmente, se han desarrollado inhibidores selectivos de los recaptadores de eCBs para profundizar en su caracterización. Un ejemplo es WOBE437, que ha demostrado inducir *in vivo* e *in vitro* un incremento moderado y selectivo del tono endocannabinoide, sin afectar a las enzimas responsables de su degradación, a otros

componentes del SEC y a proteínas relevantes del SNC. Estudios previos han reportado propiedades analgésicas, ansiolíticas y antiinflamatorias asociadas a este inhibidor (284).

Diversas enzimas intervienen en la degradación de los eCBs, concretamente, FAAH participa en la hidrólisis de AEA y otras NAEs (PEA y OEA) y MAGL en la degradación de 2-AG (285,286). El ácido araquidónico resultante de este proceso actúa como sustrato en la síntesis de prostaglandinas, lo que sugiere que la degradación de los eCBs puede activar otros tipos de señalización (287).

MAGL es una enzima anclada a la membrana celular presente en ciertos tejidos como el adiposo y el cerebral, donde se expresa específicamente en neuronas presinápticas (288,289). Interviene en la señalización mediada por los eCBs y el metabolismo del ácido araquidónico en el cerebro, hígado y pulmones. Además de metabolizar selectivamente 2-AG, MAGL también hidroliza otros monoacilglicéridos y, en consecuencia, altera los niveles de ácidos grasos libres, que actúan como precursores para la señalización de lípidos protumorigénicos (290). Existen tres tipos de inhibidores de MAGL: inhibidores no competitivos, inhibidores parcialmente reversibles y agentes que reaccionan con serina o cisteína. Estudios previos han reportado una regulación del metabolismo lipídico y una reducción de la inflamación asociados a estos inhibidores (291,292). La inhibición de MAGL se ha postulado como una potencial diana terapéutica en varias patologías, como la neurodegeneración, los trastornos psiquiátricos, el daño crónico y el cáncer (290,293).

FAAH es una enzima anclada en la membrana celular responsable de hidrolizar AEA, PEA y OEA, entre otras NAEs (234,294). Se expresa en los tejidos periféricos, como los riñones, los pulmones y el tracto gastrointestinal, y, mayoritariamente, en el SNC. FAAH se localiza principalmente en los astrocitos y las neuronas postsinápticas del hipocampo, el cerebelo, la corteza y el bulbo olfatorio (288,289,295–300).

Para profundizar en el estudio de las funciones específicas de la enzima, se han desarrollado inhibidores farmacológicos de FAAH. Diversos estudios han revelado que la inactivación de esta enzima aumenta la transmisión neuronal y regula la neuroinflamación y el dolor, sin producir los efectos secundarios asociados a la administración de cannabinoides, como la catalepsia, el descenso de la temperatura corporal, el aumento del apetito y la alteración de la motilidad y el sueño. Algunos ejemplos de inhibidores de FAAH son:

- URB59, que presenta efectos analgésicos, ansiolíticos y antidepresivos (301–307).

- PF-04457845, desarrollado por Pfizer, es el primer inhibidor de FAAH en alcanzar la fase II de los ensayos clínicos. Se caracteriza por inhibir la enzima de forma covalente e irreversible, y por presentar una farmacocinética excelente en ratas, perros y humanos. El tratamiento de ratas con PF-04457845 (0,1 mg/kg) ha logrado inhibir FAAH casi por completo (>98 %) e incrementar entre 7-8 veces los niveles de AEA en el plasma y el parénquima cerebral de estos animales (308,309).

La inhibición de la actividad de FAAH produce efectos biológicos duraderos incrementando el tono endocannabinoide y, por tanto, se ha propuesto como una potencial estrategia terapéutica en diversas patologías.

3. Alteraciones del SEC en el contexto de la EA

Se han descrito una serie de alteraciones del SEC asociadas a la progresión de la EA, aunque su relevancia biológica es todavía controvertida. Algunos autores sostienen que la sobreexpresión de algunos componentes del SEC permite contrarrestar la hiperactividad neuronal y el proceso neuroinflamatorio en el contexto patológico, mientras que otros defienden que las alteraciones del SEC desencadenan el deterioro cognitivo y la clínica característica de la EA (310).

Se desconoce con exactitud la relación entre CB₁R y la EA. Se ha descrito un descenso de la expresión de este CBR en áreas cerebrales con activación microglial, el hipocampo y la corteza frontal de los pacientes con EA (311). Algunos autores sostienen que la expresión de este receptor varía en función de la progresión de la EA; incrementando en etapas tempranas y, posteriormente, disminuyendo en fases más avanzadas de la patología (312). Benito y colaboradores no identificaron alteraciones de la expresión de CB₁R ni en la microglía ni en los astrocitos asociados a las placas neuríticas. Sin embargo, observaron que la expresión de CB₂R se induce específicamente en la microglía localizada en torno a las placas amiloides (313). El empleo de agonistas de CB₂R ha reflejado la participación de este receptor en la activación microglial y la eliminación del péptido A β (311,314,315).

Además, se ha identificado un incremento de DAGLa particularmente cerca de las placas seniles, lo que sugiere un incremento de los niveles de 2-AG y de la pérdida sináptica mediada por este eCB (316). Estas especulaciones se confirmaron gracias al empleo de modelos animales de la EA (317). Sin embargo, también se ha observado un reclutamiento de la enzima MAGL, responsable de la degradación de 2-AG, en tejidos *postmortem* de los pacientes con

EA, indicando que la progresión de la enfermedad podría reducir la señalización mediada por 2-AG (317).

Diversos estudios han mostrado un descenso de AEA en la corteza cerebral asociado al deterioro cognitivo de los pacientes y al aumento de los niveles del péptido amiloide neurotóxico 1-42 (318). En línea con estos hallazgos, se ha observado una inducción de la expresión de la enzima responsable de su degradación (FAAH) de forma selectiva en los astrocitos reactivos asociados a las placas neuríticas (313). El aumento de la actividad de FAAH, además de alterar el tono eCBs, interviene en el proceso inflamatorio de la EA, ya que el ácido araquidónico resultante de la degradación de los eCBs favorece la síntesis de las prostaglandinas y otros mediadores inflamatorios en torno a las placas seniles (319,320). Dado que los patrones de expresión de CB₂R y de FAAH se asocian con los depósitos amiloides, estos elementos del SEC podrían actuar regulando la función microglial en el contexto de la EA (292). Además, se ha identificado una estrecha relación entre la reducción de la expresión de FAAH y el aumento de AEA y otras NAEs en la corteza frontal media y temporal con mejoras cognitivas en condiciones patológicas (300,321). En este contexto, la inhibición de la actividad de FAAH podría ser beneficiosa para la prevención del proceso neuroinflamatorio y neurotóxico asociado a la EA (322).

4. Modulación del SEC como estrategia terapéutica para la EA

Los cannabinoides se han considerado un tratamiento potencial para la EA gracias a sus propiedades inmunosupresoras, antiinflamatorias y neuroprotectoras (322). Actualmente, las estrategias terapéuticas para la regulación del SEC en el contexto de la EA comprenden: 1) la modulación de los receptores CBRs con fitocannabinoides o cannabinoides sintéticos y 2) la inhibición de las enzimas responsables de la degradación de los eCBs para aumentar el tono endocannabinoide (tabla 6) (323,324).

El tratamiento de los modelos animales de la EA con fitocannabinoides ha mostrado efectos beneficiosos, tales como mejorías comportamentales, reducción de las placas neuríticas y de la neuroinflamación (325). Concretamente, se ha observado que la administración de dosis bajas de Δ^9 -THC mejora la memoria (326–328). Además, la coadministración de THC y CBD en fases avanzadas de la patología amiloide ha reportado mejoras cognitivas en el modelo murino APP/PS1 (329). Desde un punto de vista clínico, el único análogo sintético aprobado por la FDA es la nabilona, conocido como Cesamet, para el tratamiento de las náuseas y los vómitos causados por la quimioterapia en pacientes oncológicos (330). En el contexto de la

EA, los pacientes tratados con este compuesto presentan un aumento del peso corporal y una reducción de la agitación en fases avanzadas de la EA, entre otras mejoras en la clínica del paciente (331).

Tabla 6: Principales compuestos empleados para la modulación del SEC en el contexto de la EA y los efectos beneficiosos y perjudiciales asociados a cada tratamiento (325).

Compuestos	Mecanismo de acción	Efectos beneficiosos	Efectos adversos
THC	Agonista de CB ₁ R y CB ₂ R	Inhibición de la acetilcolinesterasa, reducción del A β , neurogénesis en el hipocampo y liberación de BDNF	Efectos psicóticos, deterioro cognitivo y disminución de la liberación de dopamina
CBD	Agonista de CB ₁ R y CB ₂ R	No efectos psicoactivos, neuroprotección, menor activación microglial y retraso de la aparición del deterioro cognitivo	Hipotensión (dosis altas) y efecto ansiogénico
WIN 55,212-2 HU 210 CP 55,940 JWH-018	Agonista de CB ₁ R y CB ₂ R	Eliminación del A β , neurogénesis y prevención del deterioro cognitivo	Alteración de la memoria de trabajo y de la LTP, y efecto sedante
JWH-133 AM-1241 MDA7	Agonista selectivo de CB ₂ R	Eliminación del A β , mejora cognitiva, prevención de la activación microglial y reducción de la hiperfosforilación de tau	Inmunosupresión
URB597 PF-04457845 JZL184 JZL195	Modulación de los niveles de AEA y 2-AG	Supresión de la toxicidad por glutamato inducida por A β ₁₋₄₂ , reducción de la síntesis de interleuquinas proinflamatorias, restauración de LTP y reducción de las placas amiloides	Rigidez diastólica cardíaca

Otra estrategia consiste en el incremento del tono endocannabinoide a través de la inhibición de las enzimas responsables de la degradación de los eCBs, sin la administración exógena de cannabinoides. La inhibición farmacológica de FAAH y MAGL en modelos murinos de la EA ha reflejado un incremento de los niveles de anandamida y 2-AG, y un descenso de los depósitos amiloides. Concretamente, el PF, que es un inhibidor de FAAH, ha alcanzado los ensayos clínicos y ha mostrado una buena tolerancia en personas sanas (308,325).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La presente tesis doctoral postula que el sistema endocannabinoide desempeña un papel relevante en el proceso neuroinflamatorio asociado a la patología amiloide y, por ende, su modulación se plantea como una potencial estrategia terapéutica para la EA. Para contrastar esta hipótesis se plantean dos aproximaciones experimentales: 1) administrar dosis bajas de cannabinoides (THC, CBD y CBD:THC) de forma crónica a ratones 5xFAD; e 2) inactivar FAAH para elevar el tono endocannabinoide en el organismo de este modelo animal de la EA.

1. Administración crónica de dosis bajas de cannabinoides a ratones 5xFAD

Para evaluar los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores de la administración de THC, CBD y una combinación de ambos en el contexto de la EA, se plantearán los siguientes objetivos:

- Evaluar la memoria espacial, el estado ansioso y depresivo, la coordinación motora y la locomoción de los ratones 5xFAD tras la exposición a cada tratamiento.
- Realizar estudios moleculares para analizar marcadores asociados a la inflamación, la gliosis y al daño neuronal, y cuantificar los niveles de la isoforma soluble e insoluble del péptido $A\beta_{1-42}$ en el parénquima cerebral en cada grupo experimental.

2. Incremento del tono endocannabinoide mediante la inactivación genética de FAAH en el contexto de la EA

Para lograr una mejor comprensión de los efectos paradójicos descritos en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}, en cuanto a la exacerbación de la respuesta inflamatoria y la neuroprotección, se propondrán los siguientes objetivos:

- Evaluar las consecuencias de la inactivación genética de FAAH sobre el aprendizaje espacial de los animales.
- Analizar las diferencias en la expresión génica a nivel transcriptómico en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}.
- Identificar y cuantificar cambios moleculares asociados a la inactivación genética de FAAH, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y tras la ablación microglial con PLX5622.
- Caracterizar el perfil morfológico de la microglía en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} en el contexto de ablación microglial y posterior repoblación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aproximaciones experimentales

El presente trabajo consta de dos diseños experimentales, que comprenden una amplia variedad de técnicas (pruebas de comportamiento, análisis moleculares, transcriptómica y microscopía *in vivo* dos fotones) y de grupos experimentales, para cumplir con los objetivos propuestos (tabla 7):

Tabla 7: Aproximaciones experimentales realizadas en el presente trabajo, detallando los estudios realizados y los grupos experimentales empleados.

Diseños experimentales	Estudios	Grupos experimentales
I. Evaluación del potencial efecto antiinflamatorio y neuroprotector de los cannabinoides sobre la patología amiloide	Pruebas de comportamiento	WT (VEH) 5xFAD (VEH, CBD, THC y CBD:THC)
	Análisis moleculares	WT (VEH) 5xFAD (VEH, CBD, THC y CBD:THC)
II. Estudio del impacto de la inactivación genética de la enzima FAAH en el contexto de la EA	Pruebas de comportamiento	WT FAAH ^{-/-} 5xFAD 5xFAD/FAAH ^{-/-}
	Análisis de transcriptómica	WT FAAH ^{-/-} 5xFAD 5xFAD/FAAH ^{-/-}
	Análisis moleculares	WT (VEH y PLX) FAAH ^{-/-} (VEH y PLX) 5xFAD (VEH y PLX) 5xFAD/FAAH ^{-/-} (VEH y PLX) WT/CX3CR1 ^{+/GFP} (VEH y PLX) FAAH ^{-/-} /CX3CR1 ^{+/GFP} (VEH y PLX) 5xFAD/CX3CR1 ^{+/GFP} (VEH y PLX) 5xFAD/FAAH ^{-/-} /CX3CR1 ^{+/GFP} (VEH y PLX)
	Imagen <i>in vivo</i> 2PE	5xFAD/CX3CR1 ^{+/GFP} (VEH y PLX) 5xFAD/FAAH ^{-/-} /CX3CR1 ^{+/GFP} (VEH y PLX)

1.1. Diseño experimental I

El diseño experimental I consistió en la evaluación del potencial efecto antiinflamatorio y neuroprotector del CBD y THC sobre la patología amiloide. Para su consecución, se trataron ratones 5xFAD macho de 8 meses de edad con vehículo (VEH), CBD, THC o CBD:THC, y ratones WT con VEH, que sirvieron como control del experimento. Para evaluar los efectos de la administración crónica de dosis bajas de cannabinoides, se realizaron:

1. Pruebas comportamentales a los animales tratados. Para ello, se empleó una N mínima de 16 ratones por grupo experimental, siendo aleatorizados por el peso y el tratamiento, para evaluar:
 - La memoria espacial (BM, del inglés, Barnes Maze).
 - La ansiedad (EPM, del inglés, Elevated Plus Maze).
 - La depresión (TS, del inglés, Tail Suspension test).
 - La coordinación motora (RR, del inglés, Rotarod).
 - La actividad locomotora (OF, del inglés, Open-Field test).
2. Análisis moleculares para estudiar los niveles de expresión de los receptores cannabinoides, los marcadores de inflamación, la gliosis y el daño neuronal en el parénquima cerebral tras el tratamiento con cannabinoides. Los estudios realizados contaron con una N mínima de 8 animales por grupo experimental y comprendieron:
 - La determinación del ARNm de la corteza y del hipocampo mediante RT-qPCR (del inglés, Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction)
 - El análisis de diversas proteínas de la corteza cerebral por Western-blot (WB).
 - La cuantificación de la fracción soluble e insoluble del péptido A β ₁₋₄₂ del hipocampo mediante ELISA.

1.2. Diseño experimental II

En el diseño experimental II se abordó el estudio del impacto de la inactivación genética de la enzima FAAH en el contexto de la EA. Estudios previos han mostrado una exacerbación de la respuesta inflamatoria paradójicamente asociada a efectos neuroprotectores en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} (300,332–335). Con el fin de profundizar en esta cuestión, se llevó a cabo esta segunda aproximación experimental, que consta de los siguientes estudios:

1. Pruebas de comportamiento. Concretamente, se realizó la prueba de BM para evaluar el impacto de la inactivación genética de FAAH en el aprendizaje espacial de los animales en el contexto de la EA. Para su realización, los animales se aleatorizaron por peso y genotipo. La N mínima empleada fue de 8 ratones macho de 7 meses de edad WT, FAAH^{-/-}, 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}.
2. Análisis de transcriptómica para determinar los genes diferencialmente expresados (DEG) y los procesos biológicos potencialmente alterados (GSEA, del inglés Gene Set Enrichment Analysis) por la inactivación genética de FAAH en el hipocampo de los animales. Para ello, se emplearon 3 ratones macho de 6 meses de edad por genotipo (WT, FAAH^{-/-}, 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-}).
3. Análisis moleculares para profundizar en la comprensión de la neuroinflamación asociada a la inactividad de FAAH en la patología amiloide. Además, el tratamiento de los ratones con PLX5622 (PLX) permitió detallar el grado de contribución de la microglía a los cambios moleculares observados. Se emplearon ratones (WT, FAAH^{-/-}, 5xFAD, 5xFAD/FAAH^{-/-}, WT/CX3CR1^{+GFP}, FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+GFP}, 5xFAD/CX3CR1^{+GFP}, 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+GFP}) macho de 7 meses de edad tratados con comida control (VEH) o PLX para:
 - La determinación del ARNm del hipocampo mediante RT-qPCR.
 - El análisis de proteínas de la corteza cerebral por WB.
4. Imagen *in vivo* empleando microscopía dos fotones (2PE) para el estudio de las diferencias morfológicas de las placas amiloides y de la microglía por la inactividad de FAAH en el contexto de la EA, tras la ablación microglial con PLX5622 y la posterior repoblación de este tipo celular. Para la consecución de este análisis, se emplearon ratones macho de 6 meses de edad de los siguientes genotipos 5xFAD/CX3CR1^{+GFP} y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+GFP} (N mínima=8).

2. Animales de experimentación

La estabulación y manipulación de los animales de experimentación se realizó en las instalaciones del animalario de la Universidad Francisco de Vitoria (número de autorización 28115000013). Los ratones se mantuvieron en jaulas con enriquecimiento ambiental, acceso a agua y a dieta estándar *ad libitum*, ciclos constantes de luz/oscuridad (12 h/12 h), presión positiva, temperatura constante (23 °C) y humedad relativa (55-60 %). Los procedimientos

experimentales se llevaron a cabo con la autorización del comité ético local (PROEX 149/18) y cumpliendo con la normativa española (RD 1201/2005 y RD 53/2013) y europea (2010/63/EU) para la protección de animales de experimentación.

El presente trabajo se realizó con ratones macho de 6-8 meses de edad con el fondo genético C57BL/6. Los genotipos empleados fueron los siguientes: WT, FAAH^{-/-}, 5xFAD, 5xFAD/FAAH^{-/-}, WT/CX3CR1^{+GFP}, FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+GFP}, 5xFAD/CX3CR1^{+GFP} y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+GFP}.

2.1. WT

C57BL/6 es la cepa comúnmente empleada para la generación de ratones transgénicos y *knockout*, ya que permite la máxima expresión de muchas mutaciones (336). Dado que estos animales carecen de modificaciones genéticas, se utilizaron como controles en los diferentes procedimientos experimentales.

2.2. 5xFAD

5xFAD es un modelo de ratón doble transgénico que expresa los transgenes humanos *App* y *Ps1* en heterocigosis, bajo el control del promotor murino específico de neuronas *Thy1*, con un total de 5 mutaciones asociadas a la FAD (figura 15) (337,338):

- 3 mutaciones en el gen de *App*: sueca (K670N/M671L), Florida (I716V) y Londres (V717I).
- 2 mutaciones en el gen de *Ps1*: M146L y L286V.

Estos ratones desarrollan una amiloidosis muy similar a la EA, pero sin presentar ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada. La severidad en las hembras es mayor que en los machos, probablemente debido a la presencia de un elemento sensible a estrógenos en el promotor *Thy1*.

La evolución de la patología en este modelo animal comprende:

- El incremento del péptido A β ₁₋₄₂ en el interior de las neuronas al mes y medio de edad de los animales.
- La exacerbación de la astrogliosis, la microgliosis y los depósitos de amiloide extracelulares en el subículo y la capa V cortical a los dos meses de edad.

- La diseminación de las placas amiloides por toda la corteza e hipocampo, el proceso de pérdida neuronal y el deterioro de la memoria espacial a los 6 meses de edad (337,338).

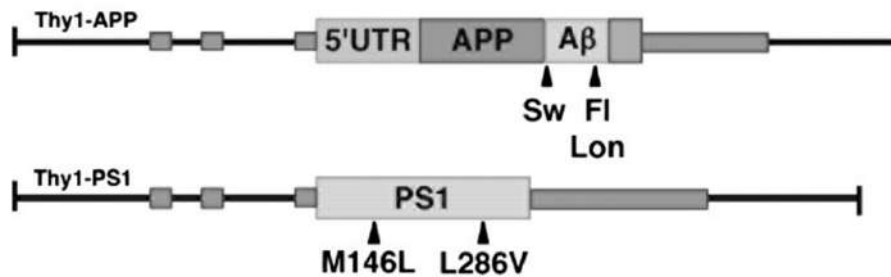


Figura 15: Esquema de las mutaciones presentes en los transgenes humanos *App* y *Ps1* del modelo murino 5xFAD. Las mutaciones asociadas a la FAD en ambos transgenes están indicadas con flechas. Sueca (Sw), Florida (FI), Londres (Lon). Los rectángulos grisáceos pequeños simbolizan los exones de *Thy1*. Las regiones codificantes de *App* y *Ps1*, representadas con rectángulos de mayor tamaño, están insertadas en el exón 2 de *Thy1* (337).

La línea 5xFAD (B6/SJL) se obtuvo de *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, Maine, EE. UU.) y se cruzó durante más de 10 generaciones con ratones C57BL/6 para cambiar su fondo genético.

2.3. FAAH^{-/-}

Este modelo fue generado y cedido por el Dr. Benjamin F. Cravatt y se caracteriza por la inactivación genética de la enzima FAAH de forma constitutiva en el organismo del ratón (339). La estrategia para diseñar este modelo *knockout* se basa en la eliminación del exón 1 (E1) del gen de *Faah* mediante recombinación homóloga con el fin de truncar e inactivar esta enzima (figura 16). Como consecuencia, el parénquima cerebral de estos animales muestra unos niveles de AEA 15 veces superiores, una regulación positiva de otras NAEs (OEA y PEA) y una menor sensibilidad al dolor respecto a los controles (339).

Con el fin de profundizar en el papel que desempeña la enzima FAAH en la modulación de la neuroinflamación en el contexto de la EA, se generó la línea 5xFAD/FAAH^{-/-}, cruzando ratones 5xFAD con el modelo FAAH^{-/-}.

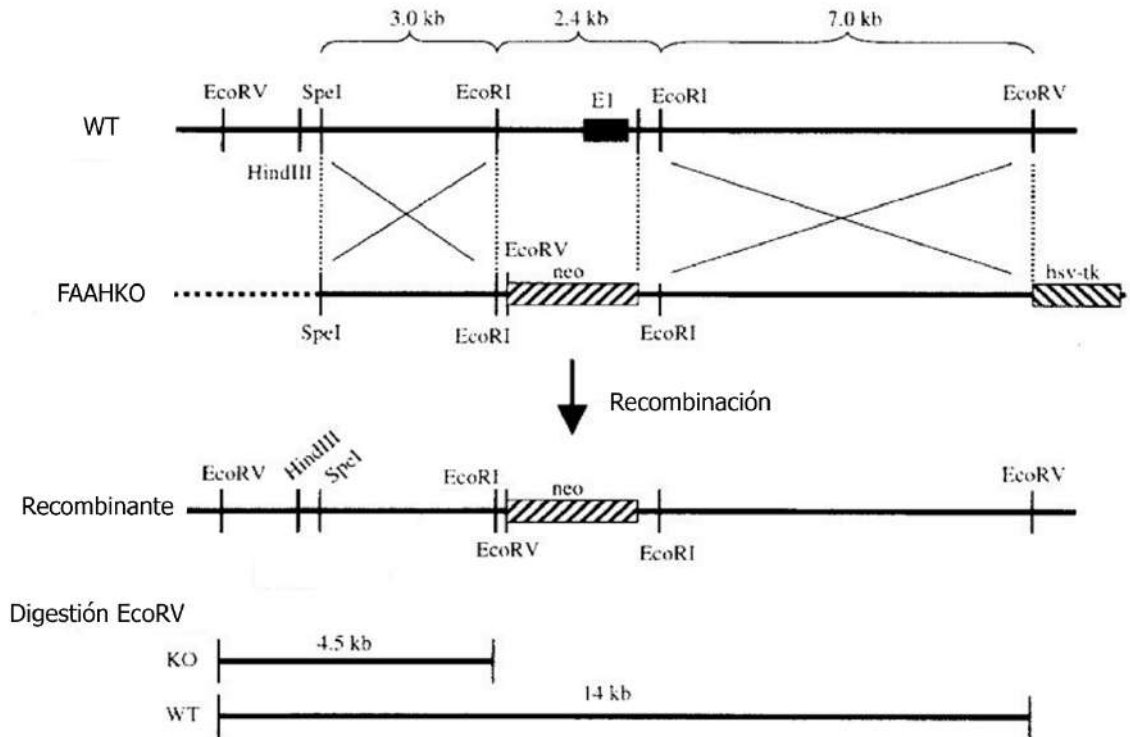


Figura 16: Esquema del constructo genético para la obtención de ratones FAAH^{-/-}. Imagen adaptada de (339).

2.4. CX3CR1^{+/GFP}

Esta línea transgénica fue obtenida de *Jackson Laboratories* y se caracteriza por tener las primeras 390 pares de bases (pb) de una de las copias del gen *Cx3cr1* sustituidas por GFP mediante recombinación homóloga, cuya expresión se encuentra controlada por el promotor de CX3CR1 (figura 17). Este receptor es característico de los monocitos, las células *natural killer*, las células dendríticas y la microglía (339).

A partir de este modelo, se generaron las líneas WT/CX3CR1^{+/GFP}, FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+/GFP}, 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+/GFP} para analizar la morfología y la respuesta microglial en el contexto de la patología amiloide en presencia y ausencia de la actividad de la enzima FAAH.

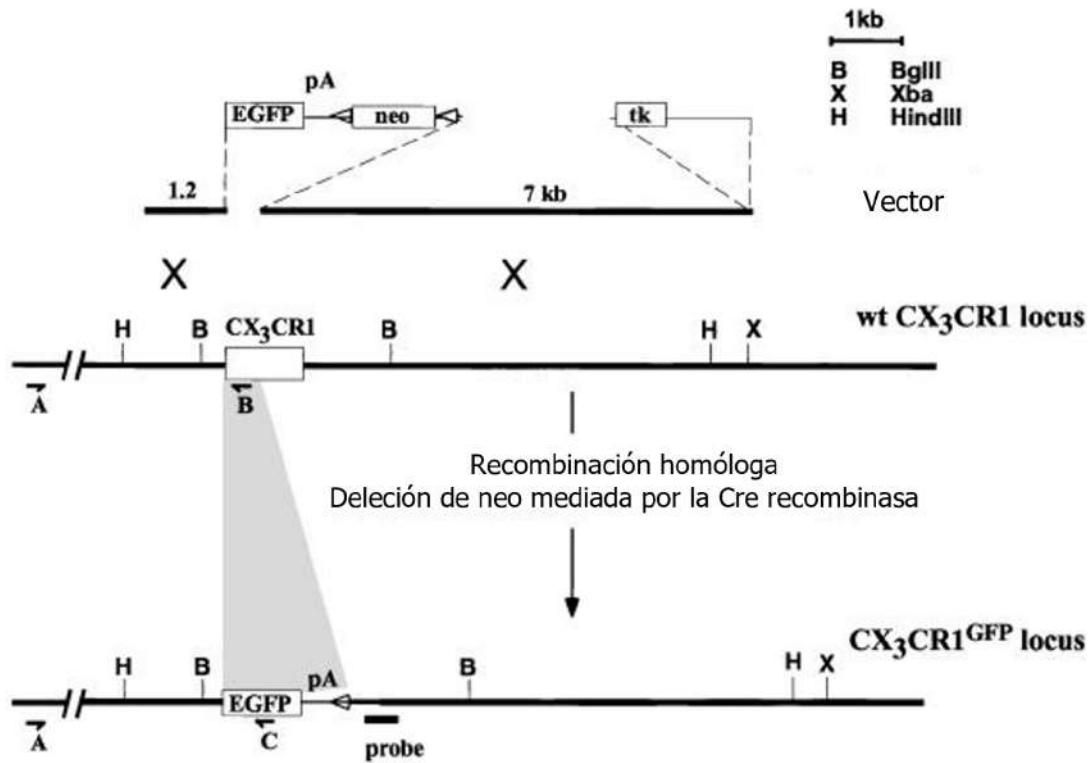


Figura 17: Esquema del constructo genético para la obtención de ratones CX₃CR1^{+/GFP}. Imagen adaptada de (339).

3. Genotipado

El genotipado de los animales de experimentación se realizó mediante la técnica PCR (del inglés, polymerase chain reaction) a partir de ADN genómico obtenido de un pequeño fragmento de tejido procedente del marcaje en la oreja de los ratones.

Para la extracción del ADN genómico, la porción de tejido se incubó con un tampón de lisis alcalina (25 mM NaOH y 0,2 mM EDTA) durante 30 minutos a 95 °C, que, posteriormente, se neutralizó empleando un tampón Tris-HCL 40 mM. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis por PCR.

La PCR se realizó en el termociclador LabCycler 48 (SensoQuest, Göttingen, Alemania) a partir de 30-50 ng de ADN genómico, *primers* específicos (tabla 8), desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), tampón de reacción 1X y ADN polimerasa (Biotools, Madrid, España), siguiendo los programas de temperatura correspondientes (tabla 9).

Los productos resultantes de la reacción se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % en TAE 1X (del inglés, tris-acetate-EDTA), añadiendo el agente de tinción

GreenSafe Premium 1X (MF13201, Nzytech, Lisboa, Portugal). Las muestras se corrieron en una cubeta con TAE 1X a 120 V durante 30 minutos.

Tabla 8: Secuencias de los *primers* empleados para el genotipado de los modelos murinos 5xFAD, FAAH^{-/-} y CX3CR1^{+/GFP}.

Genes	<i>Primers</i>	Secuencias (5'-3')
<i>hApp</i>	hAPP-S	AGA GTA CCA ACT TGC ATG ACT ACG
	hAPP-A	ATG CTG GAT AAC TGC CTT CTT ATC
<i>hPs1</i>	hPS1-S	GCT TTT TCC AGC TCT CAT TTA CTC
	hPS1-A	AAA ATT GAT GGA ATG CTA ATT GGT
<i>Faah</i>	FAAH 1	TAA CTA GGC AGT CTG ACT CTA G
	FAAH 2	ACT CAA GGT CAG CCT GAA ACC
	NEO 3	TTT GTC ACG TCC TGC ACG ACG
<i>Cx3cr1</i>	CX3 WT	TTC ACG TTC GGT CTG GTG GG
	CX3 Het	GGT TCC TAG TGG AGC TAG GG
	CX3 Mut	GAT CAC TCT CGG CAT GGA CG

Por último, el patrón de bandas obtenido se visualizó utilizando el transiluminador UV (GelDoc™ EZ System, Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) y se determinó su tamaño a partir del marcador de pesos moleculares de referencia (MWD100, NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Alemania):

- Los ratones 5xFAD, caracterizados por la presencia en heterocigosis de los transgenes humanos *App* y *Ps1* con las 5 mutaciones, mostraron una banda de 500 pb para cada transgén, mientras que los WT no presentaron banda alguna.
- Los animales FAAH^{-/-}, caracterizados por la delección en homocigosis del exón 1 de *Faah*, mostraron una banda de 300 pb, los WT (FAAH^{+/+}) una banda de 200 pb y los FAAH^{+/-} presentaron ambas bandas.
- Los ratones con CX3CR1 intacto o WT (CX3CR1^{+/+}) presentaron una banda de 970 pb, aquellos que carecían de ambas copias (CX3CR1^{GFP/GFP}) tuvieron una banda de 1200 pb, mientras que los animales con solo una copia de CX3CR1 (CX3CR1^{+/GFP}) mostraron ambas bandas.

Tabla 9: Programa de PCR para genotipar los ratones 5xFAD, FAAH^{-/-} y CX3CR1^{+ /GFP}.

Genotipado	Paso	Temperatura	Tiempo
5xFAD	Desnaturalización	96 °C	3 mins
	Desnaturalización	94 °C	30 seg (x29)
	Anillado	55 °C	45 seg (x29)
	Polimerasa	72 °C	1 min (x29)
	Polimerasa fin	72 °C	7 mins
	Fin	4 °C	∞
FAAH	Desnaturalización	95 °C	3 mins
	Desnaturalización	94 °C	1 min (x35)
	Anillado	53 °C	1 min (x35)
	Polimerasa	72 °C	1 min (x35)
	Polimerasa fin	72 °C	10 mins
	Fin	4 °C	∞
CX3CR1	Desnaturalización	95 °C	3 mins
	Desnaturalización	94 °C	30 seg (x35)
	Anillado	60 °C	30 seg (x35)
	Polimerasa	72 °C	2 min (x35)
	Polimerasa fin	72 °C	2 mins
	Fin	10 °C	∞

4. Tratamientos farmacológicos

4.1. Cannabinoides

Algunos ensayos clínicos han empleado CBs y extractos de cannabis para tratar los síntomas de la demencia, observándose una eficacia potencial y segura tras la administración diaria de THC (0,75-12 mg) por vía oral a personas de tercera edad (340). Teniendo en cuenta este potencial efecto, en el diseño experimental I se testaron los efectos del CBD y THC sintetizados con alta pureza (>97 %) por Purisys, LLC (Atenas, Georgia, EE. UU.) y suministrados por Medicane health Inc. (Kfar Sava, Israel) en el modelo murino de amiloidosis cerebral 5xFAD.

La dosis de tratamiento crónico se estableció extrapolando la dosis empleada en humanos a la equivalente en ratones, siguiendo las indicaciones de la FDA (del inglés, Food and drug administration). Para ello, se seleccionó la dosis mínima empleada en ensayos clínicos en humanos con demencia, teniendo en cuenta la vía de administración, ya que en humanos era oral y en ratones sería una dosis crónica intraperitoneal.

La solución vehículo y los diferentes cannabinoides se prepararon a partir de etanol, se suplementaron con alfa-tocoferol al 0,05 % y se conservaron a -20 °C en oscuridad. A partir de estas soluciones etanólicas, se prepararon diariamente los tratamientos a una ratio 1:1:18 (etanol:Kolliphor® (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE. UU.):suero salino fisiológico) y se administraron intraperitonealmente (i.p.) las siguientes dosis a los animales durante 28 días consecutivos:

- 0,273 mg/kg de CBD.
- 0,205 mg/kg de THC.
- 0,273:0,205 mg/kg de una combinación de CBD y THC (CBD:THC). Esta combinación se determinó en base a una evaluación previa realizada en pez cebrá patentada por MediCane.

4.2. PLX5622

PLX5622, suministrado por Plexikon Inc. (Berkeley, California, EE. UU.), es un inhibidor de CSF1R con gran biodisponibilidad por vía oral. La formulación de este fármaco se realizó en la comida estándar para roedores AIN-76A (Research Diets Inc., New Brunswick, Nueva Jersey, EE. UU.) a 1200 mg/kg. En el diseño experimental II, se realizaron estudios que incluyeron una fase de pérdida microglial crónica, en la que los ratones tuvieron acceso a la dieta PLX5622 *ad libitum* durante 28 días, y una fase de repoblación de este tipo celular, tras 9 días de exposición *ad libitum* a dieta estándar.

La síntesis de este compuesto se realizó a partir de PLX3397, introduciendo mejoras como el incremento de la especificidad de PLX5622 por CSF1R hasta 20 veces respecto al anterior compuesto. Otra propiedad destacable de PLX5622 es que presenta una permeabilidad cerebral del 20 %, en comparación con el 5 % que presenta PLX3397, gracias a su menor peso molecular, mayor lipofilidad y mejor permeabilidad celular. Por tanto, es capaz de atravesar la BHE para unirse al sitio activo de CSF1R e inhibir la señalización a través de este receptor, que es necesaria para la supervivencia celular (145,341). Se ha demostrado que la

inhibición de CSF1R produce la eliminación del 90 % de la microglía tras 5 días de tratamiento con PLX5622 en ratones. Además, la pérdida microglial persiste en el parénquima cerebral mientras dure el tratamiento, es decir, una vez sea sustituido por la dieta estándar y cese la inhibición de CSF1R, la microglía repoblará rápidamente en tan solo 7 días (341–343).

Todas estas propiedades hacen de PLX5622 una herramienta clave y novedosa en nuestro estudio para esclarecer el papel de la población microglial en los efectos derivados de la inactivación de FAAH en el contexto de la patología amiloide.

5. Pruebas comportamentales

5.1. Barnes Maze

BM permite evaluar la memoria espacial en los ratones gracias al empleo de estímulos ligeramente aversivos (luz directa y superficie blanca y abierta) y positivos (escondite oscuro con enriquecimiento ambiental), a diferencia de otras pruebas que requieren de agentes estresores, como el agua en el laberinto acuático de Morris. Para la realización de esta prueba comportamental, en el diseño experimental I y II, se siguió el protocolo descrito por Sunyer y colaboradores en 2007 y se optimizó el número de pruebas a 2 diarias (344).

Antes de comenzar cada ensayo, se ajustaron las condiciones de luz (directa, 600 lux) utilizando un luxómetro y se dispusieron las diferentes señales visuales (triángulo rojo, círculo amarillo, cuadrado verde y el propio investigador que realiza la prueba) en los puntos cardinales, sirviendo como referencia visual para el ratón (figura 18). Al finalizar cada prueba, se limpió el aparato con agua destilada y se rotó la plataforma, manteniendo el escondite en la misma posición respecto a las señales visuales, para evitar que los animales se guiaran por el olfato.

1. Fase de aprendizaje: Se realizaron 2 ensayos diarios durante 4 días, siguiendo los siguientes pasos:
 - 1.1. Colocar al ratón dentro de un cilindro cerrado en el centro de la plataforma durante 10 segundos.
 - 1.2. Dejar al ratón explorando libremente por la plataforma durante 3 minutos.
 - 1.3. Si el ratón ha encontrado el escondite antes de que finalicen los 3 minutos, cerrar el escondite para que permanezca en su interior durante 1 minuto. En

caso contrario, guiar al ratón hasta el escondite y esperar 1 minuto antes de devolverlo a la zona de estabulación.

2. Evaluación de la memoria: Se realizó un único ensayo al quinto día, pero, en esta ocasión, con el agujero del escondite cerrado. Para ello, se repitió el paso 1.1 y 1.2, reduciendo el tiempo del ensayo a 1,5 minutos.

Todas las pruebas se grabaron y analizaron utilizando el sistema de seguimiento de vídeo SMART v.3 (Panlab, Barcelona, España). En los resultados obtenidos se muestra la latencia, que es el tiempo que tarda cada ratón en encontrar el agujero del escondite.

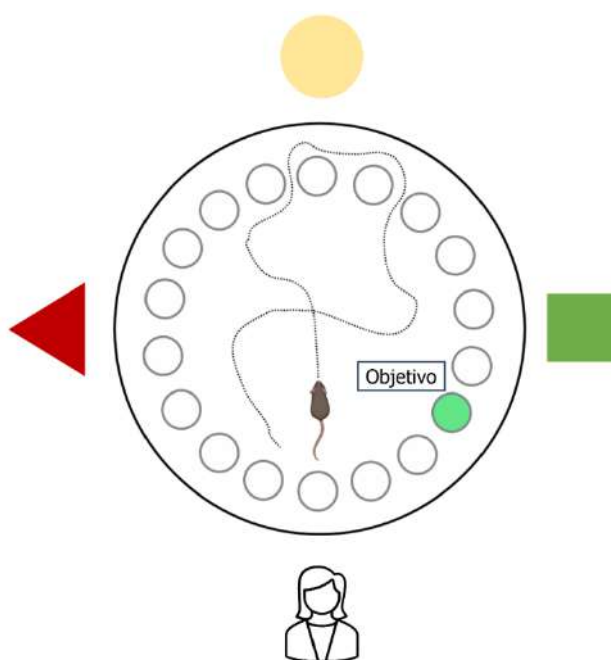


Figura 18: Esquema del aparato empleado para realizar la prueba de Barnes. Se colocaron señales visuales en los cuatro puntos cardinales de la plataforma (círculo amarillo, cuadrado verde, triángulo rojo y el investigador que realiza la prueba). El escondite de la plataforma (objetivo) aparece indicado con un círculo verde en la figura. Imagen creada con BioRender.com.

5.2. Elevated Plus Maze

El EPM es una de las pruebas realizadas en el diseño experimental I para estudiar la ansiedad. Se basa en dos tendencias naturales de los roedores: la aversión a superficies abiertas y elevadas, y la exploración de nuevos entornos. El aparato se elevó 50 cm del suelo y constaba de una zona central, dos brazos abiertos y dos cerrados, entrecruzados perpendicularmente (figura 19).

Para la realización de esta prueba, fue necesario:

- Ajustar las condiciones de luz (indirecta, 100 lux) empleando un luxómetro.
- Dejar al animal explorar libremente el aparato durante 5 minutos, que se limpió con agua destilada una vez finalizado el ensayo.
- Grabar todas las pruebas, que, posteriormente, se analizaron por un investigador independiente. Los resultados del EPM reflejan el tiempo que el ratón estuvo en el brazo abierto, expresado como porcentaje del tiempo total (345,346).

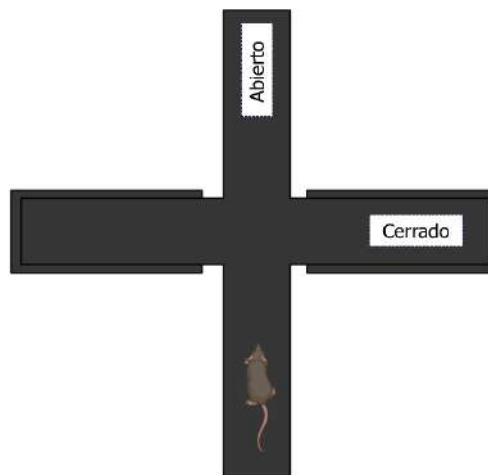


Figura 19: Aparato para la prueba EPM. Se analizó el tiempo que permaneció el animal en el brazo abierto del aparato. Imagen creada con BioRender.com.

5.3. Tail Suspension Test

El objetivo de esta prueba es abordar el estudio del comportamiento depresivo en los ratones tras la administración de cannabinoides en el diseño experimental I.

En primer lugar, se ajustaron las condiciones de luz (indirecta, 89 lux) y se colocó un dispositivo antirrotación en la base de la cola de los animales. Seguidamente, se suspendieron

en el aire durante 6 minutos, de tal modo que no pudieran escapar o sujetarse a superficies cercanas (figura 20). Al finalizar cada prueba, se limpió el aparato con agua destilada.

Todas las pruebas se grabaron y, posteriormente, se cuantificaron por un investigador independiente. Los resultados del TST muestran el tiempo de inmovilidad de cada ratón (347).



Figura 20: Esquema del aparato empleado para realizar la prueba TS. El animal se suspendió en el aire por la cola, tal y como refleja la imagen. Imagen creada con BioRender.com.

5.4. Rotarod

Para evaluar la coordinación motora de los ratones tratados con cannabinoides en el diseño experimental I, se realizó la prueba RR (Panlab; figura 21). Esta prueba evalúa el equilibrio y la capacidad de los animales para mantenerse sobre una plataforma rotatoria acelerada. Concretamente, se incrementó la velocidad de 4 revoluciones por minuto (rpm) a 40 rpm a lo largo de 10 minutos.

Se ajustaron las condiciones de luz (indirecta, 250 lux), se realizaron 3 ensayos por animal con un intervalo de 15 minutos entre pruebas. Una vez finalizada cada una, se limpió el aparato con agua destilada.

Los resultados del RR reflejan el tiempo de latencia correspondientes al tercer ensayo, que es el tiempo que permaneció cada animal en la barra giratoria (348).

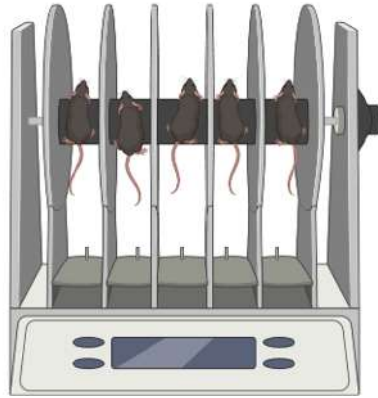


Figura 21: Aparato empleado para realizar la prueba RR. Imagen creada con BioRender.com.

5.5. Open-Field test

La prueba OF se realizó en el diseño experimental I para estudiar el impacto del tratamiento con cannabinoides sobre el estado la actividad locomotora del animal.

Tras ajustar las condiciones de luz (directa, 500 lux), se colocó al ratón en el centro de la superficie circular del aparato, que exploró libremente durante 10 minutos (figura 22). El aparato se limpió con agua destilada al finalizar cada ensayo. Todas las pruebas se grabaron y, posteriormente, se analizaron por un investigador independiente utilizando el Software SMART Video Tracking System, v.3 (Panlab). Los parámetros cuantificados en la prueba OF fueron: el tiempo empleado en la zona central y periférica del aparato, y la distancia recorrida en ambas áreas (349).

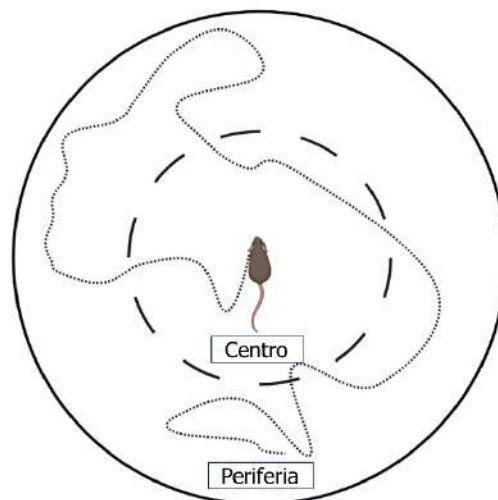


Figura 22: Esquema del aparato empleado para realizar la prueba OF. Se diferenció entre el centro y la periferia del aparato en el análisis de los datos. Imagen creada con BioRender.com.

6. Transcriptómica

Para realizar el análisis transcriptómico (*bulk RNA-seq*) del diseño experimental II, se sacrificaron los animales por dislocación cervical para aislar el hipocampo, que se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C hasta su procesamiento. El ARN del hipocampo se purificó usando el Mini kit de RNeasy® (cat. 74104, Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Brevemente, los pasos que comprende son:

1. Lisado y homogeneización de la muestra en un volumen de 350 µl del buffer de lisis (RLT) y etanol para mejorar la unión a la membrana.
2. Purificación de la muestra mediante columnas con membranas de sílice.
3. Eliminación del ADN residual usando columnas tratadas con DNAsas.
4. Elución del ARN purificado con agua libre de RNAsas.

Las muestras se secuenciaron usando la plataforma NovaSeq 6000 (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) para, posteriormente, llevar a cabo el estudio de transcriptómica, que incluyó:

1. El control de la calidad de las muestras para asegurar la integridad de los datos brutos secuenciados antes de su procesamiento mediante FastQC (versión 0.11.9). Las regiones indeseadas (la secuencia adaptadora y las lecturas de baja calidad), que fueron identificadas tras evaluar la calidad de las muestras, se eliminaron empleando Trim Galore (versión 0.6.10).
2. El mapeo de las lecturas de alta calidad mediante su alineamiento con el genoma de referencia mm39 usando el alineador STAR (versión 2.7.10b) (350). Para cuantificar los niveles de expresión génica se empleó *FeatureCounts* del paquete *Subread* programado en R (versión 2.01) (351).
3. El análisis de componentes principales (PCA, del inglés, Principal Component Analysis) permitió evaluar la presencia de muestras atípicas. Es una técnica estadística caracterizada por reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, es decir, simplificarlos en pocas componentes principales ortogonales, preservando la mayor cantidad de información posible.
4. El análisis de la expresión diferencial de genes, empleando el paquete DESeq2 (versión 1.38.0) para analizar los perfiles de expresión comparativamente entre las diferentes condiciones (352). Este análisis se caracteriza por el empleo de un modelo basado en la distribución binomial negativa para identificar genes diferencialmente expresados

(352). El p-valor se corrigió para múltiples comparaciones siguiendo el método Benjamini-Hochberg FDR (del inglés, False Discovery Rate), y se consideró estadísticamente significativo $p < 0,05$.

5. El análisis funcional utilizando el paquete GSEAPy programado en Python para realizar el análisis GSEA (353), el cual permitió la identificación de cambios en conjuntos de genes relacionados con procesos biológicos tras comparar dos fenotipos diferentes (WT/FAAH^{-/-} vs. WT y 5xFAD/FAAH^{-/-} vs. 5xFAD). Para ello, se seleccionaron algunas firmas génicas (anexo I) de la base de datos MSigDB (del inglés, Molecular Signatures Database; versión 7.0), que es una colección de grupos de genes anotados procedentes de otras bases de datos como Gene Ontology, KEGG pathway, etc. (354). Además, se empleó la firma "Microglía DAM" descrita por Grubman y colaboradores en 2021, que recoge los genes sobreexpresados en este fenotipo microglial (anexo 1) (180).

Para dar más robustez a los resultados, se realizaron 1000 permutaciones por firma en el análisis GSEA y se consideraron estadísticamente significativos el valor FDR p-valor ajustado $< 0,05$ y el p-valor nominal $< 0,05$.

7. Análisis moleculares

7.1. Obtención de las muestras

Para llevar a cabo los análisis moleculares (WB, RT-qPCR y ELISA) de los diseños experimentales I y II se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se aislaron la corteza y el hipocampo de cada hemisferio del parénquima cerebral, y se guardaron las muestras a -80 °C.

7.2. RT-qPCR

La RT-qPCR permitió identificar diferencias de expresión en genes concretos relacionados con:

- Diseño experimental I: los receptores cannabinoides y los marcadores de inflamación tras el tratamiento con cannabinoides mediante el análisis del ARNm del hipocampo y la corteza de los diferentes grupos experimentales.

- Diseño experimental II: el inflamasoma, el eje CSF1R-CSF1L, las citoquinas proinflamatorias, los receptores microgliales y algunos componentes del SEC mediante el análisis del ARN mensajero del hipocampo de cada grupo experimental.

En primer lugar, se extrajo el ARN mensajero usando el reactivo de aislamiento Tripure® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este protocolo comprende: 1) el lisado y la homogeneización mecánica (Ultra-Turrax, IKA, Staufen, Alemania) del hipocampo con 500 µl de Tripure, y 2) el aislamiento, la precipitación y la reconstitución del ARN en 20 µl H₂O con DEPC (del inglés, dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich) para eliminar ribonucleasas que puedan degradar el ARN. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

En segundo lugar, se comprobó la calidad del ARN obtenido y se cuantificó su concentración utilizando el Nanodrop (SimpliNano™, Biochrom, Holliston, Massachusetts, EE. UU.). La RT-PCR se realizó a partir de 1 µg de ARN y el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche Diagnostics). Se empleó el protocolo especificado por el fabricante y el programa de PCR específico (tabla 10) en el termociclador LabCycler 48 (SensoQuest).

En tercer lugar, las PCR cuantitativas (qPCRs) se realizaron con la mezcla de reacción (tabla 11) compuesta por: ADNc, H₂O DEPC, sondas *PrimePCR™ Probe Assay* (Bio-Rad) conjugadas con el fluoróforo FAM (tabla 12 y 13) y el kit *QuantiMix Easy Probes* (Biotools). Se empleó el programa específico (tabla 14) en el sistema *CFX Connect® Real-Time PCR Detection* (Bio-Rad) y placas de 96 pocillos con duplicados de los diferentes ensayos y controles negativos para garantizar la ausencia de contaminación de la muestra.

Para analizar los datos obtenidos, se calculó el promedio de los valores del ciclo umbral *Ct* del duplicado de cada muestra. El dato resultante se relativizó al valor de la subunidad 18 ribosomal, que, al expresarse de forma estable, se utilizó como gen de referencia. Por último, se siguió el método de cálculo $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para obtener los valores de cuantificación relativa empleados en el análisis estadístico.

Tabla 10: Programa de PCR para retrotranscribir el ARN mensajero extraído del hipocampo del ratón a ADN complementario (ADNc).

Temperatura	Tiempo
25 °C	10 mins
50 °C	1 h
85 °C	5 mins
4 °C	∞

Tabla 11: Volúmenes de cada componente por reacción de qPCR.

Componente	Volumen
Sonda	1 µl
QuantiMix	10 µl
H ₂ O DEPC	7 µl
ADNc	2 µl
Total	20 µl

Tabla 12: Sondas empleadas para la cuantificación de la expresión génica por qPCR del diseño experimental I.

Gen	Sonda	Referencia
<i>Cnr1</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Cnr1, Mouse	qMmuCEP0038879
<i>Cnr2</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Custom, Mouse	-
<i>Il1β</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Il1b, Mouse	qMmuCEP0054181
<i>Il6</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Il6, Mouse	qMmuCEP0054186
<i>Rps18</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Rps18, Mouse	qMmuCEP0053856
<i>Tnfa</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Tnf, Mouse	qMmuCEP0028054

Tabla 13: Sondas empleadas para la cuantificación de la expresión génica por qPCR del diseño experimental II.

Gen	Sonda	Referencia
<i>Asc</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Pycard, Mouse	qMmuCEP0056295
<i>Casp1</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Casp1, Mouse	qMmuCIP0037127
<i>Cnr2</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Custom, Mouse	-
<i>Csf1</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Csf1, Mouse	qMmuCIP0032398
<i>Csf1r</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Csf1r, Mouse	qMmuCEP0054028
<i>Faah</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Faah, Mouse	qMmuCEP0055480
<i>Il1a</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Il1a, Mouse	qMmuCIP0030741
<i>Il1β</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Il1b, Mouse	qMmuCEP0054181
<i>Il34</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Il34, Mouse	qMmuCEP0056163
<i>Nlrp3</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Nlrp3, Mouse	qMmuCIP0031558
<i>Rps18</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Rps18, Mouse	qMmuCEP0053856
<i>Tlr4</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Tlr4, Mouse	qMmuCIP0035732
<i>Tnfa</i>	PrimePCR™ Probe Assay: Tnf, Mouse	qMmuCEP0028054

Tabla 14: Programa de ciclos para cada reacción de qPCR.

Paso	Temperatura	Tiempo
Activación	95 °C	2 min
Desnaturalización	95 °C	5 seg (x40)
Alineamiento/extensión	60 °C	30 seg (x40)
Fin	4 °C	∞

7.3. Western-blot

Las proteínas de la corteza cerebral se cuantificaron mediante Western-blot (WB). En primer lugar, se homogeneizaron las muestras mecánicamente (Ultra-Turrax, IKA), empleando 200 µl de MLB (del inglés, Magnesium Lysis Buffer) como solución de lisis (25 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Igepal CA-630, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10 % glicerol, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF e 1X inhibidor de proteasas; Ref. 04693132001, Roche Diagnostics).

Tras su centrifugación a 9000 g durante 20 minutos a 4 °C, se cuantificó la concentración de proteínas obtenida en el sobrenadante mediante el ensayo BCA (del inglés, Bicinchoninic Acid; Protein Assay Kit; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). La recta de calibrado se realizó a partir de distintas concentraciones de BSA (del inglés, bovine serum albumin): 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml y 2000 µg/ml. Se prepararon diluciones 1:30 de cada muestra por duplicado en una placa de 96 pocillos y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en un lector de placas (Sunrise, Tecan, Männedorf, Suiza). Las muestras se preservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Posteriormente, se realizó la electroforesis SDS-PAGE (del inglés, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) a partir de 50 µg de proteínas de cada lisado con tampón de carga 1X (laemmli 8X: 520 nM Tris-HCl pH 6,8, 16 % SDS, 40 % Glicerol, 0,8 % azul de bromofenol, 8 % β-mercaptoetanol). Las muestras se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos para favorecer la desnaturalización proteica y se cargaron en geles de poli(acrilamida) con SDS.

Tras separar las proteínas a un voltaje constante (120 V), se transfirieron con amperaje constante (400 mA) durante 50 minutos a membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm (Bio-Rad) para las proteínas de mayor tamaño o de PVDF (del inglés, Polyvinylidene Difluoride) con un tamaño de poro de 0,2 µm (Bio-Rad) para las proteínas de menor tamaño. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche al 5 % en solución TTBS (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) y las de PVDF con BSA al 5 % en TTBS durante un mínimo de 3 horas a temperatura ambiente (RT, del inglés, room temperature).

Para la visualización y cuantificación de las proteínas de interés, primero se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4 °C y, seguidamente, con el anticuerpo secundario específico para cada especie animal, conjugado con la enzima HRP (del inglés, horseradish peroxidase), durante 1 hora a RT (tabla 15 y 16).

Las membranas se revelaron utilizando el reactivo de detección quimioluminiscente *Western Lighting ECL Plus* (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EE. UU.; GE Healthcare, Chicago, Illinois, EE. UU.) y el equipo ChemiDoc® (Bio-Rad). Finalmente, se cuantificó la intensidad de la señal de cada banda correspondiente a cada proteína con ImageJ (Fiji) y su expresión se relativizó a los niveles de GAPDH, que fue el control de carga empleado.

Tabla 15: Anticuerpos primarios y secundarios empleados para realizar el WB del diseño experimental I.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución
Anti-GAPDH	Abcam	Ab8245	1:1000
Anti-GFAP	Bio-rad	MCA6305	1:500
Anti-Iba1	FUJIFILM Wako Pure Chemical	016-20001	1:1000
Anti-mouse IgG-HRP	Abcam	Ab97046	1:10000
Anti-PSD95	Abcam	Ab18258	1:1000
Anti-rabbit IgG-HRP	Cell Signalling Technology	7074S	1:5000
Anti-synaptophysin	Abcam	Ab52636	1:1000

Tabla 16: Anticuerpos primarios y secundarios empleados para realizar el WB del diseño experimental II.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución
Anti-CSF1R	Abcam	ab221684	1:1000
Anti-GAPDH	Abcam	Ab8245	1:1000
Anti-Iba1	FUJIFILM Wako Pure Chemical	016-20001	1:1000
Anti-mouse IgG-HRP	Abcam	Ab97046	1:10000
Anti-rabbit IgG-HRP	Cell Signalling Technology	7074S	1:5000

7.4. ELISA para cuantificar el péptido A β ₁₋₄₂

En el diseño experimental I, se cuantificaron los niveles de A β ₁₋₄₂ del hipocampo de los animales expuestos a CBD, THC o CBD:THC mediante ELISA.

Para la obtención del A β ₁₋₄₂ se homogeneizó el tejido mecánicamente (Ultra-Turrax, IKA) con 200 μ l del buffer de extracción TBS (140 mM NaCl; 3 mM KCl; 25 mM Tris pH 7,4; 5 mM EDTA), se centrifugó a 16000 g durante 20 minutos a 4 °C y se añadió el mismo volumen de PBS 1X AEBSF 1 nM al sobrenadante para extraer la fracción soluble. El pellet obtenido se homogeneizó mecánicamente con 200 μ l de Tris-Guanidinio (50 mM Tris pH 8; 5 M Guanidinio-

HCl), se centrifugó manteniendo las mismas condiciones y se añadió el mismo volumen de PBS 1X AEBSF 1nM al sobrenadante para obtener el A β ₁₋₄₂ insoluble.

Posteriormente, se cuantificó la concentración proteica con un kit comercial (MicroBCA™ Protein Assay Kit, ref. 23235 Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, se prepararon diluciones de la muestra (1:40) y una recta de calibrado con BSA (0,5 μ g/ml; 1 μ g/ml; 2,5 μ g/ml; 5 μ g/ml; 10 μ g/ml; 15 μ g/ml; 25 μ g/ml; 50 μ g/ml; 100 μ g/ml; 200 μ g/ml; 300 μ g/ml). Tras una incubación a 37 °C durante 30 minutos en oscuridad, se midió la absorbancia de cada muestra a 562 nm (Sunrise, Tecan).

Para la cuantificación del A β ₁₋₄₂ soluble se emplearon 2 μ g de proteína por pocillo, mientras que para la fracción insoluble se partió de 1 μ g de proteína por pocillo. En ambos casos, se siguió el protocolo detallado por el fabricante del kit comercial utilizado (Human A β 42 Ultrasensitive ELISA ref. KHB3544, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Brevemente, se añadieron las muestras por duplicados en una placa de 96 pocillos y se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución estándar (100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, 3,13 pg/ml, 1,56 pg/ml, 0 pg/ml). Se incubó el anticuerpo primario a RT durante 3 horas y, posteriormente, el anticuerpo secundario durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió cromógeno a las muestras durante 30 minutos a RT en oscuridad. Una vez detenida la reacción, se midió la absorbancia a 450 nm (Sunrise, Tecan) y se calculó la concentración de cada una de las muestras a partir de la recta patrón.

8. Imagen *in vivo* 2PE

En el diseño experimental II, se realizaron estudios de imagen *in vivo* utilizando microscopía intravital dos fotones (2PE; figura 23), que incluyeron:

- La implantación de una ventana craneal a los animales.
- La adquisición de imágenes utilizando el microscopio 2PE de la Universidad Francisco de Vitoria (UFV).
- El procesamiento de las imágenes obtenidas con el microscopio 2PE empleando el software de reconstrucción tridimensional Imaris (V.10.0; Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido).

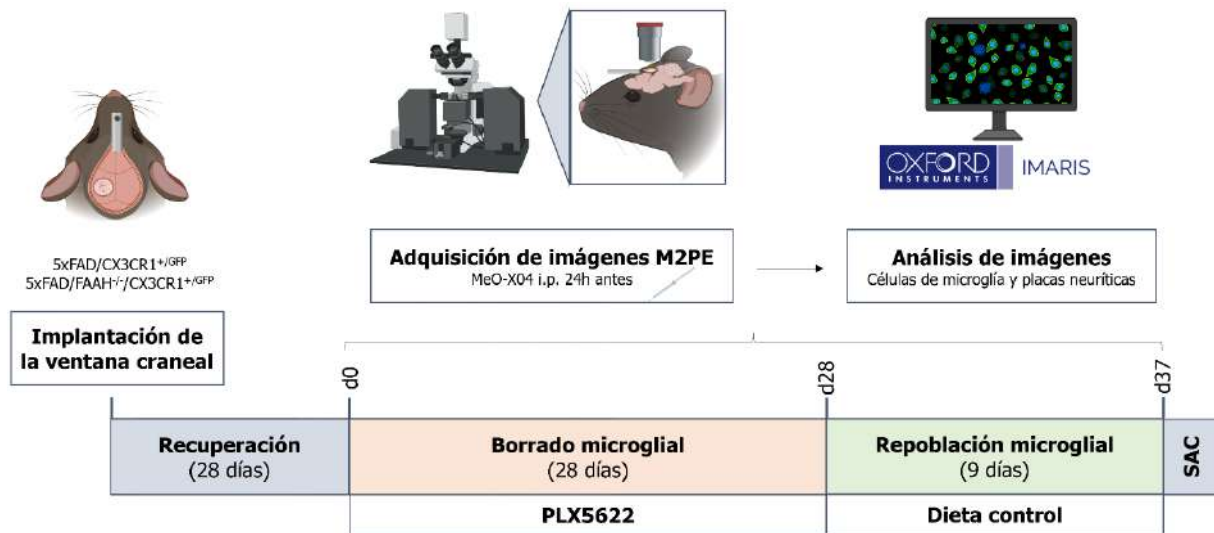


Figura 23: Diseño experimental II. En primer lugar, se implantó la ventana craneal a los animales. Tras una fase de recuperación de 28 días, se realizó la primera sesión de imagen por microscopía 2PE (día 0). Para visualizar las placas de amiloide, se administró MeO-X04 i.p. 24 horas antes de la adquisición de imagen. En cada sesión, se adquirió tanto las células microgliales como las placas neuríticas para su estudio. Los ratones se trataron con PLX5622 durante 28 días para producir un contexto de ablación microglial. En este punto temporal (día 28) se adquirieron imágenes nuevamente. Posteriormente, se cambió la dieta PLX5622 por dieta estándar durante 9 días para favorecer la repoblación microglial y realizar otra sesión de imagen (día 37). Todas las imágenes adquiridas se analizaron con el software de reconstrucción 3D Imaris 10.0. Imagen creada con BioRender.com.

8.1. Cirugía de ventana craneal

Para la adquisición de imágenes *in vivo* 2PE, se implantó una ventana craneal a los ratones (figura 24) (58). Brevemente, se realizó una craneotomía para reemplazar una porción circular del cráneo por un cubre de cristal de 5 mm, permitiendo la visualización directa de la corteza cerebral del hemisferio izquierdo y la realización de estudios crónicos de imagen *in vivo*.

Los animales se anestesiaron por vía inhalatoria con una mezcla de oxígeno a un flujo de 2 lpm y de isoflurano (IsoVet® 1000 mg/g; Ref. 469860, Piramal Critical Care, Belén, Pensilvania, EE. UU.) a una concentración del 5 % para la inducción y del 1,8-2 % para el mantenimiento de la anestesia durante la cirugía. La temperatura del animal se mantuvo constante a 37 °C utilizando una manta térmica para reducir el riesgo de hipotermia causado por la anestesia. Además, se aplicó una pomada oftálmica para hidratar la córnea del ratón y evitar quemaduras provocadas por el pegamento y el cemento dental durante la craneotomía.

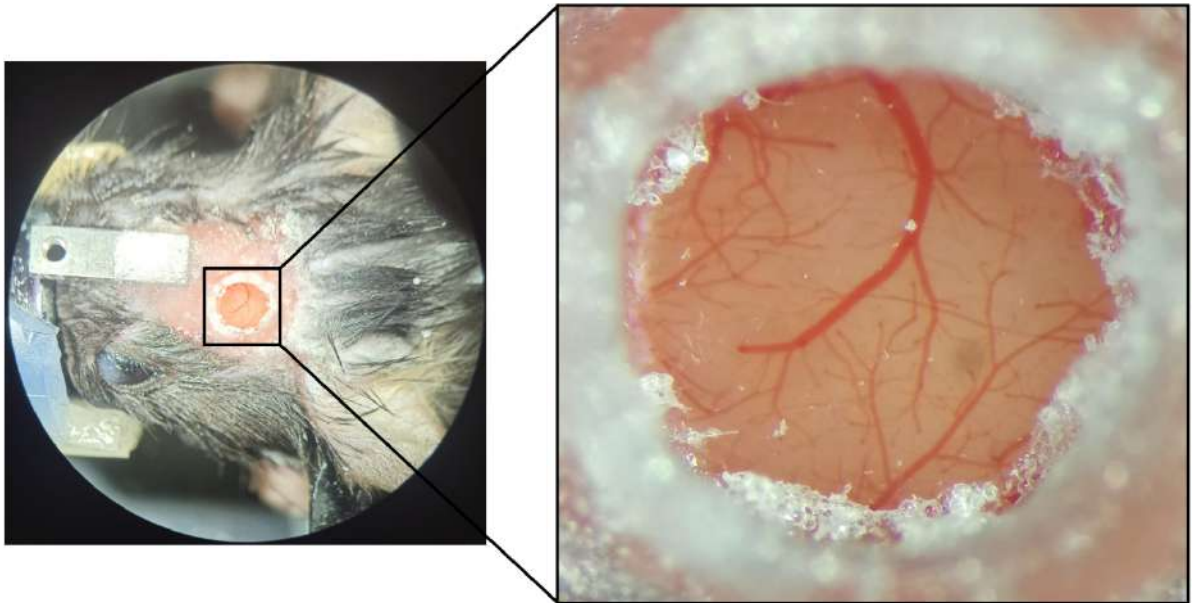


Figura 24: Ventana craneal para la adquisición de imágenes *in vivo* por microscopía 2PE.

Antes de comenzar el procedimiento quirúrgico, se inmovilizó la cabeza del animal, fijando las barras del estereotáxico bajo el arco cigomático, y se administró dexametasona (Cortexonavet® 2 mg/ml, Syva, León, España) y carprofeno (Norocarp® 50 mg/ml, Karizoo, Barcelona, España) por vía subcutánea. Seguidamente, se expuso el cráneo y se aplicó una solución hemostática y analgésica de lidocaína y epinefrina (Anesvest® 20/0,02 mg/ml, Ovejero Laboratorios, León, España) para retirar el periostio con un bisturí. Posteriormente, se realizó la craneotomía de 4 mm de diámetro empleando un taladro dental y una lupa binocular de gran aumento. A lo largo de la intervención, se irrigó la zona con suero salino fisiológico para disipar el calor generado por la fricción del taladro y retirar los restos óseos. Al lograr la profundidad requerida en el surco, se retiró el cráneo, se aplicó Espongostan® (Takeda, Osaka, Japón) y se realizó un lavado meticuloso con suero salino. La zona expuesta se cubrió con un cristal de 5 mm aplicando pegamento con cianocrilato, que también se empleó para cubrir el resto de la superficie craneal. En el mismo plano de la ventana craneal, se fijó una barra de titanio con cemento dental (Ortho-Jet® Liquid, Lang Dental, Wheeling, Illinois, EE. UU.), que sirvió como soporte para asegurar una estabilidad óptima durante las sesiones de imagen. Además, se realizó un pocillo en torno a la ventana capaz de contener la gota necesaria para el empleo del objetivo de inmersión durante la adquisición de imágenes.

Tras la implantación de la ventana craneal, se mantuvo el flujo de oxígeno y la manta térmica para garantizar la correcta recuperación de la anestesia. Con el objetivo de asegurar el

bienestar animal, se estableció un periodo de recuperación de 4 semanas tras la implantación de la ventana craneal, durante el cual se monitorizó la evolución del animal.

8.2. Adquisición de imágenes por microscopía 2PE

Tras la fase de recuperación del procedimiento quirúrgico, se procedió a la adquisición de imágenes utilizando microscopía intravital dos fotones. Entre los elementos que componen el microscopio, cabe destacar:

- Un láser sintonizable de femtosegundos (Chameleon Ultra II, Coherent, Inc., Saxonburg, Pensilvania, EE. UU.), capaz de emitir las longitudes de ondas comprendidas en el rango 680-1050 nm.
- Un sistema de control de los motores del microscopio, que permite registrar las coordenadas en X, Y, Z para el estudio de estructuras de forma prolongada en el tiempo.
- Un controlador de espejos.
- Fotomultiplicadores (PMTs).
- Un medidor de potencia, para garantizar la misma energía de excitación en cada sesión de imagen.
- El software ScanImage 3.8 desarrollado en MATLAB (Mathworks; RRID: SCR_001622), para el correcto funcionamiento del equipo.

Tal y como se detalla en el procedimiento experimental II (figura 23), se administró MeO-X04 (10 mg/kg; Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) i.p. como agente de marcaje fluorescente de las placas amiloides. Tras un periodo de 24 horas, se realizó la primera sesión de imagen (d0) para identificar las células de microglía y las placas amiloides (mínimo 3 placas por campo y 2-3 campos por ratón), así como estudiar su evolución.

Para la inducción de la anestesia de los animales se administró una mezcla de isoflurano al 5 % en oxígeno a un flujo de 2 lpm. Durante la adquisición de imagen, se redujo la concentración de isoflurano al 1,5 % y el flujo de oxígeno a 1,5 lpm para mantener el plano anestésico adecuado. Además, se aplicó una pomada oftálmica para hidratar los ojos del animal y se mantuvo una temperatura constante de 37 °C, utilizando una manta térmica para minimizar el riesgo de hipotermia. A continuación, se fijó la barra de titanio implantada en el

animal a la pletina del microscopio para garantizar una mayor estabilidad de las imágenes y realizar estudios crónicos de una misma estructura *in vivo*. Para ello, primeramente, se limpió la zona de observación con etanol y se aplicó vaselina en torno a la ventana craneal para contener la gota requerida por el objetivo de inmersión. Seguidamente, se dispuso la ventana craneal perpendicular al objetivo, utilizando un objetivo 4X (Olympus, UPLFLN 4X/0.13, Tokio, Japón) y el microscopio en formato óptico. Además, se fotografió el patrón de vasos sanguíneos (figura 25A) con el objetivo de inmersión 40X (Olympus LUMPLFLN 40X/0.8 NA), que sirvió como referencia en el estudio temporal de una misma área.

Las longitudes de onda utilizadas fueron 950 nm y 720 nm para visualizar las células de microglía y las placas neuríticas, respectivamente. Las imágenes se adquirieron a una profundidad de 50 μm respecto a la superficie cerebral empleando la misma potencia del láser. Se observó:

- El patrón de placas (figura 25B) y la microglía (figura 25C) de cada área. Se adquirió un stack de 100 imágenes consecutivas en Z con una distancia entre cada una de 2 μm (step -2) utilizando el objetivo de inmersión 40X (zoom digital 2x; 0,36 μm /píxel; 512 x 512 píxels) y las longitudes de onda correspondientes.
- Placas individualizadas (figura 25D) de cada área. El tamaño del stack dependió del volumen de la placa, es decir, se adquirieron tantas imágenes como fueron necesarias para capturar la totalidad de la estructura. Para ello, se utilizó un step de -1, el objetivo 40X a mayor magnificación (zoom digital 4x; 0,18 μm /píxel; 512 x 512 píxels) y una longitud de onda de 720 nm.

El estudio *in vivo* se llevó a cabo en 3 sesiones de imagen:

- Día 0 (d0): es el primer día de imagen, empleado como control para cada genotipo puesto que no ha sido expuesto a ningún tratamiento.
- Día 28 (d28): es el último día de tratamiento con PLX5622 y, por ende, el último día de pérdida microglial.
- Día 37 (d37): es el último día de repoblación microglial tras la sustitución del tratamiento por la dieta control durante 9 días.

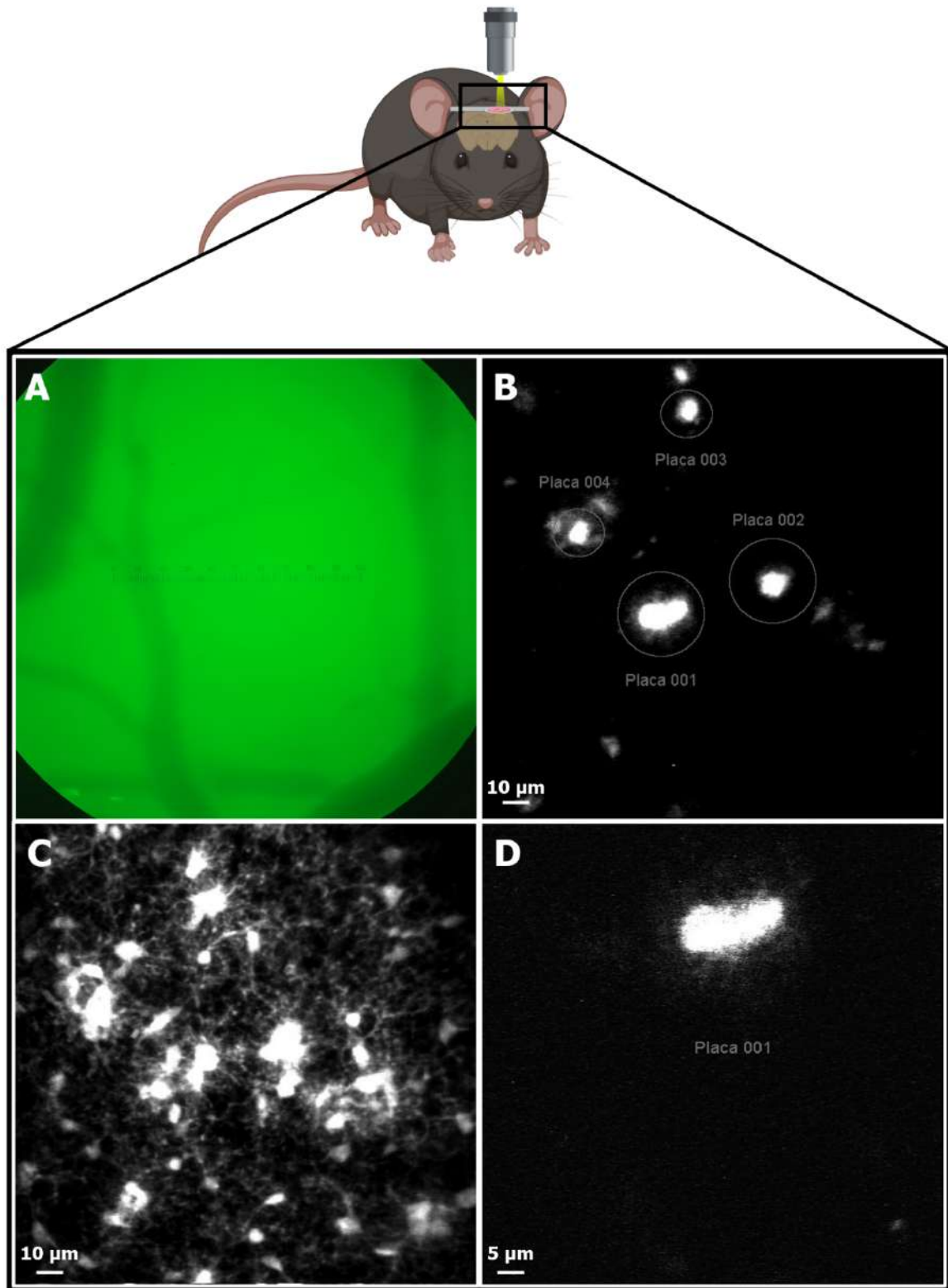


Figura 25: Esquema representativo de las imágenes adquiridas con el microscopio 2PE del campo de observación en un animal. A) El patrón vascular y la escala de referencia observados con el objetivo de inmersión 40X y el microscopio en modo óptico. B) El patrón de placas neuríticas característico de un área (720 nm). C) Las células de microglía de un área (950 nm). D) Adquisición de una placa individualizada del campo de observación.

8.3. Reconstrucción 3D y análisis de las imágenes

Las imágenes adquiridas con el microscopio 2PE se procesaron y analizaron semiautomáticamente con el software de reconstrucción tridimensional Imaris (V.10.0). Para ello, primeramente, se convirtieron las imágenes al formato ims utilizando *Imaris File Converter* (V.10.0.1) y especificando el tamaño de píxel correspondiente a la magnificación empleada.

Un aspecto importante para el análisis de las imágenes fue la identificación de los subtipos microgliales atendiendo a su localización respecto a la placa (figura 26). Tras fusionar las imágenes adquiridas a 950 nm y 720 nm, se estableció la siguiente clasificación:

- Microglía asociada a placa: aquellas células cuyo soma se encontraba a menos de 20 μm de distancia del centro de la placa en X, Y, Z.
- Microglía no asociada a placa: aquellas células cuyo soma se localizaba a más de 20 μm de distancia respecto al centro de la placa en X, Y, Z.

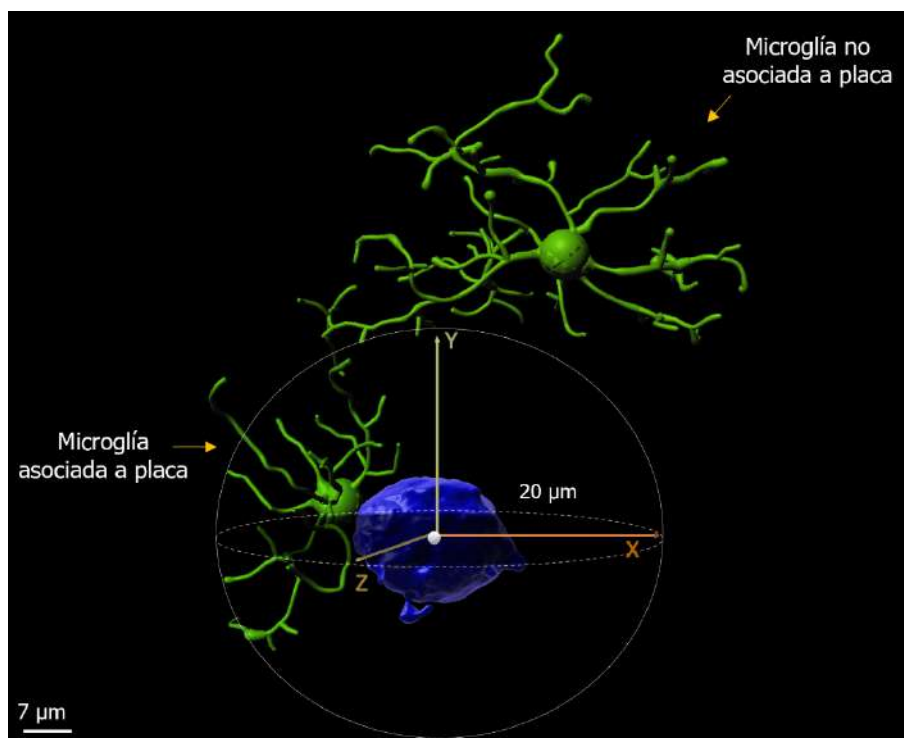


Figura 26: Clasificación de los subtipos microgliales en función de su cercanía a la placa amiloide.

Las imágenes de las células de microglía (verde) y las placas amiloides (azul), obtenidas en el estudio *in vivo* por microscopía 2PE, se reconstruyeron tridimensionalmente con el módulo *Surface* de Imaris. El soma microglial ubicado a menos de 20 μm (X, Y, Z) del centro de la placa neurítica se clasificó como microglía asociada a placa, mientras que aquel situado a más de 20 μm (X, Y, Z) se consideró microglía no asociada a placa.

Con el fin de mejorar la calidad de las imágenes, se empleó la herramienta *Attenuation Correction*, que permitió igualar la intensidad de la señal en todo el stack. Tanto el soma de la microglía como las placas amiloides se reconstruyeron con el módulo *Surface* (figura 27B y D; anexo II). Esta herramienta también sirvió para calcular el número de células MeO-X04 positivas (figura 27C), que se expresaron como porcentaje respecto al número total de células de microglía en cada área. Además, el módulo *Filament tracer* permitió la caracterización de los procesos de este tipo celular (figura 27A; anexo II).

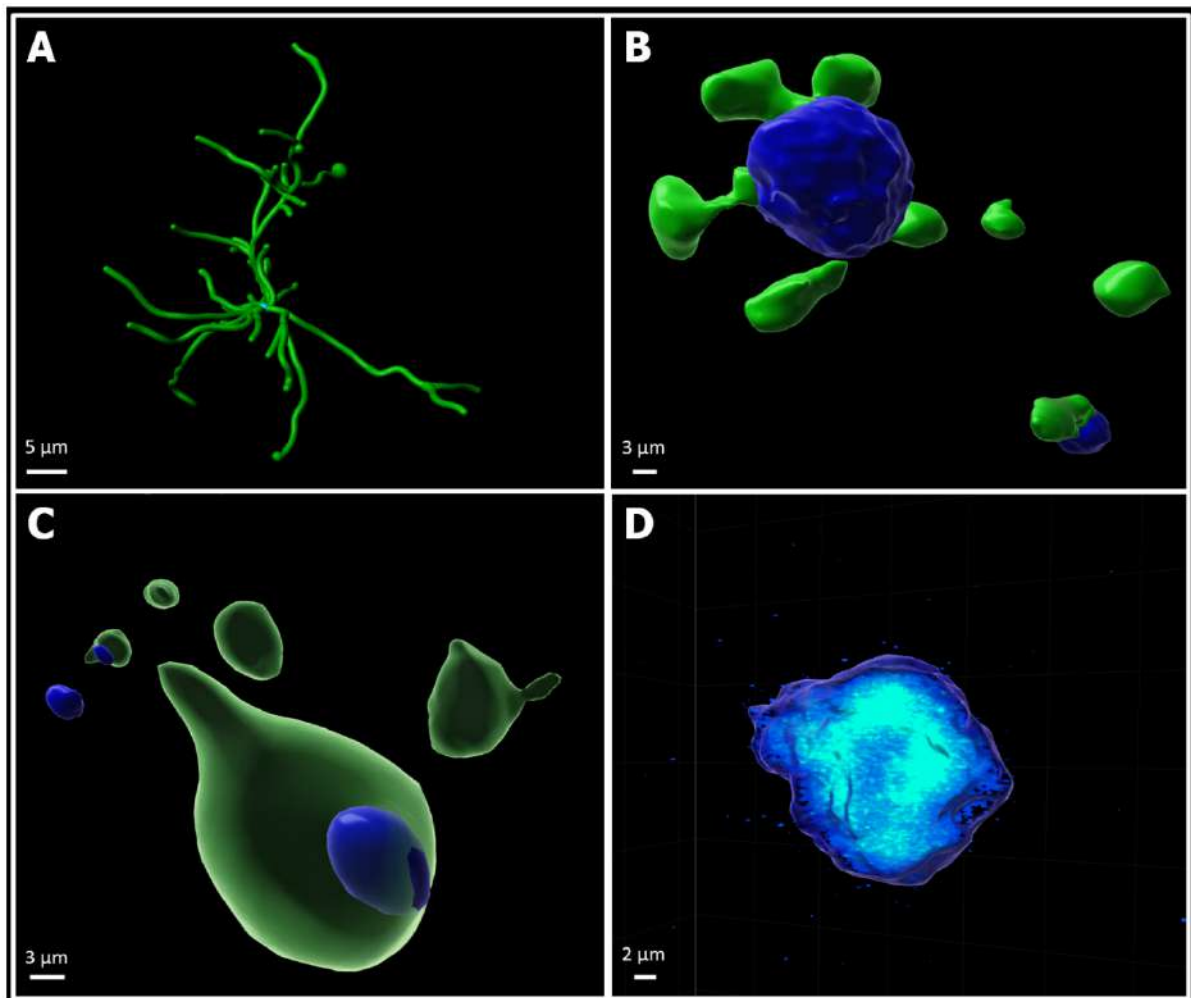


Figura 27: Esquema representativo de los análisis de reconstrucción 3D realizados con Imaris. A) Renderizado de las proyecciones de una célula microglial utilizando el módulo *Filament tracer*. B) Reconstrucción del soma microglial (verde) y de las placas amiloides (azul) utilizando el módulo *Surface*. C) Imagen representativa de la identificación de las células de microglía (verde) MeO-X04 positivas (azul) con el módulo *Surface*. D) Caracterización 3D de una placa amiloide utilizando el módulo *Surface*.

El análisis de la morfología microglial comprendió la caracterización del soma y de las proyecciones celulares. Se excluyeron del análisis aquellas células localizadas a menos de 10 μm de los bordes de la imagen para garantizar la reconstrucción 3D de la estructura completa.

Respecto al **soma**, se cuantificó automáticamente:

- Esfericidad (ψ): es una medida de cuán esférico es un objeto. En 1932, Wadell definió este concepto como la relación entre el área superficial de una esfera (con el mismo volumen que la partícula dada) y el área de la superficie de la partícula.
- Volumen: es el espacio que ocupa la superficie de un objeto.

En cuanto a las **proyecciones** de la microglía, se cuantificó su esfericidad y volumen, además de:

- Longitud total: es la suma total de las distancias entre los vértices de la estructura renderizada.
- Índice de ramificación: es el valor de máxima ramificación de la reconstrucción. Se trata de una estructura numérica que empieza con el punto de origen del filamento y se extiende hacia los puntos terminales de la reconstrucción, asignando un nivel adicional a cada punto de ramificación (figura 28).

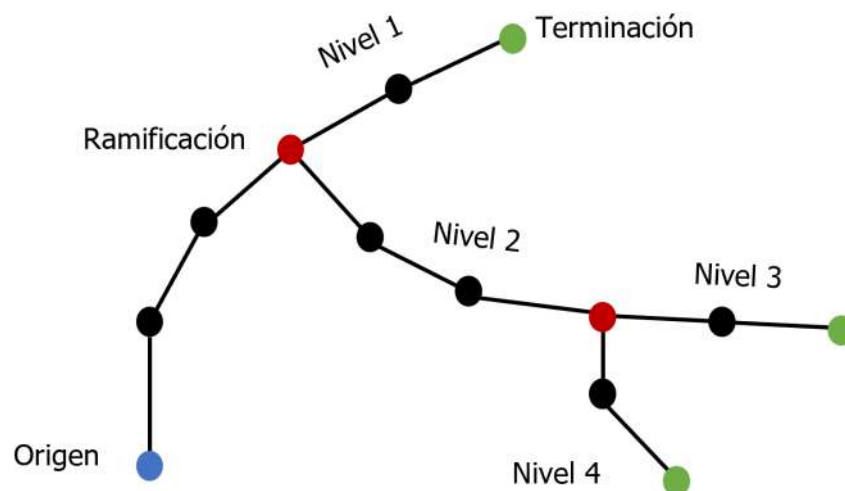


Figura 28: Esquema representativo de la determinación del índice de ramificación de una reconstrucción 3D realizado automáticamente por Imaris. El círculo azul representa el origen de la reconstrucción, el círculo rojo es el punto de ramificación y el círculo verde es el punto terminal de la estructura.

- Análisis Sholl: se basa en crear una serie de círculos concéntricos en torno al centro del filamento reconstruido. El número de intersecciones sholl se define como el número de intersecciones de cada proyección con una esfera concéntrica. De este modo, se puede estudiar la complejidad celular y cuanto de lejanas se encuentran las ramificaciones respecto al soma (figura 29).

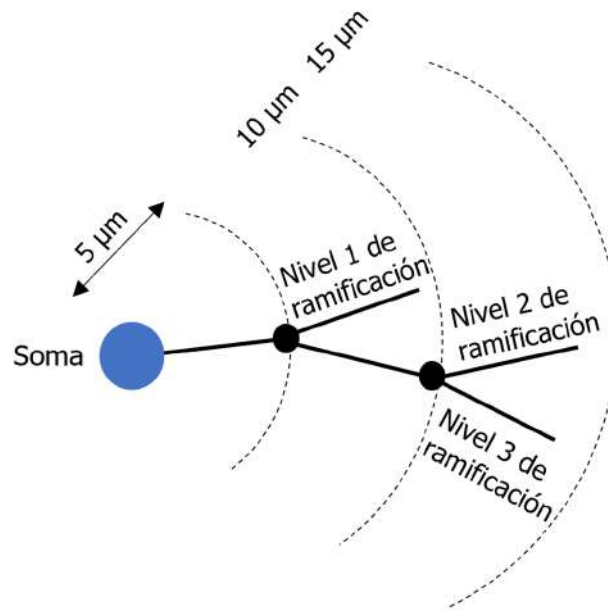


Figura 29: Esquema representativo del análisis Sholl calculado automáticamente por Imaris. El círculo azul representa el soma celular, los círculos negros son los puntos de ramificación y las líneas curvas con trazado discontinuo representan las circunferencias concéntricas a una distancia de 5 µm de distancia entre sí.

- Porcentaje de la microglía MeO-X04⁺: se calculó mediante el conteo de las células microgliales con señal MeO-X04⁺ en su interior. El valor resultante se expresó en porcentaje respecto al número total de células presentes en cada área de observación.

Con relación al análisis de las **placas** amiloides, se excluyeron aquellas con un volumen inferior a 58 µm³ y se cuantificó su volumen y esfericidad, además de:

- Densidad de proteína: se calcula dividiendo la intensidad total del fluoróforo entre el volumen de la placa. A mayor densidad, mayor concentración de proteína en la placa amiloide.
- Coefficiente de variación de la intensidad: es el resultado de la desviación estándar entre la intensidad media. Cuanto mayor sea este valor, más heterogénea será la placa.

9. Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el Software GraphPad Prism versión 10.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.). Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar (SEM, del inglés, standard error of the mean). La distribución de los datos se evaluó mediante los tests de D'Agostino-Pearson o de Shapiro-Wilk. Para aquellos que seguían una distribución normal, se utilizó la prueba t de Student, la ANOVA de una vía, seguida de un análisis post-hoc de Tukey, o una ANOVA de dos vías, seguida de esa misma prueba o la de Sidak. Los datos que no seguían una distribución normal se analizaron mediante el test de Mann-Whitney o el de Kruskal-Wallis, seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas al alcanzar un valor de $p < 0,05$. El número de animales empleados en estos estudios fue de mínimo 8 ratones para las pruebas comportamentales, 8 ratones para los estudios de biología molecular, y de 8-11 ratones para los estudios de imagen mediante microscopía multifotón. El análisis *in vivo* de las placas de A β se realizó sobre una muestra de 6-10 placas por animal.

RESULTADOS

1. Evaluación del potencial efecto antiinflamatorio y neuroprotector del CBD, THC y una combinación de ambos sobre la patología amiloide

En el diseño experimental I se evaluaron los efectos de la modulación del sistema endocannabinoide sobre la patología amiloide, concretamente, a través del tratamiento crónico del modelo murino 5xFAD con dosis bajas de cannabinoides (CBD, THC y CBD:THC).

Para ello, se realizó una batería de pruebas comportamentales para caracterizar el impacto de cada tratamiento sobre la memoria espacial, el estado ansioso y depresivo, la coordinación motora y la locomoción de los animales. Además, se llevaron a cabo estudios moleculares para determinar los efectos de la administración de cannabinoides con respecto a la inflamación, la gliosis, el daño neuronal y la concentración del péptido $A\beta_{1-42}$, tanto en su isoforma soluble como insoluble, en el parénquima cerebral de cada grupo experimental.

1.1. Datos comportamentales

1.1.1. Memoria espacial

Los resultados obtenidos en la prueba BM muestran 1) la latencia al escondite de la fase de aprendizaje (día 1-4), expresada en porcentaje respecto al día 1, 2) el área bajo la curva de la fase de aprendizaje y 3) la latencia de la evaluación de la memoria a corto plazo (día 5), expresada en segundos. La latencia al escondite se empleó como indicador del deterioro de la memoria espacial y, en este contexto, hace referencia al tiempo transcurrido hasta que el animal encontró el escondite de la plataforma; valores elevados de latencia se asociaron con un deterioro de la memoria espacial mayor.

Los ratones 5xFAD mostraron mayor latencia en los días 3 y 4 (figura 30A), mayor área bajo la curva (AUC, del inglés, Area Under the Curve) durante la fase de aprendizaje y mayor latencia a día 5 (figura 30B) en comparación con los controles. En línea con estudios previos, estos resultados confirmaron el deterioro de la memoria espacial descrito en la patología amiloide.

La exposición de ratones 5xFAD a dosis bajas de cannabinoides no produjo cambios en la latencia al escondite durante la fase de aprendizaje (figura 30C). El área bajo la curva reveló diferencias significativas por el tratamiento con dosis independientes de CBD o THC en comparación con el VEH (figura 30D). Sin embargo, la coadministración de CBD y THC sugirió un potencial beneficio en la memoria espacial a corto plazo de los animales tratados,

evidenciado por una reducción significativa de la latencia al escondite en comparación con el VEH (figura 30D). Estos datos revelaron un posible mecanismo sinérgico entre el CBD y el THC en el contexto de la patología amiloide, respaldando los hallazgos previos descritos en la literatura.

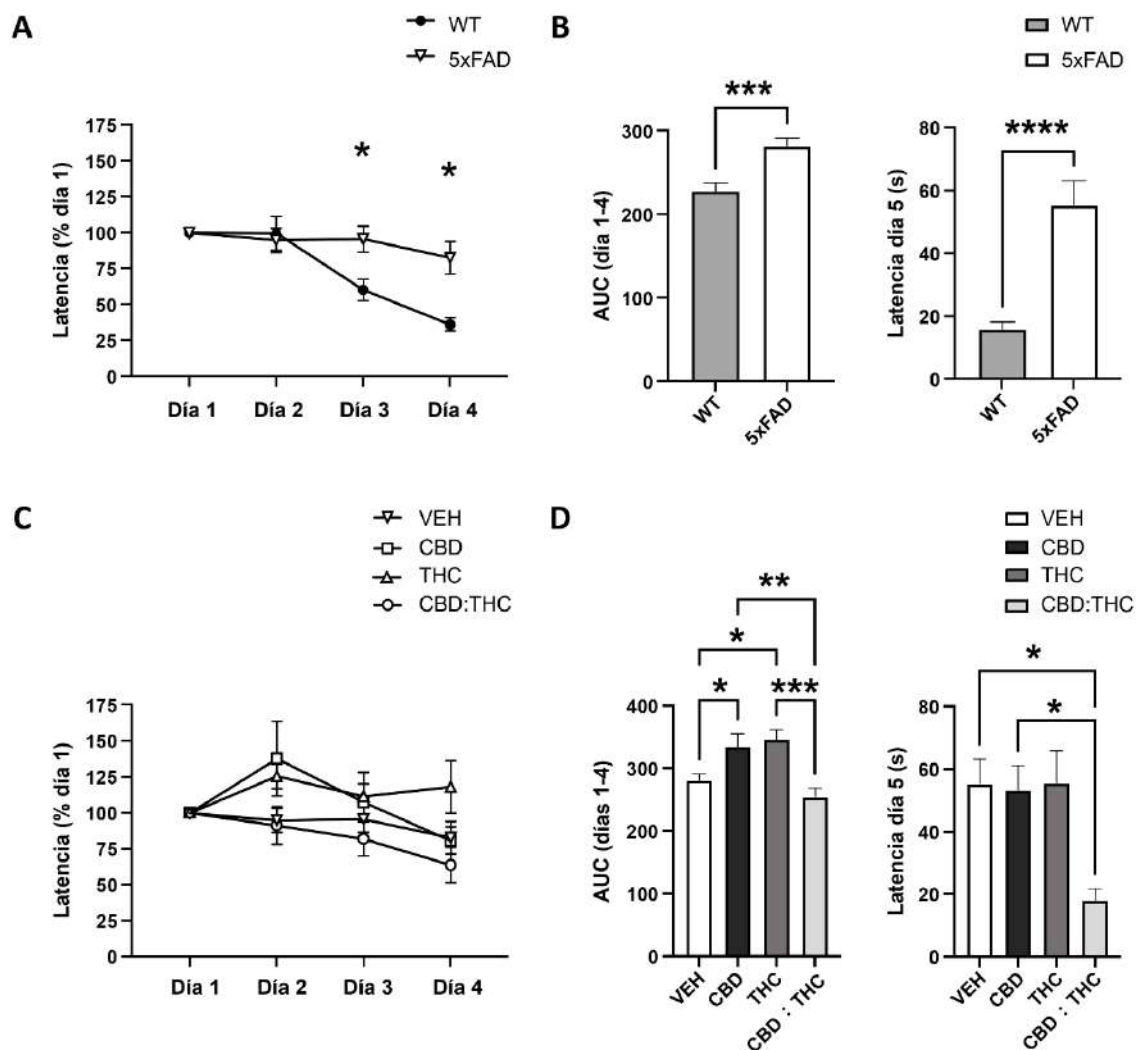


Figura 30: Efectos de la patología amiloide y de la exposición crónica a CBD, THC o CBD:THC sobre la memoria espacial de los ratones 5xFAD. A) Latencia durante la fase de aprendizaje (día 1-4) de ratones WT y 5xFAD, expresada en porcentaje respecto al día 1. Los análisis estadísticos consistieron en un ANOVA de dos vías seguido de un test post-hoc de Sidak. B) Análisis del área bajo la curva de la fase de aprendizaje (día 1-4) (t de student) y la latencia al escondite (segundos) en el 5º día de la prueba BM para evaluar los efectos de la patología amiloide sobre la memoria (test de Mann-Whitney). C) Latencia durante la fase de aprendizaje (día 1-4), expresada en porcentaje respecto al día 1, para analizar los efectos del tratamiento con CBD, THC y CBD:THC sobre la función cognitiva de los animales. D) Análisis del área bajo la curva de la fase de aprendizaje (día 1-4) (ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey) y la latencia al escondite (segundos) en el 5º día de la prueba BM (Kruskal-Wallis test seguido de un test post-hoc de Dunn) para evaluar la memoria de los ratones tras el tratamiento con CBD, THC o CBD:THC. N=43 (WT) y N=16-24 (5xFAD). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media ± SEM.

1.1.2. Ansiedad

En la prueba EPM se evaluó la ansiedad de los ratones a través de la cuantificación del tiempo de exploración en el brazo abierto del aparato. Este parámetro se expresó en porcentaje con respecto a la duración total de la prueba y sirvió como marcador de la ansiedad de los ratones por las superficies abiertas y elevadas. El tiempo en el brazo abierto se correlacionó de forma inversamente proporcional al nivel de ansiedad del animal. Por tanto, valores más altos del porcentaje de tiempo en el brazo abierto del EPM reflejaron niveles más bajos de ansiedad.

Por un lado, el modelo 5xFAD permaneció más tiempo en el brazo abierto del EPM que el WT, lo que indicó un perfil de ansiedad reducido como consecuencia de la patología amiloide (figura 31A).

Por otro lado, el tratamiento de este modelo de amiloidosis con dosis bajas de cannabinoides no reveló alteraciones de la ansiedad inducidas por CBD o CBD:THC en comparación con el VEH (figura 31B). Sin embargo, la exposición de ratones 5xFAD a THC desencadenó un perfil de mayor ansiedad que el VEH, evidenciado por el menor tiempo de exploración de este grupo experimental en los brazos abiertos del EPM (figura 31B).

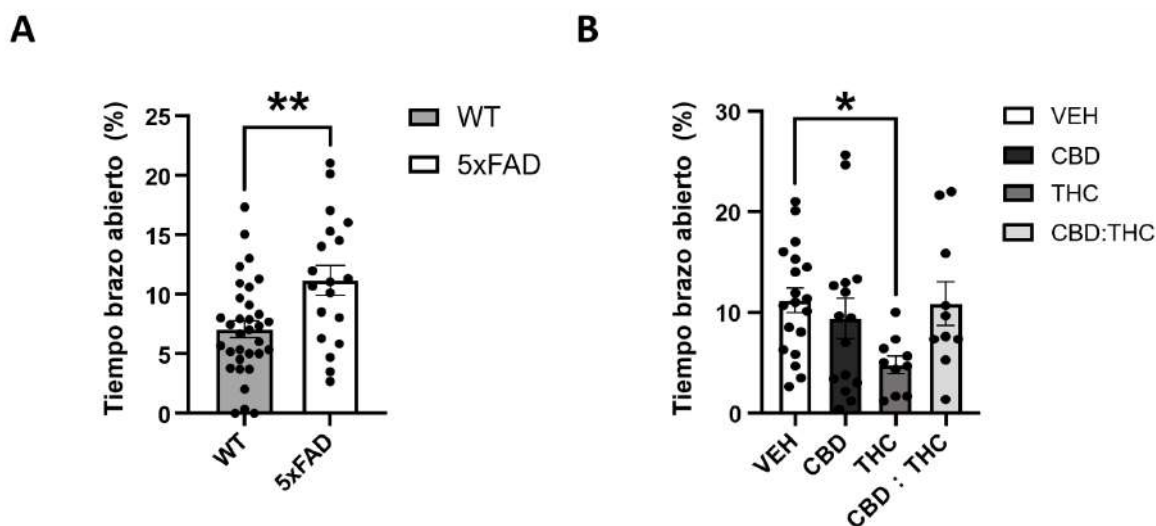


Figura 31: Prueba EPM para el estudio del estado ansioso de los animales. A) Efectos por la patología amiloide (test Mann-Whitney). B) Efectos asociados al tratamiento del modelo 5xFAD con cannabinoides (ANOVA de una vía seguido del test post-hoc Tukey). Se graficó el tiempo que permaneció cada animal en el brazo abierto, expresado como porcentaje del tiempo total de la prueba. N=43 (WT) y N=16-24 (5xFAD). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Los datos representan la media \pm SEM.

1.1.3. Depresión

El TST se empleó como técnica para evaluar la tendencia depresiva de los ratones en respuesta a una situación de estrés moderado, concretamente, inducido por la suspensión en el aire de los animales. Los resultados de esta prueba muestran el tiempo que los ratones permanecieron inmóviles en el aparato. Se consideró inmovilidad a la ausencia de comportamiento de tipo escapatorio, de tal forma que, a mayor inmovilidad, mayor será el perfil depresivo del animal.

El modelo 5xFAD no presentó cambios significativos en cuanto al tiempo de inmovilidad en comparación con el WT, lo que sugirió una ausencia de alteraciones del perfil depresivo de los ratones desencadenadas por la patología amiloide (figura 32A).

La administración crónica de dosis bajas de THC en ratones 5xFAD exacerbó su comportamiento depresivo, evidenciado por un aumento en el tiempo de inmovilidad en comparación con el grupo VEH (figura 32B). Sin embargo, la exposición de ratones 5xFAD a CBD o CBD:THC no reportó cambios estadísticamente significativos en el TST.

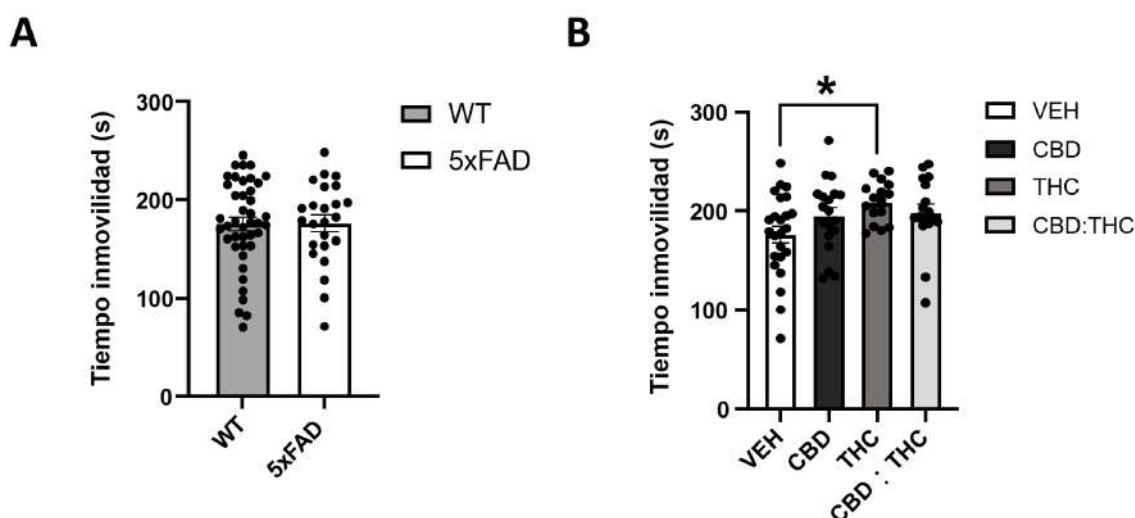


Figura 32: Prueba TST para el estudio del comportamiento depresivo de ratones 5xFAD. A) Impacto de la patología amiloide. B) Efectos del tratamiento con CBD, THC y CBD:THC (ANOVA de una vía seguido del test post-hoc Tukey). Se cuantificó el tiempo que cada ratón permaneció inmóvil en el aparato del TST, expresado en segundos. N=43 (WT) y N=16-24 (5xFAD). * $p < 0,05$. Los datos representan la media \pm SEM.

1.1.4. Coordinación motora

La prueba RR permitió estudiar los efectos de la patología amiloide y del tratamiento con cannabinoides sobre la coordinación motora de los ratones. Concretamente, se midió el tiempo total que los animales permanecieron en el aparato antes de caerse. Para la interpretación de los resultados, se asumió una relación directa entre el tiempo de realización de la prueba y el nivel de coordinación motora, es decir, a mayor tiempo de permanencia en el aparato, mejor coordinación motora.

Por un lado, los ratones 5xFAD permanecieron más tiempo en el aparato sin caerse, lo que indicó una mejoría en su coordinación motora con respecto a los WT (figura 33A). Por otro lado, el tratamiento con diferentes cannabinoides no reflejó cambios significativos en la prueba RR en comparación con el grupo VEH en el contexto de la patología amiloide (figura 33B).

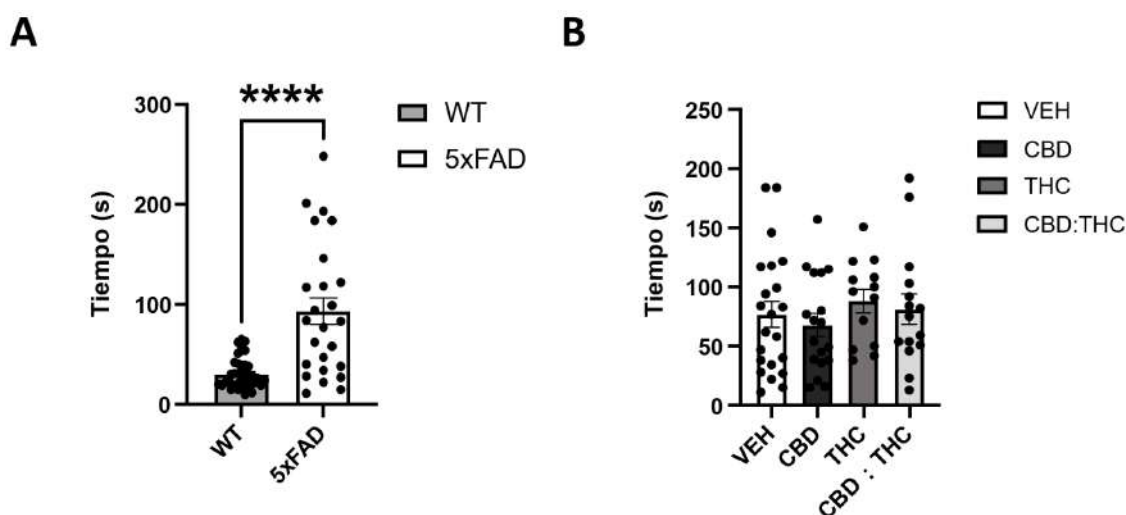


Figura 33: Prueba RR para evaluar la coordinación motora de los animales. A) Impacto de la patología amiloide (t de student). B) Efectos del tratamiento con CBD, THC o CBD:THC en los ratones 5xFAD. Se analizó el tiempo (segundos) que cada ratón permaneció en el aparato sin caerse. N=43 (WT) y N=16-24 (5xFAD).

**** $p < 0,0001$. Los datos representan la media \pm SEM.

1.1.5. Actividad locomotora

Para el análisis de la prueba OF se cuantificó la distancia recorrida en la zona central y periférica del aparato, como medida directa de la actividad locomotora de los ratones. A mayor distancia recorrida, mayor será el nivel de actividad locomotora. Adicionalmente, se analizó el tiempo de permanencia en cada zona del aparato para corroborar que las diferencias

observadas no se debían a la inactividad de los animales, sino a cambios específicos asociados al modelo animal o a los tratamientos empleados.

El modelo 5xFAD presentó un deterioro de la actividad locomotora, evidenciado por la menor distancia recorrida tanto en el centro como en la periferia del aparato en comparación con los ratones WT (figura 34A y 34B). La exposición de ratones 5xFAD a diferentes cannabinoides no alteró la distancia recorrida en el aparato en comparación con el grupo VEH (figura 34A y 34B). Además, no se observaron diferencias en cuanto al tiempo de permanencia en el centro y la periferia del aparato ni por la patología amiloide ni por el tratamiento con dosis bajas de cannabinoides (figura 34C y 34D). Estos resultados indicaron que la reducción de la actividad locomotora en el modelo 5xFAD estaba asociada específicamente a la patología amiloide y no a la inactividad de los animales en comparación con los WT.

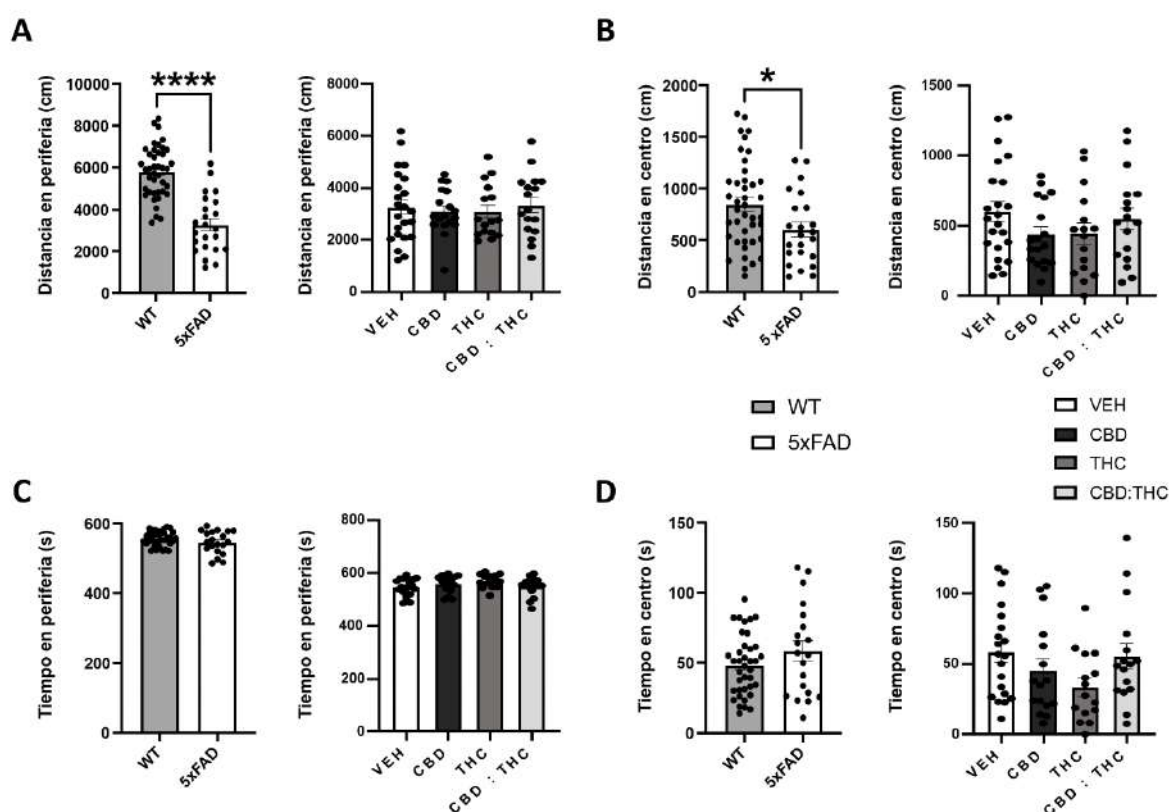


Figura 34: Evaluación de la actividad locomotora asociada a la patología amiloide y al tratamiento con CBD, THC o CBD:THC en los ratones 5xFAD. A) Distancia recorrida (centímetros) en la zona periférica (t de student). B) Distancia recorrida (centímetros) en el centro del OF (t de student). C) Tiempo (segundos) que estuvieron los animales en la periferia del aparato OF. D) Tiempo (segundos) que permaneció cada grupo experimental en el centro del aparato. N=43 (WT) y N=16-24 (5xFAD). *p<0,05 y ****p<0,0001. Los datos representan la media ± SEM.

1.2. Caracterización molecular

1.2.1. Expresión de receptores cannabinoides y marcadores inflamatorios

Para evaluar el impacto de la patología amiloide y del tratamiento crónico con cannabinoides a nivel molecular, se cuantificó por RT-qPCR la expresión del ARNm de los receptores cannabinoides CB₁R y CB₂R, y los marcadores inflamatorios TNF α , IL1 β e IL6 en el hipocampo (figura 35) y la corteza (figura 36) de ratones 5xFAD. Los datos de expresión génica se normalizaron con el gen de referencia 18S.

La patología amiloide no alteró los niveles de expresión de CB₁R ni en el hipocampo (figura 35A) ni en la corteza (figura 36A) de ratones 5xFAD en comparación con los controles. Sin embargo, se observó una sobreexpresión de CB₂R, TNF α , IL1 β e IL6 en el modelo 5xFAD con respecto al WT, tanto en el hipocampo (figura 35B-E) como la corteza cerebral (figura 36B-E).

En el contexto patológico, la exposición a CBD, THC o CBD:THC no indujo alteraciones de la expresión de CB₁R, TNF α , IL1 β e IL6 ni en el hipocampo (figura 35A, 35C-E) ni en la corteza cerebral (figura 36A, 36C-E) de los diferentes grupos experimentales. Los niveles de CB₂R tampoco se vieron alterados en ambas regiones cerebrales (figura 35B y 36B) por el tratamiento con cannabinoides en comparación con el grupo VEH. Sin embargo, se apreciaron diferencias en la expresión hipocampal de CB₂R en algunos grupos experimentales. Concretamente, la exposición del modelo 5xFAD a CBD desencadenó niveles más altos de CB₂R en comparación con los tratamientos con THC o la combinación CBD:THC en el contexto patológico (figura 35B).

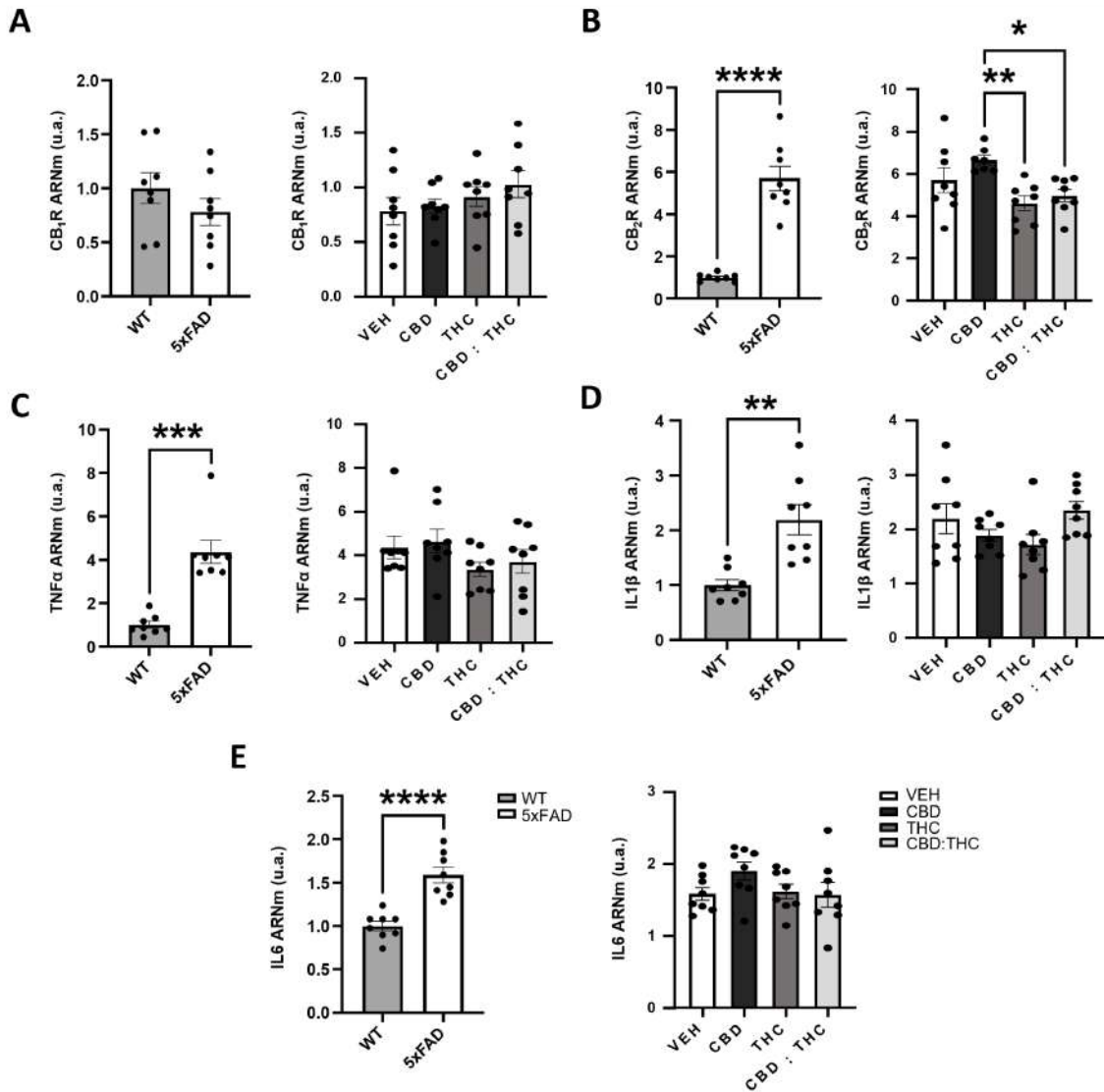


Figura 35: Análisis del ARNm hipocampal de los receptores cannabinoides y marcadores inflamatorios por RT-qPCR tras el tratamiento de ratones 5xFAD con CBD, THC o CBD:THC. A)

Cuantificación de la expresión de CB₁R. B) Cuantificación de la expresión de CB₂R. C) Cuantificación de la expresión de TNFα. D) Cuantificación de la expresión de IL1β. E) Cuantificación de la expresión de IL6. El análisis estadístico consistió en t de student. N=8 por grupo experimental. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media, expresada en unidades arbitrarias (u.a.), ± SEM.

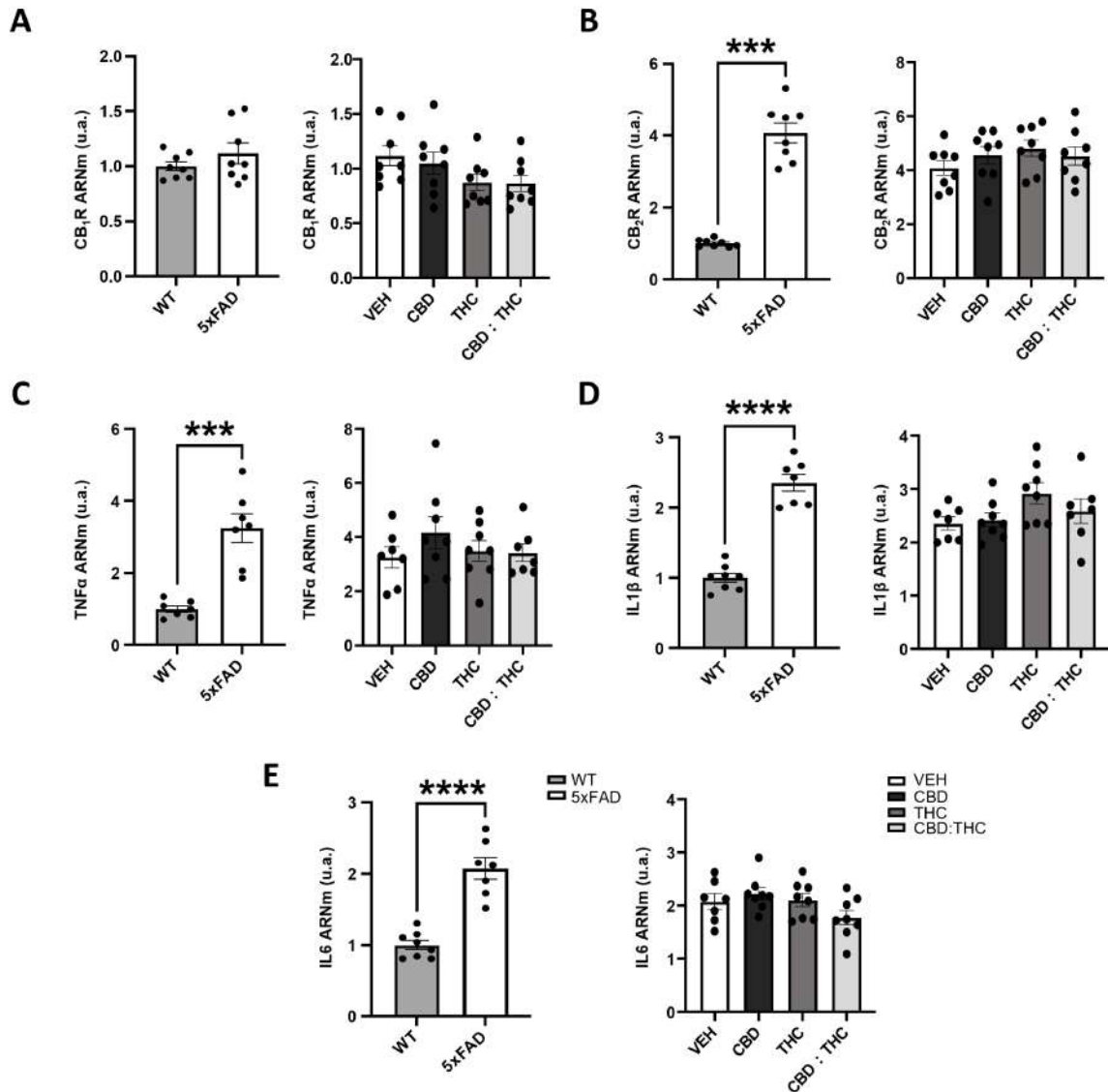


Figura 36: Análisis del ARNm cortical de los receptores cannabinoides y marcadores inflamatorios por RT-qPCR tras el tratamiento de ratones 5xFAD con CBD, THC o CBD:THC. A) CB₁R. B) CB₂R. C) TNF α . D) IL1 β . E) IL6. El análisis estadístico consistió en t de student. N=8 por grupo experimental. ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) \pm SEM.

1.2.2. Activación glial y daño neuronal

Otro estudio molecular consistió en la cuantificación de proteínas relacionadas con procesos característicos de la patología amiloide por WB, como la gliosis (IBA1 y GFAP) y la neurodegeneración (sinaptofisina y PSD95). Estos marcadores se analizaron en el hipocampo (figura 37) y la corteza (figura 38) de ratones 5xFAD para evaluar el impacto del tratamiento con cannabinoides sobre la progresión de la patología. Los datos obtenidos se normalizaron con la proteína de referencia GAPDH.

La patología amiloide indujo niveles proteicos más elevados de GFAP e IBA1 en la región hipocampal y cortical (figura 37A-B y 38A-B) del modelo 5xFAD en comparación con el WT, confirmando la exacerbación de la astrogliosis y la microgliosis en este modelo animal de amiloidosis cerebral descrita en la literatura. Además, se detectaron niveles más bajos de sinaptofisina en la corteza de ratones 5xFAD en comparación con los controles (figura 38C).

Los resultados no mostraron alteraciones de los niveles de expresión de los parámetros analizados en el hipocampo (figura 37) y la corteza (figura 38) del modelo 5xFAD por el tratamiento con CBD, THC o CBD:THC, sugiriendo, en este contexto, la ausencia de efectos sobre la gliosis y la integridad sináptica tras la exposición a cannabinoides.

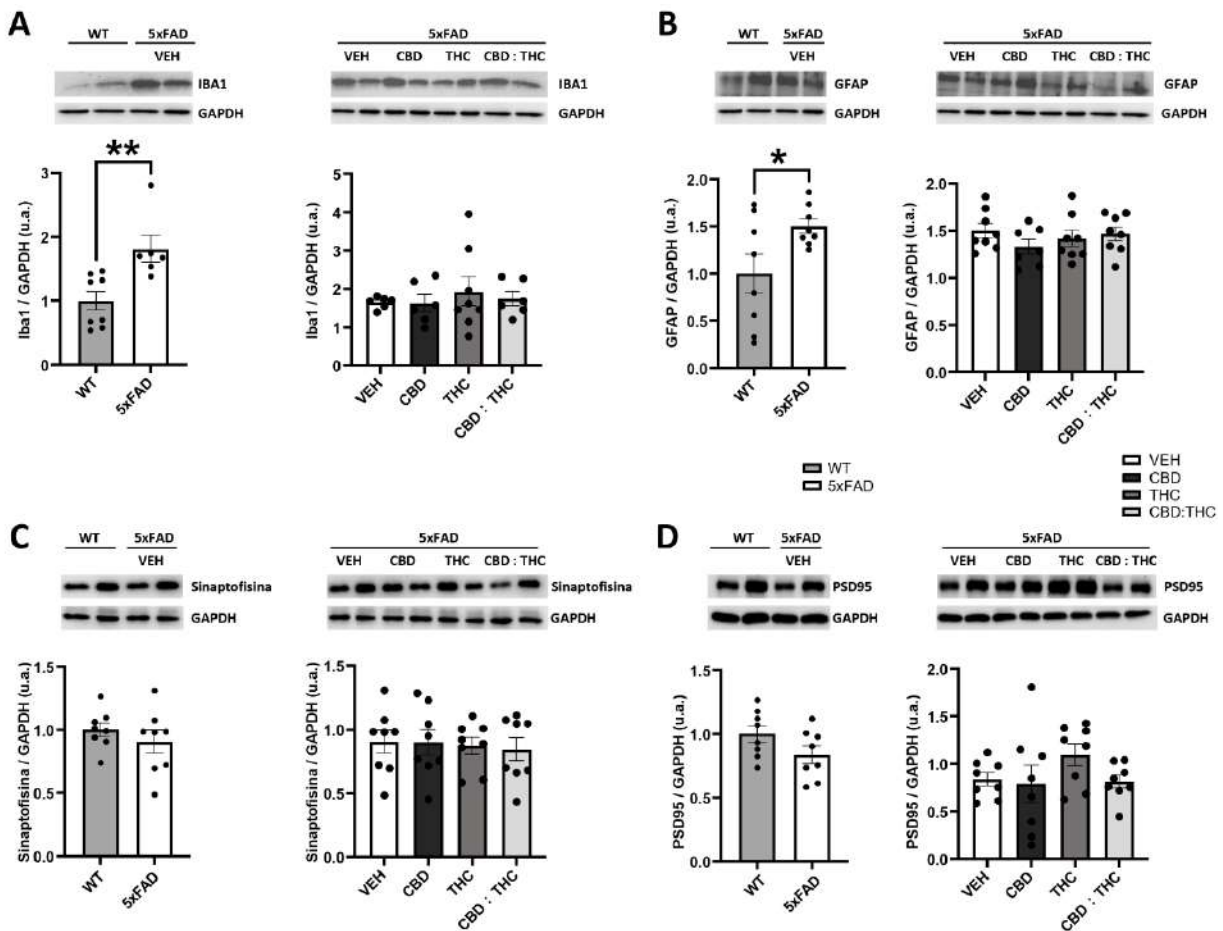


Figura 37: Cuantificación de proteínas hipocampales relacionadas con la gliosis y la integridad neuronal por WB tras el tratamiento con CBD, THC o CBD:THC en el contexto de la patología amiloide. A) IBA1. B) GFAP. C) Sinaptofisina. D) PSD95. El análisis estadístico consistió en t de student. N=8 por grupo experimental. *p<0,05 y **p<0,01. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

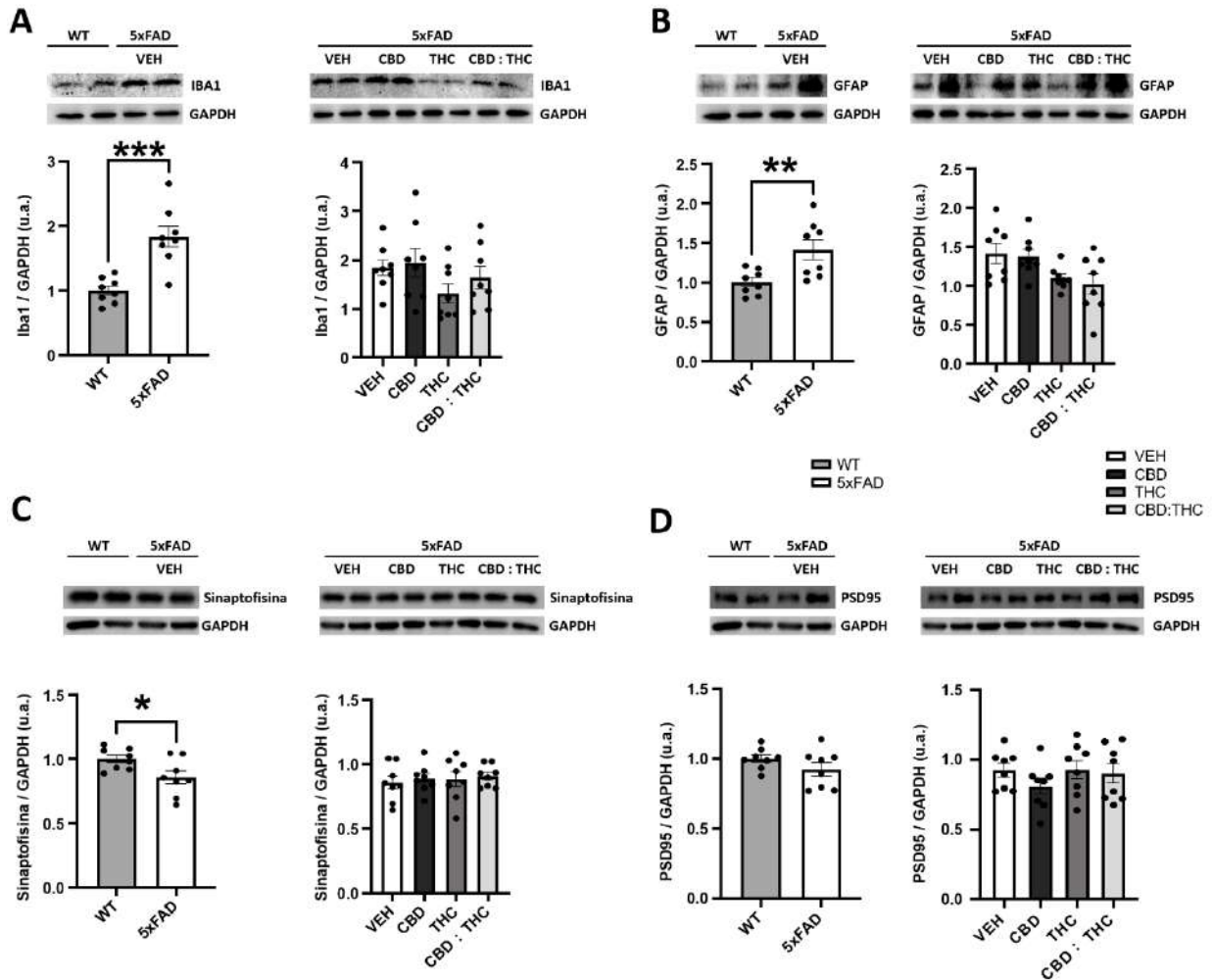


Figura 38: Cuantificación de proteínas corticales relacionadas con la gliosis y la integridad neuronal por WB tras el tratamiento con CBD, THC o CBD:THC en el contexto de la patología amiloide. A) IBA1. B) GFAP. C) Sinaptofisina. D) PSD95. El análisis estadístico consistió en t de student. N=8 por grupo experimental. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Los datos representan la media (u.a.) \pm SEM.

1.2.3. Niveles de $A\beta_{1-42}$

Se cuantificaron los niveles de $A\beta_{1-42}$, tanto en su conformación soluble como insoluble, mediante ELISA para evaluar los efectos del tratamiento con cannabinoides sobre la amiloidosis de la región hipocampal de ratones 5xFAD.

Por un lado, la fracción soluble del péptido $A\beta_{1-42}$ en el modelo 5xFAD no mostró alteraciones tras el tratamiento con cannabinoides (figura 39A).

Por otro lado, la conformación insoluble del $A\beta_{1-42}$ presentó un incremento creciente de su concentración tras la administración de CBD, THC o CBD:THC, respectivamente, en el modelo

5xFAD en comparación con el grupo VEH (figura 39B). Concretamente, la coadministración de CBD y THC produjo la concentración más elevada de $A\beta_{1-42}$ insoluble con respecto al vehículo en el contexto patológico.

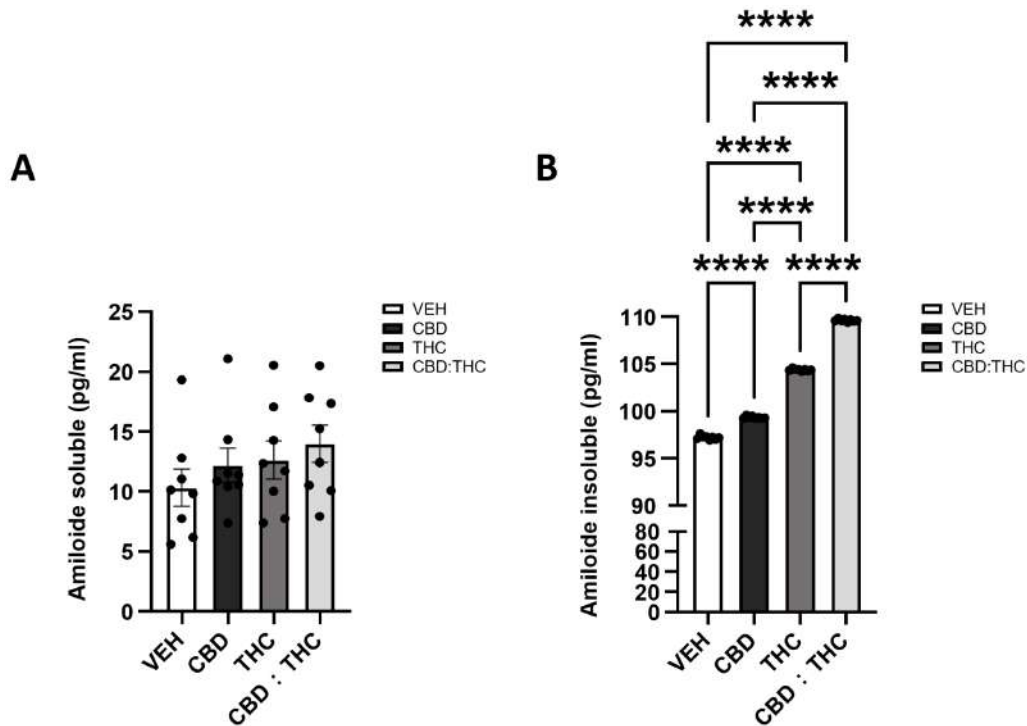


Figura 39: Cuantificación del $A\beta_{1-42}$ hipocámpal en el modelo 5xFAD tratado con CBD, THC o CBD:THC. A) Fracción soluble. B) Fracción insoluble. El análisis estadístico consistió en ANOVA de una vía seguido del test post-hoc Tukey. N=8 por grupo experimental. ****p<0,0001. Los datos representan la media (pg/ml) \pm SEM.

2. Estudio del impacto de la inactivación genética de la enzima FAAH en el contexto de la EA

En el diseño experimental II se abordó la inactivación genética de FAAH como nueva estrategia para estudiar el impacto de la modulación del sistema endocannabinoide sobre la patología amiloide. Para ello, se empleó el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}, caracterizado por la elevación del tono endocannabinoide y la exacerbación de la respuesta inflamatoria, paradójicamente asociada a efectos neuroprotectores.

Con el fin de esclarecer los efectos descritos en este modelo animal, se realizó la prueba BM para evaluar los efectos de la inactivación genética de la enzima FAAH sobre la memoria espacial de los ratones en condiciones patológicas. También, se llevaron a cabo análisis de

transcriptómica y otros estudios moleculares para profundizar en el impacto de la inactivación genética de FAAH sobre el proceso neuroinflamatorio característico de la patología amiloide. Adicionalmente, se determinó el grado de contribución de las células microgliales con respecto a los cambios moleculares observados mediante la ablación de la microglía durante 28 días con el compuesto PLX5622, que se formuló en la dieta de los animales. Por último, se realizaron sesiones de imagen *in vivo* 2PE en el contexto de ausencia de la actividad de FAAH y de ablación microglial utilizando PLX5622, con posterior repoblación de este tipo celular, en condiciones patológicas.

2.1. Datos comportamentales

2.1.1. Memoria espacial

Para profundizar en la caracterización del modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}, se analizó el aprendizaje espacial de los animales realizando la prueba comportamental Barnes Maze. Se empleó el tiempo de latencia al escondite como indicador del deterioro cognitivo, es decir, a mayor tiempo de latencia, mayor será la disfunción cognitiva en los animales.

Los modelos 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} presentaron un deterioro del aprendizaje espacial por la patología amiloide en el cuarto día de la prueba BM, evidenciado por el mayor tiempo de latencia al escondite en comparación con el grupo WT ($p < 0,0001$) y FAAH^{-/-} ($p = 0,0325$), respectivamente (figura 40).

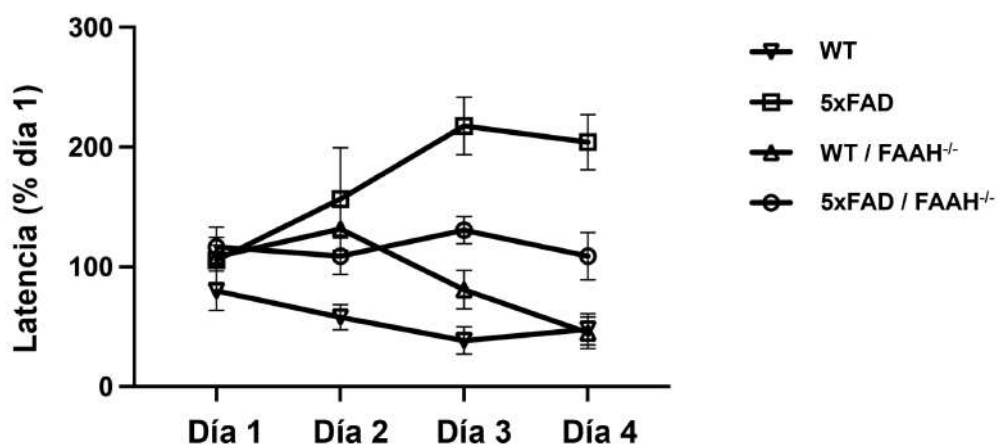


Figura 40: Análisis del aprendizaje espacial del modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} utilizando la prueba BM. Se muestra la latencia al escondite durante la fase de aprendizaje (día 1-4) expresada en porcentaje respecto al día 1. Los análisis estadísticos consistieron en un ANOVA de dos vías seguido de un test post-hoc de Sidak. N=8-16 ratones. Los datos representan la media \pm SEM.

La inactivación genética de FAAH no alteró el aprendizaje espacial de los animales en el contexto fisiológico. Sin embargo, el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} presentó un tiempo de latencia al escondite menor con respecto al grupo 5xFAD (figura 40; p=0,0124). Esto sugirió efectos neuroprotectores ligados a la inactivación genética de la enzima FAAH en el contexto de la patología amiloide.

2.2. Perfil transcriptómico

Tras confirmar la idoneidad de la calidad de las muestras por PCA (anexo III), se llevó a cabo el análisis de RNA-seq para investigar las alteraciones transcriptómicas asociadas a la inactivación genética de FAAH en el contexto de la EA.

En primer lugar, se identificaron los genes diferencialmente expresados en condiciones fisiológicas y patológicas. En la comparativa WT/FAAH^{-/-} vs. WT, se observaron 17 genes sobreexpresados y 30 infraexpresados (figura 41A), mientras que en la comparativa 5xFAD/FAAH^{-/-} vs. 5xFAD se detectaron 17 genes sobreexpresados y 16 infraexpresados (figura 41B).

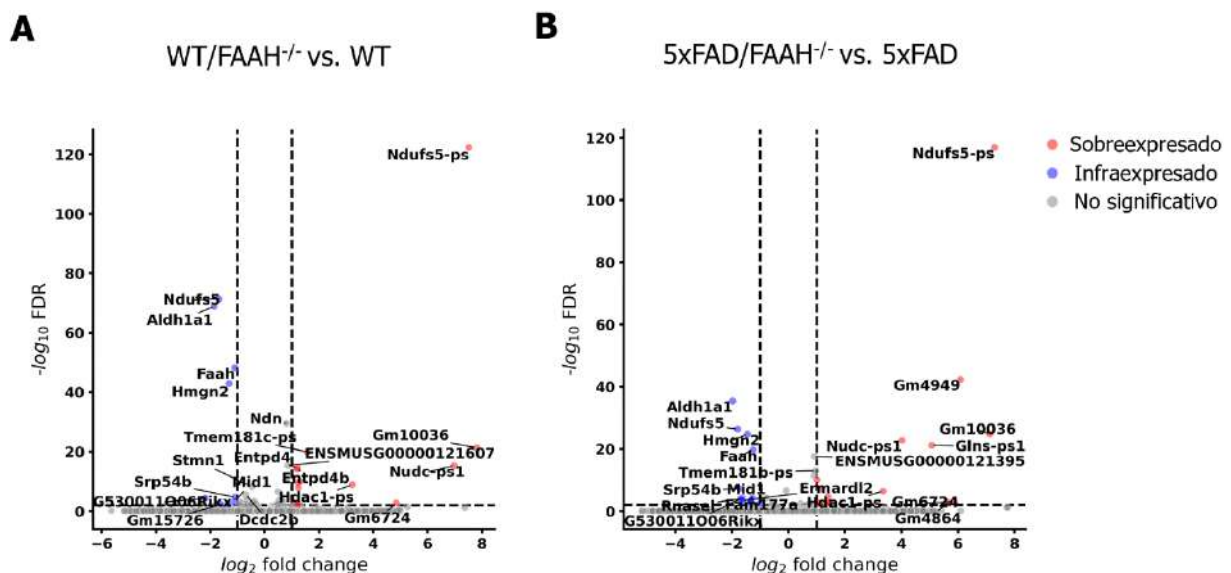


Figura 41: Volcano-plots de genes diferencialmente expresados por la inactivación de FAAH. A) Contexto fisiológico. B) Contexto patológico. Los puntos de color rojo representan genes sobreexpresados, el color azul indica genes infraexpresados y el gris refleja aquellos cambios de expresión que no son estadísticamente significativos. Se consideró significativo aquellos valores de FDR inferiores a 0,05. N= 3 por grupo experimental.

Algunos de los genes diferencialmente expresados guardaron estrecha relación con la respiración celular (*Ndufs5*), la regulación de la transcripción (*Ndn*, *Med8*, *Trnp1* o *Hdac1*), el metabolismo lipídico (*Aldh1a1*), la adhesión celular (*Col16a1* o *Ccn2*), el metabolismo de carbohidratos (*Np*), la regulación de la señalización vía TLR3 y 4 (*Wdfy1*) y el transporte de iones (*Gabra2*), entre otros procesos biológicos.

En segundo lugar, se realizaron GSEAs para identificar procesos biológicos potencialmente alterados por la inactivación de FAAH, tanto en condiciones fisiológicas (figura 42A) como patológicas (figura 42B).

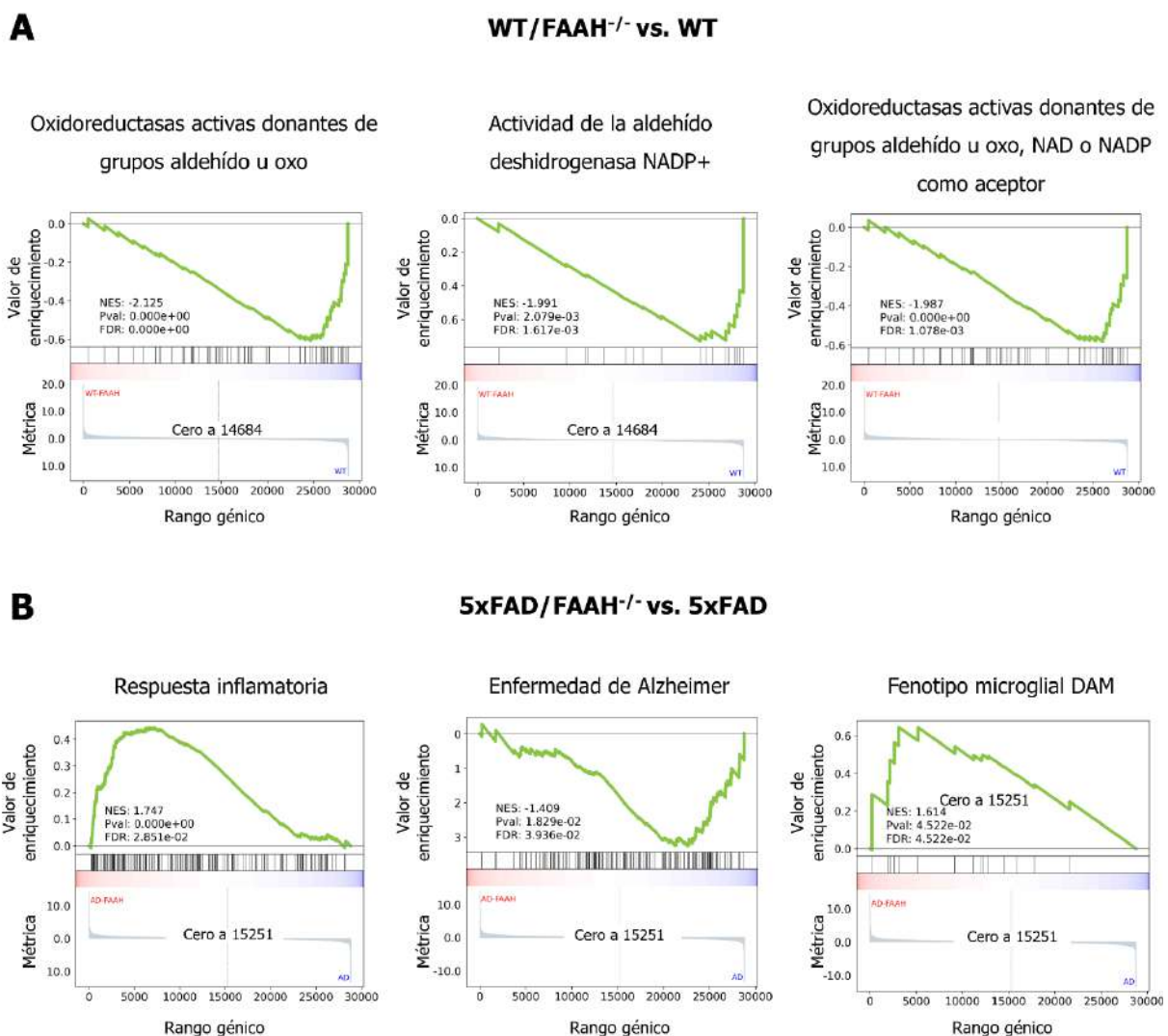


Figura 42: Gráficos GSEAs de las firmas descritas en GO alteradas por la inactivación genética de FAAH. A) Condiciones fisiológicas. B) Condiciones patológicas. El eje de la X representa el rango de genes, el eje de la Y muestra el valor de enriquecimiento y cada línea vertical indica la posición que ocupa cada gen. Los genes que se encuentran en el pico de la gráfica son aquellos que contribuyen a la puntuación de enriquecimiento. Se considera FDR significativo a los valores inferiores a 0,05. N= 3 por grupo experimental.

Al comparar el perfil transcriptómico de ratones WT/FAAH^{-/-} y WT, se observó un enriquecimiento negativo de algunas firmas génicas relacionadas con el metabolismo celular por la inactivación genética de FAAH (figura 42A y anexo III). En línea con el efecto paradójico descrito en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}, se describió un enriquecimiento positivo de la firma génica representativa de la respuesta inflamatoria y un enriquecimiento negativo de los genes asociados a la enfermedad de Alzheimer (figura 42B), entre otros procesos biológicos (anexo III), por la inactivación genética de FAAH en condiciones patológicas. Además, el genotipo 5xFAD/FAAH^{-/-} presentó un enriquecimiento positivo del fenotipo microglial DAM en comparación con el modelo 5xFAD (figura 42B).

2.3. Caracterización molecular

2.3.1. Inflamasoma canónico NLRP3

Para estudiar los efectos de la inactivación genética de FAAH sobre la neuroinflamación, se analizaron por RT-qPCR los componentes del inflamasoma canónico NLRP3, ya que es una de las principales fuentes de citoquinas proinflamatorias. Concretamente, se cuantificó la expresión del ARNm de NLRP3, Caspasa 1 (CASP1), ASC y TLR4 (figura 43), por ser un receptor implicado en la activación del inflamasoma. Adicionalmente, se determinó el grado de contribución de las células microgliales sobre los cambios moleculares observados mediante la ablación de este tipo celular con PLX5622 durante 28 días en el contexto fisiológico (figura 44) y patológico (figura 45).

Los ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} presentaron niveles más elevados de NLRP3 (figura 43A), CASP1 (figura 43B) y TLR4 (figura 43D) por la patología amiloide en comparación con los WT y WT/FAAH^{-/-}, respectivamente. A diferencia de lo observado con los otros parámetros analizados, la patología no tuvo un impacto significativo sobre la expresión de ASC (figura 43C).

La inactivación genética de FAAH en el genotipo WT/FAAH^{-/-} indujo una atenuación de la expresión de ASC (figura 43C) y mayores niveles de TLR4 (figura 43D) en comparación con el grupo WT, mientras que el ARNm de NLRP3 (figura 43A) y CASP1 (figura 43B) no se vio alterado en este marco. En condiciones patológicas, la inactivación de la enzima en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} no produjo cambios de la expresión de TLR4 (figura 43D) con respecto al modelo 5xFAD, pero desencadenó una sobreexpresión de NLRP3 (figura 43A) y una infraexpresión de CASP1 (figura 43B) y ASC (figura 43C) en este contexto.

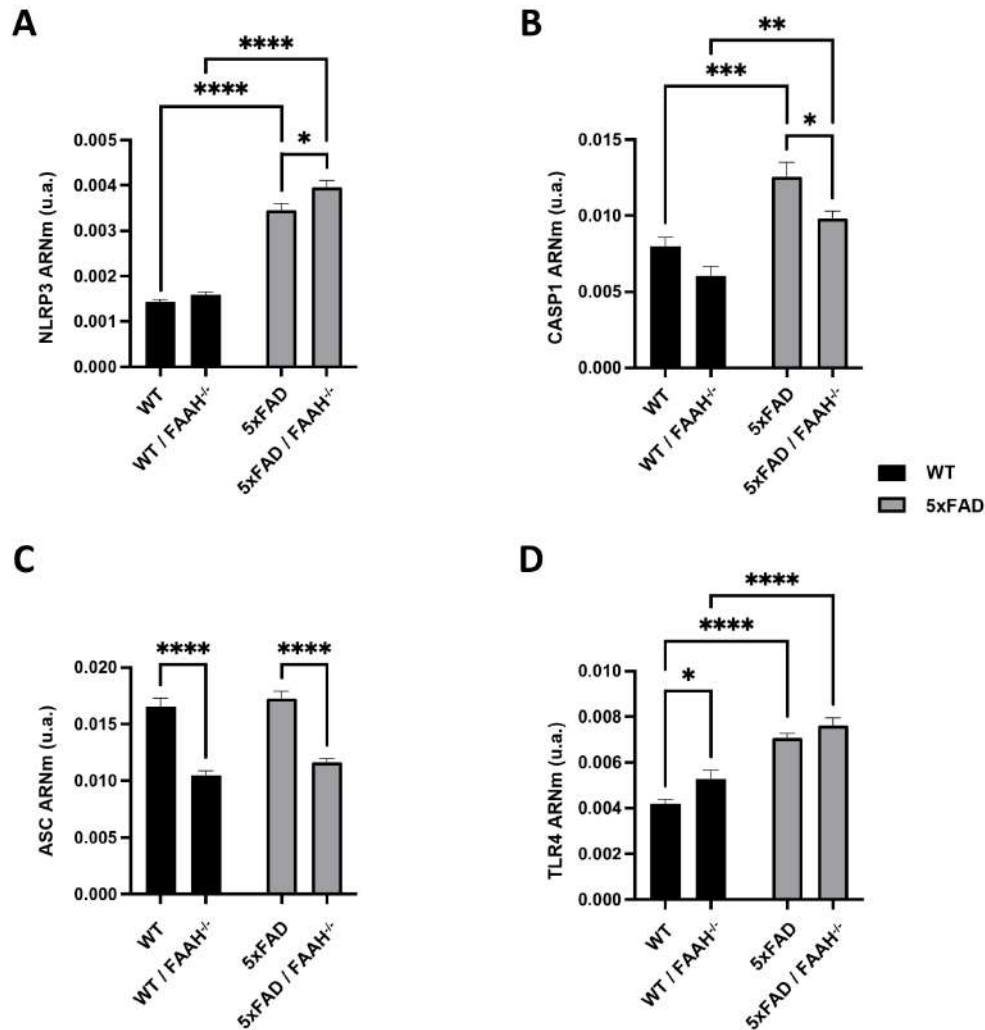


Figura 43: Caracterización de los efectos de la patología amiloide en la expresión del ARNm de los componentes del inflammasoma NLRP3. A) NLRP3. B) CASP1. C) ASC. D) TLR4. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. Los datos representan la media (u.a.) \pm SEM.

La exposición de ratones WT a dieta PLX5622 durante 28 días desencadenó el descenso de los niveles del ARNm de NLRP3 (figura 44A) en comparación con el grupo tratado con comida control (VEH). Además, el grupo WT/FAAH^{-/-} tratado con PLX5622 mostró una atenuación de la expresión de NLRP3 (figura 44A) y TLR4 (figura 44D) en comparación con el VEH. Sin embargo, el tratamiento con PLX5622 no afectó a la expresión ni de CASP1 (figura 44B) ni de ASC (figura 44C). Además, la inactivación genética de FAAH en el contexto de ablación microglial indujo una reducción de los niveles de NLRP3 (figura 44A) en los ratones WT/FAAH^{-/-} con respecto a los WT expuestos a dieta PLX.

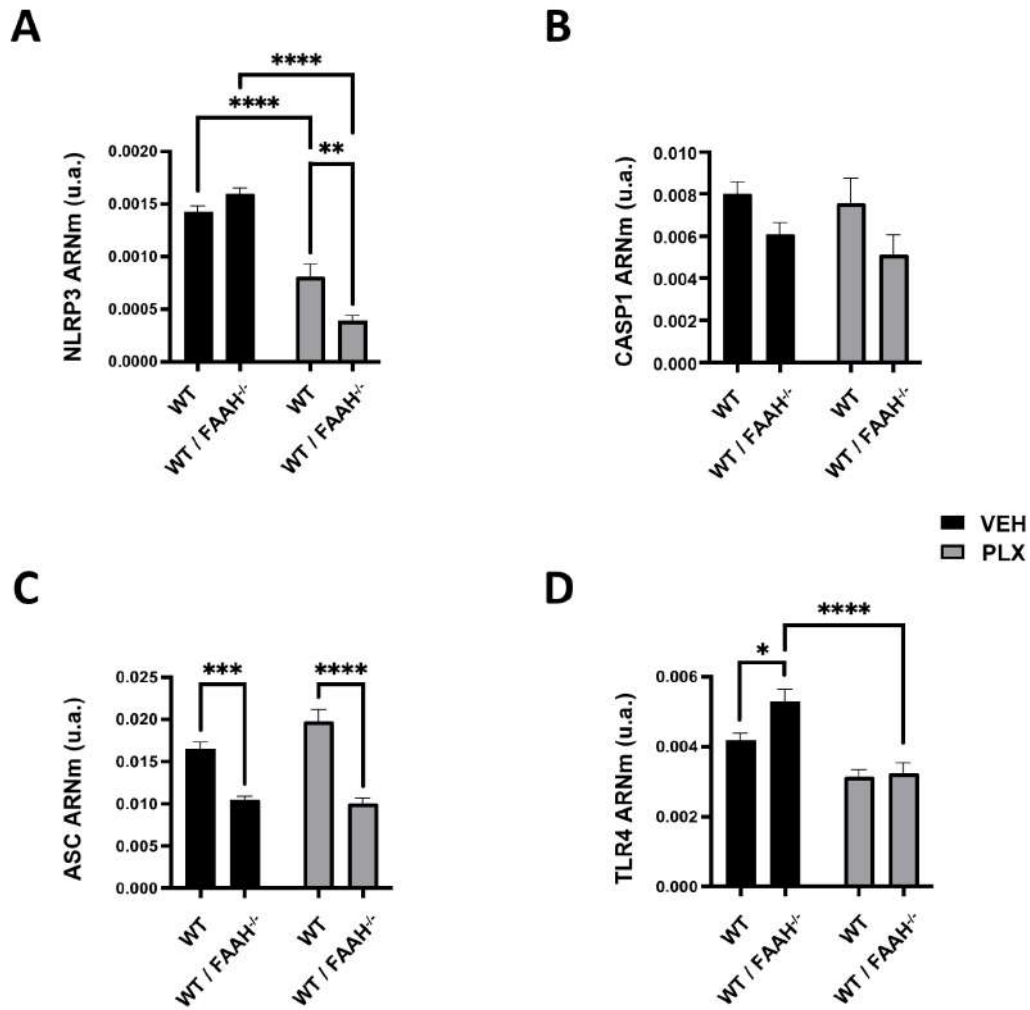


Figura 44: Estudio de los cambios de expresión génica de parámetros relacionados con el inflammasoma NLRP3 tras el tratamiento con PLX5622 en condiciones fisiológicas. A) NLRP3. B) CASP1. C) ASC. D) TLR4. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. Los datos representan la media (u.a.) \pm SEM.

En el contexto patológico tras la ablación microglial, se detectó un descenso de los niveles de NLRP3 (figura 45A) y TLR4 (figura 45D) en ratones 5xFAD tratados con PLX en comparación con el VEH. La exposición del modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} a PLX produjo una reducción significativa de la expresión de NLRP3 (figura 45A), CASP1 (figura 45B) y TLR4 (figura 45D) con respecto a la dieta VEH. Sin embargo, ASC no presentó alteraciones de su expresión tras el tratamiento con PLX5622 en el contexto de la patología amiloide (figura 45C). Además, la inactivación genética de FAAH en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con PLX produjo un descenso significativo de los niveles de CASP1 (figura 45B) en comparación con el modelo 5xFAD.

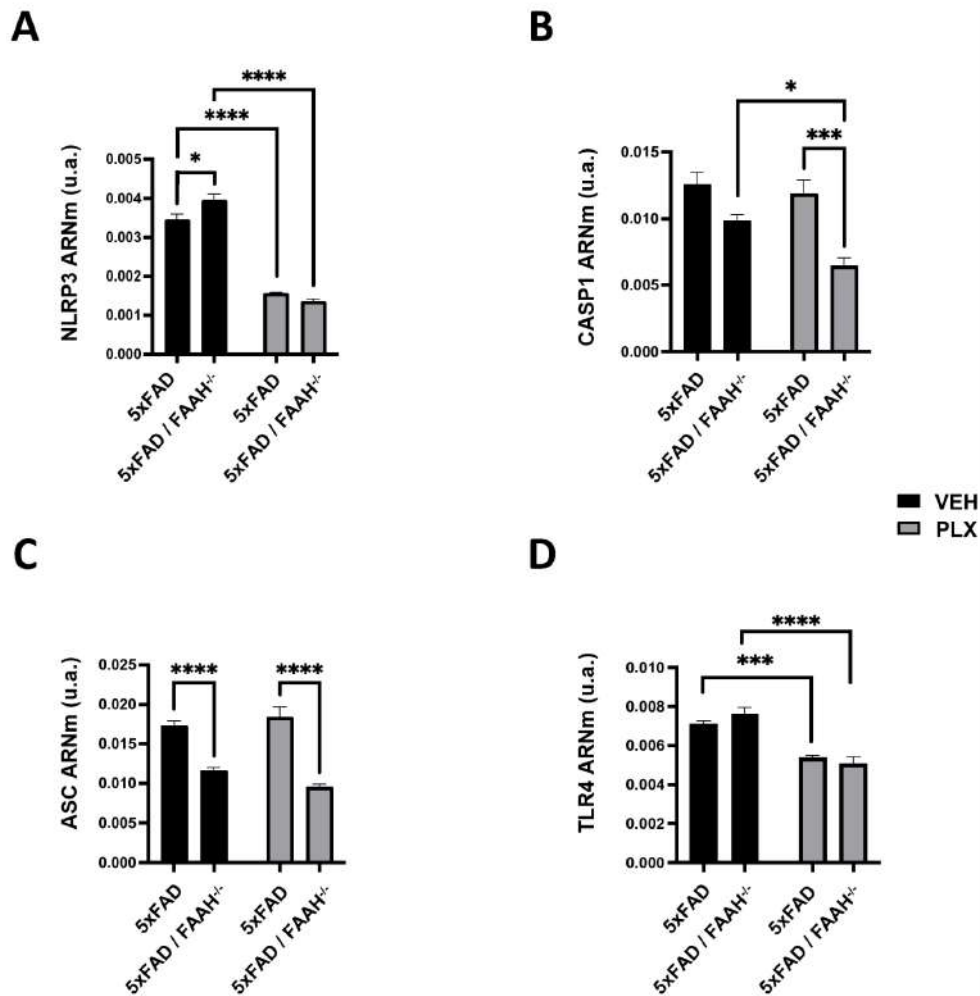


Figura 45: Estudio de los cambios de expresión génica de parámetros relacionados con el inflammasoma NLRP3 tras el tratamiento con PLX5622 en condiciones patológicas. A) NLRP3. B) CASP1. C) ASC. D) TLR4. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. Los datos representan la media (u.a.) \pm SEM.

2.3.2. Citoquinas proinflamatorias

Otro estudio para caracterizar la exacerbación de la respuesta inflamatoria en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} fue la cuantificación por RT-qPCR del ARNm de las citoquinas proinflamatorias IL1 β , TNF α e IL1 α .

El modelo 5xFAD mostró un incremento de los niveles de TNF α (figura 46B) e IL1 α (figura 46C) en comparación con el grupo WT, como era de esperar por la exacerbación del proceso neuroinflamatorio asociado a la patología amiloide. Los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} presentaron una sobreexpresión de todas las citoquinas proinflamatorias analizadas con respecto al grupo WT/FAAH^{-/-} (figura 46A-C).

Además, la expresión de IL1 β se vio exacerbada por la inactivación genética de FAAH tanto en ratones WT/FAAH^{-/-} como 5xFAD/FAAH^{-/-} en comparación con los WT y 5xFAD, respectivamente (figura 46A). TNF α e IL1 α no mostraron diferencias en los niveles de ARNm por la inactivación genética de FAAH ni en condiciones fisiológicas ni patológicas (figura 46B y 46C).

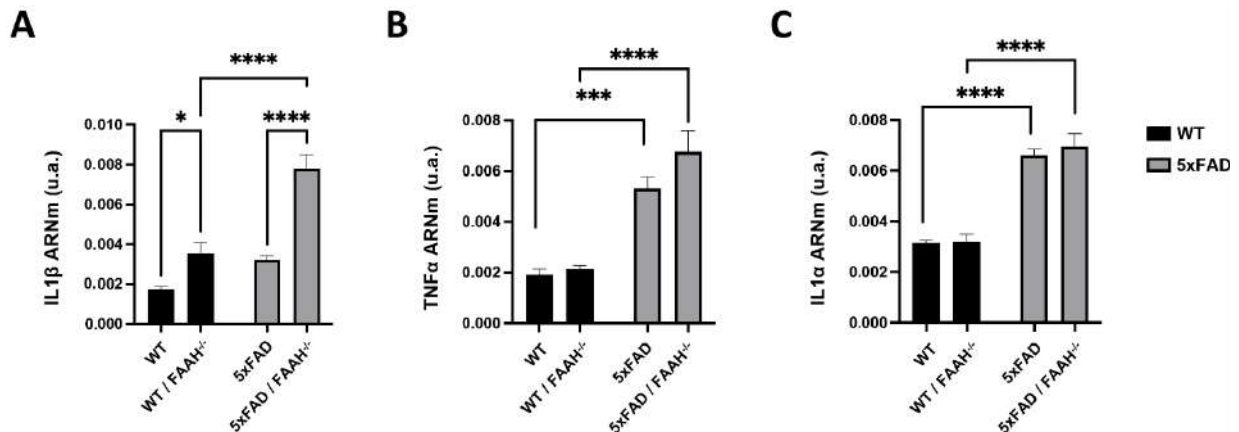


Figura 46: Análisis del ARNm de citoquinas proinflamatorias tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. A) IL1 β . B) TNF α . C) IL1 α . El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. *p<0,05, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) \pm SEM.

El tratamiento de ratones WT con PLX5622 desencadenó una reducción de la expresión de IL1 α en comparación con el grupo WT expuesto a dieta vehículo (figura 47C). El modelo WT/FAAH^{-/-} también mostró menores niveles de IL1 α en comparación con el grupo VEH, además de un descenso de la expresión de IL1 β , bajo estas condiciones (figura 47A). Sin embargo, TNF α permaneció estable tras el tratamiento con PLX5622 en condiciones fisiológicas (figura 47B).

En condiciones patológicas, el tratamiento con PLX5622 reprodujo los mismos resultados descritos previamente en el contexto fisiológico con respecto a IL1 β e IL1 α (figura 48A y 48C), a excepción de TNF α , cuya expresión disminuyó significativamente tras la exposición de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} con PLX en comparación con el grupo VEH (figura 48B).

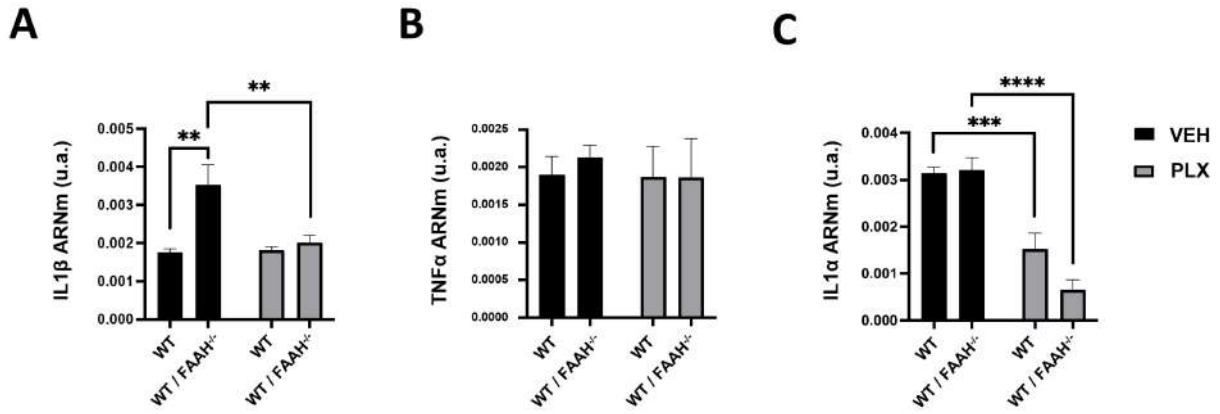


Figura 47: Estudio de los efectos derivados del tratamiento con PLX5622 en condiciones fisiológicas. A) IL1β. B) TNFα. C) IL1α. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

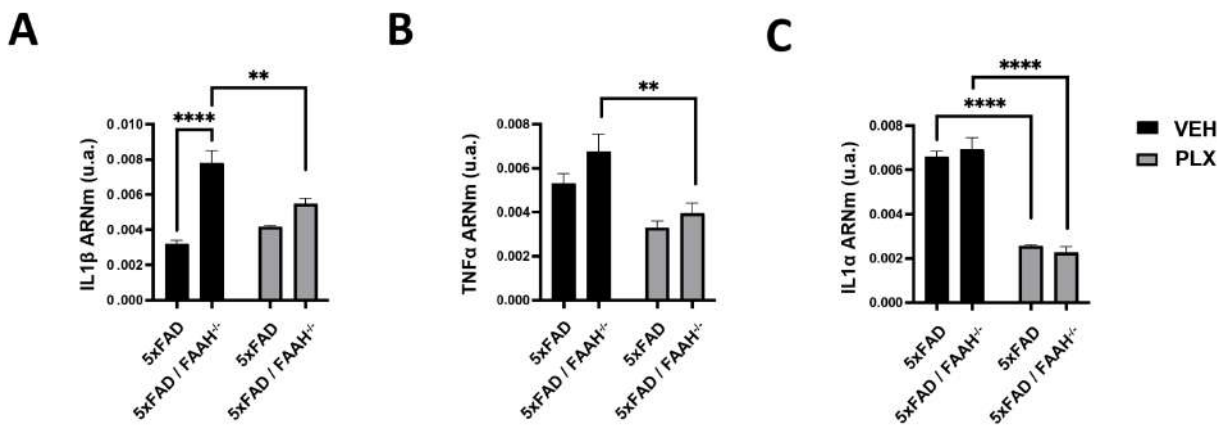


Figura 48: Estudio de los efectos derivados del tratamiento con PLX5622 en el contexto de la patología amiloide. A) IL1β. B) TNFα. C) IL1α. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. **p<0,01 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

2.3.3. Componentes del SEC

Adicionalmente, se analizó la expresión de algunos elementos del SEC por RT-qPCR. Concretamente, se cuantificó el ARNm de CB₂R, por ser un receptor cuya expresión se induce en la microglía asociada a placa en el contexto neuroinflamatorio de la patología amiloide, y de la enzima FAAH, por ser la diana propuesta en el diseño experimental II para modular el SEC en condiciones patológicas.

La patología amiloide produjo un incremento del ARNm de CB₂R (figura 49A) y un descenso de FAAH (figura 49B) tanto los ratones 5xFAD como los 5xFAD/FAAH^{-/-} en comparación con el grupo WT y WT/FAAH^{-/-}, respectivamente.

La inactivación genética de FAAH redujo la expresión CB₂R en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} con respecto a los animales con la enzima intacta (figura 49A). Conforme a lo previsto, los modelos WT/FAAH^{-/-} y 5xFAD/FAAH^{-/-} mostraron niveles significativamente más bajos de la enzima FAAH en comparación con el grupo WT y el 5xFAD, respectivamente (figura 49B).

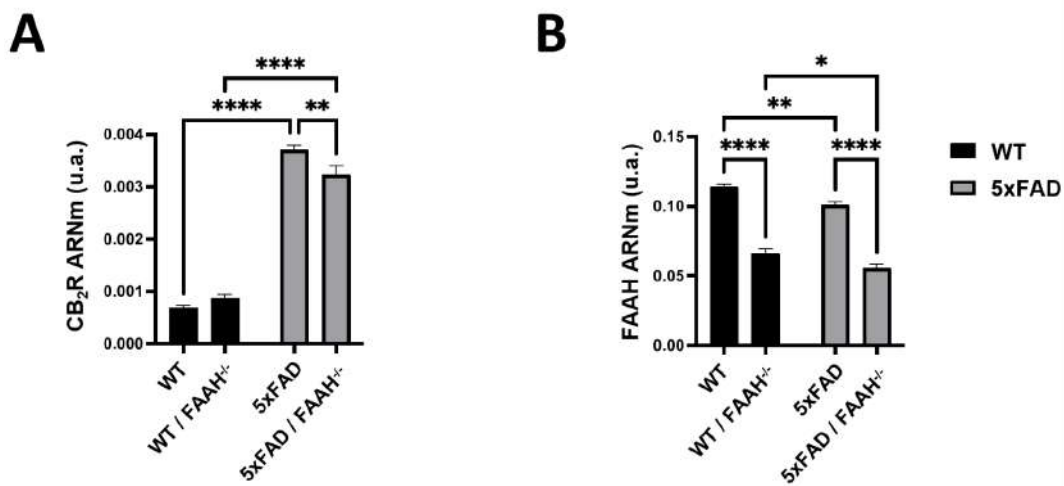


Figura 49: Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de elementos del SEC en ratones con patología amiloide y controles. A) CB₂R. B) FAAH. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. *p<0,05, **p<0,01 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

La ablación microglial inducida por PLX5622 desencadenó un descenso de CB₂R (figura 50A) y de FAAH (figura 50B) en ratones WT/FAAH^{-/-} en comparación con los expuestos a dieta control. La exposición de ratones WT a PLX incrementó los niveles de FAAH con respecto al grupo VEH (figura 50B). Además, la inactivación genética de FAAH en ratones WT/FAAH^{-/-} produjo una reducción de la expresión de CB₂R y FAAH en comparación con el grupo WT en el contexto de ablación microglial (figura 50A y 50B).

En el contexto patológico, la exposición de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} a PLX5622 produjo un descenso de la expresión de CB₂R en comparación con el grupo VEH (figura 51A). Sin embargo, no se detectaron cambios de la expresión de FAAH tras el tratamiento con PLX5622 en condiciones patológicas (figura 51B). Los resultados obtenidos en el contexto patológico

de ablación microglial corroboraron los efectos previamente descritos en condiciones fisiológicas: una disminución en los niveles de CB₂R y de FAAH (figura 51A y 51B).

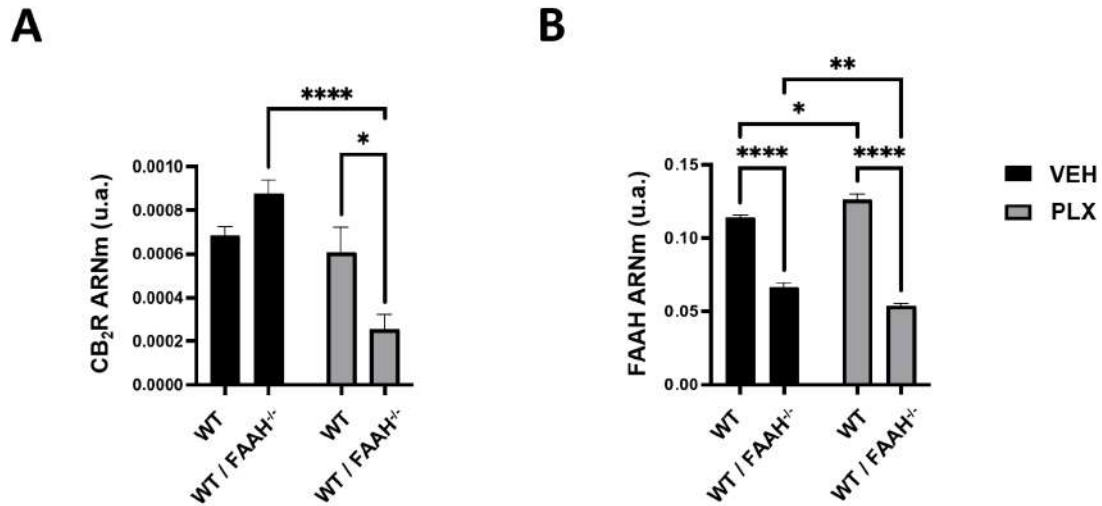


Figura 50: Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de los componentes del SEC tras la exposición a dieta PLX5622 en condiciones fisiológicas. A) CB₂R. B) FAAH. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. *p<0,05, **p<0,01 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

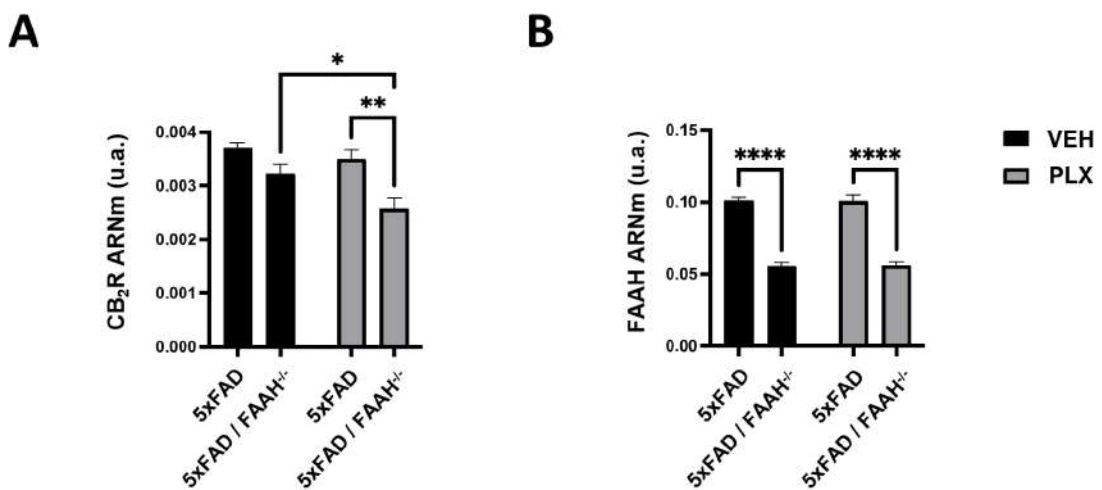


Figura 51: Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de elementos del SEC en ratones con patología amiloide expuestos a PLX5622. A) CB₂R. B) FAAH. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. *p<0,05, **p<0,01 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

2.3.4. Señalización vía CSF1R

Dado que PLX5622 se empleó como inhibidor de CSF1R en el diseño experimental II, se cuantificó el ARNm de este receptor y sus respectivos ligandos (CSF1L e IL34) por RT-qPCR para determinar los efectos de la patología amiloide y la inactivación genética de FAAH sobre la expresión de estos parámetros.

Los resultados reflejaron un aumento de CSF1R y CSF1L (figura 52A y 52B), y un descenso de IL34 (figura 52C) en ratones 5xFAD y 5xFAD/FAAH^{-/-} en comparación con el grupo WT y WT/FAAH^{-/-}, respectivamente.

Se observó un incremento de IL34 por la inactivación genética de FAAH en condiciones fisiológicas (figura 52C). La expresión de CSF1R fue significativamente mayor en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} en comparación con los ratones 5xFAD (figura 52A), mientras que los niveles de CSF1L fueron menores en este contexto como consecuencia de la inactivación genética de FAAH (figura 52B).

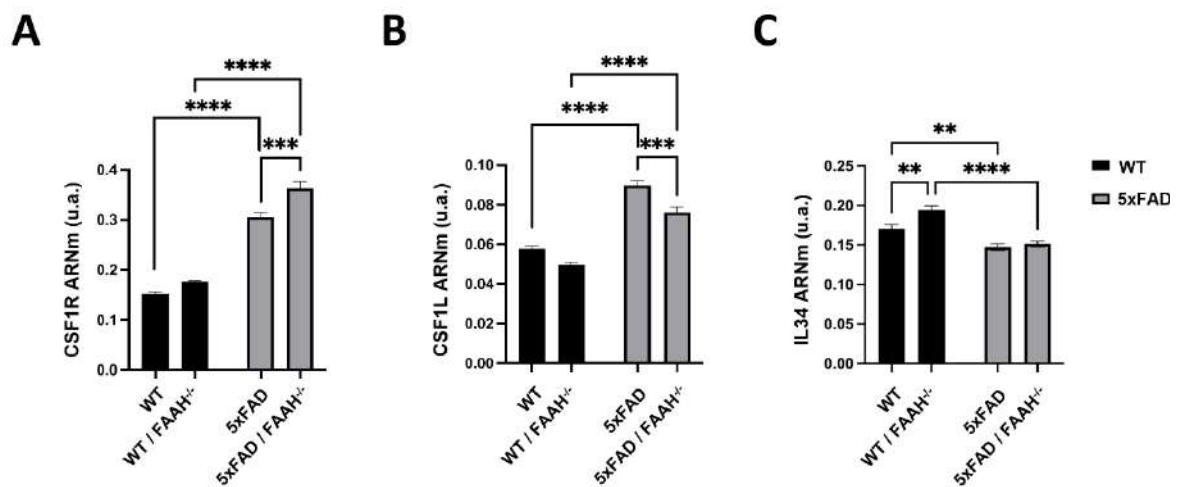


Figura 52: Análisis del impacto de la patología amiloide y la inactivación genética de FAAH en el eje CSF1R-CSF1L por RT-qPCR. A) CSF1R. B) CSF1L. C) IL34. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001.

Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

El tratamiento de ratones WT con PLX5622 provocó un descenso significativo del ARNm de CSF1R en comparación con los controles (figura 53A). El modelo WT/FAAH^{-/-} tratado con PLX5622 también presentó una reducción de la expresión de CSF1R con respecto al VEH (figura 53A). Sin embargo, la exposición a PLX5622 no alteró el ARNm de CSF1L ni de IL34 (figura 53B y 53C).

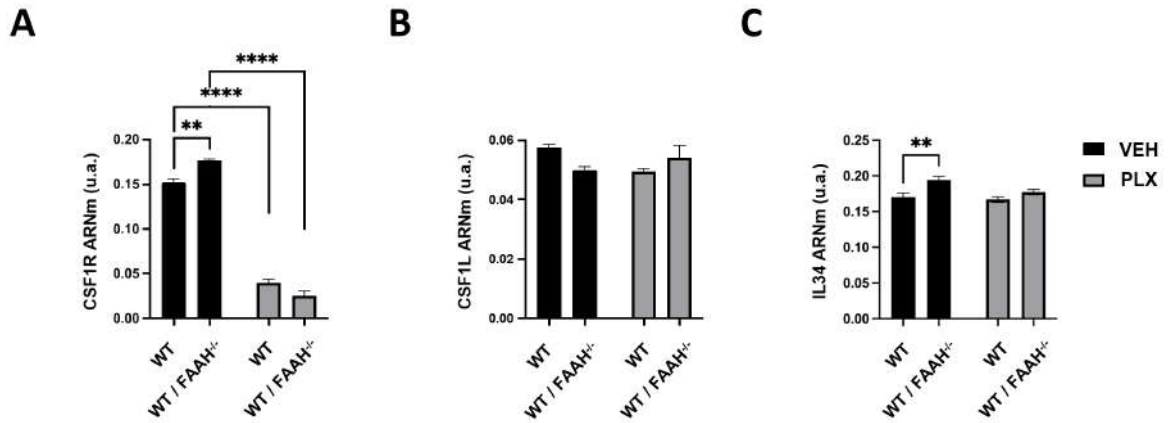


Figura 53: Cuantificación de la expresión del eje CSF1R-CSF1L por RT-qPCR tras el tratamiento con PLX5622 en condiciones fisiológicas. A) CSF1R. B) CSF1L. C) IL34. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. **p<0,01 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

En condiciones patológicas, la ablación microglial de ratones 5xFAD redujo la expresión de CSF1R y CSF1L con respecto a los animales expuestos a la comida VEH (figura 54A y 54B). Los niveles de CSF1R también descendieron tras el tratamiento de los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} con PLX5622 en comparación con el grupo VEH (figura 54A). Sin embargo, PLX5622 no indujo cambios en la expresión de IL34 en los diferentes grupos experimentales (figura 54C).

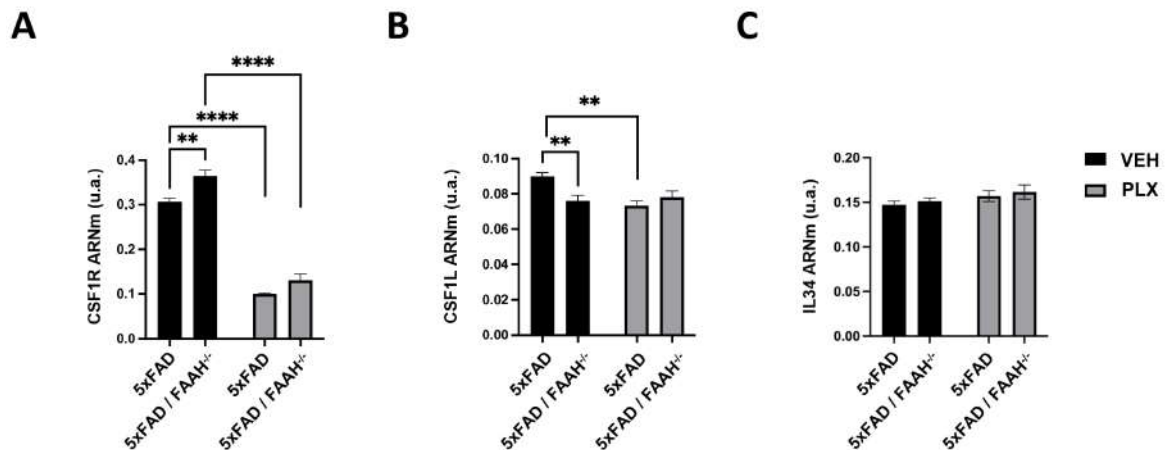


Figura 54: Cuantificación de la expresión del eje CSF1R-CSF1L por RT-qPCR tras el tratamiento con PLX5622 en el contexto de la patología amiloide. A) CSF1R. B) CSF1L. C) IL34. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. **p<0,01 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

Adicionalmente, se analizó mediante WB la expresión de CSF1R y del marcador microglial IBA1 para caracterizar el impacto de PLX5622 tras la ablación microglial en el contexto patológico. Se empleó como control de carga GAPDH, ya que su expresión es relativamente estable en las diferentes condiciones estudiadas.

Tanto los ratones 5xFAD como 5xFAD/FAAH^{-/-} tratados con PLX presentaron un descenso significativo de CSF1R y del marcador microglial IBA1 en comparación con los VEH correspondientes por la pérdida de las células de microglía (figura 55). Además, la inactivación genética de FAAH en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} expuestos a dieta control reveló menores niveles de IBA1 (figura 55A y 55C) y mayores niveles de CSF1R (figura 55B y 55C) en comparación con el grupo 5xFAD.

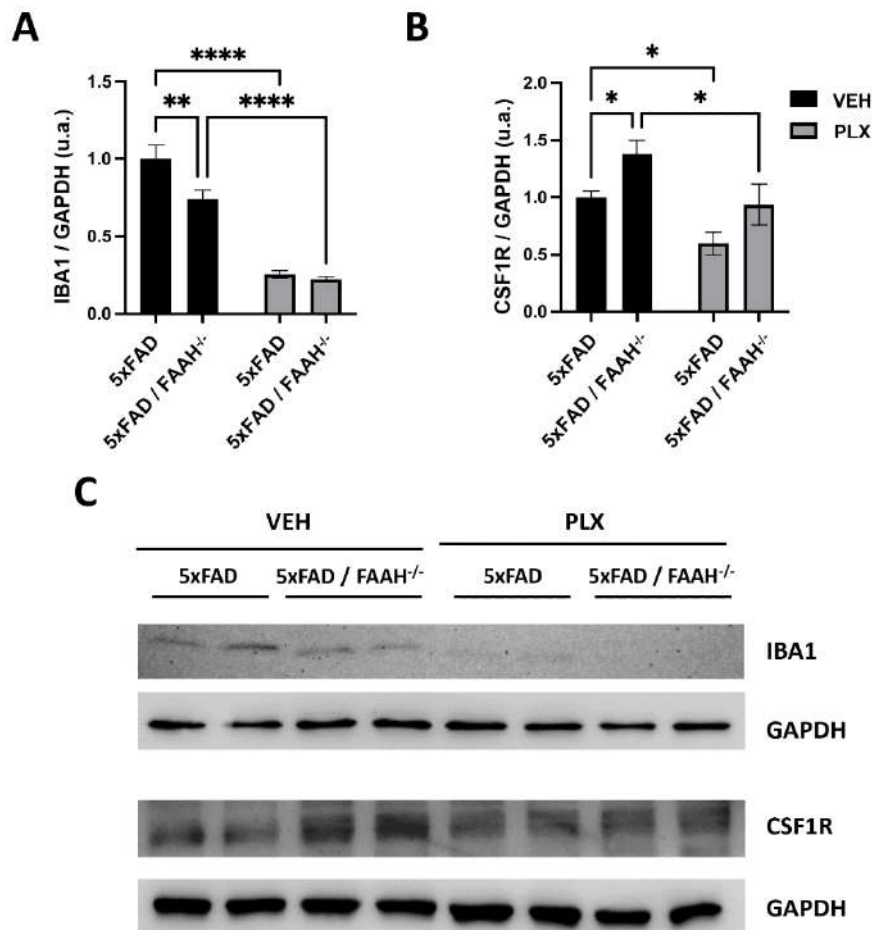


Figura 55: Evaluación de los efectos de PLX5622 sobre la expresión de IBA1 y CSF1R por WB en el contexto de la patología amiloide. A) IBA1. B) CSF1R. C) Imágenes representativas de las bandas proteicas asociadas a cada marcador analizado. GAPDH se empleó como control de carga para normalizar los resultados obtenidos. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8 por grupo experimental. *p<0,05, **p<0,01 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

3. Dinámica *in vivo* de las células microgliales y placas amiloides

En el diseño experimental II, se emplearon los genotipos 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} para realizar el estudio temporal *in vivo* por microscopía 2PE. Previo a iniciar las sesiones de imagen, se analizaron algunos parámetros previamente cuantificados en los ratones con CX3CR1 intacto, confirmándose la ausencia de grandes alteraciones moleculares por la delección parcial de CX3CR1 (anexo IV).

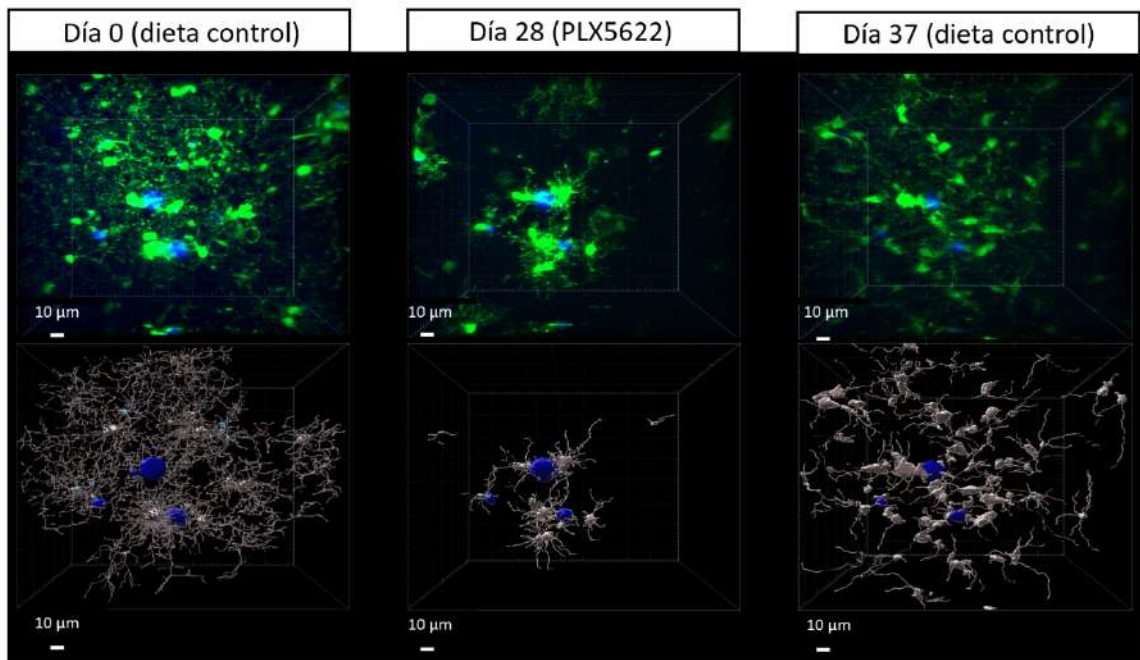
Para evaluar de forma más exhaustiva la respuesta microglial por la inactivación de FAAH, se realizaron sesiones de imagen en tres puntos temporales diferentes: 1) antes de la exposición a PLX5622 (día 0), 2) durante el tratamiento crónico con el inhibidor de CSF1R (día 28), y 3) tras la retirada del tratamiento, favoreciendo la repoblación microglial (día 37).

Se llevó a cabo un análisis detallado de los resultados, teniendo en cuenta la distribución espacial de las subpoblaciones microgliales con relación al centro de la placa amiloide. De este modo, se consideró "microglía asociada a placa" (AP) a aquellas células localizadas a <20 µm (X, Y, Z) con respecto al centro de la placa y "microglía no asociada a placa" (NAP) a aquellas células cuya distancia a la placa era >20 µm (X, Y, Z).

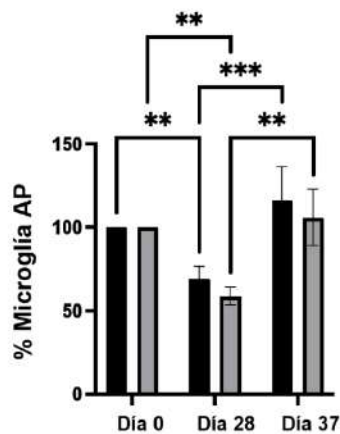
En primer lugar, se cuantificó el porcentaje de células microgliales presentes en el campo visual de cada sesión, normalizándose los valores obtenidos al día 0 (figura 56). En línea con estudios previos, se confirmó que cada subtipo microglial difería en su sensibilidad a PLX5622. Específicamente, el 69 % y 58 % de la microglía AP sobrevivió en ratones 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+} y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+}, respectivamente, tras el tratamiento durante 28 días con PLX5622 (figura 56B y 56D). Únicamente, el 14 % y 21 % de la microglía NAP resistió a día 28 en ratones 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+} y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+}, respectivamente, con respecto al día 0 (figura 56C y 56D). Sin embargo, no se observaron diferencias en el porcentaje de células microgliales ni AP ni NAP por la inactivación genética de FAAH tras 28 días de exposición a PLX5622 (figura 56D). Además, la sustitución del tratamiento por la dieta estándar (día 37) desencadenó la repoblación de la microglía AP y NAP hasta igualar la población observada a día 0 en ambos genotipos (figura 56B y 56C).

Estos resultados sugieren que la microglía AP tendría una sensibilidad menor a PLX5622 en comparación con la microglía NAP y que las ratios de repoblación de ambas subpoblaciones serían similares independientemente de la actividad de FAAH en el contexto de la patología amiloide.

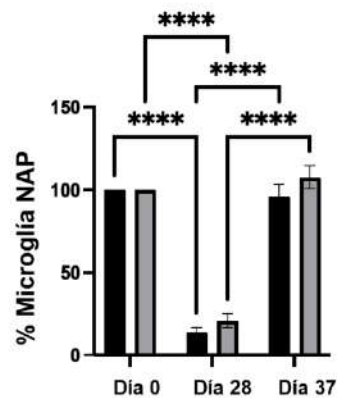
A



B



C



D

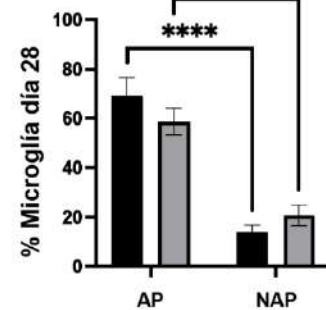


Figura 56: La ablación microglial por PLX5622 revela diferentes subpoblaciones microgliales en ratones 5xFAD. A) Parte superior: Imágenes representativas del efecto de PLX5622 sobre la supervivencia microglial (verde) y las placas amiloides (azul) obtenidas por microscopía multifotón. Parte inferior: reconstrucción 3D de las células microgliales (gris) y las placas amiloides (azul). B) Estudio crónico de la pérdida microglial y la posterior repoblación de la microglía asociada a placa (AP), <20 µm de distancia (X, Y, Z) del centro de la placa. C) Estudio crónico de la pérdida microglial y la posterior repoblación de las células de microglía no asociadas a placa (NAP), >20 µm de distancia (X, Y, Z) al centro de la placa. D) Porcentaje de microglía AP y NAP tras 28 días de tratamiento con PLX5622. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8-9 ratones por grupo. **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media ± SEM.

En segundo lugar, se caracterizó la morfología de la microglía AP y NAP en ratones 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} para identificar los cambios asociados a la inactivación genética de FAAH en el contexto de la patología amiloide y de ablación microglial.

El análisis sholl de la microglía AP de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} presentó mayor número de intersecciones que la microglía de ratones 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} a día 0, 28 y 37. Concretamente, la microglía AP de ambos genotipos mostró el mayor número de intersecciones a una distancia de 10 µm con respecto al soma. Por tanto, la microglía AP mostró una estructura más compleja por la inactivación de FAAH en todos los puntos temporales del estudio (figura 57A, 57B y 57C). Además, la microglía NAP de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} mostró un número de intersecciones mayor a 15 µm de distancia del soma por la inactivación genética de FAAH a día 0 en comparación con el modelo 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} (figura 57D). Sin embargo, no se detectaron alteraciones de la complejidad de la microglía NAP por la inactivación genética de FAAH en el análisis Sholl ni a día 28 ni 37 del estudio (57E, 57F).

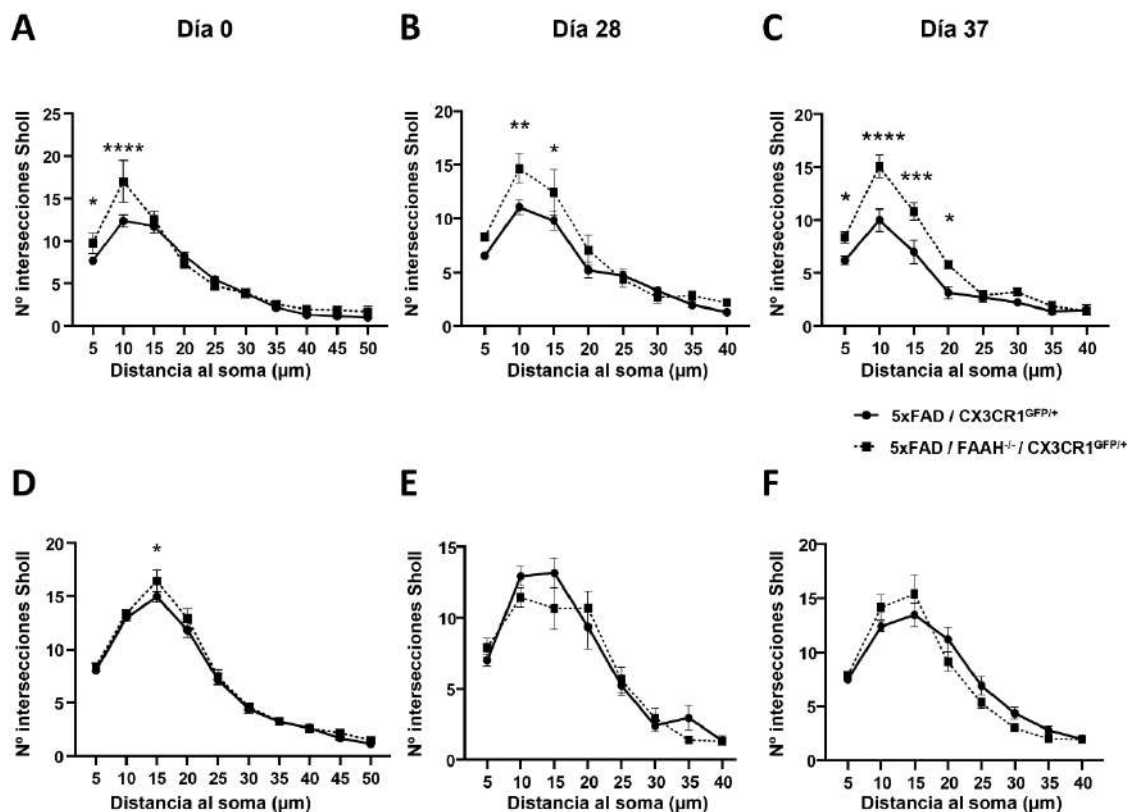


Figura 57: Análisis Sholl para el estudio de la complejidad de la estructura microglial a día 0, 28 y 37. A-C) Datos de la microglía AP en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} y 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP}. D-F) Datos de la microglía NAP en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} y 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP}. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8-11 ratones por grupo experimental. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media ± SEM.

Para la caracterización de los procesos y el soma microglial, se emplearon los módulos *Filament tracer* y *Surface* de Imaris 10.0, respectivamente. Al estudiar los procesos, se identificaron alteraciones de la morfología microglial AP en ratones 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} por la exposición a PLX5622, mientras que los procesos de la microglía AP de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} permanecieron prácticamente estables tras el tratamiento (figura 58A). Concretamente, la microglía AP de ratones 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} mostró procesos más cortos, más esféricos y menos ramificados en comparación con el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+}. Además, la microglía NAP de ratones 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} presentó procesos más esféricos por el tratamiento durante 28 días con PLX en comparación con el día 0 de estudio, mientras que el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} reveló procesos más cortos y menos ramificados en este contexto (figura 58B).

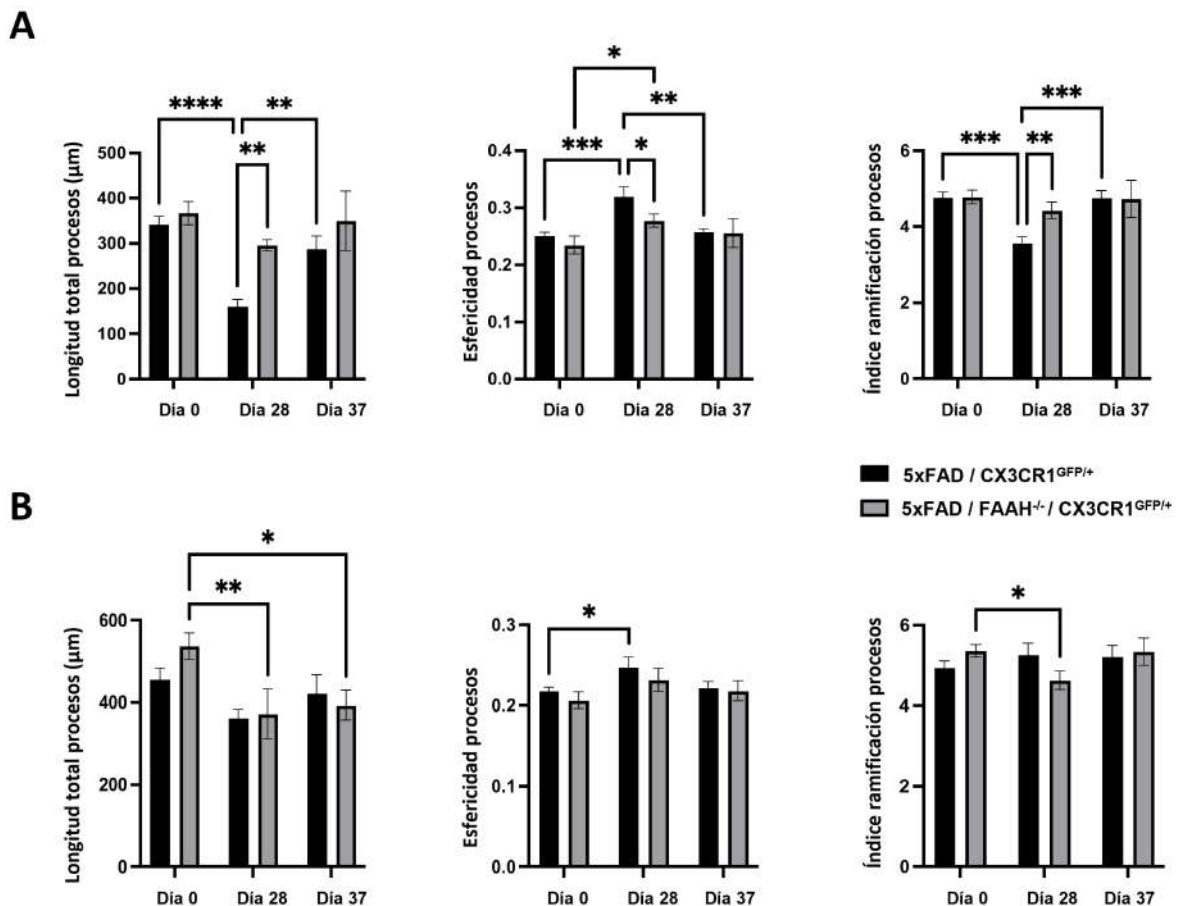


Figura 58: Estudio temporal de los procesos de la microglía AP y NAP. A) Caracterización de la longitud, la esféricidad y el índice de ramificación de la microglía asociada a placa en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} y 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP}. B) Caracterización de la longitud, la esféricidad y el índice de ramificación de la microglía no asociada a placa en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} y 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP}. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8-11 ratones por grupo experimental. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media ± SEM.

Adicionalmente, se cuantificó el volumen y la esfericidad del soma de la microglía AP de ratones 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+}, sin observarse cambios por el tratamiento con PLX5622 (anexo V-figura 72A). El soma de la microglía no asociada a placa 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} presentó un volumen mayor a día 28 en comparación con el observado a día 0 (anexo V-figura 72B). Además, el soma de la microglía NAP del modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} mostró una esfericidad mayor con respecto al 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} tras 28 días de ablación microglial con PLX (anexo V-figura 72B).

El estudio temporal *in vivo* permitió determinar la presencia o ausencia de MeO-X04 en el interior del soma microglial, como medida indirecta de las células de microglía con potencial capacidad fagocítica. Para ello, se cuantificó el número de microglía MeO-X04⁺ y se expresó como porcentaje con respecto al número total de células microgliales presentes en el campo de observación. A día 28, los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} mostraron un porcentaje mayor de la microglía MeO-X04⁺ por el tratamiento con PLX con respecto al día 0 (figura 59).

Además, se observó un porcentaje mayor de la microglía MeO-X04⁺ por la inactivación genética de FAAH tras la ablación microglial durante 28 días en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} con respecto a los 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} (figura 59). Una vez transcurrido el periodo de repoblación microglial a día 37, se perdieron las diferencias por la inactivación de FAAH descritas a día 28 entre ambos genotipos (figura 59).

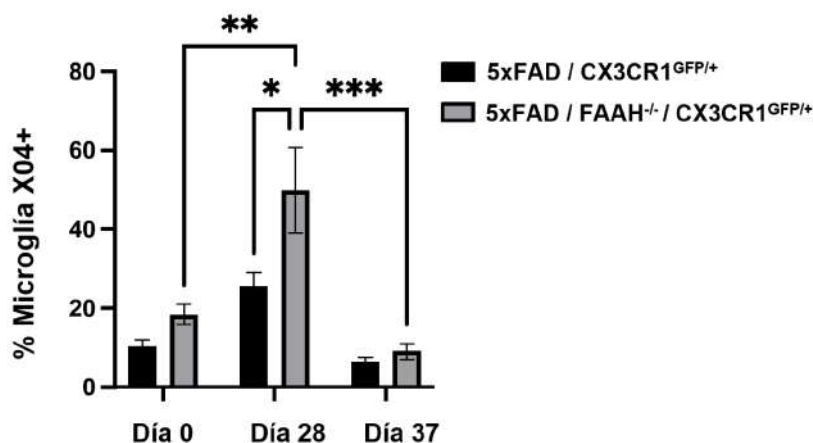


Figura 59: Cuantificación del porcentaje de microglía MeO-X04⁺ a día 0, 28 y 37 del estudio de imagen. Estudio temporal del porcentaje de microglía MeO-X04⁺ tras la ablación microglial y su posterior repoblación en el contexto de la patología amiloide. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8-11 ratones por grupo experimental. *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001. Los datos representan la media ± SEM.

Por último, se analizaron las características morfológicas de las placas de A β . Se observó que los parámetros empleados apenas se alteraron por el tratamiento con PLX5622 en ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+/-}GFP, a excepción de la densidad a día 28 que incrementó en comparación con el día 0 del estudio (figura 60). El modelo 5xFAD/CX3CR1^{+/-}GFP mostró placas de mayor volumen y menor esfericidad en comparación con el 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+/-}GFP en el contexto de ablación microglial (día 28) y posterior repoblación (día 37) (figura 60). Por tanto, estos resultados reflejaron un patrón de progresión de las placas amiloides diferente por la inactivación genética de FAAH tras el tratamiento con PLX5622.

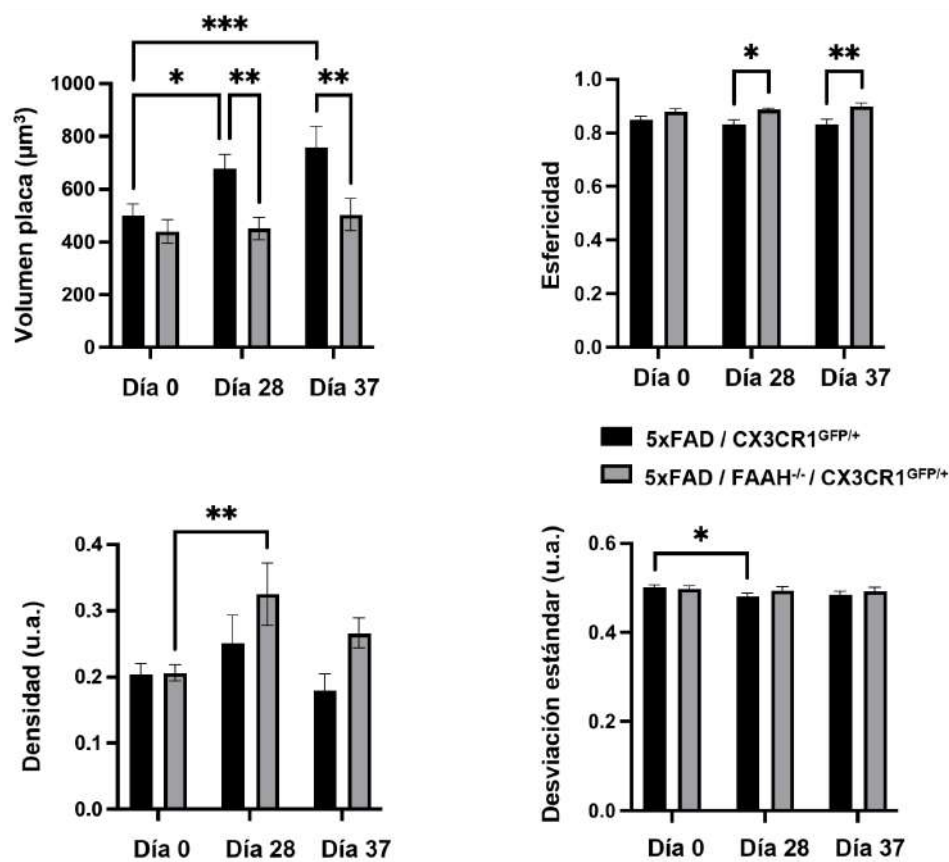


Figura 60: Caracterización de las placas amiloides a día 0, 28 y 37 del estudio de imagen en ratones 5xFAD/CX3CR1^{+/-}GFP y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+/-}GFP. Cuantificación del volumen, esfericidad, densidad y desviación estándar de la intensidad de las placas neuríticas con Imaris 10.0 tanto en los ratones 5xFAD/CX3CR1^{+/-}GFP como en los 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+/-}GFP. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. N=8-11 ratones por grupo experimental. *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001. Los datos representan la media ± SEM.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Alzheimer es una patología multifactorial y compleja cuya prevalencia crece exponencialmente con el paso del tiempo en una población cada vez más envejecida. Algunas características principales de la fisiopatología de la enfermedad son el desarrollo de los ovillos intraneuronales de tau hiperfosforilada, el descenso de los niveles de acetilcolinesterasa y la formación de las placas neuríticas en el parénquima cerebral de los pacientes (37). Además, se han descrito otros mecanismos asociados a la patogénesis de la EA como la neuroinflamación, que se encuentra exacerbada en este contexto (81). Actualmente, se ha aprobado el uso de fármacos para paliar la sintomatología de los pacientes, aunque no existe una cura para la enfermedad (100). Durante años, la comunidad científica no ha cesado en sus esfuerzos por profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a la EA para desarrollar nuevos métodos de diagnóstico y plantear nuevas estrategias terapéuticas.

Una de las vías terapéuticas emergentes para la EA es la modulación de la respuesta inflamatoria a través del sistema endocannabinoide. El SEC desempeña un papel importante en la regulación de la homeostasis del SNC al participar en procesos biológicos, como la neurotransmisión, la inflamación y la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de las neuronas y las células gliales. Además, se han asociado propiedades inmunosupresoras, antiinflamatorias y neuroprotectoras a los cannabinoides (322). En relación con la EA, se han descrito algunas alteraciones en los componentes de este sistema. A pesar de que todavía se desconoce la relevancia clínica de muchos de estos cambios, hay un creciente interés por estudiar el papel del SEC en la progresión de la EA. De hecho, algunos de sus componentes se están investigando como posibles dianas terapéuticas. Algunos ejemplos destacables son la inducción de la expresión de CB₂R en la microglía próxima a los depósitos de amiloide y la acumulación de la enzima FAAH de forma selectiva en los astrocitos reactivos asociados a las placas neuríticas (313).

En relación con la investigación de la modulación del SEC como nuevo abordaje terapéutico en la EA, algunos estudios preclínicos han demostrado que la exposición a fitocannabinoides induce mejoras comportamentales, reduce las placas neuríticas y atenúa el proceso neuroinflamatorio en modelos animales de la EA (325). En paralelo, otras investigaciones han desarrollado fármacos capaces de inhibir las enzimas catabólicas de los eCBs para prolongar su vida media y aumentar su efecto biológico (355). Concretamente, algunos inhibidores de la enzima FAAH y MAGL han demostrado reducir la síntesis de interleuquinas proinflamatorias y las placas amiloides gracias a la elevación del tono endocannabinoide en el organismo (356,357).

Con el objetivo de profundizar en el potencial terapéutico de la modulación del SEC en la EA, en la presente tesis se llevó a cabo 1) la administración crónica de dosis bajas de THC y CBD a ratones 5xFAD y 2) la evaluación de los efectos de la inactivación genética de FAAH, con la consecuente elevación del tono endocannabinoide, en ratones 5xFAD.

Respecto a la administración de THC y CBD, se observó que el tratamiento crónico con dosis bajas de THC, CBD o CBD:THC afectaba significativamente al comportamiento de los ratones 5xFAD con respecto a los controles. Concretamente, el tratamiento con THC exacerbaba el estado ansioso y depresivo de los animales en las pruebas EPM y TS, respectivamente. Además, el modo de administración del CBD y THC, como dosis independiente o combinada, resultó ser un factor determinante en los cambios observados en la memoria espacial del modelo 5xFAD en la prueba de Barnes. A nivel molecular, el tratamiento con cannabinoides aumentó los niveles de la fracción insoluble del péptido A β en condiciones patológicas, pero sin alterar la expresión de los marcadores de inflamación analizados a nivel de ARNm y proteína (anexo VI; (358)).

El modelo de amiloidosis 5xFAD desarrolla placas de A β a partir de los 2 meses de edad y presenta un deterioro de la memoria asociativa y espacial a los 6 meses de edad en la prueba de condicionamiento del miedo y en el laberinto acuático de Morris, respectivamente (214). De manera consistente con estudios previos, nuestros datos confirmaron las características del fenotipo 5xFAD, incluyendo el deterioro de la memoria espacial, el aumento de la coordinación motora (359), la atenuación de la locomoción (360) y la sobreexpresión de marcadores proinflamatorios en comparación con los controles por el aumento de la síntesis del péptido amiloide (361).

La amnesia inducida por la exposición a THC está mediada por la interacción con el receptor CB₁R, expresado en las interneuronas GABAérgicas del hipocampo, y los receptores postsinápticos NMDA (362). Existe una asociación directa entre la exposición de dosis convencionales de THC (1-20 mg/kg) y déficits en la atención (363), la memoria a corto plazo (364) y la memoria espacial de animales jóvenes (365). Sin embargo, la administración de dosis bajas (1 mg/kg y 3 mg/kg) (326,366) y ultra bajas de THC (0,002 mg/kg) (367) induce mejoras cognitivas en ratones envejecidos. Además, estudios *in vivo* han descrito una potenciación de la función cognitiva en el modelo APP/PS1 asociada al tratamiento con CBD (0,75 mg/kg o 5mg/kg) (368,369). Estas observaciones contradicen lo observado en nuestro estudio, ya que la exposición a CBD indujo un deterioro del aprendizaje espacial del modelo 5xFAD en la prueba BM. La disparidad en los datos podría atribuirse a la edad de los ratones empleada (8 meses), difiriendo de la publicada en literatura. Las discrepancias observadas en

la literatura con respecto a los efectos de los cannabinoides sugieren que factores como la edad, el modelo animal, la dosis y el tipo de cannabinoide son determinantes para explicar la variabilidad de los datos (370).

Algunos autores postulan que la administración crónica de THC en combinación con CBD produce efectos adversos en la memoria de los ratones (366), aunque nuestros datos aportan nuevas evidencias que respaldan la hipótesis de un efecto beneficioso (329,369). La prueba BM mostró una reducción del tiempo de latencia al escondite en los ratones 5xFAD tras el tratamiento con CBD:THC, sugiriendo la existencia de un efecto antagonista entre ambos cannabinoides en el contexto de la patología amiloide. En línea con nuestras observaciones, se ha descrito en literatura reciente que el CBD es capaz de reducir los efectos psicoactivos asociados al THC, incluyendo el deterioro cognitivo (370,371).

A raíz de los estudios realizados por Ben-Shabat y colaboradores, se han propuesto diferentes mecanismos para esclarecer cómo los cannabinoides no activos podrían modular la actividad de otros cannabinoides, como el THC (372). Modelos preclínicos de cáncer y daño han mostrado ejemplos de la interacción entre los fitocannabinoides y los endocannabinoides, aunque aún no se han reportado datos concluyentes (373). Se ha descrito, por ejemplo, que los cannabinoides podrían regular la interacción de otros cannabinoides con CB₁R y/o CB₂R, alterar el metabolismo de los eCBs o potenciar la interacción con otros receptores como TRPV1 o GPR55 (374).

Para esclarecer la base molecular subyacente a los efectos observados, en el presente trabajo se analizaron parámetros relacionados con la inflamación en los diferentes grupos experimentales. Para ello, se empleó tanto el hipocampo como la corteza del parénquima cerebral, ya que, como indicaron Negrón-Oyarzo y colaboradores, la interacción entre ambas áreas cerebrales es de gran relevancia en el proceso de consolidación de la memoria espacial (375). Nuestros datos no mostraron cambios en ninguno de los marcadores inflamatorios por la exposición del modelo 5xFAD a CBD, THC o CBD:THC, sugiriendo que el contexto neuroinflamatorio parecía ser insuficiente para explicar las alteraciones cognitivas observadas en este contexto.

Otras pruebas comportamentales realizadas en el presente trabajo evidenciaron que el modelo 5xFAD presentaba un perfil de menor ansiedad en comparación con los ratones WT. La exposición del modelo de amiloidosis a THC inducía un estado más ansioso y depresivo en las pruebas EPM y TS, respectivamente. Estudios preclínicos han demostrado que los cannabinoides, tanto exógenos como endógenos, inducen, generalmente, un perfil

antidepresivo en roedores (376). Dado que el THC es un agonista parcial de CB₁R (377), algunos autores han profundizado en la caracterización de este receptor para esclarecer los efectos del THC sobre la depresión y la ansiedad de los animales. Se ha descrito que la activación aguda de CB₁R con THC y otros cannabinoides, como los agonistas sintéticos WIN55, 212-2, CP55 y 940, produce efectos antidepresivos y/o ansiolíticos (378–380). A menudo, estos efectos positivos se han asociado con la administración de dosis bajas de cannabinoides, mientras que las dosis altas con la inducción de la depresión y la ansiedad (376,381). Por tanto, estas observaciones respaldarían los efectos bifásicos del THC descritos en los seres humanos en función de la dosis administrada (382).

Nuestros resultados también reflejaron un incremento significativo de la conformación insoluble del péptido A β ₁₋₄₂ tras el tratamiento de ratones 5xFAD con CBD, THC y CBD:THC, siendo este último el que mostró la máxima concentración. Aso y colaboradores describieron que la coadministración de CBD y THC facilitaba el depósito de amiloide y reducía los niveles de la conformación soluble del péptido A β ₁₋₄₂ en el modelo murino APP/PS1 (369). En contraposición, nuestro estudio no mostró alteraciones en la concentración de la isoforma soluble por el tratamiento con cannabinoides. La concordancia parcial entre nuestros datos y los de este estudio podrían deberse a los fármacos usados (cannabinoides sintéticos vs. fitocannabinoides), la dosis administrada (CBD a 0,273 mg/kg y THC a 0,205 mg/kg vs. 0,75 mg/kg) y la duración del tratamiento (28 días vs. 5 semanas).

Estudios *in vitro* y de modelado molecular han revelado que el THC puede interferir en el proceso de fibrilación del péptido A β . Dado que la morfología del A β no muestra una correlación directa con la neuroprotección, se desconoce la relevancia biológica de esta interacción (383,384). La heterogeneidad estructural de las distintas especies amiloides podría ser un factor clave en la progresión de la patología amiloide (385). Por ejemplo, los oligómeros solubles de bajo peso molecular se consideran una conformación del A β neurotóxica por su capacidad de interferir con funciones neuronales, como la potenciación a largo plazo (386). Gracias a su mayor superficie, hidrofobicidad y su capacidad de unión a la membrana, los oligómeros solubles forman poros e incrementan la permeabilidad de la membrana (387).

Además de las diferencias estructurales de los monómeros, los oligómeros pueden alterar procesos celulares mediante la interacción específica e inespecífica con los receptores, la mitocondria, las vesículas sinápticas y las membranas, provocando cambios aberrantes en la señalización y disfunción celular (388). El incremento de los niveles de A β insoluble observado en nuestro estudio podría interpretarse como un mecanismo neuroprotector, ya que podría limitar la toxicidad inducida por los oligómeros de pequeño tamaño.

Otros fitocannabinoides diferentes al CBD y THC se están empleando en diferentes estudios para evaluar sus efectos en el contexto de la patología amiloide. Patil y colaboradores han observado que el cannabidiol, presente en pequeñas cantidades en *Cannabis sativa*, y el cannabinoide actúan inhibiendo enzimas asociadas a la EA, incluyendo las acetilcolinesterasas y las butirilcolinesterasas (389). La exposición a isómeros del THC (Δ^8 -THC) ha demostrado favorecer la viabilidad celular *in vitro* (390), mientras que las variantes ácidas del CBD y THC han logrado disminuir los niveles del péptido A β y de tau fosforilada, y potenciar los efectos neuroprotectores de BDNF en el contexto de la EA (391).

Actualmente, la FDA no ha aprobado el uso de cannabinoides o sus derivados para tratar la EA. Además, se han completado pocos ensayos clínicos para evaluar el potencial uso del THC (dronabinol y nabilona) o CBD. Por ejemplo, la nabilona, que es un cannabinoide sintético aprobado para el tratamiento de las náuseas y vómitos asociados a la quimioterapia, ha resultado ser eficaz para reducir la agitación y la agresión de pacientes con EA (331). Sin embargo, es importante monitorizar los posibles efectos adversos como la sedación y el deterioro cognitivo.

El uso terapéutico de los cannabinoides tiene algunas limitaciones como la dosis, la vía de administración y el estadio de la enfermedad, además de sus efectos adversos. Cuando los cannabinoides son administrados vía oral, estos quedan retenidos en la grasa y se liberan lentamente al plasma. En consecuencia, la ventana terapéutica es estrecha y es difícil determinar la dosis necesaria (392). La inhalación del cannabis potencia sus efectos terapéuticos, aunque incrementa los efectos adversos y el riesgo de abuso de estas drogas (393). Otro problema asociado al uso terapéutico del cannabis medicinal es la tolerancia a largo plazo. Entre los mecanismos subyacentes al proceso de tolerancia se encuentran la infraexpresión de CB₁R, la internalización del receptor y su desensibilización (309,394). Dado que las alteraciones moleculares aparecen con antelación a la sintomatología de la EA, los cannabinoides deberían ser administrados en etapas iniciales para potenciar sus efectos neuroprotectores e inmunomoduladores. Sin embargo, se requiere más investigación para esclarecer la ventana terapéutica de los cannabinoides en la progresión de la EA (325).

Dado que los efectos de los cannabinoides exógenos y los endocannabinoides podrían diferir en el organismo, la síntesis de fármacos capaces de modular directamente la señalización de los eCBs ha cobrado importancia en la actualidad. Algunos enfoques terapéuticos comprenden la síntesis de moduladores alostéricos de los CBRs y el desarrollo de inhibidores de los transportadores de los eCBs o de las enzimas responsables de su degradación (228). Esta última estrategia se ha abordado en el presente trabajo utilizando el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}.

La elevación crónica del tono endocannabinoide en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} condujo a un contexto neuroinflamatorio exacerbado que, paradójicamente, vino acompañado de efectos neuroprotectores relacionados con una menor expresión de genes asociados con el desarrollo de la EA. Los resultados demostraron que la inactivación de esta enzima inducía un perfil génico y morfológico diferente en la microglía, a pesar de que FAAH no se expresa prácticamente en este tipo celular. El tratamiento con PLX5622 permitió llevar a cabo la ablación microglial, revelando cambios importantes en la morfología de la microglía dependiendo de su localización con respecto a las placas amiloides. Concretamente, la microglía 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} asociada a placa mostró una morfología más estable tras el tratamiento con PLX5622 en comparación con el modelo 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+}, que presentó procesos más cortos, más esféricos y menos ramificados. Además, se observó un incremento del porcentaje de la microglía MeO-X04⁺ y un volumen estable de las placas amiloides por la inactivación genética de FAAH en el contexto patológico de ablación microglial (anexo VII; (395)).

El análisis *postmortem* de la corteza cerebral de los pacientes con EA ha indicado una reducción significativa de la hidrólisis de AEA, junto con una mayor acumulación de FAAH en astrocitos hipertróficos cercanos a las placas amiloides en comparación con los controles sanos (313,396). Por el contrario, nuestros datos revelaron un descenso del ARNm de FAAH en el hipocampo como consecuencia de la patología amiloide. Dado que FAAH se expresa principalmente en neuronas (397), el proceso de pérdida neuronal asociado a la progresión de la EA podría ser responsable de los cambios en la expresión de FAAH reflejados en nuestro estudio. No tenemos una explicación que justifique la disparidad entre los estudios previos y nuestros datos, más allá del origen biológico de las muestras (seres humanos vs. modelos murinos), las diferencias patológicas (EA vs. amiloidosis) y las técnicas de cuantificación empleadas (inmunohistoquímica vs. RT-qPCR). Además, la cuantificación del ARNm de FAAH en ratones WT/FAAH^{-/-} y 5xFAD/FAAH^{-/-} reveló una expresión residual de la enzima. Esto se debe a que el modelo *Knock-out* empleado en nuestro estudio se caracteriza por la delección del exón 1 de FAAH para truncar la proteína y, de este modo, inactivar genéticamente FAAH (286).

La inactivación genética de FAAH induce la acumulación de anandamida, entre otras NAEs, que actúa como agonista del receptor cannabinoide CB₁R (255). Gutiérrez-Rodríguez y colaboradores han identificado la presencia del receptor CB₁R en la membrana mitocondrial de los astrocitos del hipocampo mediante microscopía electrónica (398). Estudios previos han demostrado que la activación de CB₁R mitocondrial con cannabinoideos altera la estabilidad y

la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones, reduciendo la fosforilación de la subunidad NDUFS4. En este contexto, también observaron una alteración del metabolismo de la glucosa y del lactato (399). En línea con estos hallazgos, el análisis diferencial de genes, tanto en el contexto basal como patológico de inactivación genética de FAAH, mostró un descenso significativo de la expresión de NDUFS5 hipocampal, que es una subunidad del espacio intermembrana necesaria para la maduración del complejo I de la cadena de transporte de electrones (400). En consecuencia, observamos un enriquecimiento negativo de la fosforilación oxidativa, entre otras alteraciones de las firmas génicas del metabolismo celular, por la inactivación genética de la enzima en el análisis GSEA.

Datos previos han demostrado que la inactivación genética de FAAH en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} induce un ambiente proinflamatorio cerebral que previene el deterioro cognitivo, preserva la plasticidad sináptica y reduce los depósitos del péptido Aβ en comparación con los ratones que presentan la enzima intacta (313,401–403). Nuestros resultados confirmaron la asociación paradójica entre la respuesta inflamatoria exacerbada y la neuroprotección en el contexto de inactivación genética de FAAH. Los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-} mostraron una mejora del aprendizaje espacial en la prueba BM, acompañada de un perfil transcriptómico enriquecido negativamente con genes asociados a la EA y positivamente con la firma génica “respuesta inflamatoria”.

Nuestros estudios más recientes han indicado la sobreexpresión de algunos receptores microgliales implicados en la fagocitosis, como TREM2 y CTSD, en condiciones patológicas de inactivación genética de FAAH (401). Dado que estos dos receptores son característicos del fenotipo microglial DAM, su sobreexpresión sugiere un enriquecimiento de esta población celular en el parénquima cerebral de ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}. Por este motivo, el presente trabajo abordó el análisis de la firma génica DAM descrita por Grubman y colaboradores (180), demostrando un enriquecimiento positivo del fenotipo microglial DAM en los ratones 5xFAD/FAAH^{-/-}.

El papel de la microglía DAM en la progresión de la patología amiloide sigue siendo objeto de investigación en la actualidad. Algunos estudios sugieren que la progresión de la neurodegeneración en la EA no tiene relación directa con el fenotipo DAM (404). No obstante, existen evidencias que respaldan la estrecha asociación entre la disfunción de la microglía homeostática y la progresión de la enfermedad (404,405).

Con el fin de caracterizar la microglía en el contexto de inactivación genética de FAAH, se analizó la expresión de genes específicos asociados a la activación microglial. En el contexto

de la EA, el péptido A β induce la activación de TLR4 en la microglía y promueve la activación de NF- κ B y la síntesis de citoquinas proinflamatorias, como IL1 β (406). La activación del inflamasoma NLRP3, principalmente en la microglía, media la producción de citoquinas proinflamatorias y desempeña un papel clave en la formación de las placas de A β (157,405). En consecuencia, se analizó el ARNm de componentes del inflamasoma NLRP3, citoquinas proinflamatorias y TLR4 para identificar alteraciones de su expresión por la inactivación genética de FAAH, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Como era de esperar, observamos un incremento de la expresión de estos genes por la patología amiloide, indicando una mayor activación microglial en este contexto. El modelo WT/FAAH^{-/-} mostró una sobreexpresión de TLR4 e IL1 β y el fenotipo 5xFAD/FAAH^{-/-} reveló alteraciones de algunos componentes del inflamasoma NLRP3 y un incremento significativo de la expresión de IL1 β en comparación con los respectivos controles. Estas observaciones aportan evidencias sobre la exacerbación del contexto inflamatorio y la activación microglial por la inactivación genética de FAAH en condiciones fisiológicas y patológicas.

El empleo de agonistas de CB₂R ha puesto de manifiesto la importancia de este receptor en la activación microglial y la eliminación del péptido A β (311,314). Nuestro estudio molecular reveló la sobreexpresión de CB₂R por la patología amiloide en el hipocampo, confirmando lo descrito en literatura previa (313). El modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} mostró una reducción de la expresión de CB₂R en comparación con el modelo 5xFAD, sugiriendo que la inactivación genética de FAAH podría inducir un perfil de activación microglial diferente en este contexto.

Además de evaluar la expresión de genes relacionados con la activación microglial, también cuantificamos los niveles de ARNm de CSF1R y sus respectivos ligandos (CSF1L e IL34). CSF1R se localiza predominantemente en la microglía, mientras que IL34 se expresa principalmente en neuronas y CSF1L en neuronas y astrocitos del SNC (144,407). En condiciones fisiológicas, la expresión basal de CSF1L contribuye al funcionamiento correcto de la microglía, incluyendo el podado sináptico, la liberación de factores neurotróficos y la conectividad cerebral, e IL34 desempeña un papel relevante en el desarrollo y el mantenimiento de la microglía en el cerebro (407,408). No obstante, Walker y colaboradores observaron una sobreexpresión de CSF1L y CSF1R, y una infraexpresión de IL34 en tejido cerebral *postmortem* de pacientes con EA (409), tal y como mostraron nuestros datos, como consecuencia de la patología amiloide en el modelo 5xFAD. Asimismo, estos autores reportaron respuestas similares en la microglía *postmortem* tras la activación de CSF1R indistintamente por IL34 o CSF1L (409). La sobreexpresión de CSF1R es característica del perfil génico de la microglía DAM (167,410).

Nuestros resultados revelaron una sobreexpresión de CSF1R y una reducción de CSF1L en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} en comparación con el grupo 5xFAD.

En paralelo a estas alteraciones génicas, se detectaron niveles más bajos de la proteína IBA1, señalando una atenuación de la microgliosis en este contexto. Datos previos de nuestro de investigación revelaron una menor microgliosis en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} utilizando técnicas de densitometría de células IBA1⁺ y citometría de flujo (403,411). Todos estos hallazgos respaldarían la exacerbación del perfil microglial DAM descrito en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}, y podrían explicar la preservación de las funciones de la microglía homeostática observadas en este modelo (401). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la neuroinflamación asociada a la inactivación genética de FAAH está vinculada al desarrollo del perfil microglial DAM, el cual presenta cambios en el eje CSF1R que podrían ser responsables de la mejoría significativa de la patología detectada en el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}.

Con el fin de identificar características adicionales asociadas a la inactivación genética de FAAH y la contribución de la microglía en las mismas, expusimos a la microglía a un desafío farmacológico. Concretamente, se empleó un inhibidor de CSF1R (PLX5622), que induce apoptosis en las células mieloides, incluyendo la microglía (341). La exposición a PLX5622, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, produjo una reducción de la expresión de marcadores microgliales, como NLRP3, TLR4, CSF1R y CB₂R, y de parámetros con origen celular diverso, como IL1 α y IL1 β . Además, los niveles de FAAH permanecieron estables en el contexto patológico de ablación microglial. En consecuencia, nuestros datos confirmaron la expresión baja de FAAH, en caso de que hubiera, en la microglía, tal y como describió Muccioli y Stella (412). Por tanto, los efectos observados en la microglía por la inactivación genética de FAAH, tanto en este trabajo como en otros estudios (413), sugieren una regulación heterocelular por parte de otras células gliales y/o neuronales, conforme a lo descrito en literatura previa (105).

Otro objetivo de nuestro trabajo fue evaluar si la inactivación genética de FAAH, y el ambiente neuroinflamatorio resultante, inducía cambios morfológicos y funcionales *in situ* en la microglía tras la ablación de este tipo celular por PLX5622 y su posterior repoblación. La morfología microglial y las alteraciones de la microglía cercana a la placa amiloide se han considerado indicadores de la respuesta inflamatoria (414). El uso de PLX5622 permitió evaluar diferentes poblaciones microgliales según su localización respecto a las placas de amiloide. Utilizando microscopía multifotón intravital detectamos una población microglial capaz de sobrevivir tras 28 días de exposición a PLX5622 y una rápida repoblación al retirar el inhibidor de CSF1R, respaldando lo descrito en estudios previos (341,415). Nuestros hallazgos mostraron que la

microglía asociada a placas de A β resistía más al tratamiento con PLX5622 en comparación con la microglía localizada lejos de la placa. Estos datos coinciden con lo descrito por Spangerberg y colaboradores (341), quienes, además, mostraron una correlación entre la supervivencia de la microglía cercana a placa y la expresión de marcadores del perfil microglial DAM en el hipocampo de ratones 5xFAD tratados con PLX5622. De hecho, otros trabajos, que también emplearon PLX5622 para provocar la ablación microglial y analizar sus efectos sobre la patología amiloide, describieron que las células IBA1⁺ detectadas en el parénquima cerebral de ratones expuestos a PLX5622 coexpresaban CSF1R y resistían al tratamiento (175,414). No obstante, se requiere una caracterización más detallada para determinar el papel específico de la microglía DAM en la progresión de las placas neuríticas (341).

Asimismo, analizamos la morfología de las células microgliales por su estrecha relación con la función celular (341). Algunos de los parámetros comúnmente empleados para realizar este análisis son la esfericidad, el volumen, la longitud y el número de puntos terminales de los procesos microgliales (416–418). Nuestros resultados mostraron un incremento de la ramificación de la microglía asociada a placa por la ausencia de la actividad de FAAH en el contexto de la EA, indicando una mayor complejidad estructural. Esta complejidad permaneció estable tras la exposición a PLX5622. Por el contrario, la microglía cercana a placa de ratones 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+} presentó cambios morfológicos asociados a la transición de la microglía hacia un fenotipo más ameboide en el contexto de ablación microglial.

Tradicionalmente, se han establecido dos estados de activación microglial con una serie de características morfológicas específicas. Por un lado, la morfología ramificada se ha asociado a la microglía “en reposo” presente en condiciones fisiológicas (419). Por otro lado, la morfología ameboide, con procesos engrosados y retraídos, se ha vinculado con la microglía activada, la cual comprende la potenciación de funciones gliales como la migración, la presentación antigénica o la fagocitosis (149,420,421). Gracias al descubrimiento de fenotipos microgliales alternativos mediante análisis ultraestructurales, el paradigma de dos estados de activación microglial ha quedado obsoleto en la actualidad (201,422). Los datos obtenidos por imagen *in vivo* 2PE han demostrado que la microglía está continuamente activa en el SNC, siendo capaz de fagocitar restos celulares a través de sus ramificaciones terminales. Además, varios estudios han reportado un descenso de la actividad fagocítica asociado a la microglía ameboide (192,423–426). Por tanto, la microglía muestra una notable heterogeneidad funcional, siendo capaz de modular su actividad en respuesta a factores como la especie, el sexo, la edad, el área cerebral y el contexto fisiológico o patológico (189).

Nuestros resultados mostraron que, aunque FAAH no se expresa en la microglía, la inactividad de la enzima altera la función microglial, desencadenando cambios significativos en la estructura de las placas neuríticas. Concretamente, los ratones 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+} presentaron un incremento progresivo del volumen de las placas, mientras que el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} mostró placas con un volumen más estable. Además, a pesar de la morfología más ramificada de la microglía asociada a placa, se observó un mayor número de microglía MeO-X04⁺ por la inactivación genética de FAAH en el contexto de ablación microglial. Asimismo, el modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} mostró placas más densas tras la exposición a PLX5622. En línea con estas observaciones, estudios previos demostraron un incremento del tamaño de placa tras la ablación microglial con PLX5622 y destacaron el papel de la microglía en el mantenimiento de las placas de tipo compacto, limitando el crecimiento de las placas amiloides y, por ende, retrasando la progresión de la distrofia neurítica (427,428).

A pesar de la controversia sobre el papel neuroprotector o perjudicial de la microglía en la progresión de la EA (178), FAAH podría ser considerado un modulador relevante de la función microglial, específicamente de la microglía localizada en torno a las placas neuríticas. Los hallazgos realizados en este trabajo aportan datos novedosos y relevantes sobre la modulación del SEC en el contexto de amiloidosis característico de la EA, aunque también presentan una serie de limitaciones para su traslación clínica.

Es importante destacar que los resultados obtenidos en el presente estudio se obtuvieron empleando ratones 5xFAD, que, aunque es un modelo de la amiloidosis propia de la EA, no reproduce la complejidad fisiopatológica que desarrollan los seres humanos (337,338).

Actualmente, se están desarrollando compuestos capaces de inhibir farmacológicamente la enzima FAAH como estrategia terapéutica de enfermedades neurodegenerativas. Un ejemplo es el PF-04457845, que ha mostrado ser seguro y ha reflejado una buena tolerancia a dosis altas en ensayos clínicos, sin producir alteraciones cognitivas. Este inhibidor de FAAH también se está investigando para tratar el estrés postraumático, trastornos depresivos, y los síntomas de abstinencia por consumo de cannabinoides (429). Sin embargo, se han descrito ciertos riesgos asociados a la administración de los inhibidores de FAAH. Concretamente, el compuesto BIA 10-2474 produjo neurotoxicidad en la fase I de ensayos clínicos. Van Esbroeck y colaboradores determinaron que BIA 10-2474 no solo inhibía FAAH, sino también otras lipasas no identificadas aún en combinación con PF-04457845, que inhibe FAAH con alta selectividad (430).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman hallazgos previos y proporcionan nuevos datos sobre los efectos derivados de la modulación del SEC en el contexto de la EA, concretamente, a través de la administración de cannabinoides o del incremento del tono endocannabinoide en el organismo. Gracias a estas dos aproximaciones experimentales, hemos aportado a la comunidad científica datos relevantes para abrir nuevas estrategias terapéuticas con un valor traslacional significativo.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación conducen a las siguientes conclusiones:

1. Los efectos del CBD y THC varían significativamente dependiendo de si se administran en combinación o de forma independiente en el modelo 5xFAD.
2. La exposición crónica a dosis bajas de CBD, THC o CBD:THC altera el comportamiento de los ratones 5xFAD. Concretamente, el tratamiento con THC induce un fenotipo ansioso-depresivo y la coadministración de CBD y THC produce mejoras en la memoria espacial de este modelo de amiloidosis.
3. El tratamiento crónico con THC, CBD o CBD:THC a dosis bajas incrementa los niveles de la forma insoluble del péptido A β ₁₋₄₂ en la corteza cerebral de ratones 5xFAD, pero no altera la expresión de parámetros moleculares asociados a la inflamación ni a nivel de ARNm ni de proteína.
4. La inactivación genética de FAAH mejora el aprendizaje espacial y atenúa la microgliosis de los ratones en el contexto de la patología amiloide.
5. El modelo 5xFAD/FAAH^{-/-} tiene un perfil transcriptómico caracterizado por un enriquecimiento negativo de la firma génica "EA" y, paradójicamente, un enriquecimiento positivo de grupos de genes asociados a la respuesta inflamatoria y al fenotipo microglial DAM.
6. La inactivación genética de FAAH en el contexto de la patología amiloide altera la expresión de genes involucrados en la activación microglial, como NLRP3, TLR4, CSF1R y CB₂R, revelando un perfil génico diferente de este tipo celular. La ablación microglial con PLX5622, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, reduce la expresión de marcadores microgliales (NLRP3, TLR4, CSF1R y CB₂R) y de origen celular diverso (IL1 α y IL1 β), sugiriendo una regulación heterocelular por parte de otras células gliales y/o neuronales.
7. El tratamiento con PLX5622 permite diferenciar entre la microglía asociada a placa y no asociada a placa, mostrando cambios importantes en la morfología de la microglía dependiendo de su localización con respecto a las placas amiloides. Aunque FAAH no se expresa en la microglía, la inactividad de la enzima altera la morfología microglial. Concretamente, la microglía 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} asociada a placa tiene una morfología más compleja y estable tras el tratamiento con PLX5622 en comparación con el modelo 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+}, que presenta procesos más cortos, más esféricos y menos ramificados.

8. El modelo 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} presenta una mayor captación del péptido A β por parte de la microglía y un volumen estable de las placas amiloides en comparación con el modelo 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+} ante el desafío farmacológico con PLX5622.

CONCLUSIONS

The results of this research lead to the following conclusions:

1. The effects of CBD and THC vary significantly depending on whether they are administered in combination or independently in 5xFAD mice.
2. Chronic exposure to low-dose CBD, THC, or CBD:THC alters the behavior of 5xFAD mice. Specifically, THC treatment induces an anxious-depressive phenotype, and co-administration of CBD and THC improves spatial memory in this amyloidosis mouse model.
3. Chronic treatment with low-doses THC, CBD, or CBD:THC increases insoluble A β ₁₋₄₂ peptide levels in the cerebral cortex of 5xFAD mice but does not alter the expression of inflammation related markers at either the mRNA or protein level.
4. Genetic inactivation of FAAH improves spatial learning and attenuates microgliosis in the context of amyloid pathology.
5. 5xFAD/FAAH^{-/-} mice have a transcriptomic profile characterized by a negative enrichment of the "AD" gene signature and, paradoxically, a positive enrichment of gene groups associated with the inflammatory response and the DAM microglial phenotype.
6. Genetic inactivation of FAAH in the context of amyloid pathology alters the expression of genes involved in microglial activation, such as NLRP3, TLR4, CSF1R, and CB2R, revealing a different gene profile of this cell type. Microglial ablation with PLX5622, both under physiological and pathological conditions, reduces the expression of microglial markers (NLRP3, TLR4, CSF1R, and CB2R) and markers of diverse cellular origin (IL1 α and IL1 β), suggesting heterocellular regulation by other glial and/or neuronal cells.
7. Treatment with PLX5622 allows differentiation between plaque-associated and non-plaque-associated microglia, showing significant changes in microglial morphology depending on its location relative to amyloid plaques. Although FAAH is not expressed in microglia, the enzyme inactivation alters microglial morphology. Specifically, plaque-associated 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} microglia has a more complex and stable morphology after treatment with PLX5622 compared to 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+} mice, which exhibits shorter, more spherical, and less branched processes.

8. 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{GFP/+} mice show increased A β peptide uptake by microglial cells and a stable volume of amyloid plaques compared to 5xFAD/CX3CR1^{GFP/+} mice when challenged with PLX5622.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Demencia. 2023 [cited 2023 Nov 4]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
2. Types of dementia - Queensland Brain Institute - University of Queensland. [cited 2024 Jun 24]. Available from: <https://qbi.uq.edu.au/brain/dementia/types-dementia>
3. Twarowski B, Herbet M. Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease—Pathomechanism, Diagnosis and Treatment: A Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7):1–28.
4. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell.* 2019 Oct;179(2):312–39.
5. Rawat P, Sehar U, Bisht J, Selman A, Culberson J, Reddy PH. Phosphorylated Tau in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct;23(21).
6. Xia X, Wang Y, Zheng J. COVID-19 and Alzheimer's disease: how one crisis worsens the other. *Transl Neurodegener.* 2021;10(1):15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00237-2>
7. Engelhardt E, Da Mota Gomes M. Alzheimer's 100th anniversary of death and his contribution to a better understanding of senile dementia. *Arq Neuropsiquiatr.* 2015;73(2):159–62.
8. Alzheimer A. über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die gesamte Neurol und Psychiatr.* 1911;4(1):356–85.
9. Toodayan N. Professor Alois Alzheimer (1864–1915): Lest we forget. *J Clin Neurosci.* 2016;31:47–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2015.12.032>
10. Grupo estatal de demencias. Plan Integral de Alzheimer y otras Demencias (2019-2023). *Minist Sanidad, Consum y Bienestar Soc.* 2019;13–91. Available from: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/docs/Plan_Integral_Alzheimer_Octubre_2019.pdf%0Awww.mscbs.gob.es
11. Fundación Alzheimer España. Cual es su frecuencia - Fundación Alzheimer España. 2019 [cited 2023 Nov 4]. Available from: <http://www.alzfae.org/fundacion/151/frecuencia-alzheimer>
12. Dorszewska J, Prendecki M, Oczkowska A, Dezor M, Kozubski W. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2016;13(9):952–63.
13. Guerchet M, Prince M. Chapter 12 - Dementia. *Neuroepidemiology Trop Heal.*

- 2018;155–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128046074000125>
14. Quan M, Cao S, Wang Q, Wang S, Jia J. Genetic Phenotypes of Alzheimer’s Disease: Mechanisms and Potential Therapy. *Phenomics*. 2023;3(4):333–49. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43657-023-00098-x>
 15. Roher AE, Maarouf CL, Kokjohn TA. Familial Presenilin Mutations and Sporadic Alzheimer’s Disease Pathology: Is the Assumption of Biochemical Equivalence Justified? *J Alzheimers Dis*. 2016;50(3):645–58.
 16. Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT. The Epidemiology of Alzheimer’s Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alzheimer’s Dis*. 2021;8(3):313–21.
 17. Cuyvers E, Sleegers K. Genetic variations underlying Alzheimer’s disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. *Lancet Neurol*. 2016 Jul;15(8):857–68.
 18. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer’s disease. *Nat Genet*. 2013 Dec;45(12):1452–8.
 19. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer’s disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2011 Mar;10(3):241–52.
 20. Andrews SJ, Fulton-Howard B, O’Reilly P, Marcora E, Goate AM. Causal Associations Between Modifiable Risk Factors and the Alzheimer’s Phenome. *Ann Neurol*. 2021 Jan;89(1):54–65.
 21. Najar J, Östling S, Gudmundsson P, Sundh V, Johansson L, Kern S, et al. Cognitive and physical activity and dementia: A 44-year longitudinal population study of women. *Neurology*. 2019 Mar;92(12):e1322–30.
 22. Sommerlad A, Sabia S, Singh-Manoux A, Lewis G, Livingston G. Association of social contact with dementia and cognition: 28-year follow-up of the Whitehall II cohort study. *PLoS Med*. 2019 Aug;16(8):e1002862.
 23. Diniz BS, Butters MA, Albert SM, Dew MA, Reynolds CF 3rd. Late-life depression and risk of vascular dementia and Alzheimer’s disease: systematic review and meta-analysis of community-based cohort studies. *Br J Psychiatry*. 2013 May;202(5):329–35.

24. Song H, Sieurin J, Wirdefeldt K, Pedersen NL, Almqvist C, Larsson H, et al. Association of Stress-Related Disorders With Subsequent Neurodegenerative Diseases. *JAMA Neurol.* 2020 Jun;77(6):700–9.
25. Xue M, Xu W, Ou Y-N, Cao X-P, Tan M-S, Tan L, et al. Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies. *Ageing Res Rev.* 2019 Nov;55:100944.
26. McGrath ER, Beiser AS, DeCarli C, Plourde KL, Vasan RS, Greenberg SM, et al. Blood pressure from mid- to late life and risk of incident dementia. *Neurology.* 2017 Dec;89(24):2447–54.
27. Schilling S, Tzourio C, Soumaré A, Kaffashian S, Dartigues J-F, Ancelin M-L, et al. Differential associations of plasma lipids with incident dementia and dementia subtypes in the 3C Study: A longitudinal, population-based prospective cohort study. *PLoS Med.* 2017 Mar;14(3):e1002265.
28. Tolppanen A-M, Ngandu T, Kåreholt I, Laatikainen T, Rusanen M, Soininen H, et al. Midlife and late-life body mass index and late-life dementia: results from a prospective population-based cohort. *J Alzheimers Dis.* 2014;38(1):201–9.
29. Kim D, Yang P-S, Yu HT, Kim T-H, Jang E, Sung J-H, et al. Risk of dementia in stroke-free patients diagnosed with atrial fibrillation: data from a population-based cohort. *Eur Heart J.* 2019 Jul;40(28):2313–23.
30. Mackay DF, Russell ER, Stewart K, MacLean JA, Pell JP, Stewart W. Neurodegenerative Disease Mortality among Former Professional Soccer Players. *N Engl J Med.* 2019 Nov;381(19):1801–8.
31. Kishimoto H, Ohara T, Hata J, Ninomiya T, Yoshida D, Mukai N, et al. The long-term association between physical activity and risk of dementia in the community: the Hisayama Study. *Eur J Epidemiol.* 2016 Mar;31(3):267–74.
32. Shi L, Chen S-J, Ma M-Y, Bao Y-P, Han Y, Wang Y-M, et al. Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev.* 2018 Aug;40:4–16.
33. Zhong G, Wang Y, Zhang Y, Guo JJ, Zhao Y. Smoking is associated with an increased risk of dementia: a meta-analysis of prospective cohort studies with investigation of potential effect modifiers. *PLoS One.* 2015;10(3):e0118333.

34. Langballe EM, Ask H, Holmen J, Stordal E, Saltvedt I, Selbæk G, et al. Alcohol consumption and risk of dementia up to 27 years later in a large, population-based sample: the HUNT study, Norway. *Eur J Epidemiol.* 2015 Sep;30(9):1049–56.
35. Calderón-Garcidueñas L, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Hammond J, Kulesza R, Lachmann I, et al. Quadruple abnormal protein aggregates in brainstem pathology and exogenous metal-rich magnetic nanoparticles (and engineered Ti-rich nanorods). The substantia nigrae is a very early target in young urbanites and the gastrointestinal tract a key brainstem. *Environ Res.* 2020 Dec;191:110139.
36. Grothe MJ, Sepulcre J, Gonzalez-Escamilla G, Jelistratova I, Schöll M, Hansson O, et al. Molecular properties underlying regional vulnerability to Alzheimer's disease pathology. *Brain.* 2018 Sep;141(9):2755–71.
37. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020;25(24):5789.
38. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2019;4(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>
39. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron.* 1991 Apr;6(4):487–98.
40. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Oct;12(10):383–8.
41. Bloom GS. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol.* 2014 Apr;71(4):505–8.
42. Durst F, Tropea C. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 2016;8(6):595–608. Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-81991-9_5
43. Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, et al. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Feb;87(4):1561–5.
44. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry.* 2021;26(10):5481–503.

45. Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci*. 2009 Dec;12(12):1567–76.
46. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, et al. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 2003 Mar;37(6):925–37.
47. Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*. 2009 Jul;325(5938):328–32.
48. Si K, Lindquist S, Kandel ER. A neuronal isoform of the alypsia CPEB has prion-like properties. *Cell*. 2003 Dec;115(7):879–91.
49. Fowler DM, Koulov A V, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol*. 2006 Jan;4(1):e6.
50. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2021;7(1):33.
51. Jan A, Gokce O, Luthi-Carter R, Lashuel HA. The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. *J Biol Chem*. 2008 Oct;283(42):28176–89.
52. Abcam. Beta-amyloid and tau in Alzheimer's disease. Abcam. 2023 [cited 2023 Dec 6]. Available from: <https://www.abcam.com/neuroscience/beta-amyloid-and-tau-in-alzheimers-disease#tau>
53. Golde TE. Alzheimer's disease - the journey of a healthy brain into organ failure. *Mol Neurodegener*. 2022 Mar;17(1):18.
54. Choi JW, Ju YH, Ju YH, Choi Y, Choi Y, Hyeon SJ, et al. PyrPeg, a Blood-Brain-Barrier-Penetrating Two-Photon Imaging Probe, Selectively Detects Neuritic Plaques, Not Tau Aggregates. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(12):1801–10.
55. Tong H, Lou K, Wang W. Near-infrared fluorescent probes for imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Jan;5(1):25–33.
56. Klunk WE, Bacskai BJ, Mathis CA, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, et al. Imaging A β plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol*.

- 2002;61(9):797–805.
57. Chen C, Liang Z, Zhou B, Li X, Lui C, Ip NY, et al. In Vivo Near-Infrared Two-Photon Imaging of Amyloid Plaques in Deep Brain of Alzheimer's Disease Mouse Model. *ACS Chem Neurosci*. 2018;9(12):3128–36.
 58. Mostany R, Portera-Cailliau C. A craniotomy surgery procedure for chronic brain imaging. *J Vis Exp*. 2008;5(12):2–3.
 59. Chen Y. Two-Photon Fluorescent Probes for Amyloid- β Plaques Imaging In Vivo. *Molecules*. 2023;28(17).
 60. Nordberg A, Carter SF, Rinne J, Drzezga A, Brooks DJ, Vandenberghe R, et al. A European multicentre PET study of fibrillar amyloid in Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013 Jan;40(1):104–14.
 61. Rabinovici GD, Furst AJ, O'Neil JP, Racine CA, Mormino EC, Baker SL, et al. 11C-PIB PET imaging in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*. 2007;68(15):1205–12.
 62. Yamin G, Teplow DB. Pittsburgh Compound-B (PiB) binds amyloid β -protein protofibrils. *J Neurochem*. 2017 Jan;140(2):210–5.
 63. Röhr D, Boon BDC, Schuler M, Kremer K, Hoozemans JJM, Bouwman FH, et al. Label-free vibrational imaging of different A β plaque types in Alzheimer's disease reveals sequential events in plaque development. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01091-5>
 64. Xu G, Fromholt S, Borchelt DR. Modeling the Competition between Misfolded A β Conformers That Produce Distinct Types of Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease. *Biomolecules*. 2022 Jun;12(7).
 65. Xu G, Fromholt SE, Chakrabarty P, Zhu F, Liu X, Pace MC, et al. Diversity in A β deposit morphology and secondary proteome insolubility across models of Alzheimer-type amyloidosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2020 Apr;8(1):43.
 66. Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, et al. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*. 2006 Sep;313(5794):1781–4.
 67. Tsering W, Prokop S. Neuritic Plaques — Gateways to Understanding Alzheimer's

- Disease. *Mol Neurobiol.* 2024;61(5):2808–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03736-7>
68. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem.* 2009 May;284(19):12845–52.
 69. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 2009 Jul;11(7):909–13.
 70. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.* 2004 Apr;84(2):361–84.
 71. LaPointe NE, Morfini G, Pigino G, Gaisina IN, Kozikowski AP, Binder LI, et al. The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. *J Neurosci Res.* 2009 Feb;87(2):440–51.
 72. Xia D, Li C, Götz J. Pseudophosphorylation of Tau at distinct epitopes or the presence of the P301L mutation targets the microtubule-associated protein Tau to dendritic spines. *Biochim Biophys Acta.* 2015 May;1852(5):913–24.
 73. Neddens J, Temmel M, Flunkert S, Kerschbaumer B, Hoeller C, Loeffler T, et al. Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Jun;6(1):52.
 74. Gu J, Liu F. Tau in Alzheimer ' s Disease : Pathological Alterations and an Attractive. *Curr Med Sci.* 2020;40(6):1009–21.
 75. Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Thirumalai D, Palaniappan B. Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player. *Int J Biol Macromol.* 2020;163:1599–617. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.327>
 76. Riley KP, Snowdon DA, Markesbery WR. Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: findings from the Nun Study. *Ann Neurol.* 2002 May;51(5):567–77.
 77. Braak H, Del Tredici K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Alzheimer's disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2015;215:1–162.
 78. Kwon HS, Koh S-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* 2020 Nov;9(1):42.

79. Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, et al. Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia*. 2018 Mar;66(3):637–53.
80. McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG. Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol*. 1988;76(6):550–7.
81. Prokop S, Miller KR, Heppner FL. Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2013 Oct;126(4):461–77.
82. Maccioni RB, González A, Andrade V, Cortés N, Tapia JP, Guzmán-Martínez L. Alzheimer's Disease in the Perspective of Neuroimmunology. *Open Neurol J*. 2018;12(1):50–6.
83. Morales I, Farías G, Maccioni RB. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(3):202–4.
84. Pensalfini A, Albay R 3rd, Rasool S, Wu JW, Hatami A, Arai H, et al. Intracellular amyloid and the neuronal origin of Alzheimer neuritic plaques. *Neurobiol Dis*. 2014 Nov;71:53–61.
85. Sosna J, Philipp S, Albay R 3rd, Reyes-Ruiz JM, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM, et al. Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2018 Mar;13(1):11.
86. Qin Q, Teng Z, Liu C, Li Q, Yin Y, Tang Y. TREM2, microglia, and Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2021;195(December 2020):111438. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111438>
87. Leyns CEG, Gratuze M, Narasimhan S, Jain N, Koscal LJ, Jiang H, et al. TREM2 function impedes tau seeding in neuritic plaques. *Nat Neurosci*. 2019 Aug;22(8):1217–22.
88. Jain N, Lewis CA, Ulrich JD, Holtzman DM. Chronic TREM2 activation exacerbates A β -associated tau seeding and spreading. *J Exp Med*. 2023 Jan;220(1).
89. Porsteinsson AP, Isaacson RS, Knox S, Sabbagh MN, Rubino I. Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *J Prev Alzheimer's Dis*. 2021;8(3):371–86.

90. Insel PS, Weiner M, Mackin RS, Mormino E, Lim YY, Stomrud E, et al. Determining clinically meaningful decline in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 2019 Jul;93(4):e322–33.
91. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement*. 2019 Jul;15(7):888–98.
92. Cho SH, Woo S, Kim C, Kim HJ, Jang H, Kim BC, et al. Disease progression modelling from preclinical Alzheimer's disease (AD) to AD dementia. *Sci Rep*. 2021 Feb;11(1):4168.
93. Kazim SF, Iqbal K. Neurotrophic factor small-molecule mimetics mediated neuroregeneration and synaptic repair: emerging therapeutic modality for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2016 Jul;11(1):50.
94. Jack CRJ, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018 Apr;14(4):535–62.
95. Beata BK, Wojciech J, Johannes K, Piotr L, Barbara M. Alzheimer's Disease—Biochemical and Psychological Background for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2).
96. Okamura H, Otani M, Shimoyama N, Fujii T. Combined Exercise and Cognitive Training System for Dementia Patients: A Randomized Controlled Trial. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2018;45(5–6):318–25.
97. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan E. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34(7):939.
98. Scheltens P, Strooper B De, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. 2021;397(10284):1577–90.
99. Cummings J, Zhou Y, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Cheng F. [Not Available]. *Alzheimer's Dement (New York, N Y)*. 2024;10(2):e12465.
100. 2024 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*. 2024;20(5):3708–821.
101. Ralph SJ, Espinet AJ. Increased All-Cause Mortality by Antipsychotic Drugs: Updated

- Review and Meta-Analysis in Dementia and General Mental Health Care. *J Alzheimer's Dis reports*. 2018 Feb;2(1):1–26.
102. Watt JA, Goodarzi Z, Veroniki AA, Nincic V, Khan PA, Ghassemi M, et al. Comparative Efficacy of Interventions for Aggressive and Agitated Behaviors in Dementia: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2019 Nov;171(9):633–42.
103. Blinzinger K, Kreutzberg G. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Zeitschrift fur Zellforsch und mikroskopische Anat (Vienna, Austria 1948)*. 1968;85(2):145–57.
104. Monteiro AR, Barbosa DJ, Remião F, Silva R. Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs. *Biochem Pharmacol*. 2023;211(March).
105. Lana D, Ugolini F, Giovannini MG. Space-Dependent Glia-Neuron Interplay in the Hippocampus of Transgenic Models of β -Amyloid Deposition. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec;21(24).
106. Vainchtein ID, Molofsky A V. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci*. 2020 Mar;43(3):144–54.
107. Soelter TM, Howton TC, Clark AD, Oza VH, Lasseigne BN. Altered Glia-Neuron Communication in Alzheimer's Disease Affects WNT, p53, and NF κ B Signaling Determined by snRNA-seq. *bioRxiv: the preprint server for biology*. United States; 2024.
108. Bigbee JW. *Cells of the Central Nervous System: An Overview of Their Structure and Function*. :41–64.
109. Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DWJ, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1996 Jul;16(14):4491–500.
110. Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussière T, Bouras C, Kövari E, Perl DP, et al. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*. 2003 May;60(9):1495–500.
111. Mukhin VN, Pavlov KI, Klimenko VM. Mechanisms of neuron loss in Alzheimer's disease. *Neurosci Behav Physiol*. 2017;47:508–16.

112. Huffels CFM, Middeldorp J, Hol EM. A β Pathology and Neuron–Glia Interactions: A Synaptocentric View. *Neurochem Res.* 2023;48(4):1026–46. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03699-6>
113. Czapski GA, Strosznajder JB. Glutamate and GABA in Microglia-Neuron Cross-Talk in Alzheimer ' s Disease. 2021;
114. Garaschuk O, Verkhratsky A. GABAergic astrocytes in Alzheimer's disease. Vol. 11, *Aging.* United States; 2019. p. 1602–4.
115. Perez-Nievas BG, Serrano-Pozo A. Deciphering the Astrocyte Reaction in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:114.
116. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol.* 2016 Sep;37(9):608–20.
117. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* 2017 Jun;46(6):957–67.
118. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell.* 2009 Apr;137(1):47–59.
119. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017 Jan;541(7638):481–7.
120. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010 Mar;140(6):918–34.
121. Qian Y, Liu C, Hartupée J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol.* 2007 Mar;8(3):247–56.
122. Oksanen M, Lehtonen S, Jaronen M, Goldsteins G, Hämäläinen RH, Koistinaho J. Astrocyte alterations in neurodegenerative pathologies and their modeling in human induced pluripotent stem cell platforms. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Jul;76(14):2739–60.
123. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* 2020;9(1):1–12.
124. Uddin MS, Kabir MT, Mamun A Al, Barreto GE, Rashid M, Perveen A, et al.

- Pharmacological approaches to mitigate neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int Immunopharmacol.* 2020 Jul;84:106479.
125. Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front Pharmacol.* 2019;10:1114.
126. Li K, Li J, Zheng J, Qin S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis.* 2019 Jun;10(3):664–75.
127. Carter SF, Herholz K, Rosa-Neto P, Pellerin L, Nordberg A, Zimmer ER. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med.* 2019 Feb;25(2):77–95.
128. González-Reyes RE, Nava-Mesa MO, Vargas-Sánchez K, Ariza-Salamanca D, Mora-Muñoz L. Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:427.
129. Johnston JM, Burnett P, Thomas AP, Tezapsidis N. Calcium oscillations in type-1 astrocytes, the effect of a presenilin 1 (PS1) mutation. *Neurosci Lett.* 2006 Mar;395(2):159–64.
130. Oksanen M, Hyötyläinen I, Trontti K, Rolova T, Wojciechowski S, Koskivi M, et al. NF-E2-related factor 2 activation boosts antioxidant defenses and ameliorates inflammatory and amyloid properties in human Presenilin-1 mutated Alzheimer's disease astrocytes. *Glia.* 2020 Mar;68(3):589–99.
131. Batarseh YS, Duong Q-V, Mousa YM, Al Rihani SB, Elfakhri K, Kaddoumi A. Amyloid- β and Astrocytes Interplay in Amyloid- β Related Disorders. *Int J Mol Sci.* 2016 Mar;17(3):338.
132. Al-ghraybah NF, Wang J, Alkhalifa AE, Roberts AB, Raj R, Yang E, et al. Glial Cell-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. 2022;1–29.
133. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2009 Apr;29(13):3974–80.
134. Sierra A, Paolicelli RC, Kettenmann H. Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends Neurosci.* 2019;42(11):778–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.004>
135. KERSHMAN J. GENESIS OF MICROGLIA IN THE HUMAN BRAIN. *Arch Neurol Psychiatry.*

- 1939 Jan 1;41(1):24–50. Available from: <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1939.02270130034002>
136. Andjelkovic A V, Nikolic B, Pachter JS, Zecevic N. Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 1998 Dec;814(1–2):13–25.
 137. Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay ME, Aguzzi A, Ajami B, et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron.* 2022;110(21):3458–83.
 138. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Mar;113(12):E1738–46.
 139. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci.* 2014 Jan;17(1):131–43.
 140. Buttgereit A, Lelios I, Yu X, Vrohings M, Krakoski NR, Gautier EL, et al. Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. *Nat Immunol.* 2016 Dec;17(12):1397–406.
 141. Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018 Apr;18(4):225–42.
 142. Wendimu MY, Hooks SB. Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells.* 2022;11(13).
 143. de Waard DM, Bugiani M. Astrocyte-Oligodendrocyte-Microglia Crosstalk in Astrocytopathies. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:608073.
 144. Easley-Neal C, Foreman O, Sharma N, Zarrin AA, Weimer RM. CSF1R Ligands IL-34 and CSF1 Are Differentially Required for Microglia Development and Maintenance in White and Gray Matter Brain Regions. *Front Immunol.* 2019;10:2199.
 145. Elmore MRP, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron.* 2014 Apr;82(2):380–97.
 146. Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and

- microglia. *Nat Immunol.* 2012 Jun;13(8):753–60.
147. Hatori K, Nagai A, Heisel R, Ryu JK, Kim SU. Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *J Neurosci Res.* 2002 Aug;69(3):418–26.
148. Pawelec P, Ziemka-Nalecz M, Sypecka J, Zalewska T. The Impact of the CX3CL1/CX3CR1 Axis in Neurological Disorders. *Cells.* 2020 Oct;9(10).
149. Parakalan R, Jiang B, Nimmi B, Janani M, Jayapal M, Lu J, et al. Transcriptome analysis of amoeboid and ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain. *BMC Neurosci.* 2012 Jun;13:64.
150. Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol.* 2009 May;210(1–2):3–12.
151. Song GJ, Suk K. Pharmacological Modulation of Functional Phenotypes of Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:139.
152. Gratuze M, Leyns CEG, Holtzman DM. New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2018 Dec;13(1):66.
153. Hamelin L, Lagarde J, Dorothée G, Leroy C, Labit M, Comley RA, et al. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain.* 2016 Apr;139(Pt 4):1252–64.
154. Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nat Commun.* 2015 Jan;6:6176.
155. Merlo S, Spampinato SF, Beneventano M, Sortino MA. The contribution of microglia to early synaptic compensatory responses that precede β -amyloid-induced neuronal death. *Sci Rep.* 2018 May;8(1):7297.
156. Fan Z, Brooks DJ, Okello A, Edison P. An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. *Brain.* 2017 Mar;140(3):792–803.
157. Hanslik KL, Ulland TK. The Role of Microglia and the Nlrp3 Inflammasome in Alzheimer's Disease. *Front Neurol.* 2020;11:570711.
158. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, et al.

- NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013 Jan;493(7434):674–8.
159. Venegas C, Kumar S, Franklin BS, Dierkes T, Brinkschulte R, Tejera D, et al. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature*. 2017 Dec;552(7685):355–61.
160. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*. 2016 May;352(6286):712–6.
161. Stephan AH, Barres BA, Stevens B. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:369–89.
162. Webster SD, Yang AJ, Margol L, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Tenner AJ. Complement component C1q modulates the phagocytosis of Abeta by microglia. *Exp Neurol*. 2000 Jan;161(1):127–38.
163. Shi Q, Chowdhury S, Ma R, Le KX, Hong S, Caldarone BJ, et al. Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice. *Sci Transl Med*. 2017 May;9(392).
164. Shi Q, Colodner KJ, Matousek SB, Merry K, Hong S, Kenison JE, et al. Complement C3-Deficient Mice Fail to Display Age-Related Hippocampal Decline. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2015 Sep;35(38):13029–42.
165. Mendes MS, Majewska AK. An overview of microglia ontogeny and maturation in the homeostatic and pathological brain. *Eur J Neurosci*. 2021;53(11):3525–47.
166. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseon F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015 Apr;14(4):388–405.
167. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*. 2017 Jun;169(7):1276-1290.e17.
168. Wang W-Y, Tan M-S, Yu J-T, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med*. 2015 Jun;3(10):136.
169. Lee CYD, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J*

- Neural Transm. 2010 Aug;117(8):949–60.
170. Yu Y, Ye RD. Microglial A β receptors in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2015 Jan;35(1):71–83.
 171. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.* 2010 Feb;11(2):155–61.
 172. Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, et al. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2012 Apr;122(4):1377–92.
 173. Yang J, Wise L, Fukuchi KI. TLR4 Cross-Talk With NLRP3 Inflammasome and Complement Signaling Pathways in Alzheimer's Disease. *Front Immunol.* 2020;11(April):1–16.
 174. Tarale P, Alam MM. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling in the central nervous system and the potential of its pharmacological inhibitors to halt the progression of neurological disorders. *Inflammopharmacology.* 2022;30(3):821–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-022-00958-4>
 175. Unger MS, Schernthaner P, Marschallinger J, Mrowetz H, Aigner L. Microglia prevent peripheral immune cell invasion and promote an anti-inflammatory environment in the brain of APP-PS1 transgenic mice. *J Neuroinflammation.* 2018 Sep;15(1):274.
 176. Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, Crapser J, Zhang J, Burton EA, et al. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun.* 2019 Aug;10(1):3758.
 177. Clayton K, Delpech JC, Herron S, Saito T, Ikezu S, Saido TC, et al. CSF1R inhibitor abrogates tau propagation exacerbated in APPNL-G-F knock-in mice but enhances fibrillar beta-amyloidosis and dystrophic neurite formation in the brain: Development of new models and analysis methods/neuroinflammation. *Alzheimer's Dement.* 2020;16:e040958.
 178. Casali BT, MacPherson KP, Reed-Geaghan EG, Landreth GE. Microglia depletion rapidly and reversibly alters amyloid pathology by modification of plaque compaction and morphologies. *Neurobiol Dis.* 2020 Aug;142:104956.
 179. Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. Disease-

- Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*. 2018 May;173(5):1073–81.
180. Grubman A, Choo XY, Chew G, Ouyang JF, Sun G, Croft NP, et al. Transcriptional signature in microglia associated with A β plaque phagocytosis. *Nat Commun*. 2021 May;12(1):3015.
181. Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, et al. The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*. 2017 Sep;47(3):566-581.e9.
182. Olah M, Menon V, Habib N, Taga MF, Ma Y, Yung CJ, et al. Single cell RNA sequencing of human microglia uncovers a subset associated with Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 2020 Nov;11(1):6129.
183. Srinivasan K, Friedman BA, Etxeberria A, Huntley MA, van der Brug MP, Foreman O, et al. Alzheimer's Patient Microglia Exhibit Enhanced Aging and Unique Transcriptional Activation. *Cell Rep*. 2020 Jun;31(13):107843.
184. Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng Z, Gao F, Mohammadi S, Young JZ, et al. Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature*. 2019 Jun;570(7761):332–7.
185. Hasselmann J, Coburn MA, England W, Figueroa Velez DX, Kiani Shabestari S, Tu CH, et al. Development of a Chimeric Model to Study and Manipulate Human Microglia In Vivo. *Neuron*. 2019 Sep;103(6):1016-1033.e10.
186. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Böttcher C, Amann L, Sagar, et al. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature*. 2019 Feb;566(7744):388–92.
187. Reddaway J, Richardson PE, Bevan RJ, Stoneman J, Palombo M. Microglial morphometric analysis: so many options, so little consistency. *Front Neuroinform*. 2023;17(August):1–17.
188. Sierra A, Paolicelli RC, Kettenmann H. Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends Neurosci*. 2019 Nov;42(11):778–92.
189. Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay M-E, Aguzzi A, Ajami B, et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*. 2022 Nov;110(21):3458–83.

190. Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, et al. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2008 Apr;28(16):4283–92.
191. Ohm DT, Fought AJ, Martersteck A, Coventry C, Sridhar J, Gefen T, et al. Accumulation of neurofibrillary tangles and activated microglia is associated with lower neuron densities in the aphasic variant of Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2021 Jan;31(1):189–204.
192. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May;308(5726):1314–8.
193. Glenn JA, Ward SA, Stone CR, Booth PL, Thomas WE. Characterisation of ramified microglial cells: detailed morphology, morphological plasticity and proliferative capability. *J Anat*. 1992 Feb;180 (Pt 1(Pt 1):109–18.
194. Leyh J, Paeschke S, Mages B, Michalski D, Nowicki M, Bechmann I, et al. Classification of Microglial Morphological Phenotypes Using Machine Learning. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:701673.
195. Savage JC, Carrier M, Tremblay M-È. Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. *Methods Mol Biol*. 2019;2034:13–26.
196. Fernández-Arjona MDM, Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos MD. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:235.
197. Ziebell JM, Adelson PD, Lifshitz J. Microglia: dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury. *Metab Brain Dis*. 2015 Apr;30(2):393–400.
198. Au NPB, Ma CHE. Recent Advances in the Study of Bipolar/Rod-Shaped Microglia and their Roles in Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:128.
199. Tam WY, Ma CHE. Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci Rep*. 2014 Dec;4:7279.
200. Ziebell JM, Taylor SE, Cao T, Harrison JL, Lifshitz J. Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *J Neuroinflammation*. 2012 Oct;9:247.

201. Savage JC, Picard K, González-Ibáñez F, Tremblay M-È. A Brief History of Microglial Ultrastructure: Distinctive Features, Phenotypes, and Functions Discovered Over the Past 60 Years by Electron Microscopy. *Front Immunol.* 2018;9:803.
202. Giulian D, Baker TJ. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1986 Aug;6(8):2163–78.
203. Lazarewicz JW, Salinska E, Wroblewski JT. NMDA receptor-mediated arachidonic acid release in neurons: role in signal transduction and pathological aspects. *Adv Exp Med Biol.* 1992;318:73–89.
204. Holloway OG, Canty AJ, King AE, Ziebell JM. Rod microglia and their role in neurological diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2019 Oct;94:96–103.
205. Alzheimer's Disease Research Models | ALZFORUM. [cited 2023 Dec 27]. Available from: <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>
206. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature.* 1995 Feb;373(6514):523–7.
207. Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, De Strooper B, et al. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J.* 2017 Sep;36(17):2473–87.
208. Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet.* 2014;5:88.
209. Martini AC, Forner S, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. Past to Future: What Animal Models Have Taught Us About Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;64(s1):S365–78.
210. Götz J, Bodea L-G, Goedert M. Rodent models for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018 Oct;19(10):583–98.
211. Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Sanchez-Varo R, Garcia-Leon JA, Nuñez-Diaz C, Davila JC, et al. Animal and Cellular Models of Alzheimer's Disease: Progress, Promise, and Future Approaches. *Neurosci a Rev J bringing Neurobiol Neurol psychiatry.* 2022 Dec;28(6):572–93.
212. Sanchez-Varo R, Mejias-Ortega M, Fernandez-Valenzuela JJ, Nuñez-Diaz C, Caceres-

- Palomo L, Vegas-Gomez L, et al. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: An Integrative Analysis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):1–46.
213. Nakai T, Yamada K, Mizoguchi H. Alzheimer's disease animal models: Elucidation of biomarkers and therapeutic approaches for cognitive impairment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
214. Yokoyama M, Kobayashi H, Tatsumi L, Tomita T. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci.* 2022;15(June):1–14.
215. Zhang SS, Zhang NN, Guo TT, Sheen LY, Ho CT, Bai NS. The impact of phyto- and endo-cannabinoids on central nervous system diseases : A review. *J Tradit Complement Med.* 2023;13(1):30–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2022.10.004>
216. Crocq MA. History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues Clin Neurosci.* 2020;22(3):223–8.
217. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(1):9–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>
218. Pintori N, Caria F, De Luca MA, Miliano C. THC and CBD: Villain versus Hero? Insights into Adolescent Exposure. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).
219. Urits I, Charipova K, Gress K, Li N, Berger AA, Cornett EM, et al. Adverse Effects of Recreational and Medical Cannabis. *Psychopharmacol Bull.* 2021 Jan;51(1):94–109.
220. Legare CA, Raup-Konsavage WM, Vrana KE. Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals. *Pharmacology.* 2022;107(3–4):131–49.
221. Walsh Z, Callaway R, Belle-Isle L, Capler R, Kay R, Lucas P, et al. Cannabis for therapeutic purposes: patient characteristics, access, and reasons for use. *Int J Drug Policy.* 2013 Nov;24(6):511–6.
222. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006 Jun;28(2):153–7.
223. Schlimme J, Rada D, Schneider U. [Cannabis consumption and its psychosocial effects in a comparison of different cultures]. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2001 Aug;69(8):367–73.

224. Woelkart K, Salo-Ahen OMH, Bauer R. CB receptor ligands from plants. *Curr Top Med Chem.* 2008;8(3):173–86.
225. Mechoulam R, Gaoni Y. A TOTAL SYNTHESIS OF DL-DELTA-1-TETRAHYDROCANNABINOL, THE ACTIVE CONSTITUENT OF HASHISH. *J Am Chem Soc.* 1965 Jul;87:3273–5.
226. Rezende B, Alencar AKN, de Bem GF, Fontes-Dantas FL, Montes GC. Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Pharmaceuticals.* 2023;16(2).
227. Leweke FM. Anandamide dysfunction in prodromal and established psychosis. *Curr Pharm Des.* 2012;18(32):5188–93.
228. Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging.* 2021;6(6):607–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
229. Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988 Nov;34(5):605–13.
230. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993 Sep;365(6441):61–5.
231. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995 Jun;50(1):83–90.
232. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 1992 Dec;258(5090):1946–9.
233. Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem.* 2004 Feb;279(7):5298–305.
234. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 1996 Nov;384(6604):83–7.
235. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, et al. Brain

- monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug;99(16):10819–24.
236. Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*. 2003 Nov;163(3):463–8.
237. Abuhasira R, Schleider LB-L, Mechoulam R, Novack V. Epidemiological characteristics, safety and efficacy of medical cannabis in the elderly. *Eur J Intern Med*. 2018 Mar;49:44–50.
238. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov*. 2008 May;7(5):438–55.
239. dos Reis Rosa Franco G, Smid S, Viegas C. Phytocannabinoids: General Aspects and Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2020;19(4):449–64.
240. Lewis MM, Yang Y, Wasilewski E, Clarke HA, Kotra LP. Chemical Profiling of Medical Cannabis Extracts. *ACS omega*. 2017 Sep;2(9):6091–103.
241. Pertwee R. Pharmacological actions of cannabinoids. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010;(20):S205.
242. Elsohly MA, Gul W, Wanas AS, Radwan MM. Synthetic cannabinoids: analysis and metabolites. *Life Sci*. 2014 Feb;97(1):78–90.
243. Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Oct;30(10):515–27.
244. Freeman TP, Morgan CJA, Hindocha C, Schafer G, Das RK, Curran HV. Just say “know”: how do cannabinoid concentrations influence users’ estimates of cannabis potency and the amount they roll in joints? *Addiction*. 2014 Oct;109(10):1686–94.
245. Di Forti M, Morgan C, Dazzan P, Pariante C, Mondelli V, Marques TR, et al. High-potency cannabis and the risk of psychosis. *Br J Psychiatry*. 2009 Dec;195(6):488–91.
246. Pagano C, Navarra G, Coppola L, Avilia G, Bifulco M, Laezza C. Cannabinoids: Therapeutic Use in Clinical Practice. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar;23(6).
247. Pennypacker SD, Romero-Sandoval EA. CBD and THC: Do They Complement Each

- Other Like Yin and Yang? Vol. 40, *Pharmacotherapy*. 2020. 1152–1165 p.
248. Devinsky O, Cross JH, Wright S. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. Vol. 377, *The New England journal of medicine*. United States; 2017. p. 699–700.
249. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol*. 2008 Jan;153(2):199–215.
250. Gómez-Ruiz M, Hernández M, de Miguel R, Ramos JA. An overview on the biochemistry of the cannabinoid system. *Mol Neurobiol*. 2007 Aug;36(1):3–14.
251. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*. 2009 Jan;89(1):309–80.
252. Behl T, Makkar R, Sehgal A, Singh S, Makeen HA, Albratty M, et al. Exploration of Multiverse Activities of Endocannabinoids in Biological Systems. *Int J Mol Sci*. 2022;23(10).
253. Giuffrida A, Beltramo M, Piomelli D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jul;298(1):7–14.
254. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Science (80-)*. 2002 Apr 26;296(5568):678–82. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1063545>
255. Tsuboi K, Uyama T, Okamoto Y, Ueda N. Endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines: Biological activities and metabolism Makoto Murakami. *Inflamm Regen*. 2018;38(1):1–10.
256. Mock ED, Gagestein B, van der Stelt M. Anandamide and other N-acyl ethanolamines: A class of signaling lipids with therapeutic opportunities. *Prog Lipid Res*. 2023;89(September 2022):101194. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101194>
257. Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, et al. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature*. 2003 Sep;425(6953):90–3.
258. Gabrielsson L, Mattsson S, Fowler CJ. Palmitoylethanolamide for the treatment of pain:

- pharmacokinetics, safety and efficacy. *Br J Clin Pharmacol*. 2016 Oct;82(4):932–42.
259. Petrosino S, Di Marzo V. The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations. *Br J Pharmacol*. 2017 Jun;174(11):1349–65.
260. Mattace Raso G, Russo R, Calignano A, Meli R. Palmitoylethanolamide in CNS health and disease. *Pharmacol Res*. 2014 Aug;86:32–41.
261. Komorowska-Müller JA, Schmöle AC. CB2 receptor in microglia: The guardian of self-control. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):1–27.
262. Wootten D, Christopoulos A, Marti-Solano M, Babu MM, Sexton PM. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Oct;19(10):638–53.
263. Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol*. 2015 Oct;172(20):4790–805.
264. Di Forti M, Quattrone D, Freeman TP, Tripoli G, Gayer-Anderson C, Quigley H, et al. The contribution of cannabis use to variation in the incidence of psychotic disorder across Europe (EU-GEI): a multicentre case-control study. *The Lancet Psychiatry*. 2019 May;6(5):427–36.
265. Köfalvi A, Moreno E, Cordoní A, Cai N-S, Fernández-Dueñas V, Ferreira SG, et al. Control of glutamate release by complexes of adenosine and cannabinoid receptors. *BMC Biol*. 2020 Jan;18(1):9.
266. Bushlin I, Gupta A, Stockton SDJ, Miller LK, Devi LA. Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PLoS One*. 2012;7(12):e49789.
267. Khanolkar AD, Palmer SL, Makriyannis A. Molecular probes for the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids*. 2000 Nov;108(1–2):37–52.
268. Wiley JL, Martin BR. Cannabinoid pharmacology: implications for additional cannabinoid receptor subtypes. *Chem Phys Lipids*. 2002 Dec;121(1–2):57–63.
269. Howlett AC, Abood ME. CB(1) and CB(2) Receptor Pharmacology. *Adv Pharmacol*. 2017;80:169–206.

270. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 1997;74(2):129–80.
271. Bacci A, Huguenard JR, Prince DA. Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature.* 2004 Sep;431(7006):312–6.
272. Bénard G, Massa F, Puente N, Lourenço J, Bellocchio L, Soria-Gómez E, et al. Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci.* 2012 Mar;15(4):558–64.
273. Kreitzer AC, Carter AG, Regehr WG. Inhibition of interneuron firing extends the spread of endocannabinoid signaling in the cerebellum. *Neuron.* 2002 May;34(5):787–96.
274. Maroso M, Szabo GG, Kim HK, Alexander A, Bui AD, Lee S-H, et al. Cannabinoid Control of Learning and Memory through HCN Channels. *Neuron.* 2016 Mar;89(5):1059–73.
275. Nyíri G, Cserép C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF. CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience.* 2005;136(3):811–22.
276. Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging.* 2021;6(6):607–15.
277. Navarrete M, Araque A. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron.* 2008 Mar;57(6):883–93.
278. Kienzl M, Kargl J, Schicho R. The Immune Endocannabinoid System of the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov;21(23).
279. Stasiulewicz A, Znajdek K, Grudzień M, Pawiński T, Sulkowska AJI. A Guide to Targeting the Endocannabinoid System in Drug Design. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr;21(8).
280. Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T, Melck D. Metabolism of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: an historical overview and some recent developments. *Lipids.* 1999;34 Suppl:S319-25.
281. Viader A, Ogasawara D, Joslyn CM, Sanchez-Alavez M, Mori S, Nguyen W, et al. A chemical proteomic atlas of brain serine hydrolases identifies cell type-specific pathways regulating neuroinflammation. *Elife.* 2016 Jan;5:e12345.
282. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.*

- 1994 Dec;372(6507):686–91.
283. Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S, Gertsch J. Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem*. 2012 Oct;287(41):34660–82.
284. Reynoso-Moreno I, Tietz S, Vallini E, Engelhardt B, Gertsch J, Chicca A. Selective Endocannabinoid Reuptake Inhibitor WOBE437 Reduces Disease Progression in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2021;4(2):765–79.
285. Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*. 2007 Dec;14(12):1347–56.
286. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul;98(16):9371–6.
287. Nomura DK, Morrison BE, Blankman JL, Long JZ, Kinsey SG, Marcondes MCG, et al. Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science*. 2011 Nov;334(6057):809–13.
288. Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem*. 1997 Oct;272(43):27218–23.
289. Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, et al. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*. 2004 Jul;20(2):441–58.
290. Deng H, Li W. Monoacylglycerol lipase inhibitors: modulators for lipid metabolism in cancer malignancy, neurological and metabolic disorders. *Acta Pharm Sin B*. 2020 Apr;10(4):582–602.
291. Bertrand T, Augé F, Houtmann J, Rak A, Vallée F, Mikol V, et al. Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition. *J Mol Biol*. 2010 Feb;396(3):663–73.
292. Ren S-Y, Wang Z-Z, Zhang Y, Chen N-H. Potential application of endocannabinoid system agents in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases-focusing on

- FAAH/MAGL inhibitors. *Acta Pharmacol Sin.* 2020 Oct;41(10):1263–71.
293. Gil-Ordóñez A, Martín-Fontecha M, Ortega-Gutiérrez S, López-Rodríguez ML. Monoacylglycerol lipase (MAGL) as a promising therapeutic target. *Biochem Pharmacol.* 2018 Nov;157:18–32.
294. Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev.* 2008 May;108(5):1687–707.
295. Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem.* 2006 Dec;281(48):36569–78.
296. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015 Jan;347(6220):1260419.
297. Ueda N, Puffenbarger RA, Yamamoto S, Deutsch DG. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem Phys Lipids.* 2000 Nov;108(1–2):107–21.
298. Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* 2005;40(1):2–14.
299. Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66(2–3):201–10.
300. Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, et al. Cannabinoid CB2 Receptors and Fatty Acid Amide Hydrolase Are Selectively Overexpressed in Neuritic Plaque-Associated Glia in Alzheimer's Disease Brains. *J Neurosci.* 2003;23(35):11136–41.
301. Ahn K, Johnson DS, Mileni M, Beidler D, Long JZ, McKinney MK, et al. Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain. *Chem Biol.* 2009 Apr;16(4):411–20.
302. Jhaveri MD, Richardson D, Kendall DA, Barrett DA, Chapman V. Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2006 Dec;26(51):13318–27.
303. Lichtman AH, Leung D, Shelton CC, Saghatelian A, Hardouin C, Boger DL, et al.

- Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Nov;311(2):441–8.
304. Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, et al. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med.* 2003 Jan;9(1):76–81.
305. Schuelert N, Johnson MP, Oskins JL, Jassal K, Chambers MG, McDougall JJ. Local application of the endocannabinoid hydrolysis inhibitor URB597 reduces nociception in spontaneous and chemically induced models of osteoarthritis. *Pain.* 2011 May;152(5):975–81.
306. Jayamanne A, Greenwood R, Mitchell VA, Aslan S, Piomelli D, Vaughan CW. Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br J Pharmacol.* 2006 Feb;147(3):281–8.
307. Piomelli D, Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Mor M, Compton TR, et al. Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev.* 2006;12(1):21–38.
308. Johnson DS, Stiff C, Lazerwith SE, Kesten SR, Fay LK, Morris M, et al. Discovery of PF-04457845: A Highly Potent, Orally Bioavailable, and Selective Urea FAAH Inhibitor. *ACS Med Chem Lett.* 2011 Feb;2(2):91–6.
309. Van Egmond N, Straub VM, Van Der Stelt M. Targeting Endocannabinoid Signaling: FAAH and MAG Lipase Inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2021;61:441–63.
310. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Sep;3(9):771–84.
311. Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2005 Feb;25(8):1904–13.
312. Manuel I, González de San Román E, Giralt MT, Ferrer I, Rodríguez-Puertas R. Type-1 cannabinoid receptor activity during Alzheimer's disease progression. *J Alzheimers Dis.* 2014;42(3):761–6.
313. Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, et al. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic

- plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2003 Dec;23(35):11136–41.
314. Tolón RM, Núñez E, Pazos MR, Benito C, Castillo AI, Martínez-Orgado JA, et al. The activation of cannabinoid CB2 receptors stimulates in situ and in vitro beta-amyloid removal by human macrophages. *Brain Res*. 2009 Aug;1283:148–54.
315. Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience*. 1994 Dec;63(3):637–52.
316. Farooqui AA, Liss L, Horrocks LA. Neurochemical aspects of Alzheimer's disease: involvement of membrane phospholipids. *Metab Brain Dis*. 1988 Mar;3(1):19–35.
317. Mulder J, Zilberter M, Pasquaré SJ, Alpár A, Schulte G, Ferreira SG, et al. Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. *Brain*. 2011 Apr;134(Pt 4):1041–60.
318. Jung K-M, Astarita G, Yasar S, Vasilevko V, Cribbs DH, Head E, et al. An amyloid β 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012 Aug;33(8):1522–32.
319. Koppel J, Davies P. Targeting the endocannabinoid system in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008 Nov;15(3):495–504.
320. Pazos MR, Núñez E, Benito C, Tolón RM, Romero J. Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. *Life Sci*. 2004 Sep;75(16):1907–15.
321. D'Addario C, Di Francesco A, Arosio B, Gussago C, Dell'Osso B, Bari M, et al. Epigenetic regulation of fatty acid amide hydrolase in Alzheimer disease. *PLoS One*. 2012;7(6):e39186.
322. Karl T, Cheng D, Garner B, Arnold JC. The therapeutic potential of the endocannabinoid system for Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(4):407–20.
323. Kanwal H, Sangineto M, Ciarnelli M, Castaldo P, Villani R, Romano AD, et al. Potential Therapeutic Targets to Modulate the Endocannabinoid System in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2024 Apr;25(7).
324. Wang HJ, Chinna-Meyyappan A, Feldman OJ, Lanctôt KL. Emerging therapies for

- treatment of agitation, psychosis, or apathy in Alzheimer's disease. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2024 Jun;1–15.
325. Abate G, Uberti D, Tambaro S. Potential and Limits of Cannabinoids in Alzheimer's Disease Therapy. *Biology (Basel)*. 2021 Jun;10(6).
326. Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A, Michel K, Piyanova A, Oppenheimer H, et al. A chronic low dose of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat Med*. 2017 Jun;23(6):782–7.
327. Sarne Y, Toledano R, Rachmany L, Sasson E, Doron R. Reversal of age-related cognitive impairments in mice by an extremely low dose of tetrahydrocannabinol. *Neurobiol Aging*. 2018 Jan;61:177–86.
328. Blanton H, Reddy PH, Benamar K. Chronic pain in Alzheimer's disease: Endocannabinoid system. *Exp Neurol*. 2023;360(August 2022):114287. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114287>
329. Aso E, Andrés-Benito P, Ferrer I. Delineating the Efficacy of a Cannabis-Based Medicine at Advanced Stages of Dementia in a Murine Model. *J Alzheimers Dis*. 2016 Oct;54(3):903–12.
330. Todaro B. Cannabinoids in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012 Apr;10(4):487–92.
331. Herrmann N, Ruthirakuhan M, Gallagher D, Verhoeff NPLG, Kiss A, Black SE, et al. Randomized Placebo-Controlled Trial of Nabilone for Agitation in Alzheimer's Disease. *Am J Geriatr psychiatry Off J Am Assoc Geriatr Psychiatry*. 2019 Nov;27(11):1161–73.
332. Vázquez C, Tolón RM, Grande MT, Caraza M, Moreno M, Koester EC, et al. Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation. Vol. 36, *Neurobiology of Aging*. Elsevier Ltd; 2015. 3008–3019 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.003>
333. Ruiz-Pérez G, Ruiz de Martín Esteban S, Marqués S, Aparicio N, Grande MT, Benito-Cuesta I, et al. Potentiation of amyloid beta phagocytosis and amelioration of synaptic dysfunction upon FAAH deletion in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02276-y>
334. Benito C, Tolón RM, Castillo AI, Ruiz-Valdepeñas L, Martínez-Orgado JA, Fernández-

- Sánchez FJ, 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*. 2012;166(4):1474–89.
335. Aparicio N, Grande MT, Ruiz de Martín Esteban S, López A, Ruiz-Pérez G, Amores M, et al. Role of interleukin 1-beta in the inflammatory response in a fatty acid amide hydrolase-knockout mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 2018;157:202–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.09.009>
336. Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, Alonso R, González-Neira A, López-Jiménez A, et al. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res*. 2011 Jun;20(3):481–9.
337. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*. 2006;26(40):10129–40.
338. 5xFAD (B6SJL) | ALZFORUM. [cited 2024 Jan 3]. Available from: <https://www.alzforum.org/research-models/5xfad-b6sjl>
339. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9371–6.
340. Pautex S, Bianchi F, Daali Y, Augsburger M, de Saussure C, Wampfler J, et al. Cannabinoids for behavioral symptoms in severe dementia: Safety and feasibility in a long-term pilot observational study in nineteen patients. *Front Aging Neurosci*. 2022;14(September):1–10.
341. Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, Crapser J, Zhang J, Burton EA, et al. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun*. 2019;10(1):1–21.
342. Elmore MRP, Hohsfield LA, Kramár EA, Soreq L, Lee RJ, Pham ST, et al. Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive, synaptic, and neuronal deficits in mice. *Aging Cell*. 2018;17(6).
343. Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MRP, Blurton-Jones M, et al.

- Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain*. 2016;139(4):1265–81.
344. Sunyer B, Patil S, Höger H, Lubner G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protoc Exch*. 2007;
345. Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp*. 2008;(22):1–4.
346. Saravia R, Ten-Blanco M, Julià-Hernández M, Gagliano H, Andero R, Armario A, et al. Concomitant THC and stress adolescent exposure induces impaired fear extinction and related neurobiological changes in adulthood. *Neuropharmacology*. 2018;144(October 2018):345–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.016>
347. Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The tail suspension test. *J Vis Exp*. 2012;(58):2–7.
348. JAX-MNBF. Standard Operating Procedure The Jackson Laboratory Mouse Neurobehavioral Phenotyping Facility (JAX-MNBF) Rotarod Assay [ROT]. 2014;
349. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:99–103.
350. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.
351. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(8).
352. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1–21.
353. Fang Z, Liu X, Peltz G. GSEAPy: a comprehensive package for performing gene set enrichment analysis in Python. *Bioinformatics*. 2023;39(1):1–3.
354. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545–50.
355. Bajaj S, Jain S, Vyas P, Bawa S, Vohora D. The role of endocannabinoid pathway in the neuropathology of Alzheimer's disease: Can the inhibitors of MAGL and FAAH prove to

- be potential therapeutic targets against the cognitive impairment associated with Alzheimer's disease? *Brain Res Bull.* 2021;174(July):305–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.06.022>
356. Piro JR, Benjamin DI, Duerr JM, Pi Y, Gonzales C, Wood KM, et al. A dysregulated endocannabinoid-eicosanoid network supports pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 2012 Jun;1(6):617–23.
357. Murphy N, Cowley TR, Blau CW, Dempsey CN, Noonan J, Gowran A, et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 exerts anti-inflammatory effects in hippocampus of aged rats and restores an age-related deficit in long-term potentiation. *J Neuroinflammation.* 2012;9:1–11.
358. Arnanz MA, Ruiz de Martín Esteban S, Martínez Relimpio AM, Rimmerman N, Tweezer Zaks N, Grande MT, et al. Effects of Chronic, Low-Dose Cannabinoids, Cannabidiol, Delta-9-Tetrahydrocannabinol and a Combination of Both, on Amyloid Pathology in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Cannabis cannabinoid Res.* 2024 Oct;9(5):1312–25.
359. Fertan E, Brown RE. Age-related deficits in working memory in 5xFAD mice in the Hebb-Williams maze. *Behav Brain Res.* 2022 Apr;424:113806.
360. O'Leary TP, Robertson A, Chipman PH, Rafuse VF, Brown RE. Motor function deficits in the 12 month-old female 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2018 Jan;337:256–63.
361. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, 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 Off J Soc Neurosci.* 2006 Oct;26(40):10129–40.
362. Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A. Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci.* 2009 Sep;12(9):1152–8.
363. Miller RLA, Thakur GA, Stewart WN, Bow JP, Bajaj S, Makriyannis A, et al. Effects of a novel CB1 agonist on visual attention in male rats: role of strategy and expectancy in task accuracy. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2013 Oct;21(5):416–25.
364. Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural

- encoding for short-term memory in rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2000 Dec;20(23):8932–42.
365. Verrico CD, Gu H, Peterson ML, Sampson AR, Lewis DA. Repeated Δ 9-tetrahydrocannabinol exposure in adolescent monkeys: persistent effects selective for spatial working memory. *Am J Psychiatry*. 2014 Apr;171(4):416–25.
366. Nidadavolu P, Bilkei-Gorzo A, Krämer M, Schürmann B, Palmisano M, Beins EC, et al. Efficacy of Δ (9) -Tetrahydrocannabinol (THC) Alone or in Combination With a 1:1 Ratio of Cannabidiol (CBD) in Reversing the Spatial Learning Deficits in Old Mice. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:718850.
367. Nitzan K, Ellenbogen L, Bentulila Z, David D, Franko M, Break EP, et al. An Ultra-Low Dose of Δ 9-Tetrahydrocannabinol Alleviates Alzheimer's Disease-Related Cognitive Impairments and Modulates TrkB Receptor Expression in a 5XFAD Mouse Model. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16).
368. Coles M, Watt G, Kreilaus F, Karl T. Medium-Dose Chronic Cannabidiol Treatment Reverses Object Recognition Memory Deficits of APP (Swe) /PS1 Δ E9 Transgenic Female Mice. *Front Pharmacol*. 2020;11:587604.
369. Aso E, Sánchez-Pla A, Vegas-Lozano E, Maldonado R, Ferrer I. Cannabis-based medicine reduces multiple pathological processes in A β PP/PS1 mice. *J Alzheimer's Dis*. 2015;43(3):977–91.
370. Coles M, Steiner-Lim GZ, Karl T. Therapeutic properties of multi-cannabinoid treatment strategies for Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2022;16:962922.
371. Pacher P, Kogan NM, Mechoulam R. Beyond THC and Endocannabinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2020 Jan;60:637–59.
372. Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, et al. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*. 1998 Jul;353(1):23–31.
373. Cooray R, Gupta V, Suphioglu C. Current Aspects of the Endocannabinoid System and Targeted THC and CBD Phytocannabinoids as Potential Therapeutics for Parkinson's and Alzheimer's Diseases: a Review. *Mol Neurobiol*. 2020;57(11):4878–90.
374. Anand U, Pacchetti B, Anand P, Sodergren MH. Cannabis-based medicines and pain: a review of potential synergistic and entourage effects. *Pain Manag*. 2021

- Apr;11(4):395–403.
375. Negrón-Oyarzo I, Espinosa N, Aguilar-Rivera M, Fuenzalida M, Aboitiz F, Fuentealba P. Coordinated prefrontal-hippocampal activity and navigation strategy-related prefrontal firing during spatial memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jul;115(27):7123–8.
376. El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, et al. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010 Jun;95(4):434–42.
377. Zagzoog A, Mohamed KA, Kim HJJ, Kim ED, Frank CS, Black T, et al. In vitro and in vivo pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Sci Rep*. 2020 Nov;10(1):20405.
378. Bambico FR, Hattan PR, Garant J-P, Gobbi G. Effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on behavioral despair and on pre- and postsynaptic serotonergic transmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012 Jul;38(1):88–96.
379. Bambico FR, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Gobbi G. Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models. *Curr Pharm Des*. 2009;15(14):1623–46.
380. Adamczyk P, Gołda A, McCreary AC, Filip M, Przegaliński E. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. *J Physiol Pharmacol an Off J Polish Physiol Soc*. 2008 Jun;59(2):217–28.
381. Micale V, Di Marzo V, Sulcova A, Wotjak CT, Drago F. Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. *Pharmacol Ther*. 2013 Apr;138(1):18–37.
382. Hasbi A, Madras BK, George SR. Endocannabinoid System and Exogenous Cannabinoids in Depression and Anxiety: A Review. *Brain Sci*. 2023;13(2).
383. Janefjord E, Mååg JL V, Harvey BS, Smid SD. Cannabinoid effects on β amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity in vitro. *Cell Mol Neurobiol*. 2014 Jan;34(1):31–42.
384. Kanchi PK, Dasmahapatra AK. Destabilization of the Alzheimer's amyloid- β protofibrils by THC: A molecular dynamics simulation study. *J Mol Graph Model*. 2021 Jun;105:107889.

385. Stefani M. Structural polymorphism of amyloid oligomers and fibrils underlies different fibrillization pathways: immunogenicity and cytotoxicity. *Curr Protein Pept Sci*. 2010 Aug;11(5):343–54.
386. Choi ML, Gandhi S. Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *FEBS J*. 2018 Oct;285(19):3631–44.
387. Eubanks LM, Rogers CJ, Beuscher AE 4th, Koob GF, Olson AJ, Dickerson TJ, et al. A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Mol Pharm*. 2006;3(6):773–7.
388. Tzioras M, McGeachan RI, Durrant CS, Spires-Jones TL. Synaptic degeneration in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2023 Jan;19(1):19–38.
389. Patil N, Chandel V, Rana A, Jain M, Kaushik P. Investigation of Cannabis sativa Phytochemicals as Anti-Alzheimer's Agents: An In Silico Study. *Plants (Basel, Switzerland)*. 2023 Jan;12(3).
390. Gugliandolo A, Blando S, Salamone S, Caprioglio D, Pollastro F, Mazzon E, et al. $\Delta(8)$ -THC Protects against Amyloid Beta Toxicity Modulating ER Stress In Vitro: A Transcriptomic Analysis. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr;24(7).
391. Kim J, Choi P, Park Y-T, Kim T, Ham J, Kim J-C. The Cannabinoids, CBDA and THCA, Rescue Memory Deficits and Reduce Amyloid-Beta and Tau Pathology in an Alzheimer's Disease-like Mouse Model. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr;24(7).
392. Kumar RN, Chambers WA, Pertwee RG. Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. *Anaesthesia*. 2001 Nov;56(11):1059–68.
393. Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol*. 2003 May;2(5):291–8.
394. Lichtman AH, Martin BR. Cannabinoid tolerance and dependence. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):691–717.
395. Arnanz MA, Ferrer M, Teresa M, Ruiz S, Esteban DM, Benjamin GR, et al. Fatty acid amide hydrolase gene inactivation induces hetero-cellular potentiation of microglial function in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*. 2024;1–16.
396. Pascual AC, Martín-Moreno AM, Giusto NM, de Ceballos ML, Pasquaré SJ. Normal aging in rats and pathological aging in human Alzheimer's disease decrease FAAH activity:

- modulation by cannabinoid agonists. *Exp Gerontol.* 2014 Dec;60:92–9.
397. Tsou K, Nogueron MI, Muthian S, Sañudo-Pena MC, Hillard CJ, Deutsch DG, et al. Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett.* 1998 Oct;254(3):137–40.
398. Gutiérrez-Rodríguez A, Bonilla-Del Río I, Puente N, Gómez-Urquijo SM, Fontaine CJ, Egaña-Huguet J, et al. Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus. *Glia.* 2018 Jul;66(7):1417–31.
399. Jimenez-Blasco D, Busquets-Garcia A, Hebert-Chatelain E, Serrat R, Vicente-Gutierrez C, Ioannidou C, et al. Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects. *Nature.* 2020;583(7817):603–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2470-y>
400. Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2012;1817(6):851–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.08.010>
401. Ruiz-Pérez G, Ruiz de Martín Esteban S, Marqués S, Aparicio N, Grande MT, Benito-Cuesta I, et al. Potentiation of amyloid beta phagocytosis and amelioration of synaptic dysfunction upon FAAH deletion in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2021 Sep;18(1):223.
402. Vázquez C, Tolón RM, Pazos MR, Moreno M, Koester EC, Cravatt BF, et al. Endocannabinoids regulate the activity of astrocytic hemichannels and the microglial response against an injury: In vivo studies. *Neurobiol Dis.* 2015 Jul;79:41–50.
403. Aparicio N, Grande MT, Ruiz de Martín Esteban S, López A, Ruiz-Pérez G, Amores M, et al. Role of interleukin 1-beta in the inflammatory response in a fatty acid amide hydrolase-knockout mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 2018 Nov;157:202–9.
404. Sobue A, Komine O, Yamanaka K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: microglial signature and their relevance to disease. *Inflamm Regen.* 2023 May;43(1):26.
405. Holtman IR, Raj DD, Miller JA, Schaafsma W, Yin Z, Brouwer N, et al. Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol Commun.* 2015 May;3:31.

406. Wu L, Xian X, Xu G, Tan Z, Dong F, Zhang M, et al. Toll-Like Receptor 4: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Mediators Inflamm.* 2022;2022:7924199.
407. Bo L, Bo X. Colony stimulating factor 1: friend or foe of neurons? *Neural Regen Res.* 2022 Apr;17(4):773–4.
408. Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, Leboeuf M, et al. Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity.* 2012 Dec;37(6):1050–60.
409. Walker DG, Tang TM, Lue L-F. Studies on Colony Stimulating Factor Receptor-1 and Ligands Colony Stimulating Factor-1 and Interleukin-34 in Alzheimer's Disease Brains and Human Microglia. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:244.
410. Han J, Chitu V, Stanley ER, Wszolek ZK, Karrenbauer VD, Harris RA. Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) as a potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases: opportunities and challenges. *Cell Mol Life Sci.* 2022 Apr;79(4):219.
411. Vázquez C, Tolón RM, Grande MT, Caraza M, Moreno M, Koester EC, et al. Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation. *Neurobiol Aging.* 2015 Nov;36(11):3008–19.
412. Muccioli GG, Stella N. Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide. *Neuropharmacology.* 2008 Jan;54(1):16–22.
413. Atvie F, Albayram O, Bach K, Pradier B, Zimmer A, Bilkei-Gorzo A. Enhanced microglial activity in FAAH(-/-) animals. *Life Sci.* 2015 Oct;138:52–6.
414. Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MRP, Blurton-Jones M, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain.* 2016 Apr;139(Pt 4):1265–81.
415. Elmore MRP, Hohsfield LA, Kramár EA, Soreq L, Lee RJ, Pham ST, et al. Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive, synaptic, and neuronal deficits in mice. *Aging Cell.* 2018 Dec;17(6):e12832.
416. Vidal-Itriago A, Radford RAW, Aramideh JA, Maurel C, Scherer NM, Don EK, et al. Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Front Immunol.* 2022;13:997786.

417. Zhou K, Han J, Lund H, Boggavarapu NR, Lauschke VM, Goto S, et al. An overlooked subset of Cx3cr1(wt/wt) microglia in the Cx3cr1(CreER-Eyfp/wt) mouse has a repopulation advantage over Cx3cr1(CreER-Eyfp/wt) microglia following microglial depletion. *J Neuroinflammation*. 2022 Jan;19(1):20.
418. Torres-Platas SG, Comeau S, Rachalski A, Bo GD, Cruceanu C, Turecki G, et al. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation*. 2014 Jan;11:12.
419. Wendimu MY, Hooks SB. Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2022 Jun;11(13).
420. Madore C, Joffre C, Delpech JC, De Smedt-Peyrusse V, Aubert A, Coste L, et al. Early morphofunctional plasticity of microglia in response to acute lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2013 Nov;34:151–8.
421. Kaur C, Ling EA, Wong WC. Transformation of amoeboid microglial cells into microglia in the corpus callosum of the postnatal rat brain. An electron microscopical study. *Arch Histol Jpn*. 1985 Feb;48(1):17–25.
422. Sierra A, de Castro F, Del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*. 2016 Nov;64(11):1801–40.
423. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 2010 Oct;7(4):483–95.
424. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005 Jun;8(6):752–8.
425. VanRyzin JW, Marquardt AE, Argue KJ, Vecchiarelli HA, Ashton SE, Arambula SE, et al. Microglial Phagocytosis of Newborn Cells Is Induced by Endocannabinoids and Sculptures Sex Differences in Juvenile Rat Social Play. *Neuron*. 2019 Apr;102(2):435–449.e6.
426. Abiega O, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Nadjar A, Layé S, Leyrolle Q, et al. Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. *PLoS Biol*. 2016 May;14(5):e1002466.

427. Kiani Shabestari S, Morabito S, Danhash EP, McQuade A, Sanchez JR, Miyoshi E, et al. Absence of microglia promotes diverse pathologies and early lethality in Alzheimer's disease mice. *Cell Rep.* 2022 Jun;39(11):110961.
428. Zhao R, Hu W, Tsai J, Li W, Gan W-B. Microglia limit the expansion of β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2017 Jun;12(1):47.
429. Jain S, Bisht A, Verma K, Negi S, Paliwal S, Sharma S. The role of fatty acid amide hydrolase enzyme inhibitors in Alzheimer's disease. *Cell Biochem Funct.* 2022;40(2):106–17.
430. van Esbroeck ACM, Janssen APA, Cognetta AB 3rd, Ogasawara D, Shpak G, van der Kroeg M, et al. Activity-based protein profiling reveals off-target proteins of the FAAH inhibitor BIA 10-2474. *Science.* 2017 Jun;356(6342):1084–7.

ANEXO I

Las firmas génicas empleadas en los GSEAs de la comparativa **WT/FAAH^{-/-} vs. WT** son:

- GO (del inglés, *Gene Ontology*):
 - GOMF_OXIDOREDUCTASE_ACTIVITY_ACTING_ON_THE_ALDEHYDE_OR_OXO_GROUP_OF_DONORS.
 - GOMF_OXIDOREDUCTASE_ACTIVITY_ACTING_ON_THE_ALDEHYDE_OR_OXO_GROUP_OF_DONORS_NAD_OR_NADP_AS_ACCEPTOR.
 - GOMF_ALDEHYDE_DEHYDROGENASE_NAD_P_PLUS_ACTIVITY.
- Hallmark:
 - HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM.
 - HALLMARK_MTORC1_SIGNALING.
 - HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB.
- Reactome:
 - REACTOME_REGULATION_OF_NF_KAPPA_B_SIGNALING.
 - REACTOME_TNF_SIGNALING.

En los GSEAs de la comparativa **5x~~FAD~~/FAAH^{-/-} vs. 5x~~FAD~~** se emplearon las siguientes firmas génicas:

- Hallmark:
 - HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE.
 - HALLMARK_MTORC1_SIGNALING.
 - HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE.
 - HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM.
 - HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION.
 - HALLMARK_PEROXISOME.
 - HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE.
 - HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE.
 - HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB.
 - HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING.
- KEGG:
 - KEGG_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES.
 - KEGG_ALZHEIMERS_DISEASE.

- KEGG_PROTEASOME.
 - KEGG_PROTEIN_EXPORT.
 - KEGG_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION.
 - KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION.
 - KEGG_LYSOSOME.
- Reactome:
- REACTOME_INFLAMMASOMES.
 - REACTOME_THE_NLRP3_INFLAMMASOME.
- GO:
- GOBP_COMPLEMENT_ACTIVATION.
 - GOBP_INTERLEUKIN_1_PRODUCTION.
 - GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_INFLAMMATORY_RESPONSE.
 - GOBP_PRODUCTION_OF_MOLECULAR_MEDIATOR_INVOLVED_IN_INFLAMMATORY_RESPONSE.
 - GOBP_INFLAMMATORY_RESPONSE.
 - GOBP_REGULATION_OF_PHAGOCYTOSIS.
 - GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_INTERLEUKIN_1_BETA_PRODUCTION.
 - GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_INTERLEUKIN_1_PRODUCTION.
 - GOBP_MICROGLIA_DIFFERENTIATION.
 - GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_MICROGLIAL_CELL_ACTIVATION.
 - GOBP_MICROGLIAL_CELL_MIGRATION.
 - GOBP_MICROGLIAL_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY.
 - GOBP_MICROGLIAL_DEVELOPMENT.
 - GOBP_REGULATION_OF_MICROGLIAL_CELL_ACTIVATION.
 - GOBP_MICROGLIAL_CELL_PROLIFERATION.
 - GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_INTERLEUKIN_1_PRODUCTION.

➤ Microglía DAM (Grubman et al. 2021)

Genes sobreexpresados en DAM
<i>Tyrobp</i>
<i>Ctsb</i>
<i>Ctsd</i>
<i>Apoe</i>
<i>B2m</i>
<i>Fth1</i>
<i>Lyz2</i>
<i>Trem2</i>
<i>Axl</i>
<i>Cst7</i>
<i>Ctsl</i>
<i>Lpl</i>
<i>Cd9</i>
<i>Csf1</i>
<i>Ccl6</i>
<i>Itgax</i>
<i>Clec7a</i>
<i>Lilrb4</i>
<i>Timp2</i>
<i>Igf1</i>
<i>Spp1</i>
<i>Cxcr4</i>
<i>Gas7</i>
<i>Serpine2</i>
<i>Gpnmb</i>
<i>Fabp3</i>
<i>Cd200r4</i>
<i>Apbb2</i>

ANEXO II

Tabla 17: Algoritmos de Imaris 10.0 empleados para la reconstrucción tridimensional. Soma microglial (*Surface 1*), procesos microgliales (*Filaments*), patrón de placas para clasificar la microglía en función de su cercanía o lejanía a placa (*Surface 2*), placa amiloide (*Surface 3*) y conteo del número de células de microglía (*Spots*)

<i>Surface 1</i> (soma microglial)	<i>Filaments</i> (procesos microgliales)
[Algorithm] Enable Region Of Interest = false Enable Region Growing = true Enable Tracking = false Enable Classify = true Enable Shortest Distance = true [Source Channel] Source Channel Index = 2 Enable Smooth = true Surface Grain Size= 0,700 μm Enable Eliminate Background = true Diameter Of Largest Sphere = 7,00 μm [Threshold] Active Threshold = true Enable Automatic Threshold = true Active Threshold B = false Region Growing Estimated Diameter = 7,50 μm Region Growing Morphological Split = false [Filter Seed Points] "Quality" above 370 [Filter Surfaces] "Distance to Image Border XYZ Img=1" above 10,0 μm	[Algorithm] Name = Autopath (no loops) Segment Start Point = true Detect Spines = false Enable Regions Of Interest = false Track (over time) = false [Soma Starting Points] Segment Channel Index = 2 Segment Starting Point Diameter = 7,00 μm Calculate Soma Model = false [Filter Starting Points] Segment Starting Point Threshold Low = 414.951 Segment Starting Point Threshold High = Automatic [Seed Points for Segments] Segment Seed Point Diameter = 1,00 μm [Filter Seed Points for Segments] Segment Seed Point Threshold = 355.343 Diameter around Starting Point(s) to remove Seed Points = 20,0 μm Segment Diameter Filter Strengthness = 2
<i>Surface 2</i> (patrón de placas)	<i>Surface 3</i> (placa amiloide)
[Algorithm] Enable Region Of Interest = false Enable Region Growing = false Enable Tracking = false Enable Classify = true Enable Shortest Distance = true [Source Channel] Source Channel Index = 1 Enable Smooth = true Surface Grain Size= 0,700 μm Enable Eliminate Background = false [Threshold] Active Threshold = true Enable Automatic Threshold = false Manual Threshold Value = 46 Active Threshold B = false [Filter Surfaces] "Volume" above 58,0 μm^3	[Algorithm] Enable Region Of Interest = false Enable Region Growing = false Enable Tracking = false Enable Classify = true Enable Shortest Distance = false [Source Channel] Source Channel Index = 1 Enable Smooth = true Surface Grain Size= 0,360 μm Enable Eliminate Background = false [Threshold] Active Threshold = true Enable Automatic Threshold = true Active Threshold B = false [Filter Surfaces] "Volume" above 760 μm^3
<i>Spots</i> (número de células de microglía)	
[Algorithm] Enable Region Of Interest = false Enable Region Growing = false Enable Tracking = false Enable Classify = true Enable Region Growing = false Enable Shortest Distance = true [Source Channel] Source Channel Index = 2 Estimated Diameter = 7,50 μm Background Subtraction = true [Filter Spots] "Quality" above 327	

ANEXO III

Las dos componentes principales (PC1 y PC2), representaron el 75 % y el 10 % de la variación total, respectivamente, y permitieron separar significativamente los cuatro grupos experimentales mediante un código de colores (figura 61). Por un lado, la primera componente principal evidenció las diferencias asociadas a la patología, ya que separó las muestras AD hacia la izquierda del biplot de las WT localizadas hacia la derecha. Por otro lado, PC2 separó las muestras con la enzima FAAH inactivada de los controles.

Por tanto, al observarse que las muestras del mismo grupo experimental se encontraban agrupadas próximas entre sí, se confirmó que eran óptimas para continuar con el estudio y que los cuatro grupos experimentales mostraron perfiles transcriptómicos diferentes.

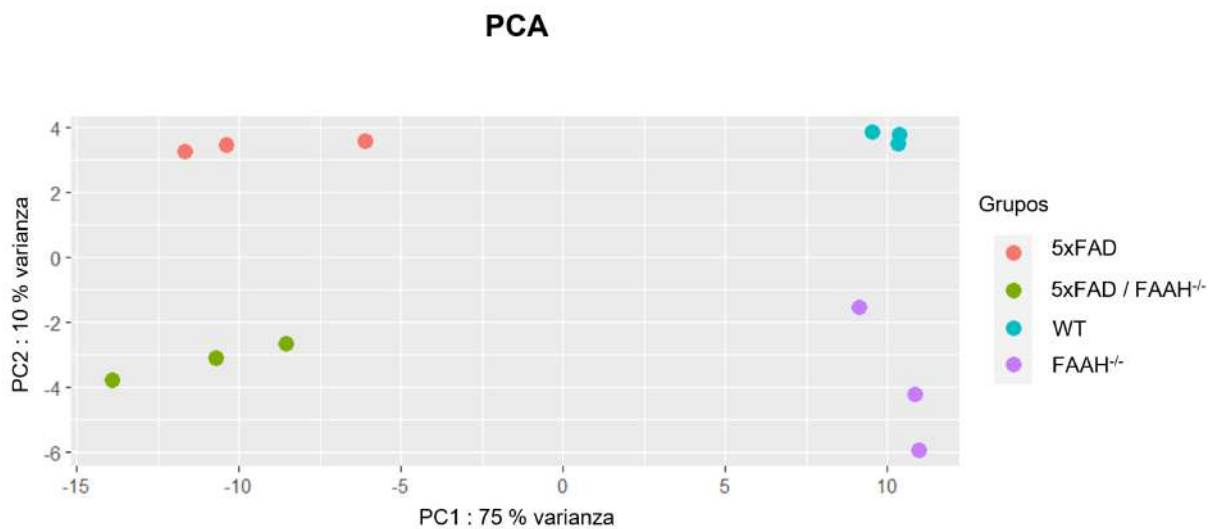


Figura 61: PCA del RNAseq. Las dos componentes principales, PC1 y PC2, representaron el 75 % y el 10 % de la variación total, respectivamente. En el biplot se muestra cada grupo experimental siguiendo un código de colores: 5xFAD en naranja, 5xFAD/FAAH^{-/-} en verde, WT en azul y WT/FAAH^{-/-} en morado. N=3 ratones por grupo experimental.

WT/FAAH^{-/-} vs. WT

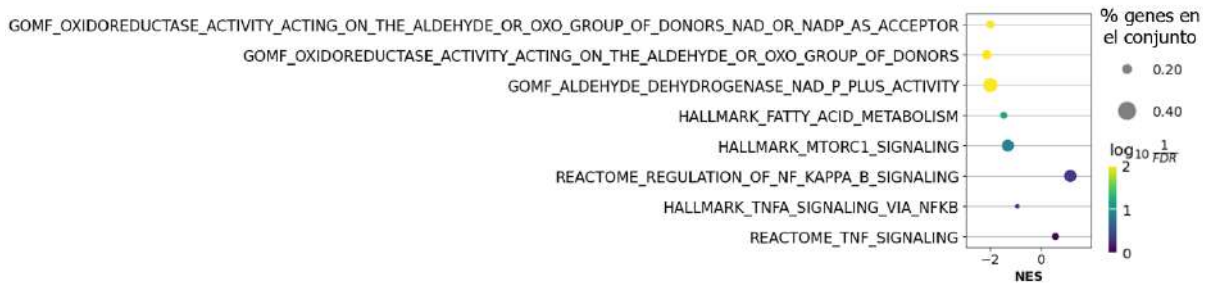


Figura 62: GSEAs para evaluar los efectos de la inactivación de FAAH en condiciones fisiológicas. El tamaño del punto representa el porcentaje de genes implicados y la intensidad de color representa la significancia del FDR. N= 3 ratones por grupo experimental. Se considera como significativo el valor de FDR inferior a 0,05.

5xFAD/FAAH^{-/-} vs. 5xFAD

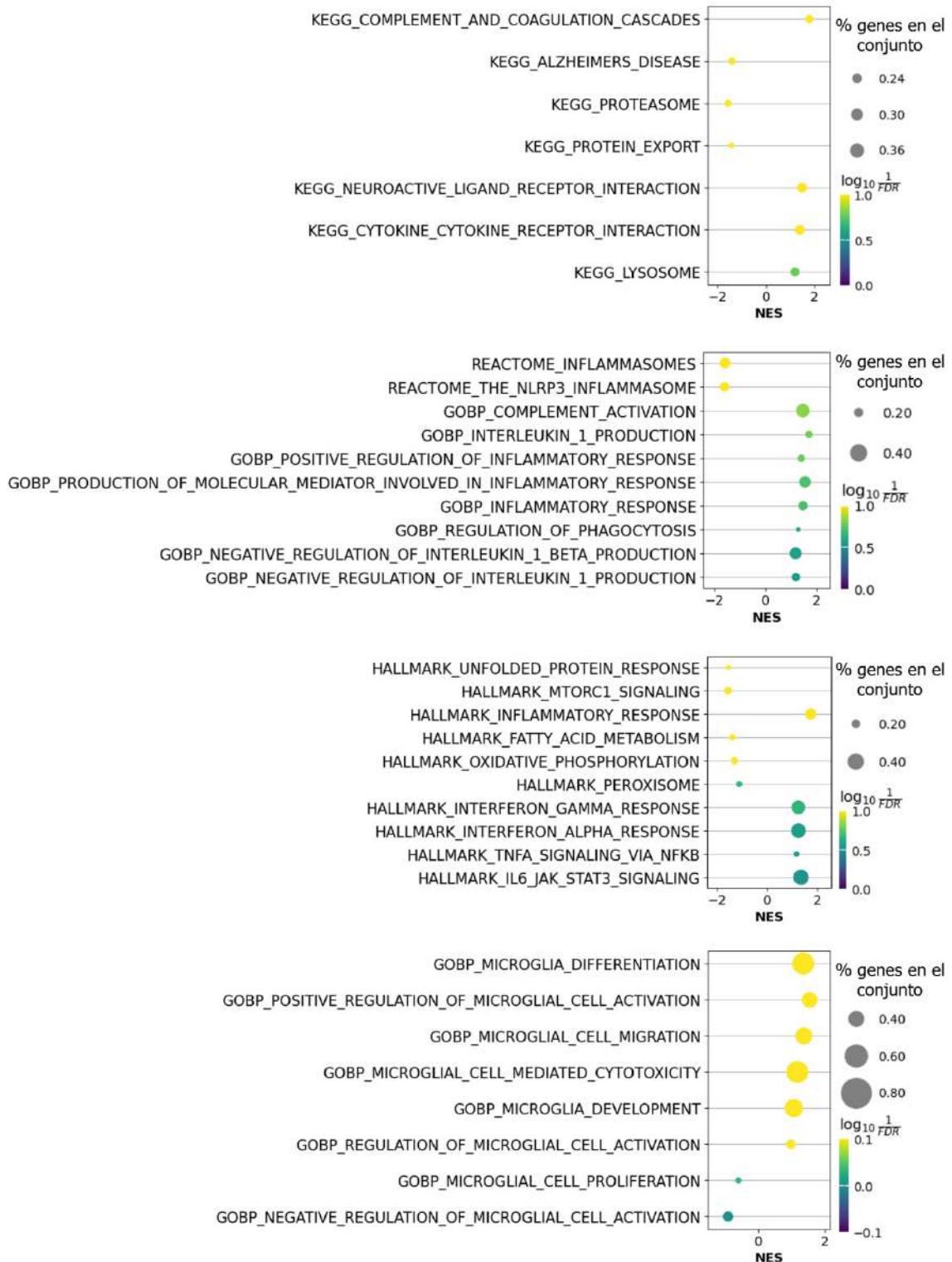


Figura 63: GSEAs para evaluar los efectos de la inactivación de FAAH en condiciones patológicas. El tamaño del punto representa el porcentaje de genes implicados y la intensidad de color representa la significancia del FDR. N= 3 ratones por grupo experimental. Se considera como significativo el valor de FDR inferior a 0,05.

ANEXO IV

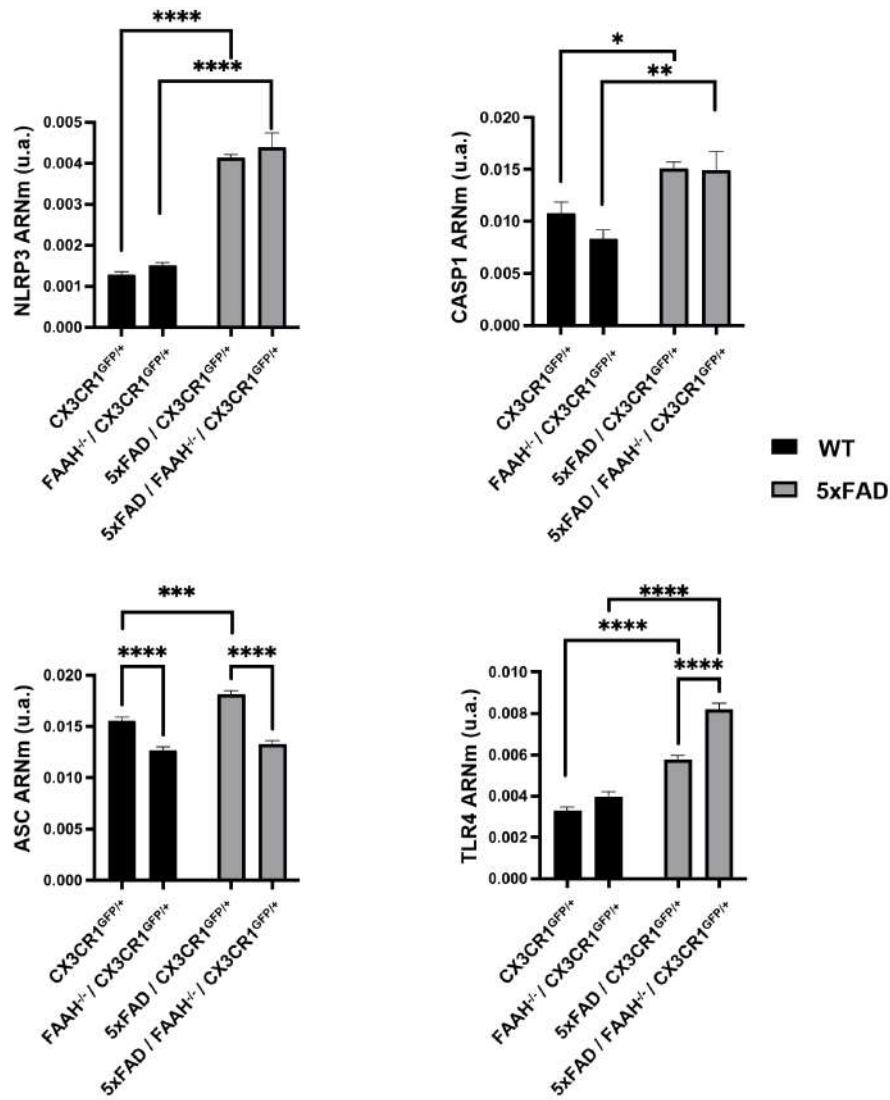


Figura 64: Caracterización de algunos componentes del inflammasoma canónico NLRP3 en el contexto de CX3CR1 en heterocigosis. Se muestra el ARNm de NLRP3, CASP1, ASC y TLR4. N=8 por grupo experimental. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. Los datos representan la media (u.a.) \pm SEM.

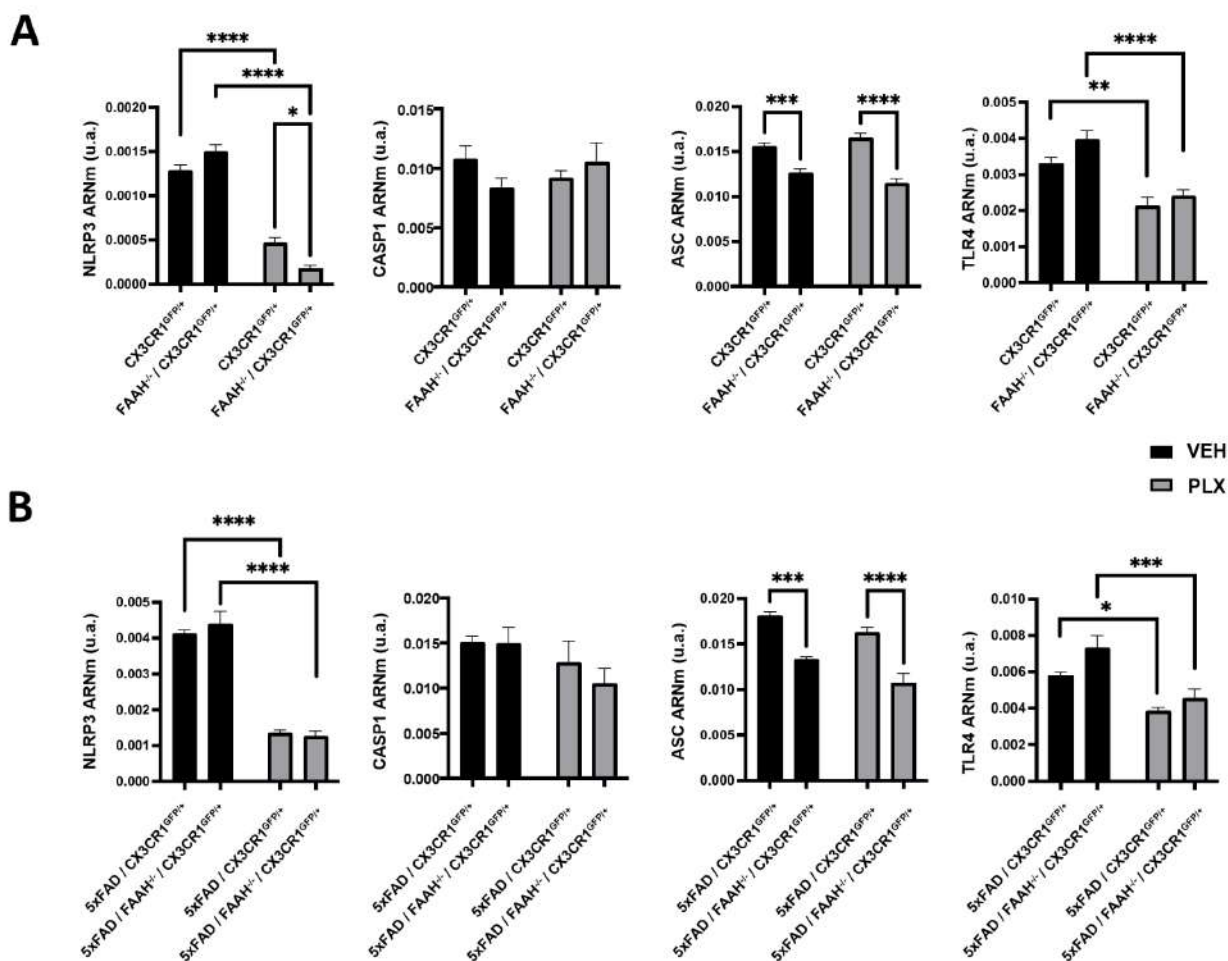


Figura 65: Efecto de PLX5622 sobre algunos componentes del inflamasoma NLRP3 en ratones con CX3CR1 en heterocigosis. A) ARNm de NLRP3, CASP1, ASC y TLR4 en condiciones fisiológicas. B) ARNm de NLRP3, CASP1, ASC y TLR4 en condiciones patológicas. N=8 por grupo experimental. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

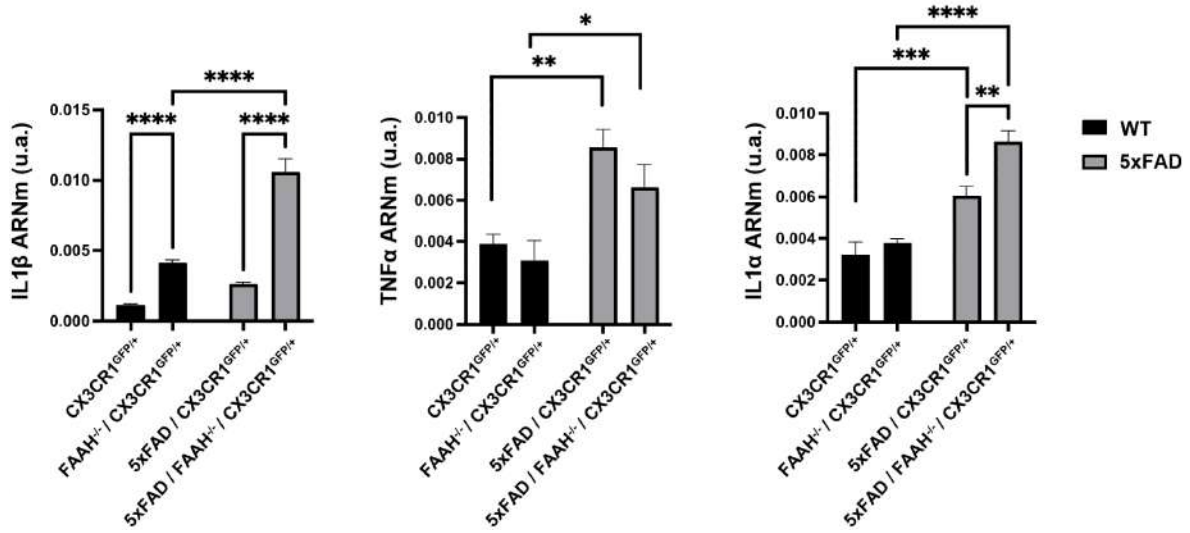


Figura 66: Cuantificación del ARNm de citoquinas proinflamatorias mediante RT-qPCR en ratones con CX3CR1 en heterocigosis. Se muestra el ARNm de IL1β, TNFα e IL1α. N=8 por grupo experimental. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

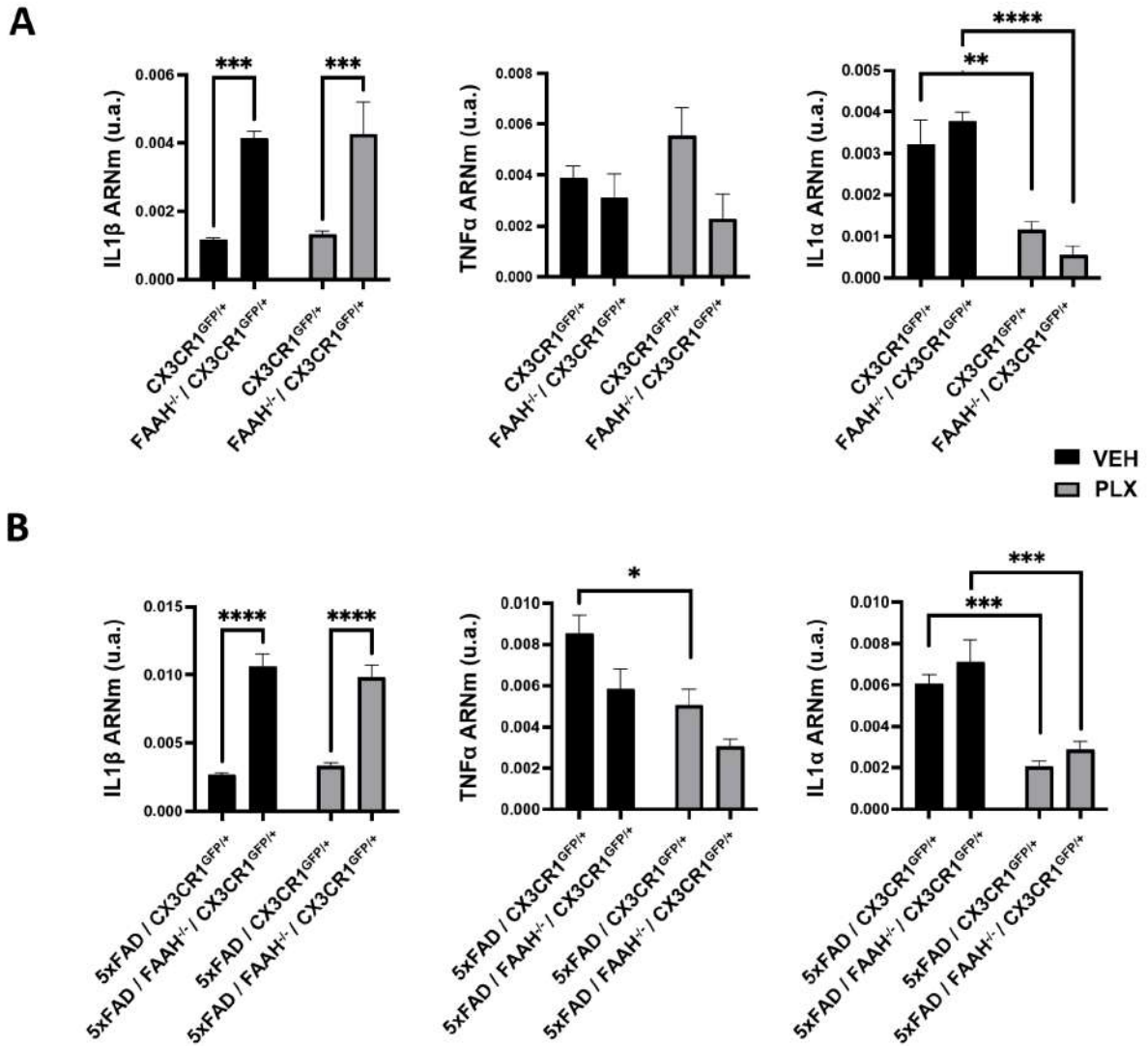


Figura 67: Análisis de los efectos del tratamiento de ratones CX3CR1^{+/GFP} con PLX5622 sobre la expresión de diferentes citoquinas proinflamatorias. A) ARNm de IL1β, TNFα e IL1α en condiciones fisiológicas. B) ARNm de IL1β, TNFα e IL1α en condiciones patológicas. N=8 por grupo experimental. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

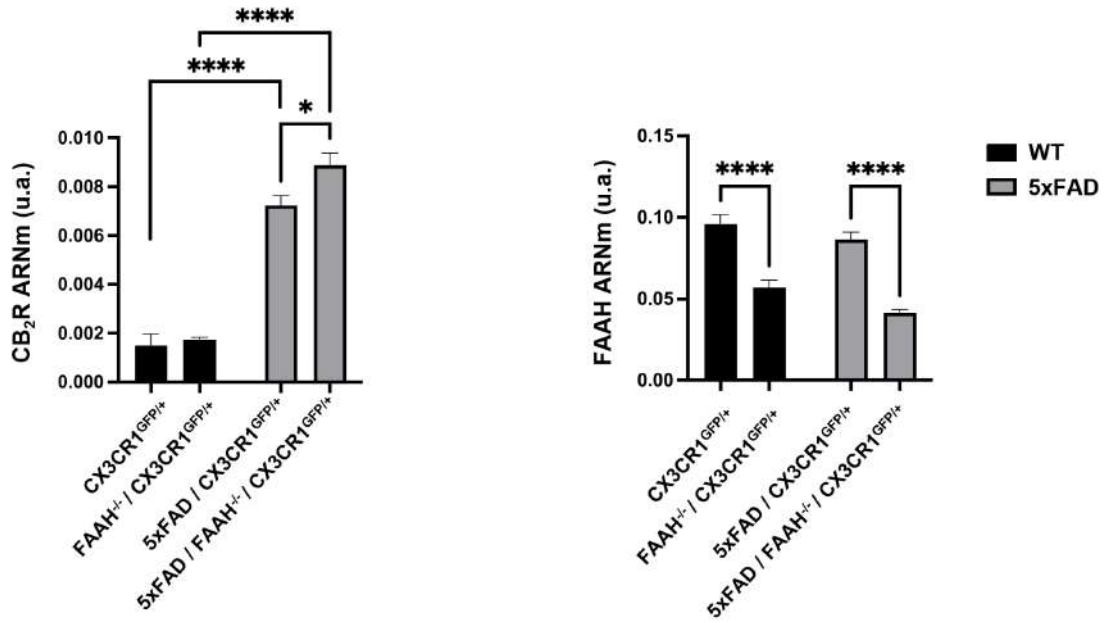


Figura 68: Cuantificación de algunos componentes del SEC por RT-qPCR en ratones con CX3CR1 en heterocigosis. Se muestra el ARNm de CB₂R y FAAH. N=8 por grupo experimental. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. *p<0,05 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

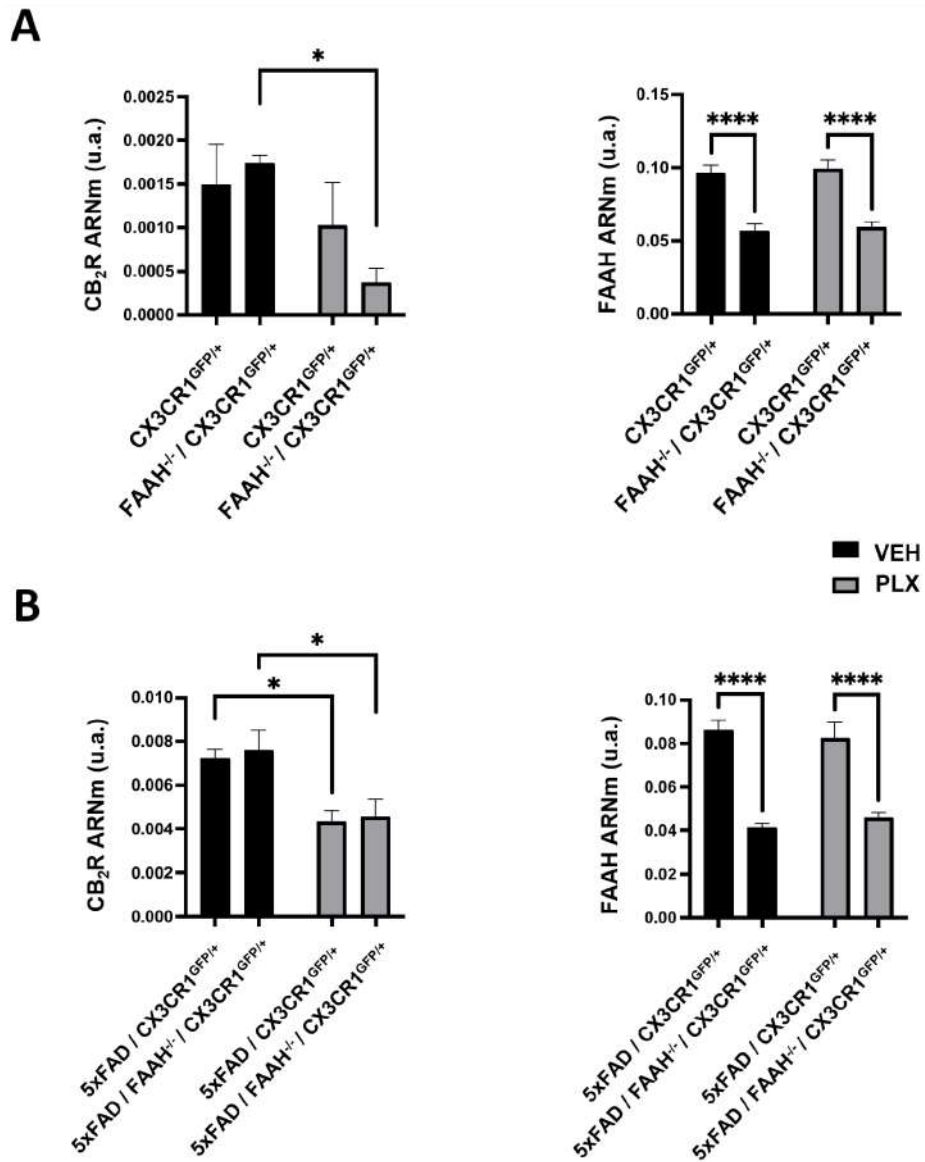


Figura 69: Análisis del ARNm de CB₂R y FAAH tras la exposición de ratones con CX3CR1 en heterocigosis a PLX5622. A) ARNm de CB₂R y FAAH en condiciones fisiológicas. B) ARNm de CB₂R y FAAH en condiciones patológicas. N=8 por grupo experimental. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. *p<0,05 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

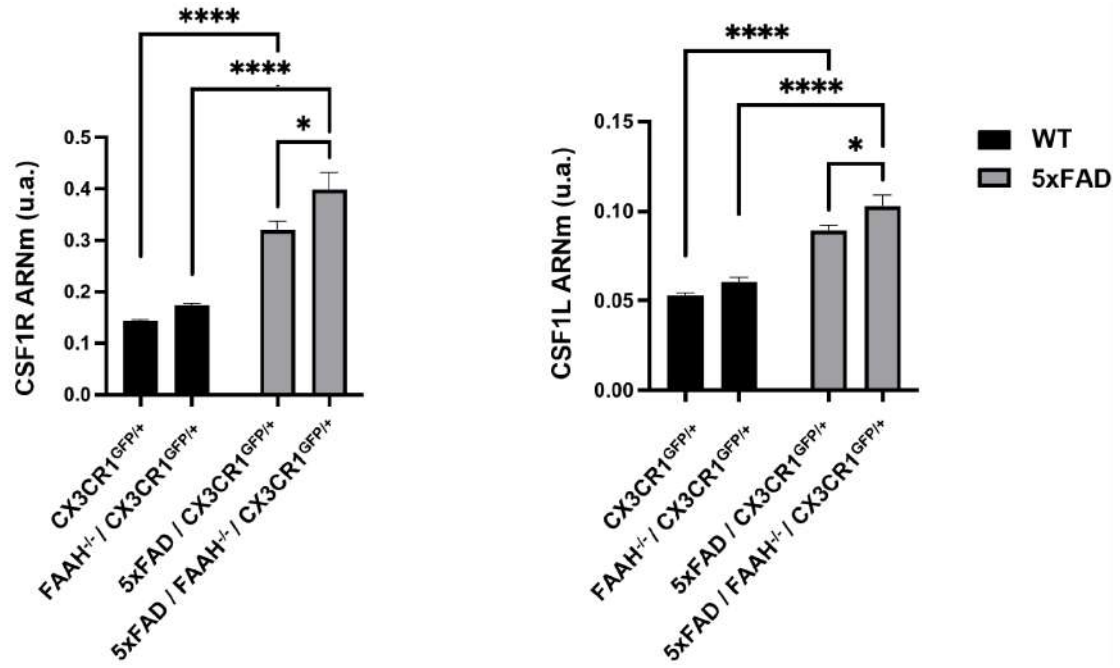


Figura 70: Caracterización del eje CSF1R/CSF1L en el modelo CX3CR1^{+/GFP}. Se muestra el ARN de CSF1R y CSF1L. N=8 por grupo experimental. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. *p<0,05 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

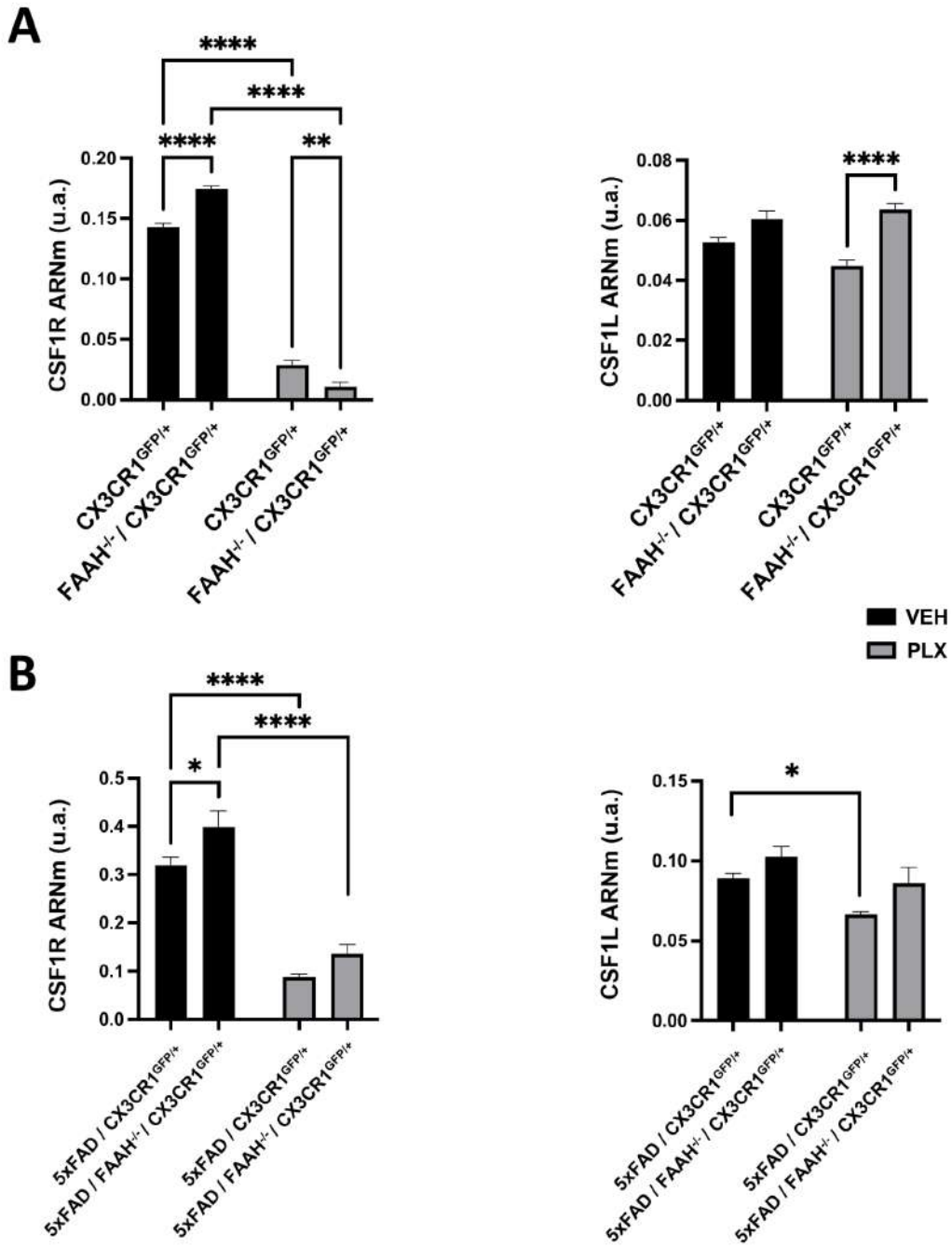


Figura 71: Identificación de los cambios de expresión de CSF1R-CSF1L derivados del tratamiento con PLX5622 en el modelo CX3CR1^{+/GFP}. A) ARNm de CSF1R y CSF1L en condiciones fisiológicas. B) ARNm de CSF1R y CSF1L en condiciones patológicas. N=8 por grupo experimental. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. *p<0,05, **p<0,01 y ****p<0,0001. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

ANEXO V

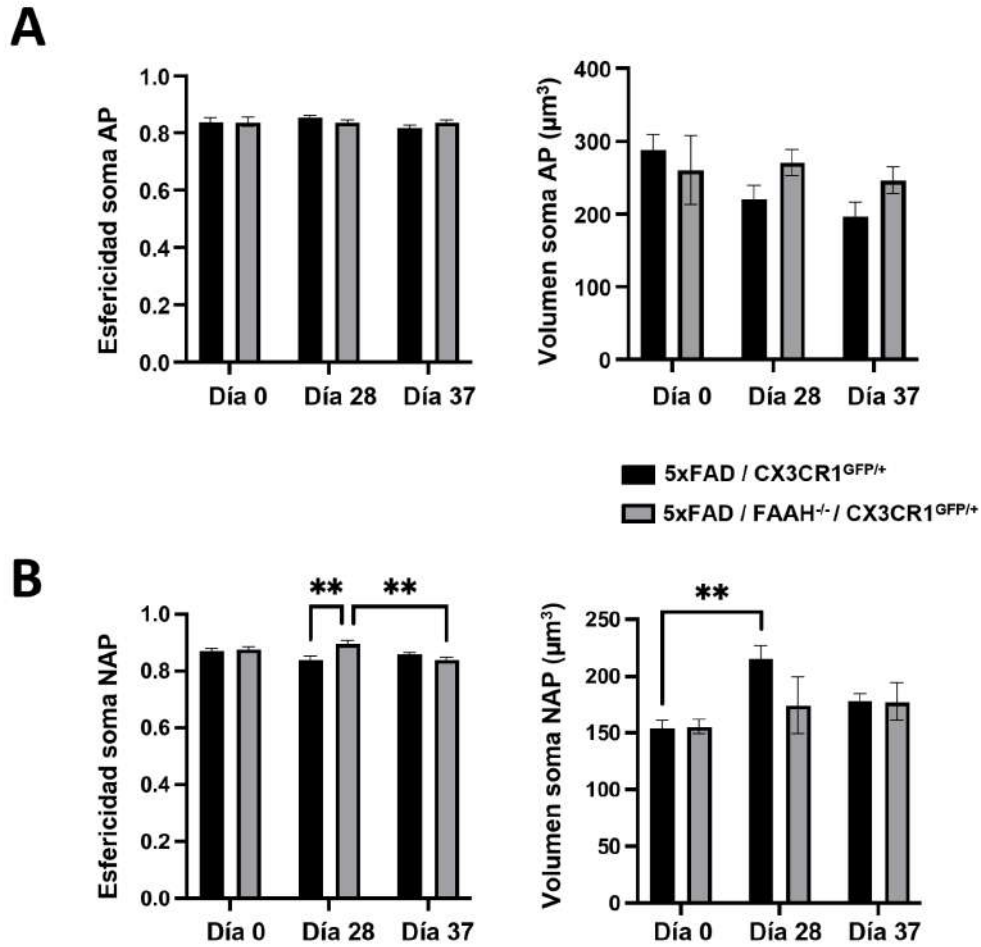


Figura 72: Caracterización de la morfología del soma de la microglía en ratones 5xFAD/CX3CR1^{+/GFP} y 5xFAD/FAAH^{-/-}/CX3CR1^{+/GFP}. A) Cuantificación de la esfericidad y del volumen de la microglía AP en el contexto de ablación microglial y posterior repoblación. B) Cuantificación de la esfericidad y del volumen de la microglía NAP en el contexto de ablación microglial y posterior repoblación. N=8-11 animales por grupo experimental. El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos vías seguida del test post-hoc de Sidak. **p<0,01. Los datos representan la media (u.a.) ± SEM.

ANEXO VI



Effects of Chronic, Low-Dose Cannabinoids, Cannabidiol, Delta-9-Tetrahydrocannabinol and a Combination of Both, on Amyloid Pathology in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease

María Andrea Aranz,¹ Samuel Ruiz de Martín Esteban,¹ Ana María Martínez Relimpio,¹ Neta Rimmerman,^{2,3} Nurit Tweezer Zaks,^{2,3} María Teresa Grande,¹ and Julián Romero^{1,*}

Abstract

Background: There is an urgent need for novel therapies to treat Alzheimer's disease. Among others, the use of cannabinoids such as delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) has been proposed as a putative approach based on their anti-inflammatory effects.

Methods: The present work was designed to explore the effects of chronic (28 days) treatment with low doses of cannabinoids: CBD (0.273 mg/kg), THC (0.205 mg/kg) or a combination of both (CBD:THC; 0.273 mg/kg:0.205 mg/kg) in the 5xFAD mouse model of AD.

Results: Our data revealed that THC-treated 5xFAD mice (but not other treatment groups) exhibited anxiogenic and depressant-like behavior. A significant improvement in spatial memory was observed only in the CBD:THC-treated group. Interestingly, all cannabinoid-treated groups showed significantly increased cortical levels of the insoluble form of beta amyloid 1-42. These effects were not accompanied by changes in molecular parameters of inflammation at the mRNA or protein level.

Conclusions: These data reveal differential effects of chronic, low-dose cannabinoids and point to a role of these cannabinoids in the processing of amyloid peptides in the brains of 5xFAD mice.

Keywords: Alzheimer; CBD; THC; behavior; amyloid

Introduction

ALZHEIMER'S DISEASE (AD) is a chronic neurodegenerative condition that leads to progressive cognitive impairment in the elderly and accounts for the majority of cases of dementia worldwide.¹ The main neuropathological features of this disease include the loss of neurons in the hippocampus and cortex, deposition of amyloid peptides and hyperphosphorylated tau, and development of a neuroinflammatory environment that is thought to aggravate the loss of neurons.^{2,3}

Clinically, AD is characterized by initial short-term memory loss, progressing to mild cognitive impairment and to dementia within years from the disease diagnosis. These features are accompanied by other

comorbidities such as sleep alterations, mood disorders, and visual and hearing impairments that eventually compromise basic functions and lead to death.^{1,4}

Considering epidemiologic data, the search for novel therapies for AD is utterly urgent.⁴ In humans, cannabinoids have been administered in several small clinical trials, mostly for treatment of behavioral symptoms of AD such as agitation and aggression.⁵⁻⁹ Among the cannabinoids, delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) have been proposed as putative therapeutics for AD. THC is the most abundant cannabinoid present in the *Cannabis sativa* plant and is responsible for the psychoactivity of plant derivatives consumed worldwide.¹⁰ This compound binds both CB₁ and CB₂

¹School of Pharmacy, Faculty of Experimental Sciences, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Spain.

²M.H. MediCane Ltd., Kfar Saba, Israel.

³MediCane R&D Ltd., Kfar Saba, Israel.

*Address correspondence to: Julián Romero, PhD, School of Pharmacy, Faculty of Experimental Sciences, Universidad Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, Spain, E-mail: jromero.prof@ufv.es

receptors¹¹ and exhibits several properties potentially relevant to AD, such as reduction in inflammation,¹² induction of hippocampal neurogenesis,¹³ and enhancement of amyloid beta ($A\beta$) removal.¹⁴

Moreover, THC was found to decrease $A\beta$ plaques and to induce neuroprotection in the 5xFAD mouse model of AD through a mechanism mediated by cyclooxygenase-2, providing a link between neuroinflammation and THC in the context of AD.¹⁵ However, at high doses, THC also triggers anxiety and memory impairment, which could be a limiting factor for its use as a drug in AD.^{6,16}

CBD, on the other hand, has been proposed as an attractive compound for treatment of several Central Nervous System (CNS) diseases, mainly because of its lack of psychoactive effects.¹⁷ The clinical use of CBD has been hampered by the complexity of its pharmacological properties that allow its interaction with a variety of receptors, such as CB₁ and CB₂, and several other GPCRs, transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1), several other ion channel receptors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), and fatty acid amide hydrolase (FAAH).^{10,18}

CBD has been also shown to have potent antioxidant and anti-inflammatory properties and to induce neuroprotection *in vitro*¹⁹ and *in vivo*.²⁰ In the context of AD, CBD has been shown to have beneficial effects in neuronal cell lines,^{21,22} in glial cells,²³ and in animal models of this disease.^{20,24,25}

The present studies have been designed to explore the potential anti-inflammatory and neuroprotective effects of cannabinoids, CBD alone, THC alone, or a combination of both (CBD:THC), in the 5xFAD mouse model of AD.

Materials and Methods

Mice

Eight-month-old, male hemizygous mice ($N=16$ per treatment group) coexpressing five familial AD mutations (5xFAD) and their wild-type (WT) littermates were used in these experiments.²⁶ Mice were housed at the animal facility of Universidad Francisco de Vitoria (authorization No. 28115000013). Experimental protocols met the European and Spanish regulations for protection of experimental animals (2010/63/EU and RD 1201/2005 and 53/2013) and were authorized by the local ethics committee (PROEX149/18).

Drugs, dosing, and treatments

High-purity (>97%) synthesized CBD and THC were purchased from Purisys, LLC (Athens, GA). Cannabi-

noids or vehicle stock solutions were prepared with ethanol (supplemented with 0.05% alpha tocopherol) and stored at -20°C and protected from light. To date, several small clinical trials have investigated the use of isolated cannabinoids as well as medical cannabis extracts for treatment of symptoms of dementia.^{27–36} A dose analysis revealed a safe and potentially efficacious THC oral dose of 0.75–12 mg daily in this elderly population.

To use translationally relevant chronic doses in the 5xFAD mice, we converted between the human equivalent doses (HEDs) and mouse doses according to the FDA Guidance for Industry on “Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers.” We selected doses that were on the lower end of clinically tested human doses for subjects with dementia, considering that all trials used oral dosing with associated low bioavailability and variable absorption, while 5xFAD mice received chronic i.p. administration.

The ratio between THC and CBD in this study was selected based on a screen of MediCane’s proprietary full-spectrum extracts on zebrafish neurological models (data not shown). Injectable solutions were prepared fresh each day from the ethanolic stock solutions using a ratio of 1:1:18 (ethanol:Cremophor[®]:saline) and were continuously stirred until injection. Mice were treated for 28 consecutive days.

The 5xFAD mice were divided into four groups (VEH, CBD, THC, and CBD+THC) with their WT (VEH) counterparts as controls. Each mouse received a daily i.p. injection containing vehicle, CBD (0.273 mg/kg), THC (0.205 mg/kg), or CBD:THC (0.273:0.205 mg/kg).

Behavioral tests

Elevated plus maze. The elevated plus maze (EPM) test was performed as described.^{37,38} Mice were analyzed for 5 min, allowing them to move freely in the platform. All tests were video recorded and analyzed by an independent researcher. Time spent in open arms was measured and expressed as % of time.

Rotarod. The Rotarod (RR) test (Panlab, Barcelona, Spain) was employed to quantify motor coordination in mice. Each mouse was tested for three consecutive trials, allowing 15 min of recovery between tests. The speed of the rolling bar was initially set at 4 rpm and then it was increased up to 40 rpm over 10 min. The time that the mouse stayed on the rolling bar was the latency time and only the third trial was represented.

Open-field test. Mice were placed in a flat circular arena and allowed to move freely for 10 min.³⁹ An independent researcher carried out the experiment and analyzed the images recorded with the SMART Video Tracking System, v.3 (Panlab). Parameters analyzed included total distance, time spent, and distance covered in the central and peripheral sections.

Tail suspension test. The tail suspension (TS) test provides a notion of the “depressive-like” state of a mouse.⁴⁰ Mice were tested for 6 min and images were recorded for analysis. Immobility time was quantified for each mouse.

Barnes maze. The Barnes maze (BM) test was used to get an estimation of memory impairment in mice.⁴¹ During the training sessions, individual mice were tested twice a day for 4 consecutive days. The mouse was placed in a cylindrical, black start chamber in the middle of the platform. After 10 sec, the chamber was removed to let the animal move freely for 3 min. All trials were recorded for the analysis. On the fifth day, a short-term memory retention test was performed (one trial).

An independent researcher carried out the experiment and analyzed images recorded with the SMART Video Tracking System, v.3 (Panlab). Latency time to the target hole was analyzed during the training sessions (days 1–4) and in the memory trial (day 5).

Molecular determinations

Quantification of A β 1–42 by enzyme-linked immunosorbent assay. To determine A β 1–42 levels in brain tissue, the hippocampus was homogenized in 10 volumes of ice-cold guanidine buffer (5.0 M guanidine·HCl/50 mM Tris·Cl, pH 8.0) containing the protease inhibitor cocktail (Roche).

Soluble and insoluble amyloid fractions were separated according to the following procedure: hippocampi were homogenized for a sequential extraction in 10 volumes of ice-cold TBS extraction buffer (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris [pH 7.4], and 5 mM EDTA) and the protease inhibitor cocktail (Roche) for the soluble fraction and guanidine buffer (5.0 M guanidine-HCl and 50 mM Tris, pH 8.0) containing the protease inhibitor cocktail (Roche) for the insoluble fraction.

Protein concentrations were determined in both fractions (Micro BCA™ protein assay kit; Thermo Scientific). Human enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Invitrogen) were used according to manufacturer’s specifications. 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.

Protein quantification by western blot. Cortices were homogenized in lysis buffer (MLB: 25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, and protease inhibitor cocktail; Roche). Then, samples were centrifuged at 12,000 g for 20 min at four degrees and protein concentrations were quantified (BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific).

Tissue lysates (50 μ g/lane) were loaded into sodium dodecyl sulfate (SDS)–polyacrylamide gels, and the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). After blocking in TTBS, they were incubated overnight at 4°C, as appropriate, with anti-GFAP (1:500; Bio-Rad), anti-Iba1 (1:1000; FUJIFILM Wako), anti-GAPDH (1:7000; Abcam), anti-PSD95 (1:1000; Abcam), and antisynaptophysin (1:1000; Abcam).

Membranes were incubated with corresponding horseradish peroxidase-conjugated mouse secondary antibody (1:10,000) or anti-rabbit (1:5000) and developed using a chemiluminescent reagent (GE Healthcare). Developed signals were recorded on the ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) for densitometric analysis (ImageJ).

Quantification of messenger RNA levels by real time-quantitative polymerase chain reaction. RNA from the cortex and hippocampus was isolated using the Tri-Pure isolation reagent (Roche). Then, a Transcriptor First Strand complementary DNA (cDNA) Synthesis Kit (Roche) was used according to manufacturer’s specifications, and different relative gene expression levels were measured using the CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad), Quantimix Easy Probes Kit (Biotools), and the following mouse probes conjugated with the FAM fluorophore PrimePCR™ Probe Assay (Bio-Rad): *Rps18* (qMmuCEP0053856), *Cnr2* (custom), *Cnr1* (qMmuCEP0038879), *Tnf* (qMmuCEP0028054), *Il6* (qMmuCEP0054186), and *Il1b* (qMmuCEP0054181).

RNA expression was calculated using the comparative Ct method normalized to the 18S ribosomal subunit. Data were expressed relative to a calibrator using the $2^{-(\Delta\Delta Ct)} \pm s$ formula.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with GraphPad 9.0. Normality was analyzed with the D’Agostino and Pearson or Shapiro–Wilk tests; normal data were checked for outliers with ROUT in GraphPad (10%),

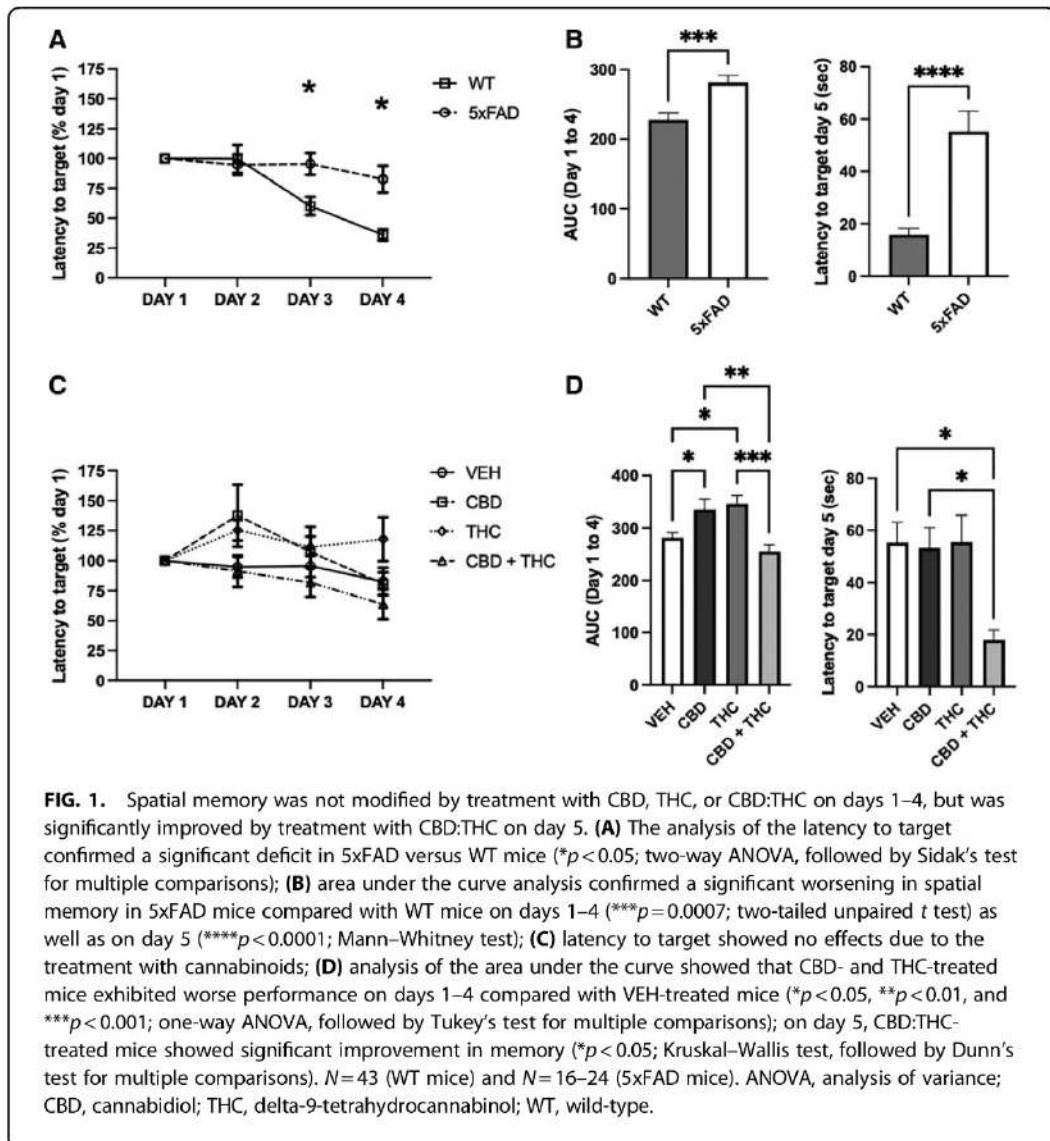
while non-normal data were assessed with the 1.5xSD approach. In the case of normal data, a two-tailed Student's *t*-test, one-way analysis of variance (ANOVA) (followed by Tukey's *post hoc* test), or two-way ANOVA (followed by Sidak's *post hoc* test) was used; for non-normally distributed data, the Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test was used.

A *p*-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Behavioral data

Spatial memory. As expected, 5xFAD mice exhibited impaired spatial memory (Fig. 1A) [genotype



$F(1, 65) = 6.909, p = 0.0107$; time $F(2.239, 132.1) = 12.85, p < 0.0001$; and interaction $F(3, 177) = 5.678, p = 0.0010$] in the BM test. Sidak's *post hoc* test revealed a significant effect on days 3 ($p = 0.0181$) and 4 ($p = 0.0029$). The AUC analysis confirmed this effect on days 1–4 ($p = 0.0007$, Fig. 1B, left). Difference in the latency to target was also significant on day 5 ($p < 0.0001$, Fig. 1B, right).

However, 5xFAD mice treated with the different cannabinoid combinations revealed differential results (Fig. 1C) [genotype $F(3, 73) = 3.288; p = 0.0273$; time $F(2.351, 154.4) = 3.852; p = 0.0177$; and interaction $F(9, 197) = 1.439; p = 0.1734$]. While CBD alone and THC alone worsened spatial memory on days 1–4 (Tukey's *post hoc* test: $p = 0.0420$ and $p = 0.0151$, respectively), the CBD:THC combination of both did not ($p = 0.5523$; Fig. 1C, D).

Interestingly, the latency to target on day 5 revealed a significant improvement in CBD:THC-treated mice over vehicle-treated mice (Tukey's *post hoc* test: $p = 0.0319$) (Fig. 1D).

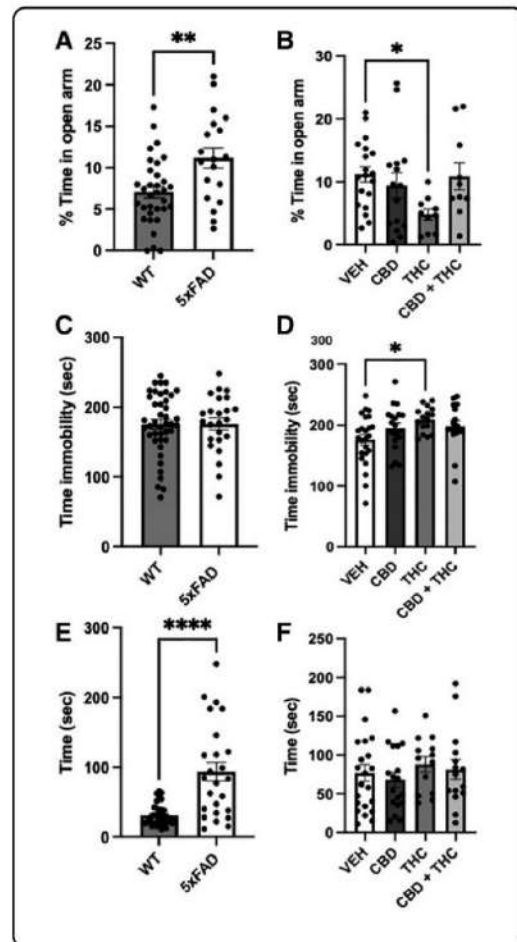
Anxiety. To measure anxiety-like behavior, we quantified the time spent in the open arms of the EPM. We found that 5xFAD mice showed decreased levels of anxiety compared with their WT counterparts ($p = 0.0064$; Fig. 2A). In addition, THC-treated 5xFAD mice showed increased anxiety [decreased time in open arms; $F(3, 50) = 2.623, p = 0.0607$; Tukey's *post*

hoc test: $p = 0.048$] (Fig. 2B). No changes were observed in mice exposed to CBD or CBD:THC (Fig. 2B).

Depression. The TS test was used as an indicator of the depressive state in mice. Our data showed no changes due to the amyloid pathology ($p = 0.9652$) (Fig. 2C). A significant increase in depressive-like behavior (increased immobility time) was observed only in THC-treated 5xFAD mice compared with vehicle-treated 5xFAD mice [$F(3, 72) = 2.991, p = 0.0365$; Tukey's *post hoc* test: $p = 0.0284$] (Fig. 2D).

Motor coordination. Analysis of the performance in the RR test showed that motor coordination was enhanced in 5xFAD mice ($p < 0.0001$; Fig. 2E). No

FIG. 2. Anxiety, depression, and locomotor coordination were measured using EPM (A, B), TS (C, D), and RR (E, F) tests, respectively. (A, B) The 5xFAD mice exhibited decreased anxious state compared with WT mice (** $p < 0.01$; Mann–Whitney test) and treatment with THC exacerbated anxiety in 5xFAD mice (* $p < 0.05$; one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons). (C, D) No differences were found between WT and 5xFAD mice, and a significant increase in time of immobility was triggered by the exposure to THC (* $p < 0.05$; one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons). (E, F) Locomotor coordination was enhanced in 5xFAD mice compared with WT mice (**** $p < 0.0001$; two-tailed unpaired *t* test) and no differences were found to be associated with treatment with the different cannabinoids. $N = 43$ (WT mice) and $N = 16$ –24 (5xFAD mice). EPM, elevated plus maze; RR, rotarod; TS, tail suspension.



changes associated with cannabinoid treatments were evident (Kruskal–Wallis test; $p=0.5004$; Fig. 2F).

Locomotor activity. The open-field test allows for determination of locomotor activity. Our data indicate that 5xFAD mice exhibited decreased locomotor activity (distance covered in the periphery and central part; $p<0.0001$ and $p=0.0192$, respectively) (Fig. 3C, D) that was not modified by treatment with any of the cannabinoids tested [periphery: $F(3, 70)=0.2195$, $p=0.8826$; center: $F(3, 70)=1.316$, $p=0.2762$] (Fig. 3).

Expression levels of cannabinoid receptors and markers of inflammation were unaltered by exposure to cannabinoids

We next analyzed the expression levels of cannabinoid *Cnr1* and *Cnr2* receptors and of several markers of neuroinflammation in the hippocampus (Fig. 4) and cortex (Fig. 5). No changes were observed in expression levels of cannabinoid CB₁ receptors due to the pathology or treatment with the different cannabinoids (Figs. 4A, 5A).

Regarding CB₂, a significant increase was detected in samples from 5xFAD mice compared with WT mice ($p<0.0001$), but no changes were found after exposure to CBD, THC, or CBD:THC (Figs. 4B, 5B). As expected, all inflammatory markers studied (TNF α , IL1 β , and IL6) were increased as a consequence of the increased amyloid production in 5xFAD mice compared with WT mice, both in the hippocampus and cortex ($p=0.0002$ and $p=0.0001$ for *Tnf*; $p=0.001$ and $p<0.0001$ for *Il1b*; and $p<0.0001$ and $p<0.0001$ for *Il6*) (Figs. 4C–E, 5C–E).

Exposure to CBD, THC, or the combination did not induce any changes in any of the parameters analyzed.

Protein levels of markers of gliosis and neuronal damage were not modified after treatment with cannabinoids

We employed western blot to quantify hippocampal and cortical levels of several proteins that are representative of the gliotic process and neurodegeneration and characteristic of the amyloid pathology. Protein levels

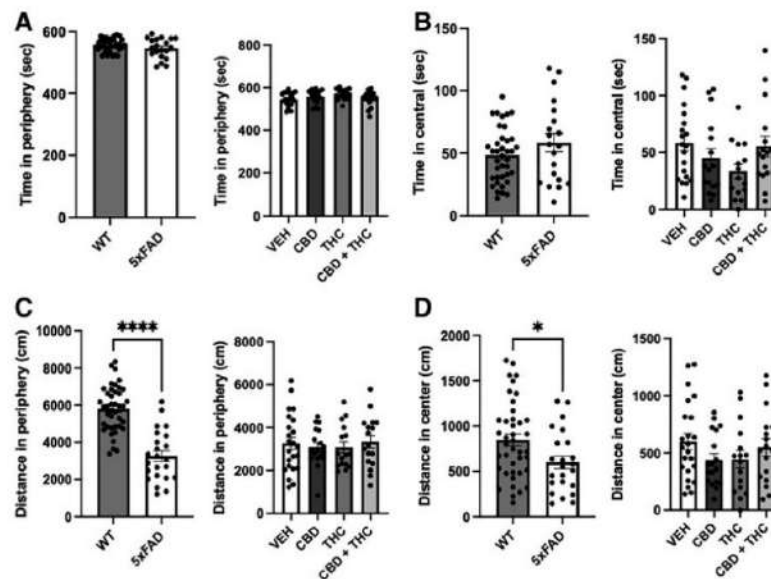


FIG. 3. The analysis of locomotor activity by the open-field test revealed no changes in time spent in peripheral or central areas of the arena (A, B) and showed a significant decrease in the distance covered (C, D) by 5xFAD mice compared with WT mice both in the periphery (**** $p<0.0001$; two-tailed unpaired t test) and in the center (* $p<0.05$; two-tailed unpaired t test) of the field. Treatment with the different cannabinoids tested did not lead to any significant changes. $N=43$ (WT mice) and $N=16-24$ (5xFAD mice).

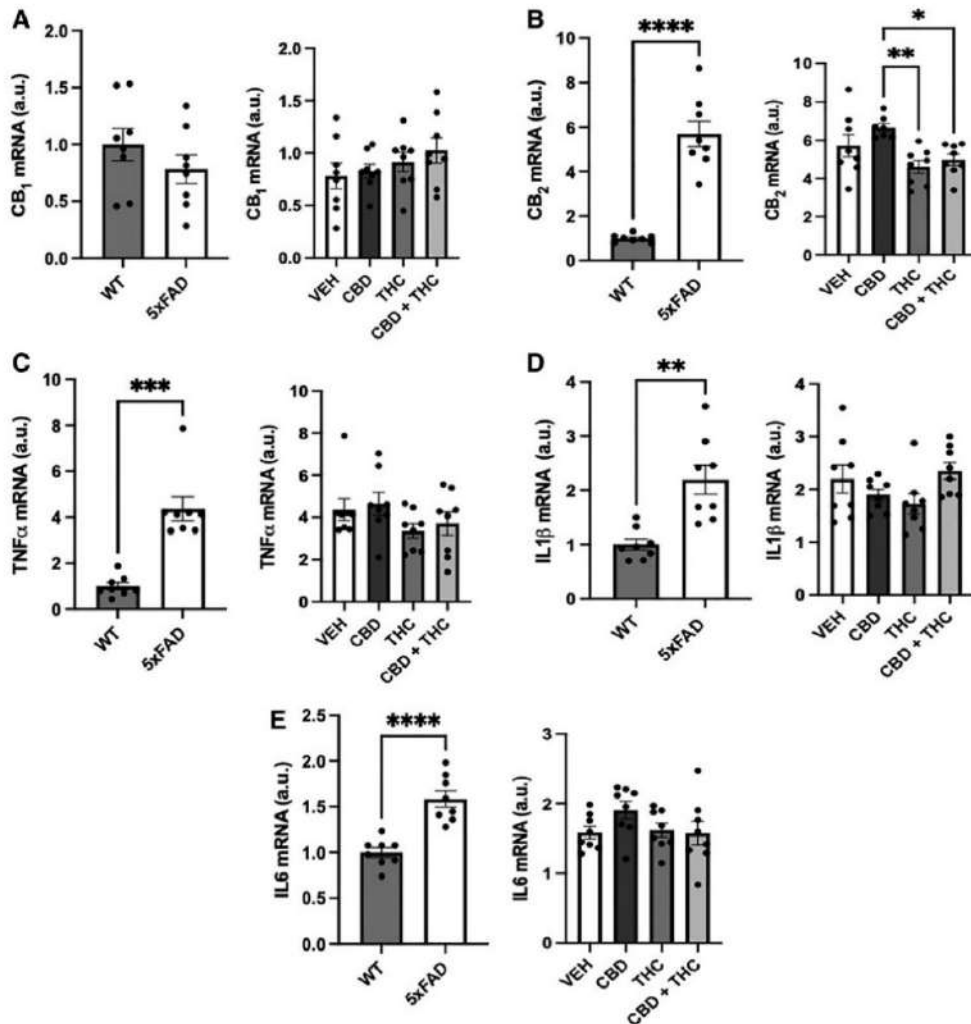
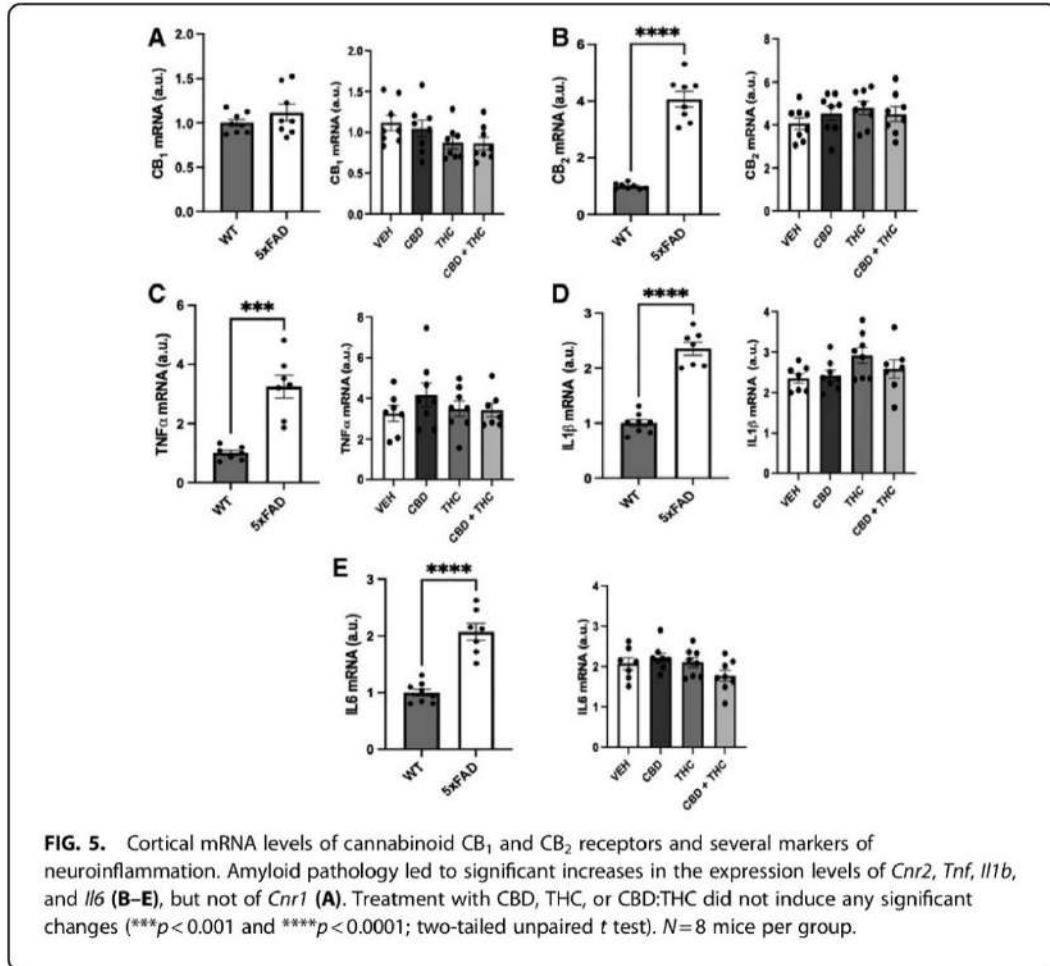


FIG. 4. Hippocampal mRNA levels of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors and several markers of neuroinflammation. Quantification of the expression levels of *Cnr1* (CB₁ receptors) (**A**) showed no differences linked to the amyloid pathology or to exposure to the different cannabinoids tested. A significant increase in *Cnr2* (CB₂ receptors) expression levels (**B**) was evident in 5xFAD versus WT mice, which was not modified after treatment with CBD, THC, or CBD:THC. Analysis of mRNA levels of *Tnf*, *Il1b*, and *Il6* (**C–E**) confirmed amyloid-induced changes that did not vary due to exposure to the cannabinoids tested (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; and **** $p < 0.0001$; two-tailed unpaired *t* test). $N = 8$ mice per group. mRNA, messenger RNA.



Downloaded by 24.9.35.214 from www.liebertpub.com at 12/07/23. For personal use only.

of Iba1, GFAP, synaptophysin, and PSD95 were determined. Our data confirmed the expected astrogliosis and microgliosis that are characteristic of 5xFAD mice, with significant increases in GFAP in the hippocampus ($p = 0.0027$) and cortex ($p = 0.0098$) and Iba1 ($p = 0.041$ and $p = 0.0003$, respectively) proteins (Figs. 6A, 6B, 7A, 7B). Treatment with the different cannabinoids, however, did not modify protein levels of the gliosis markers.

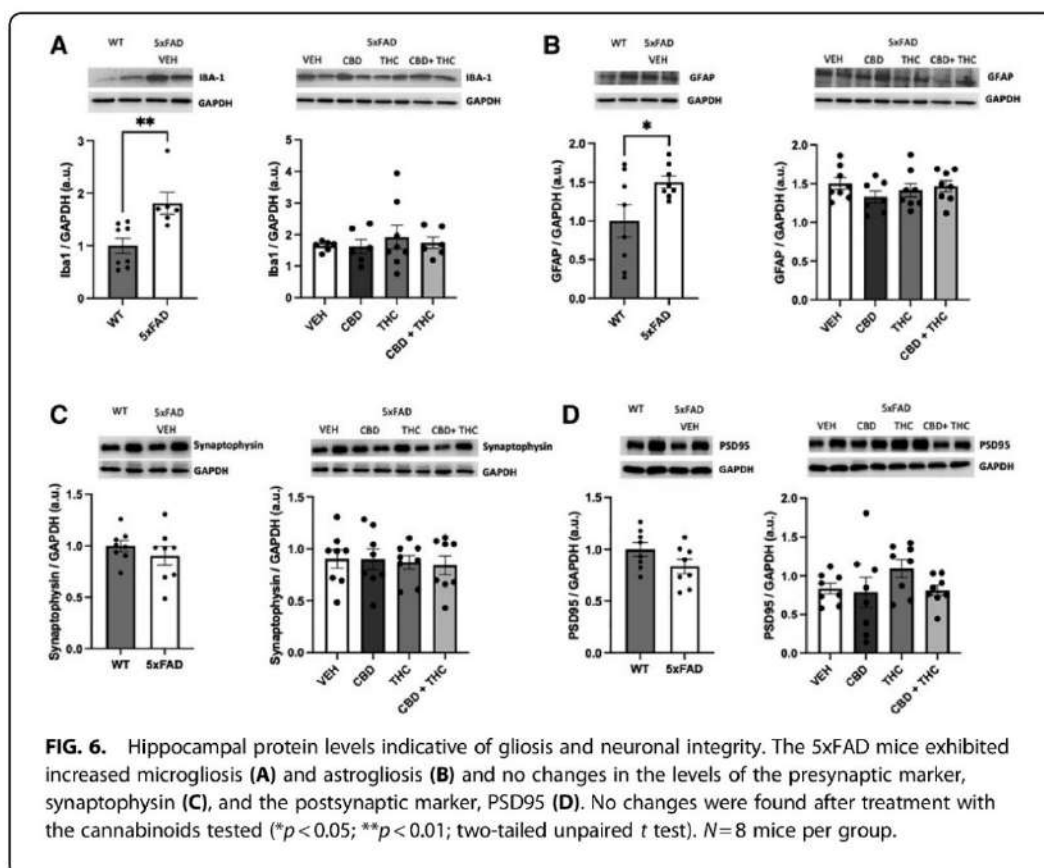
Quantification of markers of synaptic integrity revealed a decrease in the presynaptic marker, synaptophysin, in the cortex due to the AD-like pathology ($p = 0.0278$; Fig. 6C), but not of PSD95 (Figs. 6D, 7D).

No changes in these markers were observed after exposure to cannabinoids (Figs. 6C, 6D, 7C, 7D).

Aβ 1–42 levels

Finally, we quantified the hippocampal levels of the main pathological form of the amyloid peptide (Aβ 1–42) by ELISA. We found that while soluble amyloid levels remained unaltered after treatment with cannabinoids [$F(3, 28) = 0.9667$, $p = 0.4222$] (Fig. 8A), those of insoluble amyloid were significantly modified [$F(3, 28) = 10084$, $p < 0.0001$] (Fig. 8B).

Thus, exposure to CBD, THC, or the combination of both induced significant increases in respect to vehicle-



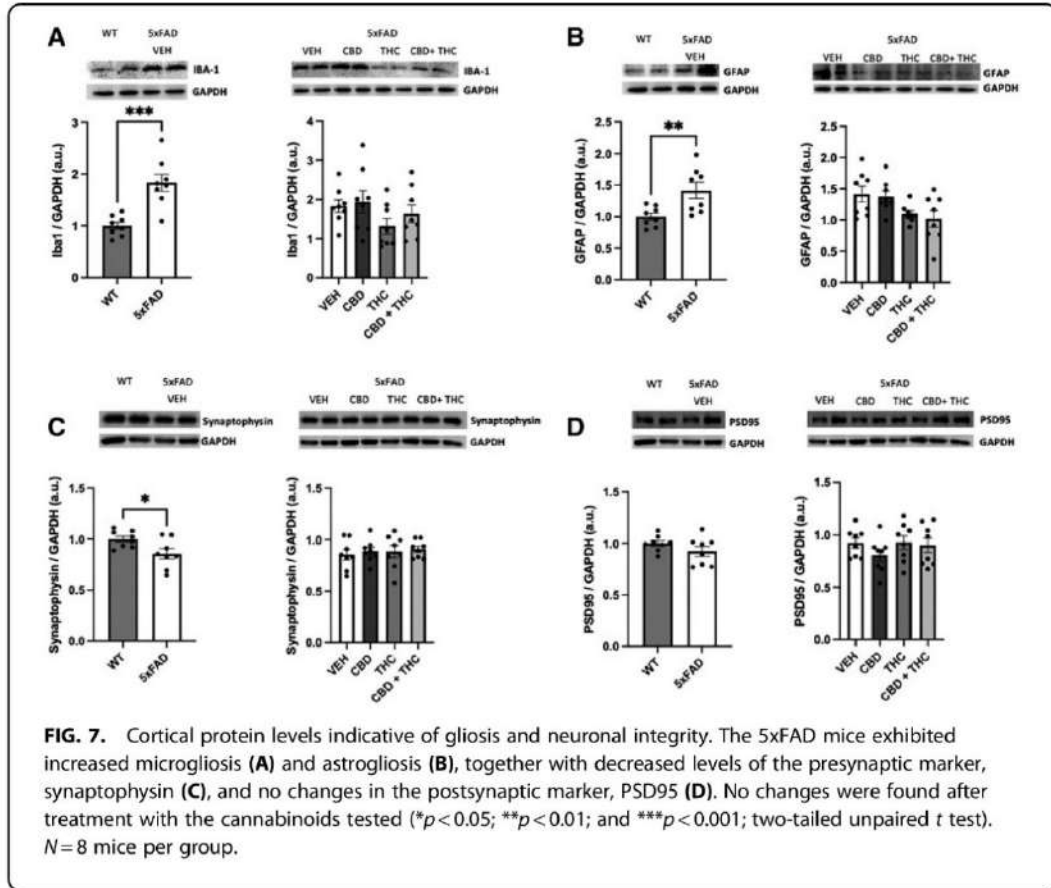
treated 5xFAD mice. Furthermore, this increase was maximal in CBD:THC-treated mice (Tukey's *post hoc* test: $p < 0.0001$) followed by THC-treated mice and, in lower levels, CBD-treated mice (Fig. 8B).

Discussion

In this study, we report the effects of the treatment with CBD, THC, or a mixture of both on behavioral and molecular parameters in the 5xFAD mouse model of AD. The main findings of this study are that (1) THC enhanced anxiety and depression (EPM and TS tests), (2) CBD and THC showed different effects when administered alone than in combination (BM test), and (3) all treatments with these cannabinoids led to an increase in the insoluble form of A β .

Importantly, these effects were not accompanied by significant changes in molecular parameters of inflammation at the messenger RNA (mRNA) or protein level. We also confirmed previously published observations on 5xFAD mice, such as increased motor coordination of these mice over controls at 6 months of age,⁴² decreased locomotion,⁴³ and induction of proinflammatory markers as a consequence of exacerbated amyloid production.²⁶

THC-induced amnesic effects are known to be mediated by hippocampal CB₁ receptors,⁴⁴ expressed in GABAergic interneurons, and involve postsynaptic NMDA glutamatergic receptors.⁴⁵ Interestingly, low doses (1 and 3 mg/kg) of THC induce improvements in cognitive performance in aged mice.^{46,47} Furthermore, the coadministration of CBD prevented this



Downloaded by 24.9.35.214 from www.liebertpub.com at 12/07/23. For personal use only.

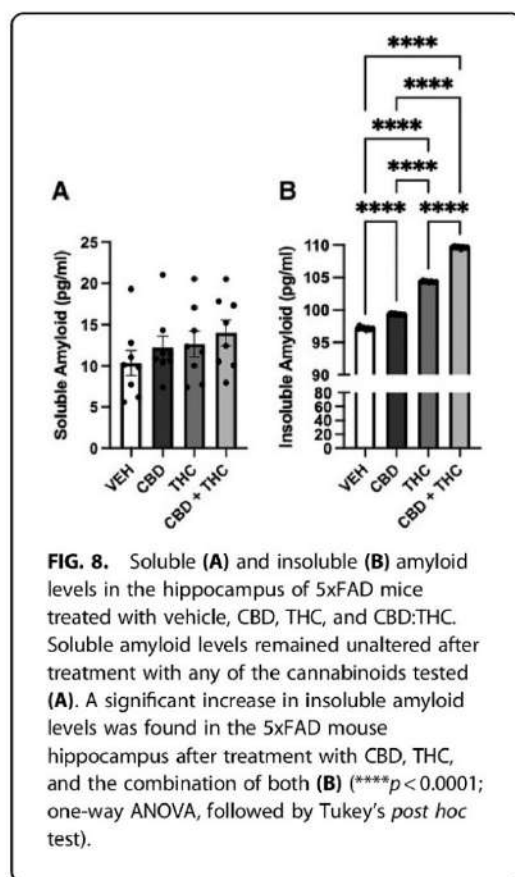
beneficial effect.⁴⁷ In our study, CBD also impaired learning working memory in 5xFAD mice (Fig. 1).

This observation is in contrast with previously published data reporting a beneficial effect of this cannabinoid in both *in vitro* and *in vivo* models of AD (reviewed by Watt and Karl⁴⁸). We do not have an explanation for this observation, other than the dose employed and the age of mice (8 months old) differing from previously published literature. As has been recently highlighted,⁴⁹ dosage, ratios, route of administration, and age of mice may be crucial determinants to explain the disparity in data after administration of cannabinoids in the context of age-associated behavioral and molecular effects.

Our data also suggest the existence of an antagonizing effect between CBD and THC, leading to

significantly different consequences when used in combination in the context of amyloid-induced memory impairment.¹⁰ This is in agreement with recently published reports demonstrating that CBD is capable of dampening the psychoactive effects of THC, including memory impairment.⁴⁹

After its description by Ben-Shabat et al.,⁵⁰ different mechanisms have been suggested to explain how nonactive cannabinoids may modulate the activity of, for instance, THC. Examples of these interactions between phytocannabinoids and endocannabinoids have been obtained in pre-clinical models of cancer and pain, but no conclusive data have been reported yet. It has been speculated, for instance, cannabinoids may regulate the interplay of other cannabinoids with CB₁ and/or CB₂, alter the metabolism of



Downloaded by 24.9.35.214 from www.liebertpub.com at 12/07/23. For personal use only.

endocannabinoids, or enhance the interaction with additional receptors such as TRPV1 or GPR55.⁵¹

The molecular basis for these effects is not clear. We have measured inflammatory parameters both in the hippocampus and cortex because, as previously shown by Negrón-Oyarzo et al.,⁵² the interplay between these two brain structures is critical for spatial memory consolidation. We found no significant differences in neuroinflammation-related parameters in the hippocampus or cortex after exposure to any of the cannabinoids tested, thus ruling out a possible effect on neuroinflammatory conditions as a putative explanation for the observed changes in memory.

Aso et al. addressed this question in the A β PP/PS1 mouse model of AD.^{53,54} These authors chronically treated 6- and 12-month-old mice with low doses

(0.75 mg/kg) of plant-extracted THC, CBD, and a combination of both and found a cannabinoid-induced improvement in memory impairment. Interestingly, mice exposed to the CBD:THC mixture also exhibited improvement in a complex cognitive task, such as the active avoidance test.⁵⁴

Discrepancies between our present data and those reported by these authors may be due to the drugs used (plant-extracted vs. synthetic drugs), doses administered (0.75 mg/kg vs. 0.273 and 0.205 mg/kg for CBD and THC, respectively), and time of testing (5 weeks of treatment vs. 28 days).

Our data also revealed that 5xFAD mice exhibited decreased anxiety compared with their WT littermates, but that treatment of 5xFAD mice with THC alone led to increased anxiety, as revealed by the EPM test. These data parallel those recently reported by Forner et al.,⁵⁵ who found a significant increase in the time spent in the open arm of the EPM by 5xFAD mice and confirm previous observations linking THC with the development of an anxious state in mice (recently reviewed by Iglesias et al.⁵⁶).

We also observed significant increases in the insoluble form of A β in CBD-, THC-, and CBD:THC-treated mice, being maximal in this last group. These data are in partial agreement with those of Aso et al.,⁵³ who found a facilitative effect of the CBD:THC mixture on A β deposition. On the contrary, these authors found no changes in plaque composition in CBD- and THC-treated mice.

In vitro^{57,58} and molecular modeling^{59,60} studies have shown that THC is capable of modifying A β fibrillation, although the biological relevance of these interactions is not clear. It is now established that the complexity of the diverse amyloid species may be a critical contributing factor to AD pathology.⁶¹ Increasing toxicity is significantly associated with soluble low-molecular-mass oligomers, which are significantly more neurotoxic and interfere with key neuronal functions such as long-term potentiation.⁶² Soluble oligomeric species show a high surface-to-volume ratio and hydrophobic-like properties and are prone to bind to membranes, which lead to pore formation and membrane permeability.^{3,59}

As well as exhibiting structural differences in the monomeric state, oligomers may initiate aberrant cellular processes through specific and non-specific interactions with receptors, mitochondria, synaptic vesicles, and membranes, leading to aberrant signaling or cellular dysfunction.³ In this line of reasoning, the increase

in insoluble amyloid levels observed herein might be considered as a protective effect, directed to prevent the spread of damage linked to small-sized oligomers.

In addition to THC and CBD, other plant cannabinoids have been recently tested on their putative effects on amyloid-induced damage. A study by Patil et al. has demonstrated that cannabidiol (a phytocannabinoid present in trace amounts in *C. sativa*) and cannabidiol inhibited enzymes related to AD, including acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.⁶³

In addition, delta-8-tetrahydrocannabinol (an isomer of THC) has been recently shown to inhibit endoplasmic reticulum stress, leading to enhancement in cell viability in an *in vitro* model of amyloid-induced toxicity.⁶⁴ This phytocannabinoid also prevented neuronal apoptosis by inhibiting Bax and increasing Bcl-2 protein levels.

Finally, the *in vivo* and *in vitro* protective effects of the acidic variants of CBD and THC, cannabidiolic acid (CBDA) and tetrahydrocannabinolic acid (THCA), respectively, have been studied by Kim et al.⁶⁵ These authors found that both CBDA and THCA decreased A β and p-tau levels and enhanced the neuroprotective effect of the brain-derived neurotrophic factor by normalizing intracellular calcium levels in neurons.

Altogether, these novel data highlight the potential of different cannabinoids as effective modulators of amyloid-induced alterations.

Authors' Contributions

M.A.A. and S.R.M.E. were involved in methodology and investigation; A.M.M.R. and M.T.G. were involved in methodology, visualization, and investigation; N.R. was involved in conceptualization, resources, and writing; N.T.Z. was involved in conceptualization and resources; and J.R. was involved in visualization, supervision, and writing.

Author Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interest.

Funding Information

This study was funded by Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-108992RB-I00/AEI/10.13039/501100011033).

References

- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease. *Lancet* 2011; 377(9770):1019–1031; doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9

- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2010;362(4): 329–344; doi: 10.1056/NEJMra0909142
- Tzioras M, McGeachan RI, Durrant CS, et al. Synaptic degeneration in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2023;19(1):19–38; doi: 10.1038/s41582-022-00749-z
- Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* 2021;7(1):33; doi: 10.1038/s41572-021-00269-y
- Outen JD, Burhanullah MH, Vandrey R, et al. Cannabinoids for Agitation in Alzheimer's Disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 2021;29(12):1253–1263; doi: 10.1016/j.jagp.2021.01.015
- Abate G, Uberti D, Tambaro S. Potential and limits of cannabinoids in Alzheimer's disease therapy. *Biology (Basel)* 2021;10(6):542; doi: 10.3390/biology10060542
- Broers B, Patà Z, Mina A, et al. Prescription of a THC/CBD-based medication to patients with dementia: A pilot study in Geneva. *Med Cannabis Cannabinoids* 2019;2(1):56–59; doi: 10.1159/000498924
- Hillen JB, Soulsby N, Alderman C, et al. Safety and effectiveness of cannabinoids for the treatment of neuropsychiatric symptoms in dementia: A systematic review. *Ther Adv Drug Saf* 2019;10: 2042098619846993; doi: 10.1177/2042098619846993
- Hermush V, Ore L, Stern N, et al. Effects of rich cannabidiol oil on behavioral disturbances in patients with dementia: A placebo controlled randomized clinical trial. *Front Med* 2022;9:951889; doi: 10.3389/fmed.2022.951889
- Pacher P, Kogan NM, Mechoulam R. Beyond THC and endocannabinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2020;60:637–659; doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021441
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev* 2010;62(4):588–631; doi: 10.1124/pr.110.003004
- Miller HP, Bonawitz SC, Ostrovsky O. The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on inflammation: A review. *Cell Immunol* 2020;352:104111; doi: 10.1016/j.cellimm.2020.104111
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, et al. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 2005;115(11):3104–3116; doi: 10.1172/JCI25509
- Cao C, Li Y, Liu H, et al. The potential therapeutic effects of THC on Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014;42(3):973–984; doi: 10.3233/JAD-140093
- Chen R, Zhang J, Fan N, et al. Δ^9 -THC-caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling. *Cell* 2013;155(5): 1154–1165; doi: 10.1016/j.cell.2013.10.042
- Calabrese EJ, Rubio-Casillas A. Biphasic effects of THC in memory and cognition. *Eur J Clin Invest* 2018;48(5):e12920; doi: 10.1111/eci.12920
- Yau GTY, Tai W, Arnold JC, et al. Cannabidiol for the treatment of brain disorders: Therapeutic potential and routes of administration. *Pharm Res* 2023;40(5):1087–1114; doi: 10.1007/s11095-023-03469-1
- Tham M, Yilmaz O, Alaverdashvili M, et al. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2019;176(10):1455–1469; doi: 10.1111/bph.14440
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, et al. Cannabidiol and (-)-delta-9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(14):8268–8273; doi: 10.1073/pnas.95.14.8268
- Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez BG, et al. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation *in vitro* and *in vivo*: Relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 2011;79(6):964–973; doi: 10.1124/mol.111.071290
- Iuvone T, Esposito G, Esposito R, et al. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 2004;89(1):134–141; doi: 10.1111/j.1471-4159.2003.02327.x
- Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC, et al. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett* 2006;399(1–2):91–95; doi: 10.1016/j.neulet.2006.01.047
- Esposito G, De Filippis D, Steardo L, et al. CB1 receptor selective activation inhibits beta-amyloid-induced iNOS protein expression in C6 cells and

CBD, THC, AND A COMBINATION OF BOTH IN A MOUSE MODEL OF AD

13

- subsequently blunts tau protein hyperphosphorylation in co-cultured neurons. *Neurosci Lett* 2006;404(3):342–346; doi: 10.1016/j.neulet.2006.06.012
24. Esposito G, Scuderi C, Savani C, et al. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2007;151(8):1272–1279; doi: 10.1038/sj.bjp.0707337
 25. Cheng D, Spiro AS, Jenner AM, et al. Long-term cannabidiol treatment prevents the development of social recognition memory deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 2014;42(4):1383–1396; doi: 10.3233/JAD-140921
 26. Oakley H, Cole SL, Logan S, 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* 2006;26(40):10129–10140; doi: 10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
 27. Pautex S, Bianchi F, Daali Y, et al. Cannabinoids for behavioral symptoms in severe dementia: Safety and feasibility in a long-term pilot observational study in nineteen patients. *Front Aging Neurosci* 2022;14:957665; doi: 10.3389/fnagi.2022.957665
 28. Shelef A, Barak Y, Berger U, et al. Safety and efficacy of medical cannabis oil for behavioral and psychological symptoms of dementia: An open label, add-on, pilot study. *J Alzheimers Dis* 2016;51(1):15–19; doi: 10.3233/JAD-150915
 29. Ahmed AIA, van den Elsen GAH, Colbers A, et al. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of multiple oral doses of delta-9-tetrahydrocannabinol in older persons with dementia. *Psychopharmacology (Berl)* 2015;232(14):2587–2595; doi: 10.1007/s00213-015-3889-y
 30. Ahmed AIA, van den Elsen GAH, Colbers A, et al. Safety and pharmacokinetics of oral delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy older subjects: A randomized controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014;24(9):1475–1482; doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.06.007
 31. van den Elsen GAH, Ahmed AIA, Verkes R-J, et al. Tetrahydrocannabinol in behavioral disturbances in dementia: A crossover randomized controlled trial. *Am J Geriatr Psychiatry* 2015;23(12):1214–1224; doi: 10.1016/j.jagp.2015.07.011
 32. van den Elsen GAH, Ahmed AIA, Verkes R-J, et al. Tetrahydrocannabinol for neuropsychiatric symptoms in dementia: A randomized controlled trial. *Neurology* 2015;84(23):2338–2346; doi: 10.1212/WNL.0000000000001675
 33. Volicer L, Stelly M, Morris J, et al. Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 1997;12(9):913–919.
 34. Walther S, Schüpbach B, Seifritz E, et al. Randomized, controlled crossover trial of dronabinol, 2.5 mg, for agitation in 2 patients with dementia. *J Clin Psychopharmacol* 2011;31(2):256–258; doi: 10.1097/JCP.0b013e31820e861c
 35. van den Elsen GA, Tobben L, Ahmed AI, et al. Effects of tetrahydrocannabinol on balance and gait in patients with dementia: A randomised controlled crossover trial. *J Psychopharmacol* 2017;31(2):184–191; doi: 10.1177/0269881116665357
 36. Woodward MR, Harper DG, Stolyar A, et al. Dronabinol for the treatment of agitation and aggressive behavior in acutely hospitalized severely demented patients with noncognitive behavioral symptoms. *Am J Geriatr Psychiatry* 2014;22(4):415–419; doi: 10.1016/j.jagp.2012.11.022
 37. Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp* 2008;(22):1088; doi: 10.3791/1088
 38. Saravia R, Ten-Blanco M, Julià-Hernández M, et al. Concomitant THC and stress adolescent exposure induces impaired fear extinction and related neurobiological changes in adulthood. *Neuropharmacology* 2019;144:345–357; doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.11.016
 39. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 2015;(96):e52434; doi: 10.3791/52434
 40. Can A, Dao DT, Terrillon CE, et al. The tail suspension test. *J Vis Exp* 2012;(59):e3769; doi: 10.3791/3769
 41. Sunyer B, Patil S, Höger H, et al. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protoc Exch* 2007;390; doi: 10.1038/nprot.2007.390
 42. Fertan E, Brown RE. Age-related deficits in working memory in 5xFAD mice in the Hebb-Williams maze. *Behav Brain Res* 2022;424:113806; doi: 10.1016/j.bbr.2022.113806
 43. O'Leary TP, Robertson A, Chipman PH, et al. Motor function deficits in the 12 month-old female 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2018;337:256–263; doi: 10.1016/j.bbr.2017.09.009
 44. Wise LE, Thorpe AJ, Lichtman AH. Hippocampal CB(1) receptors mediate the memory impairing effects of delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology* 2009;34(9):2072–2080; doi: 10.1038/npp.2009.31
 45. Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-García A, et al. Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 2009;12(9):1152–1158; doi: 10.1038/nn.2369
 46. Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A, et al. A chronic low dose of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat Med* 2017;23(6):782–787; doi: 10.1038/nm.4311
 47. Nidadavolu P, Bilkei-Gorzo A, Krämer M, et al. Efficacy of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol (THC) alone or in combination with a 1:1 ratio of cannabidiol (CBD) in reversing the spatial learning deficits in old mice. *Front Aging Neurosci* 2021;13:718850; doi: 10.3389/fnagi.2021.718850
 48. Watt G, Karl T. In vivo evidence for therapeutic properties of cannabidiol (CBD) for Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* 2017;8:20; doi: 10.3389/fphar.2017.00020
 49. Coles M, Steiner-Lim GZ, Karl T. Therapeutic properties of multi-cannabinoid treatment strategies for Alzheimer's disease. *Front Neurosci* 2022;16:962922; doi: 10.3389/fnins.2022.962922
 50. Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, et al. An entourage effect: Inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol* 1998;353(1):23–31; doi: 10.1016/s0014-2999(98)00392-6
 51. Anand U, Pacchetti B, Anand P, et al. Cannabis-based medicines and pain: A review of potential synergistic and entourage effects. *Pain Manag* 2021;11(4):395–403; doi: 10.2217/pmt-2020-0110
 52. Negrón-Oyarzo I, Espinosa N, Aguilar-Rivera M, et al. Coordinated prefrontal-hippocampal activity and navigation strategy-related prefrontal firing during spatial memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115(27):7123–7128; doi: 10.1073/pnas.1720117115
 53. Aso E, Sánchez-Pla A, Vegas-Lozano E, et al. Cannabis-based medicine reduces multiple pathological processes in A β /PP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis* 2015;43(3):977–991; doi: 10.3233/JAD-141014
 54. Aso E, Andrés-Benito P, Ferrer I. Delineating the efficacy of a cannabis-based medicine at advanced stages of dementia in a murine model. *J Alzheimers Dis* 2016;54(3):903–912; doi: 10.3233/JAD-160533
 55. Forner S, Kawauchi S, Balderrama-Gutiérrez G, et al. Systematic phenotyping and characterization of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Data* 2021;8(1):270; doi: 10.1038/s41597-021-01054-y
 56. Iglesias LP, Bedeschi L, Aguiar DC, et al. Effects of $\Delta(9)$ -THC and type-1 cannabinoid receptor agonists in the elevated plus maze test of anxiety: A systematic review and meta-analysis. *Cannabis Cannabinoid Res* 2023;8(1):24–33; doi: 10.1089/can.2022.0078
 57. Janefjord E, Määg JLV, Harvey BS, et al. Cannabinoid effects on β amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 2014;34(1):31–42; doi: 10.1007/s10571-013-9984-x
 58. Wang Y, Hong Y, Yan J, et al. Low-dose delta-9-tetrahydrocannabinol as beneficial treatment for aged APP/PS1 mice. *Int J Mol Sci* 2022;23(5):2757; doi: 10.3390/ijms23052757
 59. Eubanks LM, Rogers CJ, Beuscher AE 4th, et al. A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Mol Pharm* 2006;3(6):773–777; doi: 10.1021/mp060066m
 60. Kanchi PK, Dasmahapatra AK. Destabilization of the Alzheimer's amyloid- β protofibrils by THC: A molecular dynamics simulation study. *J Mol Graph Model* 2021;105:107889; doi: 10.1016/j.jmgm.2021.107889
 61. Stefani M. Structural polymorphism of amyloid oligomers and fibrils underlies different fibrillization pathways: Immunogenicity and cytotoxicity. *Curr Protein Pept Sci* 2010;11(5):343–354; doi: 10.2174/138920310791330631
 62. Choi ML, Gandhi S. Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *FEBS J* 2018;285(19):3631–3644; doi: 10.1111/febs.14587

63. Patil N, Chandel V, Rana A, et al. Investigation of *Cannabis sativa* phytochemicals as anti-Alzheimer's agents: An in silico study. *Plants (Basel)* 2023;12(3):510; doi: 10.3390/plants12030510
64. Gugliandolo A, Blando S, Salamone S, et al. $\Delta(8)$ -THC protects against amyloid beta toxicity modulating ER stress in vitro: A transcriptomic analysis. *Int J Mol Sci* 2023;24(7):6598; doi: 10.3390/ijms24076598
65. Kim J, Choi P, Park Y-T, et al. The cannabinoids, CBDA and THCA, rescue memory deficits and reduce amyloid-beta and tau pathology in an Alzheimer's disease-like mouse model. *Int J Mol Sci* 2023;24(7):6827; doi: 10.3390/ijms24076827

Cite this article as: Arnanz MA, Ruiz de Martín Esteban S, Martínez Relimpio AM, Rimmerman N, Tweezer Zaks N, Grande MT, Romero J (2023) Effects of chronic, low-dose cannabinoids, cannabidiol, delta-9-tetrahydrocannabinol and a combination of both, on amyloid pathology in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease, *Cannabis and Cannabinoid Research* XX, 1–14, DOI: 10.1089/can.2023.0101.





Abbreviations Used

A β = amyloid beta
 AD = Alzheimer's disease
 ANOVA = analysis of variance
 BM = Barnes maze
 CBD = cannabidiol
 CBDA = cannabidiolic acid
 ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay
 EPM = elevated plus maze
 mRNA = messenger RNA
 RR = rotarod
 THC = delta-9-tetrahydrocannabinol
 THCA = tetrahydrocannabinolic acid
 TRPV1 = transient receptor potential vanilloid-1
 TS = tail suspension
 WT = wild-type

ANEXO VII

RESEARCH ARTICLE

Fatty acid amide hydrolase gene inactivation induces hetero-cellular potentiation of microglial function in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease

María Andrea Arnanz¹  | María Ferrer² | María Teresa Grande¹ | Samuel Ruiz de Martín Esteban¹ | Gonzalo Ruiz-Pérez³ | Benjamin F. Cravatt^{4,5} | Ricardo Mostany⁶  | Víctor Javier Sánchez-Arévalo Lobo^{1,2} | Julián Romero¹  | Ana María Martínez-Relimpio¹ 

¹Faculty of Experimental Sciences, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Spain

²Departamento de Anatomía Patológica, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

³Neuroscience Research Center and Department of Pharmacology and Toxicology, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, USA

⁴The Skaggs Institute for Chemical Biology, Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, San Diego, California, USA

⁵The Skaggs Institute for Chemical Biology, Department of Chemistry, The Scripps Research Institute, San Diego, California, USA

⁶Department of Pharmacology, Tulane University School of Medicine, New Orleans, Louisiana, USA

Correspondence

Julián Romero and Ana María Martínez-Relimpio, Faculty of Experimental Sciences, Universidad Francisco de Vitoria 28223, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain.
Email: j.romero.prof@ufv.es and am.martinez.prof@ufv.es

Funding information

Universidad Francisco de Vitoria, Grant/Award Number: Ufv2024-09; Ministerio de Ciencia e Innovación - Agencia Estatal de Investigación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Grant/Award Number: PID2022-138461OB-I00

Abstract

Neuroinflammation has recently emerged as a crucial factor in Alzheimer's disease (AD) etiopathogenesis. Microglial cells play an important function in the inflammatory response; specifically, the emergence of disease-associated microglia (DAM) has offered new insights into the conflicting perspectives on the detrimental or beneficial roles of microglia. We previously showed that modulating the endocannabinoid tone by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inactivation renders beneficial effects in an amyloidosis context, paradoxically accompanied by an exacerbated neuroinflammatory response and the enrichment of DAM population. Here, we aim to elucidate the role of microglial cells in FAAH-lacking mice in the 5xFAD mouse model of AD by using RNA-sequencing analysis, molecular determinations, and morphological studies by using in vivo multiphoton microscopy. FAAH-lacking AD mice displayed upregulated inflammatory genes and exhibited a DAM genetic profile. Conversely, genes linked to AD were downregulated. Depleting microglia using PLX5622 revealed that plaque-associated microglia in FAAH-deficient AD mice had a more stable, ramified morphology and increased A β uptake, leading to reduced plaque growth compared to control mice. Importantly, FAAH expression was negligible in microglial cells, thus suggesting a role for FAAH in the cellular interplay in the central nervous system. Our findings show that *Faah* gene inactivation triggers a hetero-cellular enhancement of

Abbreviations: 5xFAD, five familial Alzheimer's disease mutations; A β , amyloid beta; AD, Alzheimer's disease; AEA, anandamide; CB₂R, cannabinoid receptor subtype 2; CSF1L, colony stimulating factor 1 ligand; CSF1R, colony stimulating factor 1 receptor; DAM, disease-associated microglia; ECS, endocannabinoid system; FAAH, fatty acid amide hydrolase; FDR, false discovery rate; GSEA, gene set enrichment analysis; IL1 α , interleukin 1 alpha; IL1 β , interleukin 1 beta; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; mRNA, messenger ribonucleic acid; MSigDB, molecular signatures database; NAEs, N-acyl ethanolamines; NES, normalized enrichment scores; NLRP3, NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3; RNA-seq, ribonucleic acid sequencing; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction; TLR4, toll-like receptor 4.

microglial function that was paradoxically paralleled by an exacerbated inflammatory response. Taken together, the present data highlight FAAH as a potential therapeutic target in AD.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, damage associated microglia, fatty acid amide hydrolase, microglia, neuroinflammation, two-photon microscopy

1 | INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by the deterioration of cognitive functions and changes in behavior, typically beginning with impaired short-term memory. It has become the leading cause of dementia and its worldwide prevalence is projected to continue rising. AD is considered a multifactorial disorder influenced by various risk factors such as advancing age, vascular diseases, and genetic factors that significantly contribute to disease development (Zhang et al., 2021). From a molecular point of view, primary changes include intraneuronal deposits of hyperphosphorylated tau protein (so called "neurofibrillary tangles"), reduced levels of acetylcholinesterase, and formation of extracellular deposits of amyloid beta (A β) peptide 1–42 and 1–40 in the brain parenchyma (referred to as "neuritic plaques") (Zhang et al., 2021). However, accumulating evidence suggests that these classic pathological hallmarks cannot fully explain much of the pathogenesis of AD, suggesting the involvement of additional mechanisms of disease. Specifically, with the discovery of elevated levels of inflammatory markers in AD patients, inflammation has emerged as a crucial factor in AD etiopathogenesis (Leng & Edison, 2021).

Neuroinflammation generally refers to an inflammatory response within the central nervous system (CNS) and is a common feature in the development of neurodegenerative pathologies. It can be considered as a physiological protective response that, when chronically active, can also drive neurodegeneration. Nevertheless, the role played by neuroinflammation in neurodegenerative diseases, particularly in AD, is still a subject of debate (Leng & Edison, 2021). In general, it is accepted that there is a significant chronic release of inflammatory cytokines in the AD brain, primarily from microglial cells. Microglia, the resident macrophages of the brain and spinal cord, have traditionally been described as a uniform population of cells, essential for CNS development and brain homeostasis. However, under neurodegenerative conditions, they transition from their normal function to a state where they become detrimental to CNS health (Heneka et al., 2015). Recently, comprehensive single-cell RNA analysis of CNS immune cells under neurodegenerative conditions has revealed the existence of disease-associated microglia (DAM) (Keren-Shaul et al., 2017). These microglia represent a distinct subset of cells displaying a unique transcriptional and functional signature. In AD mouse models, DAM are closely associated with A β plaques, participate in the clearance of amyloid peptides, and exhibit defined gene expression profiles characterized by reduced expression of homeostatic

microglial genes (Keren-Shaul et al., 2017). The emergence of DAM as significant contributors to brain diseases offers new insights into the conflicting perspectives on the detrimental or beneficial roles of microglia. However, further research is required to understand the triggering mechanisms, signaling pathways, and regulatory checkpoints associated with DAM, as well as their implications in various brain diseases (Muzio et al., 2021). In this way, developing strategies focused on modulating microglial function, such as molecules targeting the colony stimulating factor-1 receptor (CSF1R), are emerging, not only as a novel approach to treat neurodegenerative diseases, but also to explore the contribution of microglia to AD progress in the initial stages of the disease (Han et al., 2022; Spangenberg et al., 2019).

The endocannabinoid system (ECS) plays an important role in the regulation of CNS homeostasis by participating in several key functions, including neurotransmission, inflammation, as well as neuronal and glial cell proliferation, differentiation, migration, and survival (Lu & Mackie, 2021). The ECS is composed of endogenous cannabinoids, cannabinoid receptors, and the enzymes responsible for the synthesis and degradation of endocannabinoids. In recent years, there has been a growing interest in studying the role of the ECS in health and disease, and some of its components are now considered as potential pharmacotherapeutic targets for different conditions (Lowe et al., 2021). Specifically, the ECS appears to be relevant as a therapeutic target in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, epilepsy, AD, and amyotrophic lateral sclerosis.

The modulation of the ECS by increasing the endocannabinoid tone appears to be a promising strategy for the treatment of various CNS diseases. Specifically, the inhibition of endocannabinoids' catabolic enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) has been suggested as a putative therapeutic approach (Van Egmond et al., 2021). FAAH is the main degradative enzyme for anandamide (AEA), as well as other *N*-acylethanolamines (NAEs), such as *N*-oleoylethanolamine and *N*-palmitoylethanolamine. Pharmacological inactivation of FAAH leads to heightened endocannabinoid neurotransmission and may counteract neuroinflammation, pain, depression, and anxiety (Tripathi, 2020). Consequently, FAAH represents a promising therapeutic target for various disorders affecting the peripheral and CNS and several FAAH inhibitors are currently being tested in clinical trials. One of them is Pfizer's PF-04457845, a highly potent and selective FAAH inhibitor, which is currently under investigation for treating post-traumatic stress disorders and Tourette's syndrome, among others (Tripathi, 2020). In the case of AD, it is speculated that elevated FAAH expression levels in the brain correlate with reduced levels of lipid amides and with an increase in symptomatology (Jain et al., 2022). Therefore, FAAH enzyme inhibition

shows promising potential for improving symptoms associated with AD (Jain et al., 2022; Papa et al., 2022).

Previous data from our group revealed that the genetic inactivation of *Faah* leads to a significant modification of the inflammatory state in the mouse brain, characterized by an increased expression of proinflammatory cytokines. Paradoxically, this enhanced neuroinflammatory milieu has beneficial consequences in terms of prevention of memory impairment, synaptic plasticity, and decreased amyloid peptide deposition (Aparicio et al., 2018; Benito et al., 2003; Ruiz-Pérez et al., 2021; Vázquez, Tolón, Pazos, et al., 2015). Although the expression of FAAH is mainly located in neurons and reactive astrocytes (Romero et al., 2002; Tsou et al., 1998), these results suggest that this pro-inflammatory environment might induce a shift in the activity and inflammatory profile of microglial cells. This was evident, for instance, in the increased microglial ability to respond against a laser-induced acute injury to the brain parenchyma (Vázquez, Tolón, Pazos, et al., 2015). Furthermore, the microglia M1/M2 ratio in mice lacking FAAH activity was significantly elevated and accompanied by a decrease in microgliosis and amyloid peptide levels (Aparicio et al., 2018). Finally, we also showed that microglia of FAAH-deficient mice have a greater capacity to phagocytose A β and show a profile closer to that of DAM (Ruiz-Pérez et al., 2021). Therefore, these observations seem confirmative of the role of FAAH in the control of the inflammatory status of the mouse brain and underline the relevance of microglial cells as key players in these effects.

The present work aims to define the molecular and morphological profiles of microglia following the genetic inactivation of *Faah* in the context of AD. To achieve this goal, we have performed a transcriptomic analysis and quantified the expression levels of several parameters indicative of the microglial activation state in 5xFAD mice. Additionally, we carried out an in vivo multiphoton microscopy study to analyze the impact of *Faah* gene inactivation on microglial morphology as well as on the structural features of neuritic plaques. Since CSF1R inhibitors are useful tools to explore the contribution of microglia to the progression of AD, we also induced the pharmacological ablation of microglial cells with PLX5622, and subsequent repopulation, to assess whether the genetic inactivation of *Faah* may induce changes in microglial morphology and plaque evolution in the context of AD.

2 | METHODS

2.1 | Mice

Mice used in these experiments were described in our previous works (Aparicio et al., 2018; Ruiz-Pérez et al., 2021; Vázquez, Tolón, Grande, et al., 2015). Briefly, mice co-expressing five familial Alzheimer's disease mutations in heterozygosis (5xFAD) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) (Oakley et al., 2006). Mice homozygous for disruption of the gene that encodes FAAH were generated by Dr. Cravatt (FAAH^{-/-} mice, (Cravatt et al., 2001)) in the C57BL/6 J background by replacing the first FAAH exon (encoding amino acids 1–65) and \approx 2 kb of upstream

sequence, and, consequently, the functionality of FAAH enzyme was constitutively altered. Then, these mice were crossed with 5xFAD mice and backcrossed for at least 10 generations to generate 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} littermates and their respective WT were used as controls. For experiments involving in vivo imaging, the Cx3cr1^{EGFP} mouse line was used to visualize microglia (Jung et al., 2000). Therefore, 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} mice were mated with Cx3cr1^{EGFP} mice to obtain 5xFAD/Cx3cr1^{EGFP/+} and 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{EGFP/+} mice for in vivo imaging of microglia. Mice were housed at the animal facility of Universidad Francisco de Vitoria (authorization number #28115000013). Food and water were available ad libitum, and cages were kept under a 12-h light/dark cycle. Experimental protocols met the European and Spanish regulations for protection of experimental animals (2010/63/EU and RD 1201/2005 and 53/2013) and were authorized by the local ethics committee (PROEX149/18).

2.2 | Transcriptomic analysis

Here we profiled the transcriptome of hippocampi obtained from the brains of 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} using RNA-sequencing (RNA-seq). For tissue collection, six-month-old male ($N = 3$ per genotype) were sacrificed by cervical dislocation and their brains were dissected to obtain hippocampi. Tissues were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing. RNA from hippocampi was isolated with the RNeasy mini kit (Qiagen). Samples were analyzed by using the NovaSeq 6000 sequencing platform (Macrogen). Quality checks on the raw sequencing data were performed using FastQC (version 0.11.9) to ensure data integrity before further processing. Subsequently, we employed Trim Galore (version 0.6.10) for adaptor trimming and removal of low-quality reads. The high-quality trimmed reads were aligned to the mm39 reference genome using the STAR aligner (version 2.7.10b) (Dobin et al., 2013). To quantify gene-level expression, we utilized FeatureCounts from the Subread R package (version 2.01) (Liao et al., 2019), obtaining expected count data for subsequent analysis. Comparative analysis of expression profiles across different conditions was conducted using the DESeq2 package (version 1.38.0) (Love et al., 2014). This analysis employs a model based on a negative binomial distribution to identify differentially expressed genes. p -values were corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR) method. Adjusted p -values below .05 were considered statistically significant and were used as the basis for functional enrichment analysis and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). GSEA was carried out with the GSEAPy Python package (Fang et al., 2023). We analyzed the expression data against a compendium of gene sets that represent Hallmark and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways. Gene sets for the GSEA were sourced from the Molecular Signatures Database (MSigDB version 7.0) (Subramanian et al., 2005). To enhance the robustness of our findings, we performed 1000 gene-set permutations during the GSEA. Terms with both FDR-adjusted $p < .05$ and a nominal p -value $< .05$ were deemed statistically significant.

2.3 | Molecular determinations

The expression of genes and molecules associated with the intrinsic activity of microglial cells was quantified in order to analyze possible differences due to the genetic inactivation of the FAAH enzyme in the context of AD. Additionally, these molecular determinations were also performed after the treatment of mice with PLX5622, a CSF1R antagonist, provided by Plexikon Inc. and formulated in AIN-76A standard chow (Research Diets Inc) at 1200 mg/kg that was administered to cause the pharmacological ablation of microglial cells (Spangenberg et al., 2019). To that end, six-month-old male WT, WT/FAAH^{-/-}, 5x*FAD* and 5x*FAD*/FAAH^{-/-} mice (N = 8 per genotype) were exposed to control or PLX5622 diet ad libitum for 4 weeks to cause the pharmacological ablation of microglia. Then, mice were sacrificed and their brains were dissected to obtain hippocampus and cortex, which were processed for qPCR and western blot analysis, respectively.

2.3.1 | Quantification of mRNA levels by RT-qPCR

RNA from the hippocampus was isolated using Tripure isolation reagent (Roche). Then, a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) was used according to manufacturer's specifications and relative gene expression was measured using CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad), Quantimix Easy probes Kit (Biotools), and the following mouse probes conjugated with FAM fluorophore PrimePCR™ Probe Assay (Bio-Rad): *Rps18* (qMmuCEP0053856), *Tlr4* (qMmuCIP0035732), *Nlrp3* (qMmuCIP0031558), *Csf1r* (qMmuCEP0054028), *Csf1l* (qMmuCIP0032398), *Ii1a* (qMmuCIP0030741), *Ii1b* (qMmuCEP0054181) *Cnr2* (Custom) and *Faah* (qMmuCEP0055480). RNA expression was calculated using the comparative Ct method normalized to 18S ribosomal subunit. Data were expressed relative to a calibrator using the $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm s$ formula.

2.3.2 | Protein quantification by western blot

Cortices were homogenized in lysis buffer (MLB: 25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF and protease inhibitor cocktail; Roche). Then, samples were centrifuged at 12,000×g for 20 min at 4°C and protein concentrations were quantified (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Tissue lysates (50 µg/lane) were loaded into SDS-polyacrylamide gels, and the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (BioRad). After blocking in 5% bovine serum albumin in TTBS (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) membranes were incubated overnight at 4°C, as appropriate, with primary antibodies: anti-IBA1 (1:1000 FUJIFILM Wako), anti-CSF1R (1:1000, Abcam), and anti-GAPDH (1:10,000, Abcam). Membranes were incubated with corresponding horseradish peroxidase-conjugated mouse secondary antibody (1:10,000) or anti-rabbit (1:5000) and were developed using a chemiluminescent reagent (GE Healthcare). Developed signals were recorded on ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) for densitometric analysis (ImageJ).

2.4 | In vivo imaging experiments

2.4.1 | Cranial window surgery

Six-month-old male 5x*FAD*/Cx3cr1^{GFP/+} and 5x*FAD*/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} mice (N = 7–8 per group) were used for intravital analysis of microglia and amyloid plaques using two-photon microscopy. To that end, these mice underwent surgery to implant a chronic glass-covered cranial window over the left barrel cortex as described by Mostany and Portera-Cailliau (Mostany & Portera-Cailliau, 2008). Mice were anesthetized with a combination of isoflurane (Isoflurin[®], 1000 mg/g, Fatro Iberica) and oxygen at 4%, with subsequent maintenance at 1.5% during the surgical procedures under sterile conditions. Animal's core temperature was maintained at 37°C using a heating pad and their eyes were lubricated with eye ointment. Prior to the surgical intervention, dexamethasone (Cortexonavet[®], 2 mg/mL, Syva) and carprofen (Norocarp[®], 50 mg/mL, Karizoo) were administered subcutaneously and, when the skull was exposed, a drop of lidocaine and epinephrine solution (Anesvet[®], 20/0.02 mg/mL, Ovejero Laboratorios) was applied for topical analgesia. The craniotomy (4 mm in diameter) was performed using a pneumatic dental drill, a 5 mm coverslip was placed on top of the dura mater and was secured, as well as a titanium bar, with cyanoacrylate-based glue and dental acrylic (Ortho-Jet[®] Liquid, Lang Dental).

2.4.2 | Chronic in vivo 2PE imaging

All mice were allowed to recover for 4 weeks prior to imaging experiments. After this period, mice received an intraperitoneal dose of methoxy-XO4 to stain amyloid plaques (10 mg/kg, Tocris Bioscience) and, 24 h later, the first imaging session was performed ($t = 0$) to identify both microglial cells and amyloid plaques (at least three plaques per mouse and field, two/three fields per mouse) for subsequent tracking. Prior to the imaging acquisition, mice were anesthetized with isoflurane (5.0% for induction, 1% to 1.5% for imaging) and head-fixed to the microscope stage using the titanium bar. Imaging was done using a custom-built two-photon microscope with a femtosecond laser (Chameleon Ultra II, Coherent, Inc.). A 40x 0.8 NA water-immersion objective (Olympus), and ScanImage 3.8 Software written in MATLAB (Mathworks; RRID:SCR_001622). Microglial imaging was performed at 950 nm, later switched to 720 nm for visualizing amyloid plaques to distinguish between microglial subtypes. Low magnification (0.36 µm/pixel) image stacks consisting of 100 single images (512 × 512 pixels) taken at 2 µm intervals (Z-step) were obtained starting ~40–50 µm below the brain's surface. Additionally, for a more detailed characterization of amyloid plaques, high magnification (0.18 µm/pixel) image stacks (512 × 512 pixels) taken at 1 µm intervals (Z-step) were captured until the entire plaque was visualized.

After the first imaging session ($t = 0$), PLX5622 treatment was started for 28 consecutive days, followed by exposure to control diet again for 9 days to evaluate cellular repopulation. Methoxy-XO4 i.p. injections and image acquisition sessions were repeated at the end of

PLX5622 treatment ($t = 28$) and after the repopulation period ($t = 37$). All the images obtained were processed using Imaris software.

2.4.3 | 3D reconstruction and microglial morphology analysis

Three-dimensional reconstruction of two-photon microscopy images was performed using Imaris Software (V.10.0, Oxford Instruments). Microglial cells and amyloid plaques were visualized by merging images captured at 950 and 720 nm wavelength. An important aspect of microglial morphology analysis was the identification of different microglial subtypes. For this purpose, the Surface tool was used to render amyloid plaques and reconstruct microglial soma. Microglial soma located less than 20 μm from amyloid plaques were classified as plaque-associated microglia, while those situated further than 20 μm were referred to as non-plaque-associated microglia (Figure S1). Microglial soma located within 10 μm from the image edges were excluded from the analysis to ensure the rendering of the complete cell structure. To improve image quality, the *Attenuation Correction Extension* of Imaris Software was employed to equalize image brightness throughout the Z-stack. Additionally, microglial processes were modeled using the Imaris *Filament* tool. The number of microglial X04-positive cells was determined using the *Spots* tool and expressed as the percentage of the total number of microglial cells in each area. The analysis of microglial soma focused on measuring volume and sphericity, while the analysis of microglial processes included total length, sphericity, ramification index, and Sholl analysis. Amyloid plaque analysis involved measuring volume, sphericity, protein density, and intensity standard deviation. Additional details on the object segmentation algorithms used are provided in Figure S2.

2.5 | Statistical analysis

The statistical analysis was performed with GraphPad 10.0. Data were analyzed by two-way-ANOVA (followed by Sidak's post-hoc test). All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). A p -value < 0.05 was considered as statistically significant. The number of mice used in each experiment is included in the figure legends.

3 | RESULTS

3.1 | Transcriptomic analysis of 5xFAD/FAAH^{-/-} mice revealed a significant enrichment in "inflammatory response" pathway and DAM signature, as well as a significant downregulation of "Alzheimer's disease" pathway

In our study, RNA-seq analysis of hippocampi obtained from the brains of 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} mice was employed to investigate the transcriptomic alterations stemming from FAAH inactivation

in AD context. We undertook differential gene expression analysis, the results of which are depicted in a Volcano plot that delineates genes significantly upregulated (red) and downregulated (blue) with an FDR-adjusted p -value below .05, compared to those without significant changes (gray) (Figure 1A, Table S3, and Additional material). Pathway enrichment analysis, leveraging Hallmark gene sets and KEGG pathways, unveiled biological processes that are modulated due to FAAH inactivation, as indicated by the Normalized Enrichment Scores (NES). These pathways are associated with a variety of immune responses, including TNF α , IL-6, and IFN signaling (Figure 1b). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) revealed a significant enrichment in the "Inflammatory Response" pathway (Figure 1b,d and Figure S4A,B), and a specific microglia signature from Grubman et al. (2021) (Figures 1F and S4C), while the "Alzheimer's disease" (Figures 1c,e and S4B) pathway demonstrated an inverse trend (Figure 1c,e).

3.2 | *Faah* gene inactivation altered the expression pattern of genes associated with microglial function in AD

We analyzed the expression of some genes known to be involved in the A β -induced activation of microglia to detect possible differences due to the genetic inactivation of FAAH enzyme. We performed RT-qPCR experiments to measure mRNA levels of toll-like receptor 4 (*Tlr4*), NOD-like receptor protein 3 (*Nlrp3*), *Il1 α* , *Il1 β* , colony stimulating factor 1 receptor (*Csf-1r*) and its ligand (*Csf1l*), cannabinoid receptor subtype 2 (*Cb2r*), and FAAH in WT groups (CTRL and FAAH^{-/-}) and AD animals (5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-}) (Figure 2). As expected, the expression of all genes was significantly increased in AD animals compared to WT groups, except for that of *Faah*, which was significantly reduced. Additionally, expression levels of *Nlrp3*, *Il1 β* , and *Csf1r* were significantly upregulated, while *Csf1l* and *Cb2r* were significantly downregulated in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice compared to 5xFAD littermates.

3.3 | Microglial ablation with PLX5622 revealed a FAAH-mediated differential response in the context of AD

Then, we analyzed tissue samples obtained from 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} mice treated with PLX5622 or control diet for 28 days. This CSF1R-selective antagonist triggers apoptosis in microglial cells, thus allowing for a precise evaluation of putative changes after microglial deletion. To corroborate the ablating effects of PLX5622 on microglia, we first analyzed IBA1 and CSF1R protein levels in cerebral cortex lysates by western blot (Figure 3a,b). As expected, IBA1 and CSF1R protein levels were reduced after PLX5622 exposure, regardless of FAAH expression. Interestingly, we observed that CSF1R protein levels were significantly higher in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice compared to 5xFAD control mice, even though 5xFAD/FAAH^{-/-} control mice exhibited a significant

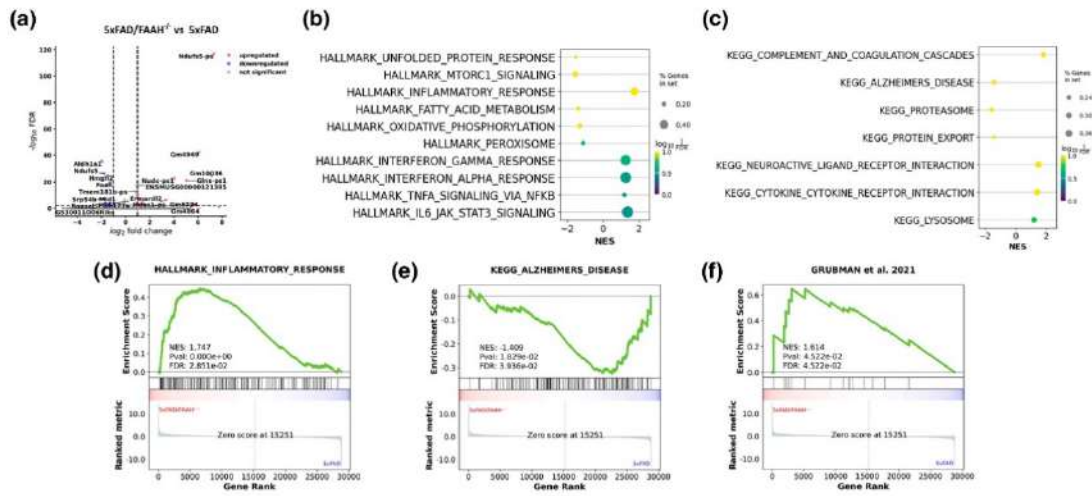


FIGURE 1 Differential Expression and Pathway Interplay Elicited by FAAH inactivation. (a) Volcano plot representing differential gene expression in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice compared to 5xFAD mice ($n = 3$ per genotype), with significant upregulation (red), significant downregulation (blue), and non-significant changes (gray). Notable genes are labeled. (b) Hallmark gene set enrichment analysis highlighting the top enriched pathways, with dot size correlating with the percentage of genes involved and color intensity representing FDR significance. (c) Enrichment of KEGG pathways is shown by NES values; dot size indicates the percentage of genes in the set, and color denotes FDR significance. (d–f) GSEA plots for the “Inflammatory Response,” “Alzheimer’s disease,” and microglia signature from Grubman et al. (2021), respectively, with the x-axis representing gene rank, the y-axis showing the running enrichment score, and vertical lines indicating the position of AD-FAAH within the gene list. The plots illustrate significant pathways with FDR-adjusted p values <0.05, emphasizing the genes contributing to the enrichment score at the peak of each plot.

decrease in *Iba1* expression (Figure 3a,b). This observation suggests a combined decrease in microglialosis together with an enhanced level of CSF1R expression. Finally, we also assessed whether PLX5622 induced changes in mRNA levels of the same genes previously examined (Figure 3c–j). As expected, *Faah* expression remained unaffected by microglial ablation (Figure 3j) and the expression of *Tlr4*, *Nlrp3*, *Csf1r*, and *Ili1a* was significantly reduced after treatment (Figure 3c–e,g, respectively), irrespective of FAAH enzyme inactivity. *Ili1 β* and *Cb2R* mRNA levels were significantly decreased following microglial ablation in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice but not in 5xFAD mice (Figure 3f,h, respectively), in which the expression of *Csf1l* was significantly reduced after treatment (Figure 3i). Furthermore, when exposed to PLX5622, *Cb2R* expression was notably lower in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice compared to 5xFAD mice.

3.4 | Plaque-associated microglia exhibited greater resistance to PLX5622 compared to non-plaque-associated microglia

We next performed an in vivo study of microglial function using multiphoton microscopy. A cranial window was implanted on 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} and 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} mice to perform a longitudinal examination of the microglial response when exposed to PLX5622 (Figure 4a). This approach allowed an in-depth

characterization of microglial subtypes in the presence or absence of FAAH activity and under the influence of amyloid-induced neuroinflammation. To test the PLX5622 microglia depleting effect, we chronically imaged the microglia population before PLX5622 treatment initiation (Day 0), after the chronic exposure to the CSF1R-antagonist (Day 28), and after treatment withdrawal and microglial repopulation (Day 37). Images were analyzed using Imaris 10.0 Spots tool, and the percentage of living cells relative to day 0 was quantified (Figure 4b). To perform a detailed follow-up of the microglial response, we differentiated “plaque-associated” cells (located at less than 20 μ m from amyloid plaque center) from “non-plaque associated” cells (located >20 μ m from the plaque center). These microglial subtypes showed different sensitivity to PLX5622 treatment. Specifically, 69% and 58% of plaque-associated microglia in 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} and 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} mice, respectively, survived after the PLX5622 treatment (Day 28; Figure 4c,e), while 14% and 21% of living cells was observed for non-plaque-associated microglia (Figure 4e). FAAH deletion did not cause significant differences in cell survival after 28 days of treatment. At day 37 the glial population was restored to levels of those on day 0 (Figure 4c,d). These results suggest that plaque-associated microglia may be less responsive to PLX5622 treatment than non-plaque-associated microglia, and that both microglial subtypes have similar repopulation rates regardless of FAAH activity under pathological conditions.

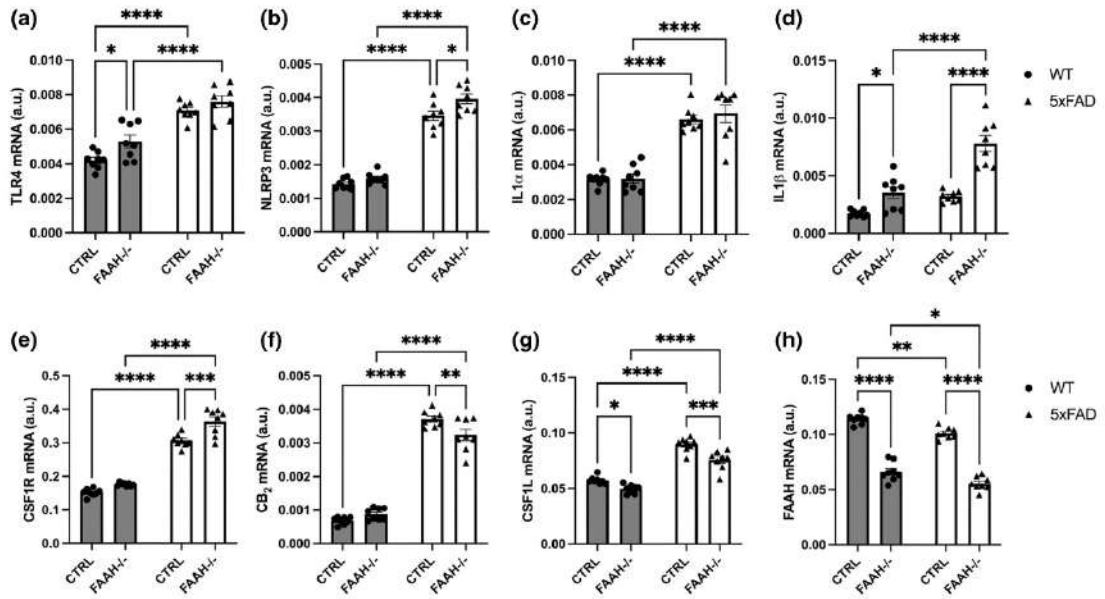


FIGURE 2 Amyloid pathology selectively modifies the expression levels of several key microglial genes. Expression levels of the microglial markers *Tlr4* (a), *Nlrp3* (b), *Il1a* (c), *Il1b* (d), *Csf1r* (e), and *Cb2* (f) were increased as a consequence of the enhanced amyloid production characteristic of 5xFAD mice (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p = .001$; **** $p < .0001$). *Csf1l* expression levels (g), although of neuronal origin, were also significantly modified due to the pathology (* $p < .05$; ** $p = .001$; **** $p < .0001$). *Faah* expression (h) decreased as in 5xFAD mice (* $p < .05$; ** $p < .01$; **** $p < .0001$). Data are presented as mean \pm standard error of the mean. $N = 8$ mice per group.

3.5 | Exposure to PLX5622 reveals unique morphological features in neuritic plaque-associated microglia in FAAH-deficient mice

We next aimed to characterize microglial morphology changes associated with FAAH genetic inactivation in the context of AD and microglial ablation. To achieve this, we performed a longitudinal imaging study using *in vivo* multiphoton microscopy while administering PLX5622 to 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} and 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} mice. Imaging sessions were performed at different time-points and the images obtained after each session were processed and three-dimensionally reconstructed and analyzed using Imaris Software. First, we quantified the number of Sholl intersections of plaque-associated and non-plaque-associated microglia (Figure 5). At Day 0, the Sholl analysis of 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} plaque-associated microglia revealed a more complex structure than that of 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} mice, as observed by the significantly higher number of Sholl intersections (Figure 5a). This increased microglial complexity was also detected both after exposure to PLX5622 at Day 28 (Figure 5b) as well as after repopulation at Day 37 (Figure 5c). However, neither the genetic inactivation of *Faah* nor PLX5622 exposure affected non-plaque-associated microglial complexity (Figure 5d–f).

To characterize the morphological features of processes and soma of microglia, images were reconstructed and analyzed using

Imaris 10.0 filament and surface tools, respectively (Figure 6a,b). Regarding cell processes of plaque-associated microglia, 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} mice showed significant morphological changes after PLX5622 treatment, while the glia of 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} mice remained almost unaltered (Figure 6c–e). The glia from 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} mice exhibited shorter processes (Figure 6c), with higher sphericity (Figure 6d), and lower ramification index (Figure 6e) than those of 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} microglia. On the other hand, the volume and soma sphericity of plaque-associated microglia were not significantly affected by PLX5622 treatment (Figure S3A). Finally, processes of non-plaque associated microglia were almost unaffected by PLX5622 treatment (Figure 6f–h), while soma showed lower sphericity and higher volume linked to 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} mice (Figure S3B).

3.6 | PLX5622 treatment revealed changes in phagocytic microglial activity linked to FAAH genetic inactivation that also impacted the progression of neuritic plaques

Time-lapse analysis of *in vivo* microglial dynamics allowed us to determine the effect of FAAH enzyme inactivation on the phagocytic activity of microglia and on the progression of the amyloid pathology. Microglial phagocytic activity was determined by the presence or

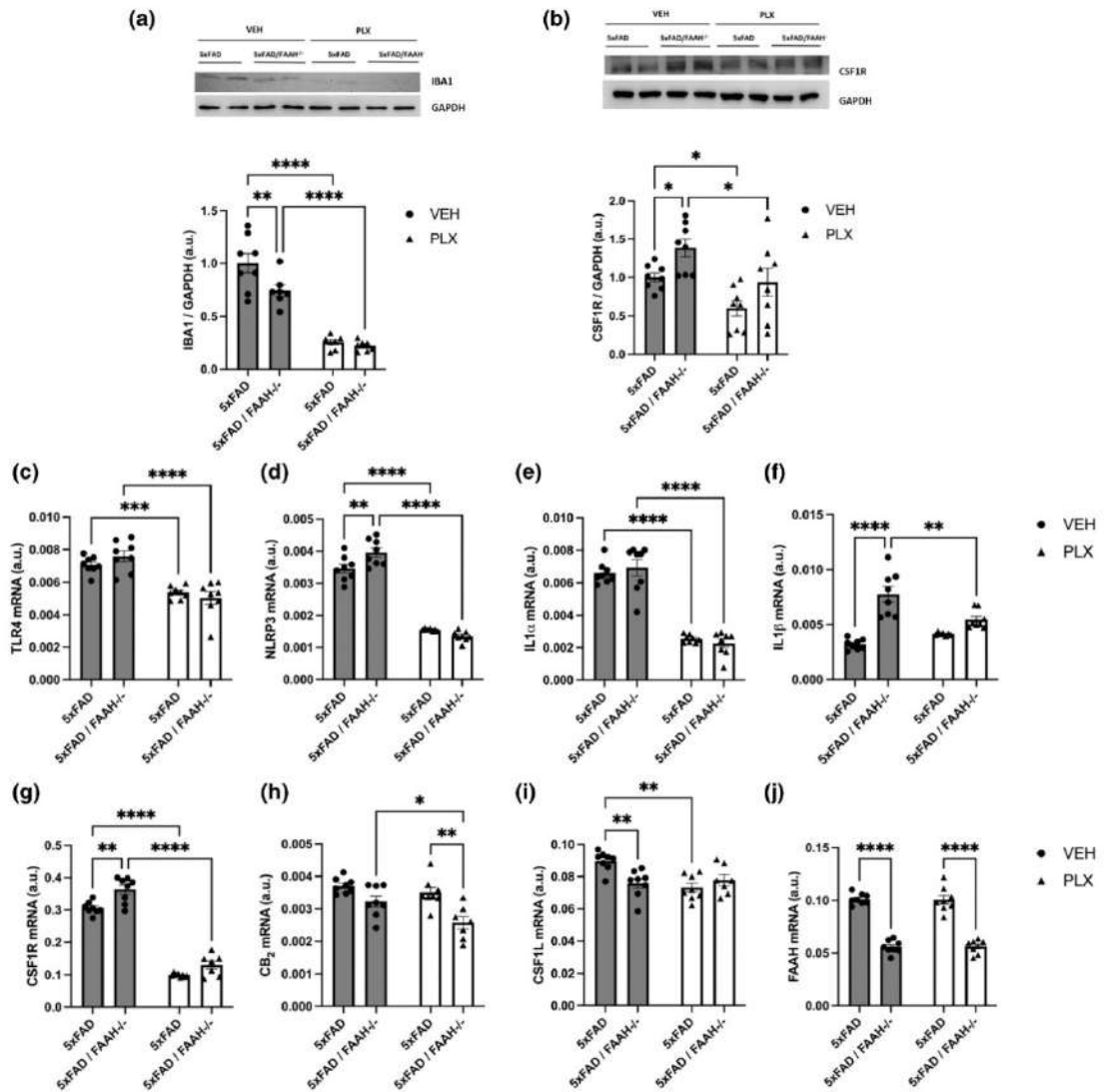


FIGURE 3 PLX5622 exposure induces the ablation of microglial cells in the brains of 5xFAD mice and significantly reduces the expression levels of microglial markers. (a) IBA1 protein levels were significantly lower in FAAH-lacking AD mice (** $p < .01$); Iba1 was significantly diminished after treatment with PLX5622 in both 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} mice (**** $p < .0001$). (b) CSF1R protein levels were increased in FAAH^{-/-} mice and significantly reduced after treatment with PLX5622 (* $p < .05$). mRNA levels of *Tlr4* (c), *Nlrp3* (d), *Il1a* (e), *Il1b* (f), and *Csf1r* (g) were dramatically reduced after treatment with the CSF1R antagonist, PLX5622 (** $p < .01$; *** $p = .001$; **** $p < .0001$). (h) *Cb2* mRNA levels were diminished in 5xFAD/FAAH^{-/-} but not in 5xFAD mice (* $p < .05$; ** $p < .01$), probably due to the restricted expression of this receptor in plaque-associated microglia, which exhibited significantly higher resistance to PLX5622 treatment (see text). (i) The neuronal marker *Csf1l* was also affected by PLX5622 treatment (** $p < .01$), but no differences were found between genotypes. (j) *Faah* expression was significantly lower in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice (**** $p < .0001$) and remained unaltered after exposure to PLX5622. Data are presented as mean \pm standard error of the mean. $N = 8$ mice per group.

absence of methoxy-X04 labeling in microglia and we identified X04-positive microglia as cells with potential phagocytic role (Figure 7a). The number of microglial X04-positive cells was quantified

and expressed as the percentage of the total number of microglial cells (Figure 7b). After 28 days of PLX5622 exposure, we observed that *Faah* gene inactivation was associated with a significant increase

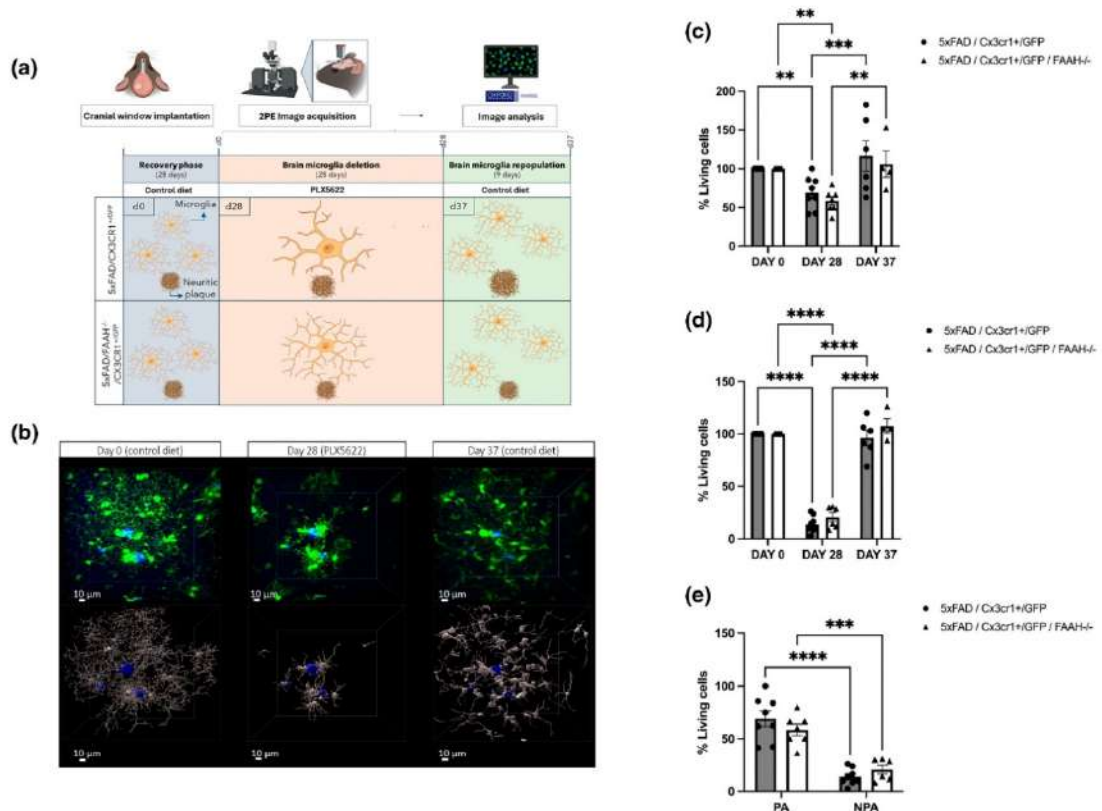


FIGURE 4 PLX5622-induced apoptosis reveals different subpopulations of microglial cells in 5xFAD mice. (a) Schematic representation of the experimental set-up performed in the in vivo study of microglial function using multiphoton microscopy (b) Top: Representative time-lapse in vivo multiphoton microscopy images of the effect of PLX5622 on microglial survival. After 28 days of exposure to PLX5622 (middle panel) a clear reduction in microglial cell population was evident with respect to day 0 (left panel). Note that this decrease was especially intense in areas located far from neuritic plaques (blue color), while microglial cells surrounding these pathological structures survived. 9 days after the return to normal diet (Day 37), a significant re-population was evident (right panel). Bottom: 3D reconstructions of the microscope fields shown. (c) Time-course of the ablation and subsequent re-population process of plaque-associated (<20 μm distance from plaque center) microglial cells; percentage of survival after 28 days of exposure to PLX5622 was of 69.16 ± 20.85 and 58.60 ± 14.32 for 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} and 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+}, respectively. (d) Non-plaque associated microglial cells (>20 μm distance from plaque center) survival was 13.96 ± 8.00% and 20.70 ± 10.23% for 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} and 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+}, respectively. (e) The rate of survival of microglial cells was significantly lower in non-plaque associated microglial cells (NPA) than in those located in close vicinity to these pathological structures (plaque-associated cells, PA), independently of the genotype (**p = .001; ****p < .0001). Data are presented as mean ± standard error of the mean. N = 8–9 mice per group.

in the percentage of X04-positive microglial cells (Figure 7b), suggesting an enhanced phagocytic activity.

We also analyzed several structural features of amyloid plaques (Figure 7c–h). Our data show that amyloid plaques in 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} mice remained almost unaffected by PLX5622 treatment (except for an increase in plaque density at day 28) (Figure 7f). Plaques in 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} mice, however, showed larger plaque volume (Figure 7d) and reduced plaque sphericity (Figure 7e) than those in 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} mice at Days 28 and 37. Therefore, we conclude that the lack of FAAH

activity resulted in different plaque progression patterns following microglia ablation.

4 | DISCUSSION

Intraneuronal deposits of abnormal tau tangles, reduced levels of acetylcholinesterase, and formation of Aβ-plaques have long been recognized as the primary pathological hallmarks of AD in the brain. Recent evidence suggests the involvement of additional mechanisms of

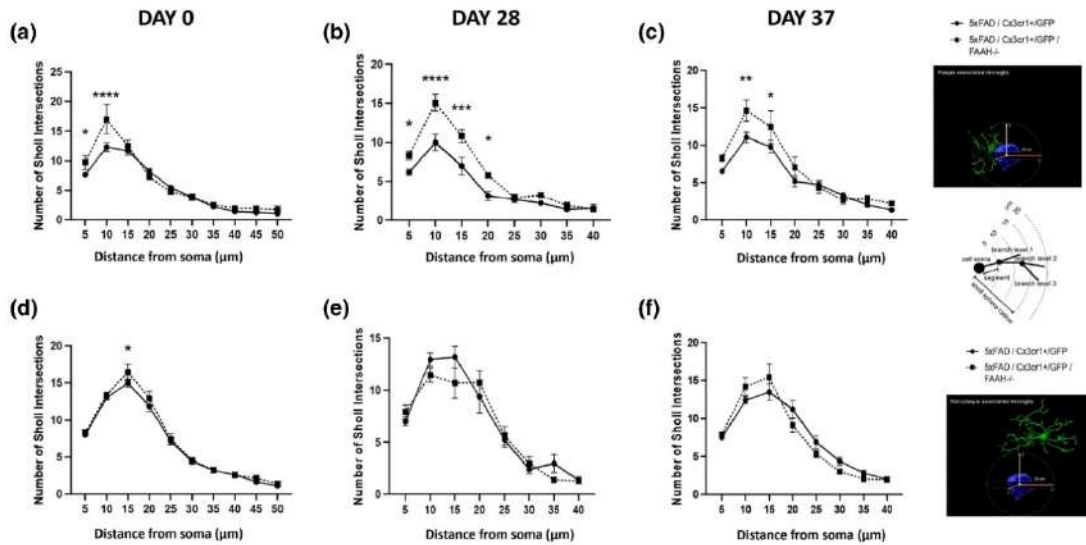


FIGURE 5 Time-course Sholl analysis of microglial morphological complexity. (A to C) Arborization complexity of plaque-associated 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} versus 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} microglia before the treatment with PLX5622 (day 0), the last day of treatment (Day 28), and 9 days after recovery (Day 37); microglia from FAAH-lacking mice exhibited increased complexity at all time points studied (**p* < .05; ***p* < .01; ****p* = .001; *****p* < .0001). (d–f) Sholl analysis of non-plaque associated microglia revealed no differences between groups at the time points studied in this glial subpopulation. Data are presented as mean ± standard error of the mean. *N* = 8–11 mice per group.

disease to further explain the pathogenesis of AD. Particularly, neuroinflammation has emerged as a critical player in AD progression, together with the identification of AD risk genes associated with innate immune functions, particularly in microglial cells. Regarding the underlying physiology, there is a significant imperative to understand and regulate interactions between the neurons and microglial cells, to develop approaches that may prevent or delay disease's progression (Király et al., 2023; Leng & Edison, 2021).

In this study, we demonstrate that the chronic increase in endocannabinoid tone in a mouse model of AD is associated with a genetic profile that triggers an exacerbated inflammatory response. Paradoxically, this finding is accompanied by a lower expression of genes associated with AD development. This modulation may be mediated by changes in the expression of certain microglial genes, as well as by changes in morphology and activity of microglia in the absence of FAAH. Specifically, FAAH-lacking AD mice showed an upregulation of genes involved in several inflammatory signaling pathways and a DAM genetic profile, whereas the expression of genes associated with AD development was downregulated. Furthermore, after 28 days of PLX5622-induced microglial ablation, we observed that plaque-associated, but not non-plaque-associated, microglial cells in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice exhibited a more stable morphological profile (including longer, more ramified, and less spherical processes) and an enhanced uptake of A β peptides, along with a reduced growth of amyloid plaques compared to those observed in 5xFAD mice. Consequently, our findings seem to show that, although FAAH is not expressed by microglial cells, it may modulate their functions.

Our previously published data, also obtained in 5xFAD and 5xFAD/FAAH^{-/-} mice, pointed that the genetic inhibition of FAAH in the context of AD lead to a pro-inflammatory environment that prevents memory impairment, preserves synaptic plasticity, and decreases amyloid peptide deposition (Aparicio et al., 2018; Benito et al., 2003; Ruiz-Pérez et al., 2021; Vázquez, Tolón, Pazos, et al., 2015). This paradoxical association between exacerbated neuroinflammation and neuroprotective effects in the context of *Faah* gene inactivation was confirmed by the transcriptomic analysis performed in the present study. The most interesting results emerged when we analyzed data from GSEA. Hallmark enrichment analysis detected a significant over-expression of genes associated with cellular processes and signaling pathways involved in inflammatory response (Figure 1d). In contrast, KEGG enrichment analysis showed a significant downregulation of genes that usually contribute to AD progression (Figure 1e). Moreover, we have recently reported an overexpression of TREM2 and CTSD phagocytic-related microglial receptors, which was specifically associated to *Faah* deletion in pathological conditions (Ruiz-Pérez et al., 2021). These two genes are commonly associated with the DAM signature and their over-expression indicated the presence of a DAM-enriched microglial population in 5xFAD/FAAH^{-/-} brains. In the present study, we also evaluated the transcriptional signature associated with DAM defined by Grubman et al. (2021). We found that these genes were significantly upregulated in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice compared to 5xFAD mice (Figure 1f). This finding supports the presence of a DAM-enriched microglial population in the brains of 5xFAD/FAAH^{-/-} mice, as highlighted in our previous work (Ruiz-Pérez et al., 2021). Consequently, it appears that the

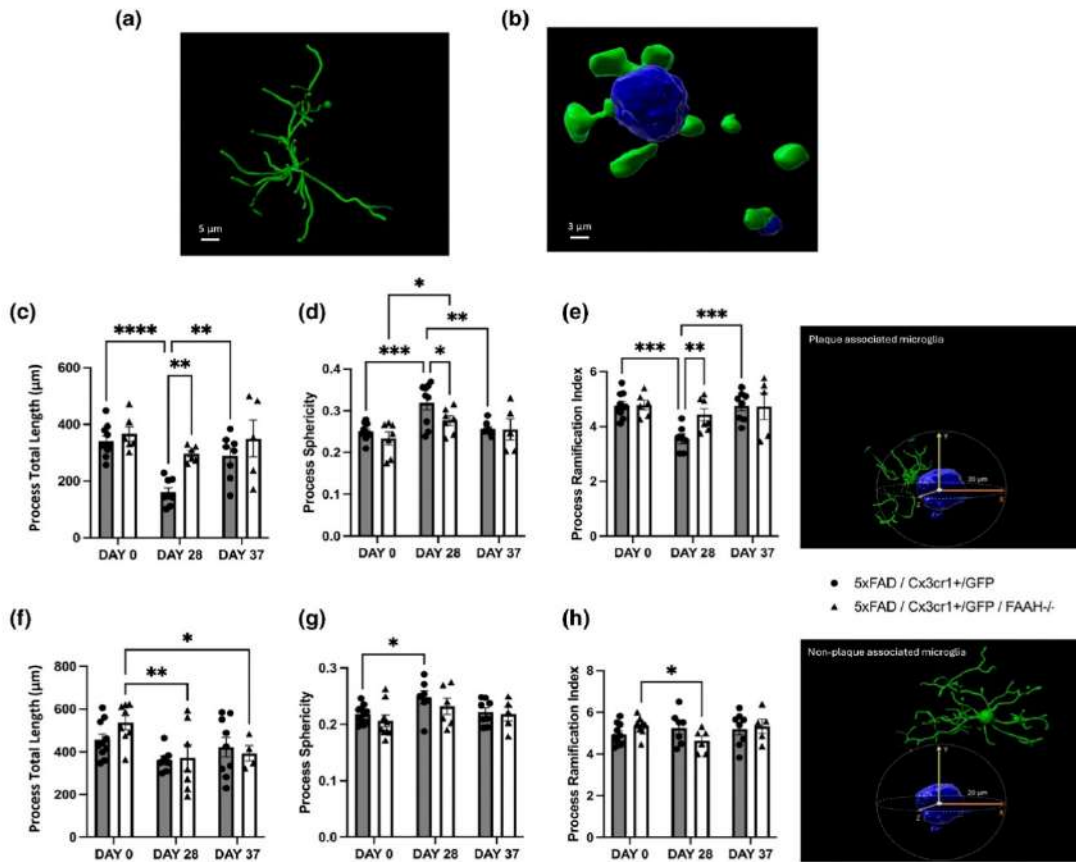


FIGURE 6 Time-course analysis of processes from plaque and non-plaque associated microglial cells. (a and b) Representative 3D reconstruction (Imaris) of in vivo multiphoton images of microglial processes. *Faah* gene inactivation prevented PLX5622-induced changes in morphological features of microglial processes in plaque-associated cells; total length (c), sphericity (d), and ramification index (e) were dramatically altered in 5x*FAD*/*Cx3cr1*^{GFP/+} mice after 28 days of exposure to PLX5622 and returned to normal levels after 9 days of normal diet. Microglia from 5x*FAD*/*FAAH*^{-/-}/*Cx3cr1*^{GFP/+} mice, however, exhibited constant features throughout the period studied (**p* < .05; ***p* < .01; ****p* = .001; *****p* < .0001). (f to h) Non-plaque associated cells exhibited limited changes after treatment with PLX5622, with no differences due to genotype (**p* < .05; ***p* < .01). Data are presented as mean ± standard error of the mean. *N* = 8–11 mice per group.

induction of the DAM profile has a beneficial impact regarding amyloidosis levels when *FAAH* is genetically inactivated. However, the contribution of DAM microglia to AD progression is still under investigation. For instance, recent studies have suggested that the progression of neurodegeneration in AD is not directly linked to DAM genes (Sobue et al., 2023). Nonetheless, it is evident that the dysfunction of homeostatic microglia is closely associated with AD progression (Holtman et al., 2015; Sobue et al., 2023).

We analyzed next the expression of specific genes which are related to microglial activation to study possible differences when *FAAH* is genetically inactivated. In AD, Aβ induces TLR4 activation in microglia and promotes the activation of NF-κB and the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL1β (Wu et al., 2022). Additionally, NLRP3 inflammasome activation mainly occurs in microglia

and leads to the production of several inflammatory cytokines, like IL-1β and IL-1α (Sobue et al., 2023), playing a key role in the development and progression of Aβ-plaque formation (Hanslik & Ulland, 2020). Consequently, we measured mRNA levels of *Tlr4*, *Nlrp3*, *Il1β*, and *Il1α* in WT and AD mice to check whether *Faah* gene inactivation changes their expression levels. As expected, we detected a general increase in mRNA expression of these genes due to the AD pathology, being the expression of *Nlrp3* and *Il1β* higher in 5x*FAD*/*FAAH*^{-/-} mice when compared with 5x*FAD* mice (Figure 2b,d).

Together with the evaluation of the expression of genes related to microglia activation, we also measured the expression of colony stimulating factor 1 (CSF1L) and its receptor (CSF1R). CSF1R is predominantly expressed in microglia and CSF1L is generally

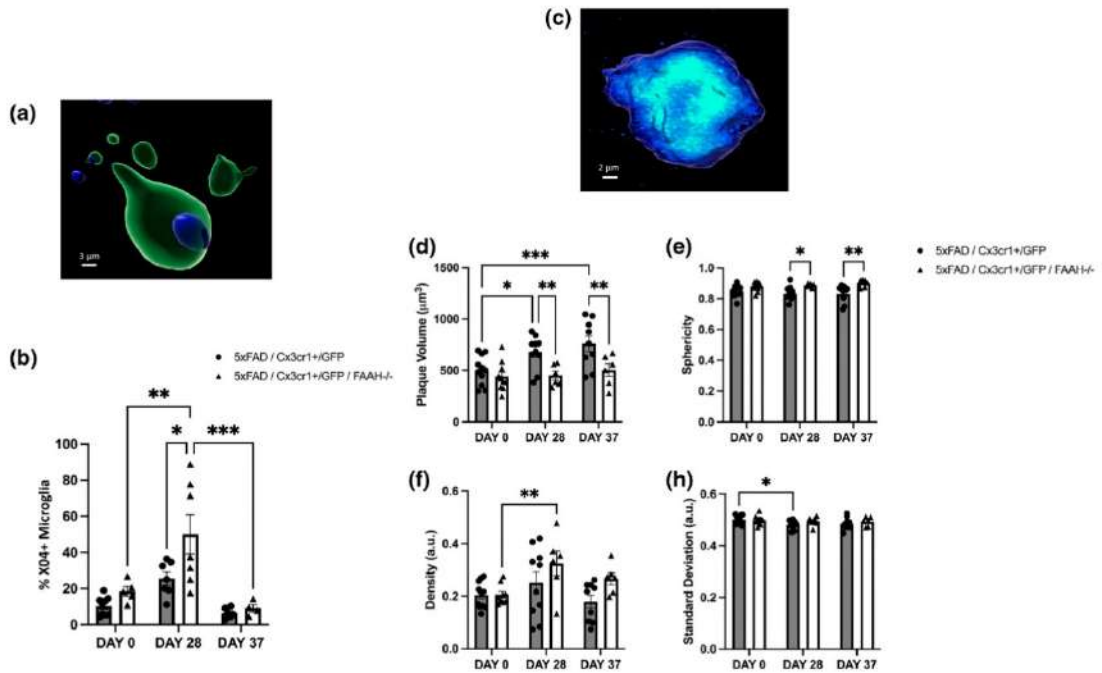


FIGURE 7 FAAH inactivation induced a significant increase in microglial phagocytosis and changes in neuritic plaques features. (a) Representative 3D reconstruction (Imaris) of in vivo multiphoton images of microglia-plaque interaction. This approach allowed for the precise observation and quantification of amyloid effectively being phagocytosed (internalized) by microglial cells. In green: Microglial soma associated to GFP expression in this mouse model. In blue: Amyloid peptide plaque associated to X04 fluorescent signal. (b) The percentage of X04-positive microglial was significantly higher in 5xFAD/FAAH^{-/-}/Cx3cr1^{GFP/+} than in 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} mice ($p < .05$; $**p < .01$; $***p = .001$). (c) Representative 3D reconstruction (Imaris) of a neuritic plaque stained with X04; this approach allowed a detailed description of key structural features of these pathological deposits. An increased fluorescent intensity is associated to a higher concentration of amyloid peptide into the plaque associated to X04 fluorescent signal. (d to h) The analysis of amyloid plaques revealed that the *Faah* gene inactivation prevented the increase in plaque volume that was observed in 5xFAD/Cx3cr1^{GFP/+} mice and led to an increased sphericity ($*p < .05$; $**p < .01$; $***p = .001$). Data are presented as mean \pm standard error of the mean. $N = 8-11$ mice per group.

expressed by neurons and astrocytes in the CNS (Bo & Bo, 2022; Easley-Neal et al., 2019). Interestingly, CSF-1R signaling and the expression of CSF-1L can be significantly upregulated during inflammation (Bo & Bo, 2022). In the homeostatic brain, a baseline level of CSF1L helps to maintain microglial roles of synaptic pruning, release of neurotrophic factors, and promotion of brain connectivity (Bo & Bo, 2022). However, changes in CSF1L secretion from neurons and astrocytes and increases in CSF1R expression have been described in various pathological conditions of the CNS and are considered activating factors for resting microglia (Bo & Bo, 2022). Additionally, the upregulation of CSF1R expression has been linked to the DAM profile (Han et al., 2022; Keren-Shaul et al., 2017). In our study, we found a significant elevation in CSF1R expression (Figure 2e) and a reduction in CSF1L expression (Figure 2g) in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice compared to 5xFAD mice. Importantly, these changes were concomitant with decreased microgliosis, as indicated by lower levels of Iba1 protein (Figure 3a). Decreased microgliosis in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice has been previously observed by our group by means of Iba1⁺ cell densitometry

(Vázquez, Tolón, Grande, et al., 2015) and flow cytometry (Aparicio et al., 2018). This observation may be linked to the DAM profile exhibited by microglia in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice and could also explain the preservation of homeostatic microglial functions observed in these mice, such as hippocampal synaptic plasticity, dendritic spine density, and uptake of A β (Ruiz-Pérez et al., 2021). Considering our present results, we suggest that neuroinflammation associated with FAAH genetic inactivation is linked to DAM profile development, which involved changes in CSF1R-axis, that could be, at least in part, responsible for the significant amelioration of the pathology detected in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice.

To understand the triggering mechanisms and regulatory checkpoints associated with the role of microglia in AD, and additionally as a novel approach to treat neurodegenerative diseases, CSF1R inhibitors, such as PLX562, are emerging (Han et al., 2022; Spangenberg et al., 2019). In this way, we also explored whether a pharmacological challenge to microglia could unveil additional features affected by the genetic inactivation of *Faah*. To that end, we employed PLX5622, known to induce a powerful apoptotic response in cells of myeloid

origin, including microglia (Spangenberg et al., 2019). In addition to the expected decrease in microglial markers (TLR4, CSF1R, CB₂) triggered by the administration of PLX5622 (Figure 3c,g,h), we also found significant decreases in markers of diverse cellular origin, that is, IL1 α , IL1 β , and CSF1L (Figure 3e,f,i). Importantly, *Faah* expression levels remained unaltered, confirming that microglial cells exhibit very low expression levels (if any) of this enzyme, as previously described by Muccioli and Stella (Muccioli & Stella, 2008) and that the effects associated to FAAH gene inactivation on microglia observed in this and previous studies (Ativie et al., 2015) reflect a hetero-cellular regulation by other glial and/or neuronal cells.

Additionally, the use of PLX5622 allowed us to define and study two different populations of microglia according to their proximity to amyloid plaques: plaque-associated and non-plaque-associated microglia. Our study aimed to assess whether the genetic inactivation of *Faah* and the resulting pro-inflammatory environment leads to morphological and in situ functional differences in these two populations of microglial cells after their ablation induced by PLX5622 and subsequent repopulation. Microglial morphology and changes in plaque-associated microglia have been described as indicators of inflammatory response (Kwon & Koh, 2020). By using intravital multiphoton microscopy, we observed a surviving microglial population after 28 days of PLX5622 exposure and a rapid repopulation after CSF1R inhibition withdrawal (Elmore et al., 2018; Spangenberg et al., 2019). Our findings revealed that microglia associated with plaques display increased resistance to PLX5622 treatment compared to those not associated with plaques (Figure 4c,e). These data agree with those of Spangenberg et al. (2019), who suggested that the enhanced survival of plaque-associated microglia may be linked to the expression of several markers of the DAM profile in the hippocampus of PLX5622-treated 5xFAD mice, such as CSF1R. In fact, previous works, that also used PLX5622 to cause microglial ablation and analyzed its consequences to AD pathology, described that the Iba1+ cells detected in the brains of PLX5622-treated animals did co-express CSF1R and seem to be resistant to the PLX5622 treatment (Spangenberg et al., 2016; Unger et al., 2018). However, further characterization should be required to delineate the precise role of DAM in the progression of neuritic plaques (Spangenberg et al., 2019).

We also analyzed microglial morphology due to its close relation to cellular function (Lier et al., 2021). Some of the parameters extensively used to assess this analysis are sphericity, volume, length, and number of endpoints of microglial processes, among others (Torres-Platas et al., 2014; Vidal-Itriago et al., 2022; Zhou et al., 2022). Our results indicate that the lack of *Faah* activity in AD may contribute to increased branching complexity of plaque-associated microglia (Figures 5a–c and 6c). This complexity remained stable throughout PLX5622 exposure. In contrast, 5xFAD mice exhibited morphological changes typically associated with microglial transition into a more amoeboid state.

Ramified morphology was long thought to be adopted by microglial cells under physiological conditions and were termed as “resting microglia” (Wendimu & Hooks, 2022). In contrast, amoeboid shape with thickened and retracted processes was traditionally linked to an

activation state associated with the enhancement of several glial functions like migration, antigen presentation, or phagocytosis (Kaur et al., 1985; Madore et al., 2013; Parakalan et al., 2012). Nevertheless, this two-state microglial activation paradigm seems now outdated due to the discovery through ultrastructural analysis of alternative microglial phenotypes (Savage et al., 2018; Sierra et al., 2016). Moreover, in vivo two-photon imaging data has revealed that microglia are continuously active in the CNS, being able to phagocytose cellular debris through their terminal branches. It is also generally accepted that amoeboid microglia exhibit reduced phagocytic activity (Abiega et al., 2016; Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Sierra et al., 2010; VanRyzin et al., 2019). Therefore, microglia react to different factors such as species, sex, age, specific brain area, and health or disease conditions by transitioning to different states and displaying several functions (Paolicelli et al., 2022).

Our data indicate that, despite FAAH not being expressed in microglia, the absence of FAAH activity impairs microglial function, which, in turn, triggers significant changes in neuritic plaque structural features. We observed a progressive increase in plaque volume in 5xFAD mice (Figure 7d), whereas 5xFAD/FAAH^{-/-} mice exhibited an unaltered progression of neuritic plaque volume alongside an increased number of X04+ microglial cells (Figure 7b,d, respectively), despite the more ramified morphology of their plaque-associated microglia. In addition, these mice showed plaques with increased density after PLX5622 exposure (Figure 7f). These observations are in accord with previous reports showing that microglial depletion by CSF1R antagonism leads to increased plaque size (Clayton et al., 2021; Deczkowska et al., 2018), and confirm a critical role for microglia in maintaining compact-like plaques, thereby limiting the growth of amyloid plaques and potentially slowing the progression of neuritic dystrophy (Kiani Shabestari et al., 2022; Zhao et al., 2017). Although the neuroprotective or detrimental role of microglia in AD progression is still a subject of debate (Casali et al., 2020), FAAH may be considered as a relevant modulator of microglial function, specifically in microglia located near neuritic plaques.

5 | CONCLUSIONS

In the present work, we demonstrate that chronic increase in endocannabinoid tone due to FAAH genetic inactivation in a mouse model of AD leads to a gene expression profile that triggers an exacerbated inflammatory response, which is paradoxically coupled to a lower expression of genes associated with AD development. This modulation seems to be influenced by alterations in the expression of certain microglial genes together with changes in microglial morphology and function following *Faah* gene inactivation. Specifically, our studies revealed an increase in the expression of genes linked to a DAM signature, suggesting an enrichment of this microglial population in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice brains. Additionally, after 28 days of pharmacological microglial ablation induced by PLX5622, we observed that plaque-associated microglial cells in 5xFAD/FAAH^{-/-} mice exhibited a more stable morphological profile that enhanced the uptake of A β peptides and reduced the growth of amyloid plaques compared to those in 5xFAD mice.

In summary, our findings showed that, although FAAH is not expressed by microglial cells, it may modulate their functions, leading to neuroprotective effects associated, paradoxically, to an exacerbated inflammatory response. Taken together, the present data highlight FAAH as a potential therapeutic target in AD.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JR and AMR designed the experiments; MAA, MF, MTG, SRdME and AMR carried out the experiments; GRP, BJC, RM provided materials; VJSA, JR, and AMR wrote the manuscript. All authors revised the final version of the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT


The data that support the findings of this study are openly available in Gene Expression Omnibus (GEO) database at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, reference number SUB14399624.

ORCID

Maria Andrea Arnanz  <https://orcid.org/0000-0002-5940-3301>

Ricardo Mostany  <https://orcid.org/0000-0002-5379-0080>

Julián Romero  <https://orcid.org/0000-0002-2897-606X>

Ana María Martínez-Relimpio  <https://orcid.org/0000-0001-8432-937X>

REFERENCES

- Abiega, O., Beccari, S., Diaz-Aparicio, I., Nadjar, A., Layé, S., Leyrolle, Q., Gómez-Nicola, D., Domercq, M., Pérez-Samartin, A., Sánchez-Zafra, V., Paris, I., Valero, J., Savage, J. C., Hui, C. W., Tremblay, M. È., Deudero, J. J. P., Brewster, A. L., Anderson, A. E., Zaldumbide, L., ... Sierra, A. (2016). Neuronal hyperactivity disturbs ATP microgradients, impairs microglial motility, and reduces phagocytic receptor expression triggering apoptosis/microglial phagocytosis uncoupling. *PLoS Biology*, 14(5), e1002508.
- Aparicio, N., Grande, M. T., Ruiz de Martín Esteban, S., López, A., Ruiz-Pérez, G., Amores, M., Vázquez, C., Martínez-Relimpio, A. M., Pazos, M. R., Cravatt, B. F., Tolón, R. M., & Romero, J. (2018). Role of interleukin 1-beta in the inflammatory response in a fatty acid amide hydrolase-knockout mouse model of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 157, 202–209.
- Ativie, F., Albayram, O., Bach, K., Pradier, B., Zimmer, A., & Bilkei-Gorzo, A. (2015). Enhanced microglial activity in FAAH^{-/-} animals. *Life Sciences*, 138, 52–56.
- 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. *The Journal of Neuroscience*, 23(35), 11136–11141.
- Bo, L., & Bo, X. (2022). Colony stimulating factor 1: Friend or foe of neurons? *Neural Regeneration Research*, 17, 773–774.
- Casali, B. T., MacPherson, K. P., Reed-Geaghan, E. G., & Landreth, G. E. (2020). Microglia depletion rapidly and reversibly alters amyloid pathology by modification of plaque compaction and morphologies. *Neurobiology of Disease*, 142, 104956.
- Clayton, K., Delpech, J. C., Herron, S., Iwahara, N., Ericsson, M., Saito, T., Saido, T. C., Ikezu, S., & Ikezu, T. (2021). Plaque associated microglia hyper-secrete extracellular vesicles and accelerate tau propagation in a humanized APP mouse model. *Molecular Neurodegeneration*, 16(1), 18.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 9371–9376.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758.
- Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2018). Disease-associated microglia: A universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell*, 173, 1073–1081.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21.
- Easley-Neal, C., Foreman, O., Sharma, N., Zarrin, A. A., & Weimer, R. M. (2019). CSF1R ligands IL-34 and CSF1 are differentially required for microglia development and maintenance in white and gray matter brain regions. *Frontiers in Immunology*, 10, 10.
- Elmore, M. R. P., Hohsfield, L. A., Kramár, E. A., Soreq, L., Lee, R. J., Pham, S. T., Najafi, A. R., Spangenberg, E. E., Wood, M. A., West, B. L., & Green, K. N. (2018). Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive, synaptic, and neuronal deficits in mice. *Aging Cell*, 17(6), e12832.
- Fang, Z., Liu, X., & Peltz, G. (2023). GSEAPy: A comprehensive package for performing gene set enrichment analysis in python. *Bioinformatics*, 39(1).
- Grubman, A., Choo, X. Y., Chew, G., Ouyang, J. F., Sun, G., Croft, N. P., Rossello, F. J., Simmons, R., Buckberry, S., Landin, D. V., Pflueger, J., Vandekolk, T. H., Abay, Z., Zhou, Y., Liu, X., Chen, J., Larcombe, M., Haynes, J. M., McLean, C., ... Polo, J. M. (2021). Transcriptional signature in microglia associated with A β plaque phagocytosis. *Nature Communications*, 12(1), 3015.
- Han, J., Chitu, V., Stanley, E. R., Wszolek, Z. K., Karrenbauer, V. D., & Harris, R. A. (2022). Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) as a potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases: Opportunities and challenges. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79, 219.
- Hanslik, K. L., & Ulland, T. K. (2020). The role of microglia and the Nlrp3 inflammasome in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology*, 11, 570711.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El, K. J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschi, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14, 388–405.
- Holtman, I. R., Raj, D. D., Miller, J. A., Schaafsma, W., Yin, Z., Brouwer, N., Wes, P. D., Möller, T., Orre, M., Kamphuis, W., Hol, E. M., Boddeke, E. W. G. M., & Eggen, B. J. L. (2015). Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: A co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathologica Communications*, 3, 31.
- Jain, S., Bisht, A., Verma, K., Negi, S., Paliwal, S., & Sharma, S. (2022). The role of fatty acid amide hydrolase enzyme inhibitors in Alzheimer's disease. *Cell Biochemistry and Function*, 40, 106–117.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and Green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11), 4106–4114.
- Kaur, C., Ling, E. A., & Wong, W. C. (1985). Transformation of amoeboid microglial cells into microglia in the corpus callosum of the postnatal rat brain. An electron microscopical study. *Archivum Histologicum Japonicum*, 48(1), 17–25.
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2017). A

- unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell*, 169(7), 1276–1290.e17.
- Kiani Shabestari, S., Morabito, S., Danhash, E. P., McQuade, A., Sanchez, J. R., Miyoshi, E., Chadarevian, J. P., Claes, C., Coburn, M. A., Hasselmann, J., Hidalgo, J., Tran, K. N., Martini, A. C., Chang Rothermich, W., Pascual, J., Head, E., Hume, D. A., Pridans, C., Davtyan, H., ... Blurton-Jones, M. (2022). Absence of microglia promotes diverse pathologies and early lethality in Alzheimer's disease mice. *Cell Reports*, 39(11), 110961.
- Király, M., Foss, J. F., & Giordano, T. (2023). Neuroinflammation, its role in Alzheimer's disease and therapeutic strategies. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 10(4), 686–698.
- Kwon, H. S., & Koh, S. H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, 9, 42.
- Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17(3), 157–172.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2019). The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*, 47(8), e47.
- Lier, J., Streit, W. J., & Bechmann, I. (2021). Beyond activation: Characterizing microglial functional phenotypes. *Cells*, 10, 2236.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.
- Lowe, H., Toyang, N., Steele, B., Bryant, J., & Ngwa, W. (2021). The endocannabinoid system: A potential target for the treatment of various diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9472.
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the endocannabinoid system. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6, 607–615.
- Madore, C., Joffre, C., Delpech, J. C., de Smedt-Peyrusse, V., Aubert, A., Coste, L., Layé, S., & Nadjar, A. (2013). Early morphofunctional plasticity of microglia in response to acute lipopolysaccharide. *Brain, Behavior, and Immunity*, 34, 151–158.
- Mostany, R., & Portera-Cailliau, C. (2008). A craniotomy surgery procedure for chronic brain imaging. *Journal of Visualized Experiments*, 12, 680.
- Muccioli, G. G., & Stella, N. (2008). Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide. *Neuropharmacology*, 54, 1–22.
- Muzio, L., Viotti, A., & Martino, G. (2021). Microglia in neuroinflammation and neurodegeneration: From understanding to therapy. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 742065.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308(5726), 1314–1318.
- 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 β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience*, 26(40), 10129–10140.
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Bröne, B., Brown, G. C., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110, 3458–3483.
- Papa, A., Pasquini, S., Contri, C., Gemma, S., Campiani, G., Butini, S., Varani, K., & Vincenzi, F. (2022). Polypharmacological approaches for CNS diseases: Focus on endocannabinoid degradation inhibition. *Cells*, 11(3), 471.
- Parakalan, R., Jiang, B., Nimmi, B., Janani, M., Jayapal, M., Lu, J., Tay, S. S. W., Ling, E. A., & Dheen, S. T. (2012). Transcriptome analysis of amoeboid and ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain. *BMC Neuroscience*, 13(1), 64.
- Romero, J., Hillard, C. J., Calero, M., & Rábano, A. (2002). Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: An immunohistochemical study. *Molecular Brain Research*, 100(1–2), 100.
- Ruiz-Pérez, G., Ruiz de Martín Esteban, S., Marqués, S., Aparicio, N., Grande, M. T., Benito-Cuesta, I., Martínez-Relimpio, A. M., Aranz, M. A., Tolón, R. M., Posada-Ayala, M., Cravatt, B. F., Esteban, J. A., Romero, J., & Palenzuela, R. (2021). Potentiation of amyloid beta phagocytosis and amelioration of synaptic dysfunction upon FAAH deletion in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 223.
- Savage, J. C., Picard, K., González-Ibáñez, F., & Tremblay, M. É. (2018). A brief history of microglial ultrastructure: Distinctive features, phenotypes, and functions discovered over the past 60 years by electron microscopy. *Frontiers in Immunology*, 9, 803.
- Sierra, A., de Castro, F., del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., & Kettenmann, H. (2016). The “Big-bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*, 64(11), 1801–1840.
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E., & Maelic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), 483–495.
- Sobue, A., Komine, O., & Yamanaka, K. (2023). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Microglial signature and their relevance to disease. *Inflammation and Regeneration*, 43, 26.
- Spangenberg, E., Severson, P. L., Hohsfield, L. A., Crapser, J., Zhang, J., Burton, E. A., Zhang, Y., Spevak, W., Lin, J., Phan, N. Y., Habets, G., Rymar, A., Tsang, G., Walters, J., Nespi, M., Singh, P., Broome, S., Ibrahim, P., Zhang, C., ... Green, K. N. (2019). Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nature Communications*, 10(1), 3758.
- Spangenberg, E. E., Lee, R. J., Najafi, A. R., Rice, R. A., Elmore, M. R. P., Blurton-Jones, M., West, B. L., & Green, K. N. (2016). Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain*, 139(4), 1265–1281.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550.
- Torres-Platas, S. G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G. D., Cruceanu, C., Turecki, G., Giros, B., & Mechawar, N. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 12.
- Tripathi, R. K. P. (2020). A perspective review on fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors as potential therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 111953.
- Tsou, K., Nogueuron, M. I., Muthian, S., Sañudo-Peña, M. C., Hillard, C. J., Deutsch, D. G., & Walker, J. M. (1998). Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neuroscience Letters*, 254(3), 137–140.
- Unger, M. S., Scherthaner, P., Marschallinger, J., Mrowetz, H., & Aigner, L. (2018). Microglia prevent peripheral immune cell invasion and promote an anti-inflammatory environment in the brain of APP-PS1 transgenic mice. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 274.
- Van Egmond, N., Straub, V. M., & Van Der Stelt, M. (2021). Targeting endocannabinoid signaling: FAAH and MAG lipase inhibitors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61, 441–463.
- VanRyzin, J. W., Marquardt, A. E., Argue, K. J., Vecchiarelli, H. A., Ashton, S. E., Arambula, S. E., Hill, M. N., & McCarthy, M. (2019). Microglial phagocytosis of newborn cells is induced by endocannabinoids and sculpts sex differences in juvenile rat social play. *Neuron*, 102(2), 435–449.e6.

- Vázquez, C., Tolón, R. M., Grande, M. T., Caraza, M., Moreno, M., Koester, E. C., Villascusa, B., Ruiz-Valdepeñas, L., Fernández-Sánchez, F. J., Cravatt, B. F., Hillard, C. J., & Romero, J. (2015). Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation. *Neurobiology of Aging*, 36(11), 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. *Neurobiology of Disease*, 79, 41–50.
- Vidal-Itriago, A., Radford, R. A. W., Aramideh, J. A., Maurel, C., Scherer, N. M., Don, E. K., Lee, A., Chung, R. S., Graeber, M. B., & Morsch, M. (2022). Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Frontiers in Immunology*, 13, 997786.
- Wendimu, M. Y., & Hooks, S. B. (2022). Microglia phenotypes in aging and neurodegenerative diseases. *Cells*, 11(13), 2091.
- Wu, L., Xian, X., Xu, G., Tan, Z., Dong, F., Zhang, M., & Zhang, F. (2022). Toll-like receptor 4: A promising therapeutic target for Alzheimer's disease. *Mediators of Inflammation*, 2022, 1–20.
- Zhang, X. X., Tian, Y., Wang, Z. T., Ma, Y. H., Tan, L., & Yu, J. T. (2021). The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 8(3), 313–321.
- Zhao, R., Hu, W., Tsai, J., Li, W., & Gan, W. B. (2017). Microglia limit the expansion of β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 47.
- Zhou, K., Han, J., Lund, H., Boggavarapu, N. R., Lauschke, V. M., Goto, S., Cheng, H., Wang, Y., Tachi, A., Xie, C., Zhu, K., Sun, Y., Osman, A. M., Liang, D., Han, W., Gemzell-Danielsson, K., Betsholtz, C., Zhang, X. M., Zhu, C., ... Blomgren, K. (2022). An overlooked subset of Cx3cr1 wt/wt microglia in the Cx3cr1 CreER-Eyfp/wt mouse has a repopulation advantage over Cx3cr1 CreER-Eyfp/wt microglia following microglial depletion. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 20.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Arnanz, M. A., Ferrer, M., Grande, M. T., de Martín Esteban, S. R., Ruiz-Pérez, G., Cravatt, B. F., Mostany, R., Lobo, V.-A., Romero, J., & Martínez-Relimpio, A. M. (2024). Fatty acid amide hydrolase gene inactivation induces hetero-cellular potentiation of microglial function in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/glia.24638>

