



Localización por imagen de
alta resolución del sistema
cannabinoide endógeno en
la mitocondria del músculo
estriado de roedor

TESIS DOCTORAL

Doctorando: Ricardo Elorriaga García
Médico Adjunto del Servicio de Traumatología
Hospital Universitario de Basurto

2015

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Directores:

Dr. Pedro Rolando Grandes Moreno

Dra. Miren Josune Canduela Pérez

Departamento de Neurociencias

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

A mis padres, a Arantza y a Lucía

Quiero expresar, de forma muy especial, mi sincero agradecimiento a mi mentor el **Dr. Pedro Rolando Grandes Moreno** por ser el verdadero impulsor de éste trabajo de tesis doctoral, por su ímpetu e ilusión constantes, por no dejarme desfallecer, y por haber despertado en mí el interés por la investigación.

Igualmente quiero agradecer a la **Dra. Miren Josune Canduela Pérez** por su apoyo incondicional y por transmitirme todos sus conocimientos así como resolver mis múltiples dudas.

Así mismo, mi más profundo agradecimiento a todos y cada uno de los miembros del **Laboratorio de Neuroanatomía** por facilitarme tantas cosas durante el transcurso de ésta Tesis Doctoral, que hago extensivo a todo el **Departamento de Neurociencias**.

Finalmente quiero recordar con cariño a mis padres traumatológicos, el **Dr. Félix García Pérez** y el **Dr. Mikel Sánchez Álvarez**, con quienes he compartido maravillosos momentos de trabajo y esfuerzo, por transmitirme su ilusión en seguir aprendiendo y mejorar cada día, y a Mikel en especial le deseo lo mejor en su futura tesis doctoral.

En el apartado personal, mi enorme gratitud a **mis padres** por todo el esfuerzo desinteresado que a lo largo de tantos años han realizado en mi formación como médico, investigador y sobre todo como persona.

A mi mujer **Arantza** por animarme constantemente a realizar éste proyecto con todo su cariño y dedicación y a mi querida hija **Lucía**, que sueña con ser investigadora, para que éste sea un pequeño estímulo en su formación.

ÍNDICE

Localización por imagen de alta resolución del sistema cannabinoide endógeno en la mitocondria del músculo estriado de roedor

Financiación	5
Resumen	6
Introducción	8
Hipótesis de trabajo	36
Objetivos	38
Material y métodos	39
Resultados	49
Discusión	72
Conclusiones	83
Bibliografía	85

FINANCIACIÓN

Este trabajo doctoral ha sido realizado gracias a las ayudas concedidas por organismos públicos a proyectos de investigación del Dr. Pedro Grandes:

- Ministerio de Economía y Competitividad BFU2012-33334.
- Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS). Red de Trastornos Adictivos. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. RD12/0028/0004.
- Ayudas para Apoyar las Actividades de Grupos de Investigación del Sistema Universitario Vasco. Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura. Gobierno Vasco. IT764-13.
- Unidad Integrada de Neurociencia Estructural, Clínica y Funcional (Uineclyf). Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.UFI11/41.

RESUMEN

El sistema endocannabinoide es un sistema modulador versátil que se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (Chevaleyre y cols., 2006; Mackie, 2008; Heifets y Castillo, 2009; Kano y cols., 2009; Castillo y cols., 2012; Kano, 2014).

Este sistema está compuesto por los cannabinoides endógenos o endocannabinoides (los principales son la anandamida y 2-araquidonil-glicerol-2-AG) que activan los mismos receptores de cannabinoides que los componentes psicoactivos del cannabis, así como los enzimas de síntesis y degradación de los endocannabinoides (Howlett y cols., 2002; Freund y cols., 2003; Mackie, 2008; Pertwee y cols., 2010) y los sistemas de transporte selectivos, como el recientemente identificado para anandamida (Fu y cols., 2011). Muchos de los efectos de los cannabinoides y endocannabinoides están mediados por los receptores CB₁ y CB₂ unidos a proteínas G de carácter inhibitorio (G_i y G_o), habiendo además otros receptores como el GPR55 activado por endocannabinoides (Ryberg y cols., 2007; Mackie, 2008; Pertwee y cols., 2010), o el receptor TRPV1 (Micale y cols., 2009).

Los receptores CB₁ también están presentes en órganos periféricos, como el músculo esquelético, hígado, páncreas o grasa, donde participan en las funciones celulares y en el metabolismo energético (Piomelli, 2003; Silvestri y Di Marzo, 2013); de tal manera, la deficiencia genética o el bloqueo farmacológico de los receptores CB₁ tiene un efecto beneficioso en ciertas alteraciones metabólicas, tales como la obesidad y el síndrome metabólico (Vickers y cols., 2003; Pagotto y cols., 2006; Nam y cols., 2012; Silvestri y Di Marzo, 2013).

Por otra parte, datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado la existencia de CB₁ en membranas de mitocondrias de neuronas del hipocampo de ratón, cuya activación regula la respiración celular y la producción de energía (Benard et al., 2012). Sin embargo, se desconoce si CB₁ está localizado en mitocondrias de la periferia.

En base a estos antecedentes, nuestra hipótesis sostiene que los receptores CB₁ distribuidos en órganos periféricos podrían estar localizados en las mitocondrias del músculo, al igual que ocurre en el cerebro.

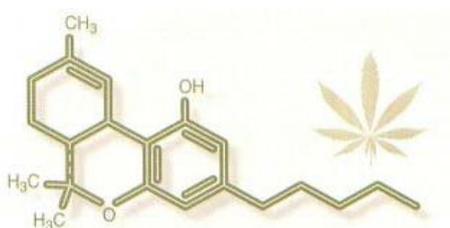
El objetivo de este Proyecto de Tesis Doctoral es investigar la existencia de CB₁ y de elementos clave del sistema endocannabinoide en mitocondrias del músculo estriado, un órgano en el que este sistema ha sido identificado (Crespillo et al., 2011). Con este fin, utilizaremos anticuerpos altamente específicos frente a CB₁ y proteínas relacionadas en combinación con un método de preinclusión de inmuno-oro intensificado con plata. La visualización de la localización proteica será por medio de técnicas de imagen de alta resolución. Los tejidos a estudiar serán los músculos estriados gastrocnemio, abdominal y cardiaco extraídos tras la perfusión transcardiaca de una solución fijadora a ratones silvestres (CB₁-WT) y mutantes que carecen constitutivamente del gen que codifica CB₁ (CB₁-KO).

Si se confirma la hipótesis de partida, los datos anatómicos de este trabajo Doctoral permitirán a posteriori determinar si la presencia de CB₁ en mitocondrias musculares participa en la regulación intracelular del metabolismo, a través del control de las funciones mitocondriales.

INTRODUCCION

Cannabinoides

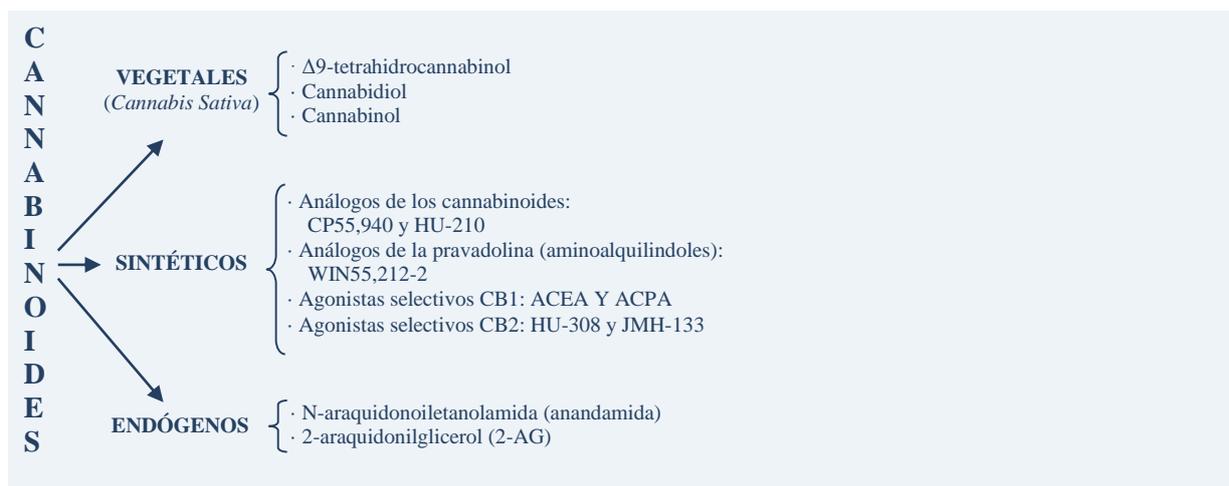
La planta *Cannabis sativa* contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes de los que unos 60 se consideran dentro del grupo de los cannabinoides. El principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta es el compuesto lipofílico Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), que fue aislado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



Estructura química del Δ^9 -tetrahidrocannabinol.

Este descubrimiento sin embargo no vino acompañado de la caracterización molecular del receptor correspondiente en el cerebro de los mamíferos, sino que hubo que esperar más de dos décadas hasta que se descubriera que los principios activos de la marihuana, el hachís, u otros preparados de la planta *Cannabis sativa*, tienen sus efectos psicotrópicos a través de la activación de una serie de receptores de membrana presentes en las células nerviosas. El primer receptor específico de THC, denominado receptor de cannabinoides tipo 1 (CB_1) fue identificado y posteriormente clonado tras el *screening* de afinidad por THC de varios receptores huérfanos unidos a proteínas G que habían sido caracterizados previamente. El segundo receptor cannabinoide, denominado CB_2 , identificado por la técnica de clonación por homología, resultó ser bastante diferente de CB_1 , tanto en la secuencia de aminoácidos, como en la localización en tejidos de mamífero. En este sentido, CB_1 es muy abundante en el cerebro, lo que sugiere que es responsable de la psicoactividad del THC, expresándose CB_2 sobre todo en células inmunes. La clonación de los receptores de cannabinoides abrió la puerta a la identificación de sus ligandos endógenos, denominados por analogía funcional cannabinoides endógenos o endocannabinoides.

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



Principales cannabinoides y compuestos relacionados.

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

El sistema endocannabinoide es un complejo sistema endógeno de señalización que interviene en múltiples vías metabólicas. Está formado por los receptores de cannabinoides, sus ligandos endógenos o endocannabinoides, las proteínas involucradas en su síntesis e inactivación, así como las vías de señalización intracelular reguladas por los endocannabinoides.

Endocannabinoides

La familia de agonistas endógenos del receptor CB₁ es mayor de lo que se pensaba inicialmente. Por definición, los endocannabinoides son compuestos endógenos derivados de ácidos grasos poliinsaturados que se unen y activan el receptor CB₁, CB₂ o ambos.

El primer endocannabinoide descubierto fue la etanolamida del ácido araquidónico, conocida como anandamida (del sánscrito “placer interno”; N-araquidonoiletanolamida). A este hallazgo se sumó el descubrimiento de que el metabolito endógeno 2-araquidonilglicerol (2-AG), también presentaba alta afinidad por los receptores CB₁ y CB₂. Otro miembro de esta familia de lípidos, la palmitoiletanolamida, comparte con los cannabinoideos endógenos diversos efectos fisiológicos, aunque no es capaz de unirse a ninguno de los dos receptores de cannabinoideos conocidos hasta el momento. Se han identificado otros endocannabinoideos en los últimos años, entre los que se encuentran el 2-araquidonil-glicerol éter (noladin éter), N-araquidonil-dopamina (NADA) y O-araquidonil-etanolamina (virodamina), cuya actividad farmacológica y metabolismo de estos compuestos lipídicos son centro de interés científico en la actualidad. Por lo tanto, por el momento la anandamida y 2-AG son considerados los endocannabinoideos mayores. Además se ha aislado el péptido hemopresina en diversos tejidos, incluido el cerebro, conocido previamente por su efecto hipotensor y que tiene la característica de ser el primer potente agonista inverso/antagonista endógeno de CB₁.

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

Región SNC	Anandamida	2-AG	Receptor CB ₁
Cuerpo estriado	+++	++++	++++
Mesencéfalo	++	++	++
Tronco del encéfalo	++++	+++++	++
Cerebelo	+	++	+++++
Hipocampo	+++	+++++	++++
Estructuras límbicas	++	++++	++

Corteza cerebral	+	++	++
Diencéfalo	+	+	+++
Médula espinal	+++	++++	++
Anandamida (pmol/g tejido): + (<20); ++ (20-40); +++ (40-60); ++++ (60-80); +++++ (>80)			
2-AG (nmol/g tejido): + (<3); ++ (3-6); +++ (6-9); ++++ (9-12); +++++ (>12)			
Receptor CB₁ (fmol/mg tejido): + (<250); ++ (250-500); +++ (500-750); ++++ (750-1000); +++++ (>1000)			

Distribución de los endocannabinoides y del receptor CB₁ en diversas regiones del sistema nervioso central (SNC) de la rata.

Las concentraciones de 2-AG en el cerebro son mayores que las de anandamida, aunque en general hay una buena correlación entre los dos endocannabinoides en las distintas regiones en las que estos compuestos han sido analizados (Hu SS y cols., 2015).

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

Biosíntesis y metabolismo de los endocannabinoides

Las rutas de síntesis y las vías catabólicas de la anandamida y 2-AG son de interés científico desde hace tiempo, siendo su conocimiento a pesar de todo sólo parcial hasta la fecha.

N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NArPE) y diacilgliceroles (DAGs) junto con ácido araquidónico en posición-2 actúan como los principales precursores biosintéticos de anandamida y 2-AG, respectivamente. La producción de NArPE tiene lugar por la transferencia de ácido araquidónico desde la posición sn-1 de los fosfolípidos al átomo de nitrógeno de fosfatidiletanolamina, mientras que los precursores DAG necesarios para la síntesis de 2-AG derivan sobre todo de la

hidrólisis de fosfatidilinositol catalizada por fosfolipasa C y en algunas células por la hidrólisis del ácido fosfatídico.

Las enzimas de biosíntesis de ambos endocannabinoides son: dos DAG lipasas selectivas por sn-1 denominadas DAGL- α y DAGL- β , responsables de la biosíntesis de 2-AG en células y tejidos; la enzima fosfolipasa D específica N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE-PLD) cataliza la conversión directa de NArPE en anandamida. La síntesis de anandamida se produce mediante la hidrólisis catalizada por NAPE-PLD del precursor fosfolipídico NArPE presente en la membrana celular. Este compuesto sirve como depósito de almacenaje de la anandamida que será sintetizada y liberada en el momento en que exista una demanda de la misma. La vida media de la anandamida es muy corta ya que es rápidamente recaptada por un transportador de alta afinidad (*anandamide membrane transporter* o AMT), aún no caracterizado molecularmente, pero que está presente tanto en neuronas como en células gliales. Por su parte, el 2-AG tras su liberación puede ser recaptado por el transportador de anandamida y posteriormente degradado. Algunos autores han propuesto un proceso específico por medio del cual los endocannabinoides, según la dirección de su gradiente de concentración a través de la membrana plasmática, son captados por las células una vez que han activado los receptores, o liberados por las células tras la biosíntesis de endocannabinoides. Hasta la fecha, este mecanismo no ha sido identificado a nivel molecular.

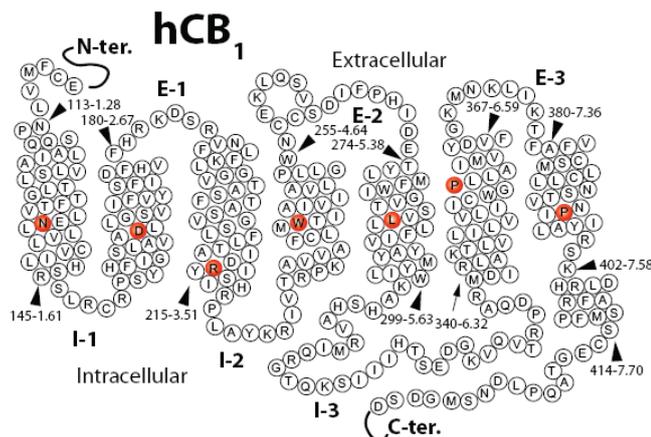
Los dos endocannabinoides son inactivados esencialmente por hidrólisis enzimática de sus amidas y sus uniones éster. Las enzimas responsables de estas reacciones fueron clonadas en diversas especies de mamíferos e identificadas como amidohidrolasa de ácidos grasos (*fatty acid amide hydrolase* o FAAH) para anandamida y monoacilglicerol lipasa (MAGL) para 2-AG. FAAH cataliza la hidrólisis de la anandamida en el interior de la célula dando lugar a dos componentes fundamentales: ácido araquidónico y etanolamina. Por su parte, MAGL convierte 2-AG en ácidos grasos libres (ácido araquidónico) y glicerol. Los endocannabinoides comparten ciertos criterios con los neurotransmisores clásicos, en el sentido de que son sintetizados y liberados por las neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membrana, y finalmente son inactivados

por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula. Únicamente, a diferencia de lo que ocurre con los neurotransmisores y dada la naturaleza lipídica de estos compuestos, los endocannabinoides no son almacenados en el interior de vesículas sinápticas.

Receptores de cannabinoides

Los cannabinoides ejercen sus efectos mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta el momento se han clonado dos receptores para cannabinoides: el receptor CB₁ que se expresa abundantemente en el sistema nervioso central, y el receptor CB₂ localizado fundamentalmente a nivel del sistema inmune. Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por la presencia de siete dominios transmembrana, un dominio amino-terminal extracelular y un dominio carboxilo-terminal intracelular.

El receptor CB₁ contiene 472-473 aminoácidos organizados en una secuencia típica, altamente conservada entre las distintas especies estudiadas. El receptor CB₂ presenta una homología global del 44% (68% en las regiones transmembrana) con el receptor CB₁.



Representación de la secuencia del receptor CB₁ humano. Adaptada de Mackie, 2008.

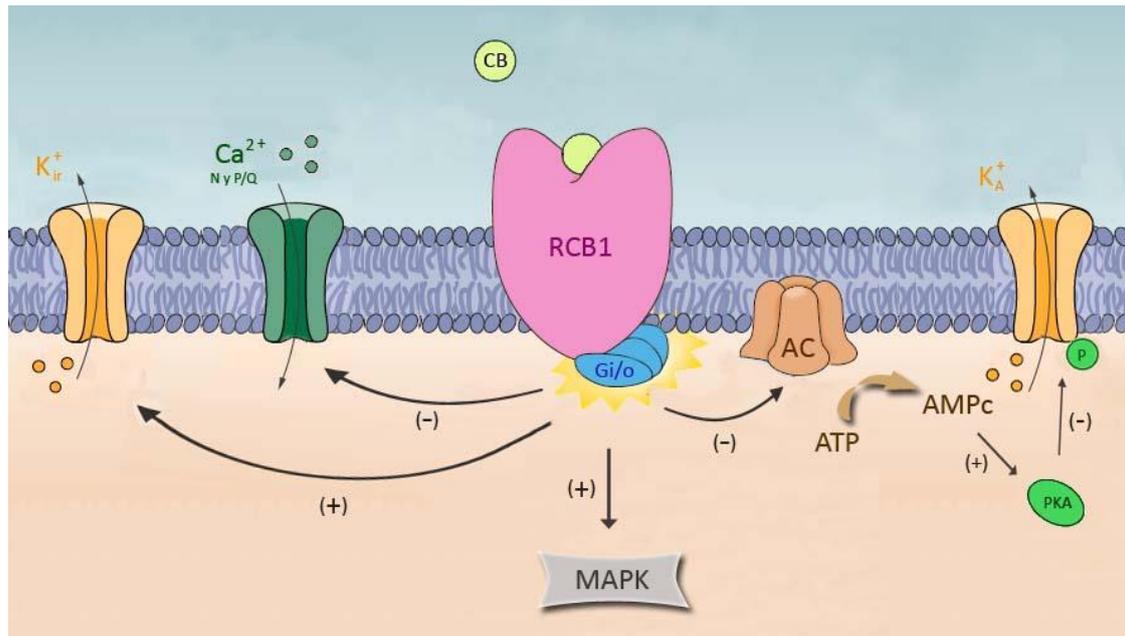
Los estudios en ratones *knockout* para el receptor CB₁ y CB₂ sugieren la existencia de receptores de cannabinoides adicionales. Por ejemplo, algunos fitocannabinoides, cannabinoides sintéticos y endocannabinoides se unen y activan

in vitro el receptor huérfano GPR55 que está acoplado a proteína G. Esta es una proteína presente en diversos tejidos y órganos humanos y de rata, incluido el cerebro, con una homología de secuencia con CB₁ y CB₂ inferior al 20%. También hay evidencias de un receptor endocannabinoide vascular distinto de GPR55, CB₁ o CB₂.

Los endocannabinoides también pueden producir efectos que no son mediados por receptores acoplados a proteínas G. Por ejemplo, la anandamida comparte con el THC y con otros cannabinoides la mayoría de sus propiedades farmacológicas tanto en el sistema nervioso central como a nivel periférico, pero existen algunos efectos de este endocannabinoide que no son a través de los receptores de cannabinoides conocidos hasta el momento. La anandamida y NADA (pero no 2-AG) activan el receptor de vanilloide tipo 1 (TRPV1), un receptor no-CB₁, no-CB₂ identificado como un canal catiónico no selectivo que forma parte de la amplia familia de los canales transitorios de receptores potenciales (TRP) activados por calor nocivo (>42°C), pH bajo (<6,0) y la capsaicina, componente activo del chili picante. Los datos experimentales apuntan a que TRPV1 participa en algunos de los efectos farmacológicos de la anandamida. También hay evidencias obtenidas *in vitro* de que la anandamida antagoniza otro canal TRP, el TRP de melastatina tipo 8 (TRPM8), el cual es responsable de la sensación de frío inducida por el mentol y por temperaturas inferiores a 25°C.

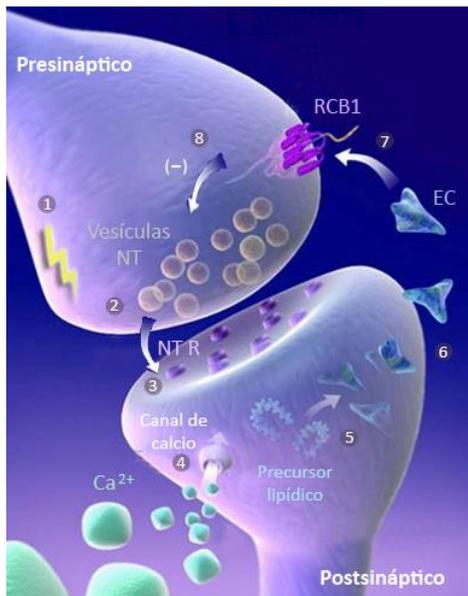
Mecanismos de transducción de señales

Ambos receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ están sobre todo unidos a proteínas Gi/o, a través de cuyas subunidades α inhiben la adenilato ciclasa lo que da lugar a un descenso de los niveles de AMPc intracelular. De esta forma, se ve afectada la capacidad de fosforilación de proteínas quinasas dependientes de este nucleótido cíclico. Los cannabinoides también estimulan la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), vía involucrada en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación.



Mecanismos de transducción de señales de los receptores CB₁. Modificada de Purves y cols., 2008.

Los eventos intracelulares típicos mediados por las proteínas Gi/o unidas a la activación del receptor CB₁ son la inhibición de la mayoría de los canales de calcio dependientes de voltaje, incluidos los de tipo P/Q, N y L, así como el aumento de la conductancia al potasio. Ambos fenómenos (inhibición de los canales de calcio y estimulación de los canales de potasio) contribuyen a la reducción de la excitabilidad neuronal y la supresión de la liberación de neurotransmisor. La activación del receptor CB₁ inhibe por tanto la liberación de GABA o glutamato según sea un tipo de neurona inhibidora o excitadora la que localice el receptor CB₁, e inhibe también la liberación de neuropéptidos por las terminales nerviosas.



Señalización retrógrada mediada por los endocannabinoides:

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

Adaptada de: "Endocannabinoid System Network" (cortesía Dr. V. Di Marzo).

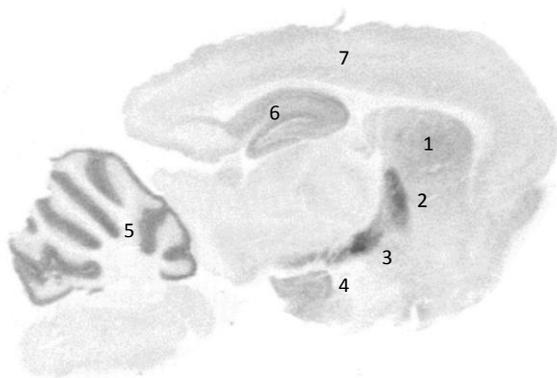
Existen evidencias crecientes de la capacidad de algunos agonistas de CB₁ de estimular directamente en algunos tipos celulares: 1) la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) por fosfolipasa C-β, con la consecuente liberación de inositol-1,4,5-fosfato (IP₃) y movilización de calcio intracelular del retículo endoplasmático rugoso, a través de mecanismos mediados por Gq/11 o Gi/o. 2) la modulación de la cascada de señalización de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) por medio de Gi/o, descrita como de naturaleza positiva o negativa dependiendo del tipo celular, por tanto afectando la vía de señalización Akt/proteína quinasa B. Otros efectos de la señalización intracelular descritos para los receptores CB₁ y CB₂ son la liberación de óxido nítrico y la consecuente activación de GMPc, así como el aumento de la liberación de ceramida por CB₂.

Distribución de los receptores de cannabinoides

- Receptor CB₁

El receptor CB₁ se localiza principalmente en el sistema nervioso central siendo el receptor acoplado a proteína G más abundante del cerebro. La aplicación con éxito de diferentes técnicas autorradiográficas e inmunohistoquímicas tuvo como resultado el conocimiento de la distribución detallada de CB₁ en el cerebro de la rata. La mayor densidad del receptor se encuentra en los ganglios basales

(sustancia negra, globo pálido, estriado, núcleo entopeduncular), capa molecular del cerebelo y ciertas partes del hipocampo (región CA3 del asta de Ammón y capa molecular del giro dentado). La densidad de CB₁ es más moderada en las capas I y IV de la corteza cerebral, mientras que un escaso número de receptores se



Distribución del receptor CB₁ en un corte sagital de cerebro de ratona adulta:

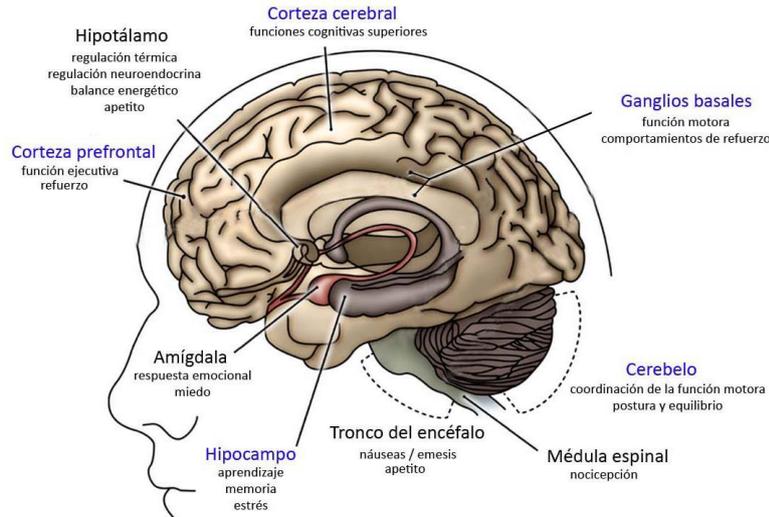
1. Estriado
2. Globo pálido
3. Núcleo entopeduncular
4. Sustancia negra
5. Cerebelo
6. Hipocampo
7. Corteza cerebral

encuentra en el hipotálamo,

Tomado de: Berrendero F. En: Guía Básica sobre los Cannabinoides. Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides. I.S.B.N.: 84-699-8658-9. Capítulo 2: Elementos que forman el sistema cannabinoide endógeno 2002; Págs: 23-31.

tronco del encéfalo y médula espinal.

En general, la distribución del receptor CB₁ está estrechamente ligada a los efectos farmacológicos que producen los cannabinoides. Así, la gran densidad de este receptor en los ganglios basales se relaciona con las manifestaciones de los cannabinoides en la actividad locomotora de los roedores, llegando a producir catalepsia a dosis elevadas. La presencia de CB₁ en áreas hipocampales y corticales explicaría los efectos de los cannabinoides sobre el aprendizaje y la memoria así como las propiedades anticonvulsivas de los mismos. Finalmente, la baja densidad de CB₁ en el tronco del encéfalo, área que controla las funciones cardiovascular y respiratoria, explica la baja toxicidad y ausencia de letalidad de la marihuana.



Regiones encefálicas que expresan el receptor CB₁ y funciones en las que participan. En azul están marcadas las regiones con una expresión abundante del receptor CB₁ y en negro las que presentan una expresión moderada. Adaptada de: "Endocannabinoid System Network".

El receptor CB₁ también está presente a nivel periférico. Se han encontrado receptores en el bazo y las amígdalas, corazón, próstata, útero, ovario y a nivel presináptico en terminales nerviosas simpáticas. Otras localizaciones periféricas del receptor CB₁ incluyen el tejido adiposo, hígado, tracto gastrointestinal y páncreas.

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

Sistema nervioso central	Aparato genitourinario / reproductivo	Aparato gastrointestinal	Otros
Cerebro Médula espinal	Riñón Placenta Próstata Testículos y esperma Útero	Íleon Hígado Estómago Páncreas	Tejido adiposo Pulmón Músculo Bazo

- **Receptor CB₂**

El receptor CB₂ se localiza fundamentalmente en bazo, amígdalas y en distintas células del sistema inmune (linfocitos B, aunque también en monocitos y linfocitos T). También se expresa en tejido nervioso, particularmente tras sufrir una lesión. Los receptores CB₂ presentes en estos tejidos y células parecen ser los responsables de las propiedades inmunosupresoras de la marihuana.

Correlación fisiológica de la anatomía del sistema endocannabinoide

Existen indicios de que el sistema endocannabinoide está presente en todos los vertebrados, además de que los receptores CB₁ y CB₂ están distribuidos más ampliamente que lo pensado en un principio, por lo que la participación de este sistema en funciones biológicas vitales parece evidente. Por ejemplo, el hígado es la fuente de una pequeña cantidad de CB₁ funcionalmente importante. Inicialmente, se descartó la existencia de CB₂ en el cerebro, pero después fue detectado en este órgano no sólo en condiciones de neuroinflamación. Por lo tanto, la idea original de que CB₁ tiene un papel casi exclusivo en el cerebro y CB₂ en el sistema inmune, ha cambiado hacia el concepto de que ambos tipos de receptores controlan funciones centrales y periféricas de vital importancia, como son: desarrollo neuronal, transmisión sináptica, neuroprotección, inflamación, nocicepción, control motor, memoria y aprendizaje, miedo y ansiedad, apetito, ingesta; función cardiovascular, respiratoria y reproductiva, modulación del sistema inmune; liberación y acción hormonal, formación ósea y metabolismo energético; funciones celulares, como la arquitectura celular, proliferación, motilidad, adhesión así como la apoptosis (Wei D y cols., 2015 ; Soria-Gómez E y cols., 2015).

No sólo el nivel de expresión de los receptores cannabinoides, sino que también las concentraciones tisulares de los endocannabinoides principales sufren cambios significativos tras estímulos fisiológicos y patológicos. Esta plasticidad del sistema endocannabinoide es observada claramente en el sistema nervioso central,

donde se da en respuestas adaptativas y pro-homeostáticas frente a situaciones de estrés crónico, excitotoxicidad neuronal y daño, y en neuroinflamación (Ma L y cols., 2015). Lo mismo ocurre en mecanismos más fisiológicos como es la transmisión sináptica que tiene lugar durante la elaboración de procesos cognitivos, motivacionales y afectivos, así como en la alteración patológica de estos procesos (Anderson GR y cols., 2015). La biosíntesis, acción y degradación de los endocannabinoides cursan según las necesidades generadas, y normalmente los endocannabinoides están restringidos en tiempo y espacio gracias a la naturaleza lipofílica de estos compuestos, sus vías de biosíntesis dependientes de fosfolípidos y la sensibilidad al calcio de algunas de sus enzimas de biosíntesis. La acción pro-homeostática de la activación de CB₁ y/o CB₂ por los endocannabinoides habitualmente ejerce una función general de protección.

La distribución anatómica de las enzimas metabólicas y de los receptores de endocannabinoides sustenta la estrategia pro-homeostática del sistema. En el cerebro, por ejemplo, las enzimas de biosíntesis y degradación de 2-AG se localizan con respecto a CB₁ de tal forma que las neuronas postsinápticas que expresan DAGL- α en espinas dendríticas y compartimentos somatodendríticos, por medio de la producción y liberación de 2-AG, controlan la actividad de las neuronas presinápticas complementarias, donde a menudo se encuentra el receptor CB₁. Esta acción moduladora retrógrada es terminada por MAGL que se localiza en la misma terminal presináptica (Viader A y cols., 2015). De este modo, la activación de CB₁ reduce la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje y aumenta la actividad de los canales de potasio rectificadores de corriente, teniendo todo ello como consecuencia la inhibición de la liberación de neurotransmisor. Esta señalización paracrina representa un mecanismo de freno del circuito.

En el aparato reproductor femenino, los efectos paracrinos de los gradientes de concentración de endocannabinoides en las trompas de Falopio y útero controlan el lugar exacto de la implantación del embrión. La ingesta crónica de alcohol provoca en el hígado un aumento de la expresión de CB₁ y una elevación de los niveles de 2-AG y DAGL- β selectivamente en células hepáticas estrelladas. El cocultivo de hepatocitos de animal silvestre con células estrelladas de ratones alimentados con alcohol resulta en un aumento de la expresión de CB₁ y de genes

lipogénicos, no así en el animal carente de CB₁. Por lo tanto, la activación paracrina del receptor CB₁ por 2-AG procedente de las células estrelladas interviene en la esteatosis inducida por alcohol a través de un aumento de la lipogénesis y de un descenso de la oxidación de ácidos grasos. De hecho, la selectividad de acción tan marcada que tienen los endocannabinoides en el tiempo y en el espacio podría perderse en situaciones patológicas crónicas, en las que los endocannabinoides actuarían por un mayor periodo de tiempo o sobre receptores localizados en células donde inicialmente no se supone que actúan, contribuyendo de este modo a la aparición de los síntomas y a la progresión de los desórdenes degenerativos. Esto podría explicar los efectos beneficiosos de los potenciadores de la acción endocannabinoide (como los inhibidores de FAAH y MAGL) y de los antagonistas de receptores de cannabinoides para el mismo tipo de condición patológica.

La estrategia general de acción de la anandamida en el cerebro puede ser más compleja que en el caso de 2-AG, por las siguientes observaciones: 1) FAAH, a diferencia de MAGL, se localiza fundamentalmente a nivel postsináptico y en membranas intracelulares, lo que puede limitar la inactivación rápida de la acción de la anandamida en neuronas presinápticas. 2) NAPE-PLD, a diferencia de DAGL- α , se localiza sobre todo presinápticamente y en membranas intracelulares (aunque no siempre). 3) La anandamida también activa TRPV1, el cual puede estar unido a la liberación de glutamato cuando se localiza presinápticamente en el cerebro, o a la inhibición de DAGL- α , y por tanto de los niveles de 2-AG y de la actividad de señalización retrógrada mediada por CB₁ cuando se localiza postsinápticamente. Estas observaciones indican un posible papel mediador de la anandamida intracelular que actuaría sobre el canal TRPV1 a nivel de un lugar de unión citosólico, controlando así la homeostasis de calcio y/o la biosíntesis de 2-AG. Por otra parte, la anandamida extracelular actuaría anterógradamente sobre las dianas postsinápticas de este compuesto.

Tabla 2. Respuestas producidas por la estimulación de los receptores de cannabinoides

Sensación de euforia, sedación y relajación.
Alteraciones de la percepción temporal (sobreestimación del tiempo transcurrido) y de la memoria reciente.
Actividad analgésica y antiinflamatoria.

Actividad orexígena y antiemética.
Acciones sobre el tono muscular y la coordinación motora (ataxia, debilidad muscular).
Disminución de la presión intraocular.
Hipotermia.
Acciones sobre el aparato respiratorio (broncodilatación).
Efectos cardiovasculares (hipotensión y taquicardia).
Efectos neuroendocrinos (disminución en la liberación de distintas hormonas sexuales e incrementos en la liberación de hormonas relacionadas con la respuesta al estrés).
Efectos inmunomoduladores (inmunoestimulación a dosis bajas e inmunosupresión a dosis altas).
Efectos antiproliferativos.

Además, el sistema endocannabinoide influye otros sistemas fisiológicos mediante su interacción con receptores, vías de señalización intracelular, hormonas y neurotransmisores, de tal forma que algunos de los efectos biológicos del sistema endocannabinoide ocurren a través de una compleja interacción con otros sistemas (Hillard CJ., 2015). Entre los sistemas implicados están el receptor de vanilloide tipo 1, el receptor serotoninérgico 5-HT₃, los receptores NMDA de glutamato y los receptores nicotínicos de acetilcolina.

Sistema endocannabinoide en la periferia

Como ya ha sido comentado, el sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema complejo de señalización endógena constituido por receptores de cannabinoides con siete dominios de transmembrana (receptores CB₁ y CB₂), sus ligandos endógenos derivados de lípidos (endocannabinoides, eCBs) y las enzimas para la síntesis y degradación de estos lípidos. Los dos eCBs más estudiados son el N-araquidoniletanolamida, denominado anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG). Los eCBs no se almacenan en las células sintetizándose a demanda a partir de precursores de fosfolípidos que contienen ácido araquidónico en la membrana celular de la mayoría de las células de los mamíferos, tales como neuronas, adipocitos o células del músculo esquelético (Newman y cols., 2007), posiblemente en respuesta a unos niveles elevados de calcio intracelular (Cadas y cols., 1996), despolarización de la membrana y/o estimulación de receptor (Pagotto y cols., 2006). Tras haber ejercido su efecto agonista sobre los correspondientes

receptores (Dainese y cols., 2010) a través de mecanismos autocrinos y paracrinos (Petrosino y cols., 2009), los eCBs se dirigen a compartimentos celulares donde se localizan las enzimas catabólicas, probablemente por medio de vías de transporte que implican, entre otras, proteínas específicas de transporte y una endocitosis dependiente de caveolas (Piomelli y cols., 2003; McFarland y cols., 2005; Placzek y cols., 2008).

Los receptores CB₂ están implicados sobre todo en procesos inmunes y de inflamación (Howlett y cols., 2002). Por su parte, los receptores CB₁ se expresan en tejidos centrales y periféricos e influyen las vías metabólicas de los lípidos y de la glucosa (Di Marzo y cols., 2004; Pagotto y cols., 2006; Silvestri y cols., 2011). A su vez la activación de estos receptores influye conductas como la ingesta de alimentos, que también se ve afectada a través de la modulación de las propiedades de recompensa de la comida ejercida por CB₁ en áreas mesolímbicas específicas del cerebro (Di Marzo y Matias, 2005; Cavuoto y Wittert, 2009; Bellocchio y cols., 2010; Maccarrone y cols., 2010).

La perturbación de la homeostasis desencadena la producción de eCBs, los cuales junto con otros sistemas de señalización homeostática, ayudan a las células a retornar a su estado de equilibrio. Sin embargo, en condiciones de alteraciones prolongadas o crónicas, el sistema endocannabinoide pierde su regulación, por lo que la producción y acción de los eCBs merman especificidad en el tiempo y en el espacio. Teniendo en cuenta el importante papel del sistema endocannabinoide en la regulación del metabolismo central y periférico, no es de sorprender que esta pérdida de la regulación tenga lugar en patologías, como por ejemplo la obesidad (Jbilo y cols., 2005; Poirier y cols., 2005; Nogueiras y cols., 2009). Por todo ello, el SEC está emergiendo como uno de los sistemas fundamentales en la regulación de la homeostasis energética, y su disfunción como un determinante de ciertos desórdenes metabólicos (Mazier y cols., 2015; Gatta-Cherifi y cols., 2015).

El control del balance energético por la acción del sistema endocannabinoide ha sido ampliamente estudiado en áreas mesolímbicas cerebrales y en el hipotálamo, pero también en tejidos periféricos como los adipocitos, los hepatocitos y el tracto gastrointestinal (Matias y cols., 2006, 2008; Pagotto y cols.,

2006). Sin embargo, sólo se tienen referencias desde 2007 de la importancia de este sistema en el músculo esquelético.

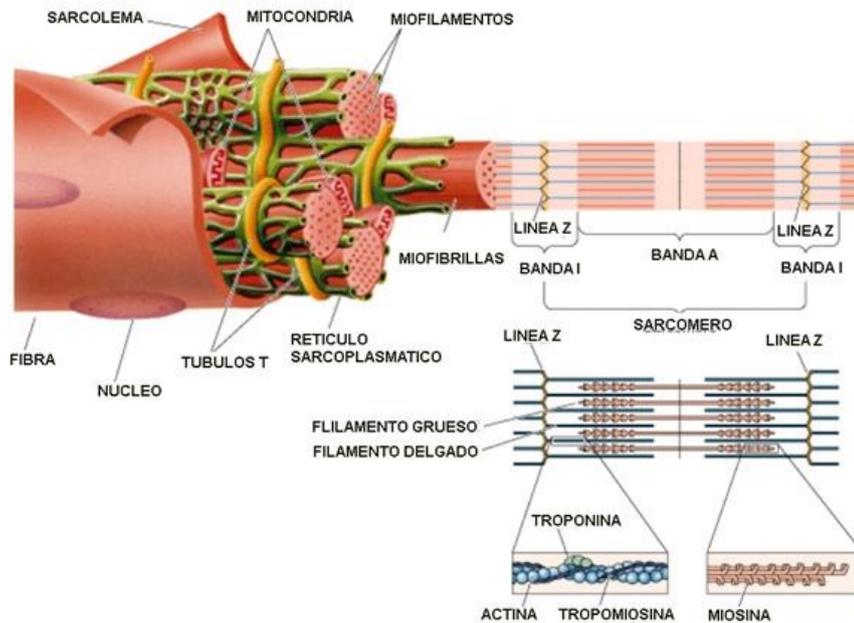
El músculo esquelético tiene un papel crucial en el gasto de energía en reposo (Zurlo y cols., 1990) y en la homeostasis de los lípidos y de la glucosa, al ser el lugar primario de los procesos de oxidación de los ácidos grasos y de disposición de glucosa regulados por la insulina (Abdul-Ghani y DeFronzo, 2010). El ejercicio físico se asocia con numerosas adaptaciones metabólicas (Wood y cols., 1988; Lesniak y cols., 2001; Fujii y cols., 2004) y algunos trabajos subrayan el posible efecto del ejercicio agudo sobre los niveles plasmáticos de eCBs (Sparling y cols., 2003; Heyman y cols., 2012) y del ejercicio crónico sobre la expresión de CB1 en tejidos metabólicamente activos (Yan y cols., 2007). Estas observaciones inclinan a pensar en un posible papel de los eCBs inducidos por el ejercicio, con la consecuente activación de CB1 en las adaptaciones metabólicas asociadas a la actividad física (Fuss y cols., 2015).

Por lo tanto, un mejor conocimiento de la respuesta del sistema endocannabinoide en el ejercicio, así como de los mecanismos implicados y de sus consecuencias metabólicas, pueden suponer la piedra angular en el diseño de apropiadas intervenciones basadas en la actividad física para el tratamiento de ciertas enfermedades metabólicas.

El sistema endocannabinoide en el músculo esquelético

La expresión de receptores CB1 y de otros componentes del sistema endocannabinoide a nivel de proteína y de ARNm ha sido demostrada en diferentes células musculares esqueléticas de humano y roedor (Cavuoto y cols., 2007; Esposito y cols., 2008; Eckardt y cols., 2009; Crespillo y cols., 2010; Lipina y cols., 2010).

Los resultados de varios estudios incorporan el sistema endocannabinoide y, más específicamente, la señalización a través de CB1, al complejo sistema de mecanismos que modulan la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina, a



Representación esquemática de la composición del músculo estriado. Imagen tomada de internet.

pesar de que existen diferencias respecto a los efectos de la activación de CB₁ sobre las vías intracelulares que regulan la sensibilidad a la insulina y la señalización del receptor de la insulina (Esposito y cols., 2008; Eckardt y cols., 2009; Lipina y cols., 2010; Watkins et al., 2010).

La incubación de células musculares esqueléticas primarias humanas con niveles bajos de AEA y 2-AG, reduce la captación de 2-deoxi-D-[14C]glucosa (2-DOG) estimulada por insulina a través de la activación de CB₁ (Eckardt y cols., 2009). La captación basal de glucosa también está modulada por el antagonismo de CB₁. De tal modo, la silenciación genética de CB₁ causa un incremento de la captación basal de 2-DOG (Esposito y cols., 2008). En este mismo sentido, una preincubación corta con una dosis suficiente (0.1–0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$) del antagonista/agonista inverso del receptor CB₁ Rimonabant (SR141716A), aumenta la captación de 2-DOG en miotubos L6 (Esposito y cols., 2008). Es de reseñar que cuando la dosis de Rimonabant aumenta a concentraciones del rango micromolar (1–10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), tiene lugar una reducción de la captación de 2-DOG (Esposito y cols., 2008; Eckardt y cols., 2009), lo cual es consistente con la actividad agonista

parcial de Rimonabant (Krylatov y cols., 2005) y/o con una regulación al alza de la expresión de CB₁ a estas concentraciones elevadas en las células L6 (Esposito y cols., 2008). Varias líneas de evidencia indican que la regulación de la captación de glucosa por CB₁ puede ser a través de la señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Esposito y cols., 2008).

A la vista de los datos mencionados, la señalización de CB₁ ejerce una acción tónica inhibitoria sobre la captación de glucosa y la vía de señalización PI3K, al menos en cultivos celulares, pudiendo revertirse ambas por antagonistas de CB₁ y aumentarse sólo parcialmente y de forma muy selectiva por algunos agonistas de CB₁. El tratamiento con Rimonabant (10 mg kg⁻¹ d⁻¹, i.p.) *in vivo* induce un incremento de la actividad del transporte de glucosa estimulada por insulina en el músculo sóleo de ratas delgadas y obesas Zucker resistentes a la insulina (Lindborg y cols., 2011). Lo mismo ocurre tras un tratamiento similar durante 7 días de ratonas obesas (Lep(ob)/Lep(ob) que causa un aumento de la captación de glucosa en preparaciones de músculo sóleo aislado (Liu y cols., 2005). Sin embargo, este incremento no se acompaña de modificaciones en los factores de señalización insulínica, así como el tratamiento agudo (2h) *in vivo* con el mismo antagonista no es capaz de mejorar en el músculo sóleo el transporte estimulado de glucosa por insulina (Lindborg y cols., 2011).

A pesar de que los estudios *in vitro* no han revelado efecto alguno del agonismo/antagonismo de CB₂ (Esposito y cols., 2008; Lipina y cols., 2010), ni del antagonismo del receptor de vanilloide tipo 1 (TRPV1) (Esposito y cols., 2008) sobre la señalización de insulina en el músculo esquelético, un estudio realizado *in vivo* en ratones que carecen de CB₂ (CB₂^{-/-}) sugiere que este receptor podría estar implicado en la alteración de la captación de glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético (Agudo y cols., 2010).

El sistema endocannabinoide y las vías oxidativas en el músculo esquelético

Varios grupos de investigación han sugerido la existencia de un importante efecto del SEC sobre las vías oxidativas musculares. De tal modo, en cultivos primarios de miotubos humanos, el antagonista AM251 específico de CB₁ (0,2–5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ durante 24 h) aumenta el ARNm codificante para la proteína quinasa 1 activada por AMP (AMPK α 1) (Cavuto y cols., 2007), la cual es una reguladora al alza de la oxidación de glucosa y ácidos grasos así como de la biogénesis mitocondrial (Hardie, 2011). De especial interés es la observación de que estos efectos son revertidos por la incubación concomitante con anandamida, lo que sugiere que el receptor CB₁ está implicado (Cavuto y cols., 2007). En respuesta al antagonista de CB₁, la expresión del ARNm codificante para la piruvato deshidrogenasa quinasa-4 (PDK4) desciende en esa misma preparación de miotubos (Cavuto y cols., 2007). Como PDK4 inhibe el complejo piruvato deshidrogenasa, el descenso de la expresión de PDK4 conlleva un descenso de la inhibición del flujo de glucosa hacia el interior de la mitocondria, por lo que se facilita el aumento de la oxidación de glucosa en los miotubos (Rowles y cols., 1996). El efecto negativo observado *in vitro* de la señalización de CB₁ sobre las vías oxidativas del músculo, podría explicar el motivo por el que la administración aguda o crónica de antagonistas/agonistas inversos de CB₁ en ratones genéticamente obesos (Liu y cols., 2005), en ratas alimentadas con golosinas (Herling y cols., 2008), en ratas o ratones sanos (Kunz y cols., 2008) o en humanos obesos (Addy y cols., 2008) induce un incremento del consumo corporal de oxígeno no debido a un aumento de la actividad física (Liu y cols., 2005; Addy y cols., 2008; Herling y cols., 2008; Kunz y cols., 2008), así como de la oxidación de ácidos grasos (Addy C, 2008; Herling AW, 2008).

En definitiva, estos datos indican un claro efecto negativo de la señalización de CB₁ sobre genes que regulan la oxidación y la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético. Como el tejido muscular es responsable de la mayor parte (>80%) de la disponibilidad de glucosa estimulada por insulina del organismo, a la vez que juega un papel destacado en la patogenia de la resistencia a la insulina

(Phielix y cols., 2008; Abdul-Ghani y DeFronzo, 2010), la disfunción del sistema endocannabinoide en el músculo esquelético supone un importante foco de interés de la investigación actual de cara a entender mejor la etiología de los desórdenes metabólicos. En el caso de la obesidad, una hiperactividad del sistema endocannabinoide ya ha sido descrita en otros tejidos metabólicamente activos, tales como el tejido adiposo visceral (Matias y cols., 2006) o el hígado (Osei-Hyiaman y cols., 2005).

El sistema endocannabinoide y músculo esquelético en obesidad y diabetes

A pesar de que existe cierta discrepancia en la literatura sobre si la expresión de CB₁ está alterada en el músculo esquelético en obesidad y diabetes tipo 2, parece ser que el aumento de los niveles de eCBs es un fenómeno común en ambas patologías. Pagotto y cols. (2006) observaron un incremento de la expresión de ARNm codificante para CB₁ en músculo de ratones sometidos durante 2 meses a dieta rica en grasa, mientras que Crespillo y cols. (2010) detectaron una tendencia hacia el descenso de la expresión de CB₁ y un descenso significativo del ARNm para CB₂ en músculo de pared abdominal de ratas obesas sometidas a dieta rica en grasa durante 10 semanas. A su vez, Lindborg y cols. (2010) detectaron un descenso del 40% en la expresión proteica de CB₁ en el músculo sóleo de ratas obesas Zucker resistentes a la insulina en comparación con animales delgados. En miotubos de músculo esquelético humano procedentes de individuos obesos y delgados, Cavuoto y cols. (2007) no observaron ninguna variación en la expresión del ARNm para CB₁. Algunos factores podrían explicar la aparente discrepancia de estos resultados, como por ejemplo el tipo de músculo esquelético (locomotor o no) y las especies estudiadas, las diferencias entre *in vitro* (Cavuoto y cols., 2007) e *in vivo* (Pagotto y cols., 2006; Lindborg y cols., 2010), o las posibles diferencias en la expresión proteica de CB₁ debidas a una modificación post-traslacional (Lindborg y cols., 2010) sin efecto (Cavuoto y cols., 2007) o con efectos opuestos (Pagotto y cols., 2006) sobre la expresión del ARNm. Incluso si CB₁ no se sobreexpresa en la obesidad o en la diabetes por resistencia a la insulina, la

señalización de CB₁ podría encontrarse activada en exceso debido a un aumento de los niveles de eCBs circulantes o en músculo (Cote y cols., 2007). Matias y cols. (2008) demostraron que los niveles de 2-AG se elevan en el sóleo tras 3 semanas de dieta rica en grasa, cuando todavía los ratones no son ni obesos ni hiperglucémicos, aunque este efecto no se mantiene tras 8 semanas sometidos a dieta enriquecida. Más tarde, después de 14 semanas con dieta grasa cuando ya los ratones son claramente obesos e hiperglucémicos, se detecta de nuevo un aumento de 2-AG.

Estos resultados sugieren que la obesidad, sola o combinada con hiperglucemia, podría incrementar de forma transitoria o a largo plazo los niveles de 2-AG en el músculo esquelético. Este aumento presumiblemente refleja una tasa de producción aumentada, pues la enzima responsable de la degradación de 2-AG aparece regulada al alza en el músculo de la pared abdominal de ratas alimentadas durante 10 semanas con dieta rica en grasa (Crespillo y cols., 2010). Por el contrario, no cambian los niveles de anandamida en el músculo esquelético en esas mismas condiciones de dieta grasa (Matias y cols., 2008). Sin embargo, otras evidencias indican que anandamida, pero no 2-AG, aumenta en el músculo sóleo de ratas Zucker, debido posiblemente a un aumento en la expresión de las enzimas de biosíntesis de anandamida. Por lo tanto, la alteración en obesidad del tipo de endocannabinoide en el músculo esquelético, probablemente refleje que los dos principales eCBs tienen diferentes vías metabólicas, así como también roles específicos diferenciados. De hecho, AEA y 2-AG no comparten las vías de biosíntesis e inactivación, ni las enzimas, como ya hemos descrito en secciones anteriores (para la biosíntesis de AEA: N-araquinodil fosfatidiletanolamida fosfolipasa D -NAPE-PLD-, glicerofosfodiesterasa 1 y a,b hidrolasa-4; para la biosíntesis de 2-AG: diacilglicerol lipasas- α y β ; inactivación de AEA: sobre todo amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH); inactivación de 2-AG: sobre todo por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Petrosino y cols., 2009). Además, la existencia de diferencias en la disponibilidad de reservorios de precursores de ácidos grasos puede afectar de modo diferencial los niveles de N-aciletanolamidas y monoacilgliceroles, como son AEA y 2-AG, respectivamente (Phinney, 1996). Respecto a las funciones específicas de los eCBS, la AEA es un agonista parcial de CB₁ y asimismo interacciona con receptores no-cannabinoideos, como el TRPV1

(Zygmunt y cols., 1999; Ross, 2003) y, a altas concentraciones micromolares, con los receptores PPAR (“peroxisome proliferator-activated receptor”) como son los PPAR- γ (Bouaboula y cols., 2005) y PPAR- α (O’Sullivan, 2007; Sun y cols., 2007). Por el contrario, 2-AG es un agonista completo de CB₁ y CB₂, no presentando apenas actividad sobre el receptor TRPV1 (Mackie, 2006; Sugiura y cols., 2006). Hay que tener en cuenta esta diferencia entre AEA y 2-AG, ya que la activación de PPAR- α o PPAR- γ por un ligando endógeno o farmacológico, suprime el apetito y estimula la lipólisis, o mejora la sensibilidad a la insulina, respectivamente (O’Sullivan, 2007). En concreto, la activación farmacológica de PPAR- γ en músculo esquelético oxidativo reduce la acumulación de diacilglicerol y la saturación de ácidos grasos en ratas sometidas a dieta grasa, por lo que mejora la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético (Chabowski y cols., 2012). Por otra parte, todavía hoy hay poca información sobre el efecto de los eCBs en los PPAR δ (también denominados PPAR β), los cuales han sido propuestos como importantes reguladores de la función metabólica (O’Sullivan y cols., 2007), siendo además la isoforma predominante de PPAR en roedores y en el músculo esquelético, donde aumenta su expresión tras el entrenamiento físico (Grimaldi, 2007; Ehrenborg y Krook, 2009). La activación de PPAR δ en el músculo interacciona con el sensor de energía AMPK (“AMP-activated protein kinase”) aumentando la expresión de genes implicados en la oxidación lipídica y en la expresión de PGC1 α (“peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1”), favoreciendo así la vías musculares oxidativas y el catabolismo de los ácidos grasos (Ehrenborg y Krook, 2009; Lendoye y cols., 2011). Es de reseñar que la activación de PPAR δ es capaz de reducir el ARNm para CB₁ en adipocitos y así contrarrestar su diferenciación y la lipogénesis *de novo* (Yan y cols., 2007).

Se ha sugerido la existencia de roles específicos para la AEA y 2-AG al examinar los niveles plasmáticos de ambos endocannabinoides que reflejan, en gran medida, la difusión (“spill over”) de los eCBs desde órganos periféricos. En sujetos obesos, las concentraciones plasmáticas de 2-AG, pero no de AEA, se correlacionan positivamente con la masa de tejido adiposo visceral, la apolipoproteína B, los triglicéridos circulantes y los niveles de insulina tras el ayuno, y se correlacionan inversamente con los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la sensibilidad a la insulina (Blüher y cols., 2006; Cote y cols.,

2007; Di Marzo y cols., 2009a,b). Por lo tanto, basado en estas diferencias entre 2-AG y AEA es plausible plantear la hipótesis de que concentraciones elevadas de 2-AG en el músculo esquelético, altera la sensibilidad a la insulina y el sustrato de oxidación a través de una activación específica y potente de los receptores CB₁, mientras que la AEA puede tener efectos beneficiosos en el metabolismo actuando sobre los receptores PPAR.

La estimulación crónica (4 semanas) de CB₁ por el agonista específico ACEA descende el contenido de mitocondrias y la respiración mitocondrial en ratones obesos inducidos por la dieta, no dándose estos cambios en ratones delgados sometidos a dieta normal (Tedesco y cols., 2010). Sin embargo, el tratamiento con una única dosis relativamente elevada de AEA durante 24 h aumenta la expresión de PGC1- α (un regulador fundamental de la biogénesis mitocondrial muscular) en células musculares humanas de sujetos delgados (Cavuoto y cols., 2007). Como ya hemos dicho, otra diana de AEA puede ser el receptor TRPV1, que no es activado por 2-AG, y que recientemente se ha demostrado que estimula la expresión de PGC1- α , la biogénesis mitocondrial en células musculares en cultivo y en músculo *in vivo*, por lo tanto, incrementando la resistencia durante el ejercicio (Luo y cols., 2012). El posible impacto positivo de la AEA sobre la captación de glucosa y la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético es de especial relevancia, pues el ejercicio físico, una condición fisiológica que requiere una importante movilización energética, tiene un importante efecto específico sobre la anandamida.

Ejercicio físico agudo y el sistema endocannabinoide

Diversos estudios en humanos han sido publicados en relación con el efecto del ejercicio agudo sobre el sistema endocannabinoide. Todos apuntan a que tiene lugar un aumento significativo de AEA en plasma, mientras que 2-AG permanece estable (Sparling y cols., 2003; Feurecker y cols., 2012; Heyman y cols., 2012; Raichlen y cols., 2012). Además, también aparecen aumentados dos lípidos de la familia de la AEA, en concreto la N-oleiletanolamida (OEA) y la N-

palmitoiletanolamida (PEA) que tienen actividad sobre los receptores PPAR (Heyman y cols., 2012).

Los niveles plasmáticos de AEA se duplican en individuos entrenados tras realizar 45 min de ejercicio moderado, sin sufrir modificación los niveles de 2-AG (Sparling y cols., 2003; Dietrich y cols., 2004). Lo mismo ocurre tras un ejercicio moderado pero más prolongado consistente en hacer senderismo en un ambiente normoxémico (4-4,5h). Sin embargo, el mismo ejercicio en un ambiente hipoxémico (3,5-5,5 h) provoca que los niveles plasmáticos de AEA aumenten tres veces. En todos los casos, los niveles de 2-AG no se ven modificados (Feuerecker y cols., 2012).

También se han desarrollado protocolos para determinar los efectos de la intensidad del ejercicio y la recuperación tras el mismo, sobre los niveles plasmáticos de eCBS en ciclistas bien entrenados. En estas pruebas, los sujetos realizan un ejercicio continuado de intensidad moderada durante 1 hora seguido de un ejercicio muy intenso y extenuante durante 30 minutos (Heyman y cols., 2012). En estas condiciones, los niveles de AEA se duplican respecto a los niveles basales tras el episodio de ejercicio intenso, y todavía aumentan más después de 15 minutos de recuperación tras el ejercicio realizado (~2,5 veces), mientras que 2-AG no cambia (Heyman y cols., 2012). Las concentraciones plasmáticas de OEA y PEA aumentan inmediatamente tras la fase de ejercicio moderado y continúan aumentando después de la fase de ejercicio intenso y tras los 15 minutos de recuperación (Heyman y cols., 2012). Finalmente, experimentos llevados a cabo en animales indican que los humanos y los perros comparten un incremento significativo de AEA en plasma (~2,5 veces), pero no de 2-AG, tras 30 minutos de carrera intensa, no observándose tal aumento después de 30 minutos de marcha suave (Raichlen y cols., 2012). Llama la atención que la señalización endocannabinoide no aumenta significativamente en hurones tras el ejercicio ni por la intensidad del mismo (Raichlen y cols., 2012).

La elevación de los niveles plasmáticos de AEA en humanos tras el ejercicio se correlaciona con efectos positivos y de recompensa. De hecho, este aumento de AEA también se ha detectado en el sistema nervioso central de la rata. Después de 8 días de acceso libre a ruedas de correr, el contenido total de AEA se ve

aumentado en el hipocampo, sin sufrir cambios la FAAH, lo que refleja un aumento potencial de la biosíntesis de la AEA (Hill y cols., 2010). Por el contrario, los niveles de 2-AG en el hipocampo no sufren cambios significativos tras el ejercicio, al igual que ocurre en plasma (Hill y cols., 2010). Sin embargo, también existen evidencias en rata de que un ejercicio aeróbico exhaustivo y un ejercicio de resistencia se acompañan de una elevación significativa de los niveles plasmáticos de AEA, OEA y PEA, pero también de 2-AG, y este efecto resulta en una antinocepción mecánica y térmica mediada por CB₁ y CB₂ (Heyman y cols., 2012).

Mecanismos implicados en la activación del sistema endocannabinoide inducida por el ejercicio

Como ya hemos dicho, AEA, OEA y PEA son N-aciletanolamidas sintetizadas a través de la hidrólisis de las correspondientes N-acilfosfatidiletanolamidas, las cuales a su vez, se forman a partir de la N-acilación de fosfatidiletanolamida con ácido araquidónico, ácido oleico o ácido palmítico, respectivamente. Su degradación es por FAAH, aunque también se han identificado y clonado hidrolasas más específicas para OEA (FAAH-2) y PEA (amidasa ácida hidrolizante de N-aciletanolamida) (Petrosino y cols., 2009). Por el contrario, la biosíntesis de 2-AG depende de otros precursores (diacilglicerol) y enzimas (diacilglicerol lipasas- α y β), siendo degradado sobre todo por MAGL y α,β -hidrolasa 6 (Petrosino y cols., 2009; Di Marzo, 2008). Por lo tanto, no es de sorprender que las concentraciones plasmáticas de AEA, OEA y PEA, al compartir rutas metabólicas similares, presenten cambios parecidos tras un ejercicio agudo (Heyman y cols., 2012), mientras que los cambios de 2-AG sean diferentes.

La señalización endocannabinoide se pone en marcha ante situaciones de estrés y de hormonas circulantes, en particular cortisol (Hill y cols., 2010a). Hill y cols. (2010b) demostraron que la administración sistémica del glucocorticoide corticosterona resulta en un incremento del contenido de AEA en varias estructuras cerebrales de la rata (amígdala, hipocampo e hipotálamo), mientras que 2-AG sólo se ve aumentado en el hipotálamo. La rapidez del incremento de AEA (a los 10 min) tras la administración de corticosterona sugiere que los

glucocorticoides actúan por medio de una vía no-genómica (Hill y cols., 2010b), compatible con la adaptación aguda a la condición de estrés fisiológico como es el ejercicio físico intenso. En base a esta correlación positiva entre el cortisol sérico y los niveles plasmáticos de AEA durante el ejercicio y la recuperación en individuos sanos (Heyman y cols., 2012), es posible pensar que el incremento periférico de AEA podría deberse al cambio en el cortisol circulante inducido por el ejercicio.

Localización del sistema endocannabinoide en el músculo esquelético

La expresión del receptor CB₁ ha sido descrita por RT-PCR en muestras de tejido muscular humano y de roedor (Cavuto y cols., 2007). El tamaño de los productos de DNA es de 66 pares de bases en humano y de 68 en roedor, como era de esperar. En concreto, se observó la expresión de CB₁ en miotubos primarios de músculo esquelético, músculo recto del abdomen, tejido adiposo intra-abdominal y tejido adiposo subcutáneo. También CB₁ se expresa en cultivos de células musculares de rata (Lipina y cols., 2010). Asimismo, el DNA para CB₂ se expresa en músculo esquelético y tejido adiposo intra-abdominal humano (141 bp) y de roedor (369 bp) (Cavuto y cols., 2007). Finalmente, con esta técnica de RT-PCR, los mismos autores detectaron la presencia de FAAH en las muestras de miotubos primarios de músculo esquelético, músculo recto del abdomen, tejido adiposo intra-abdominal y tejido adiposo subcutáneo de humano (111 bp) y de roedor (87 bp), así como también TRPV1 en las mismas muestras de humano (112 bp) y de roedor (228 bp) (Cavuto y cols., 2007). TRPV1 está presente en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético de roedor, desde donde posiblemente sea responsable de la liberación de calcio en el interior de la célula (Xin y cols., 2005). Como TRPV1 y FAAH se expresan en el músculo esquelético de humano y roedor, la vía que une ambos podría estar también implicada en la regulación del metabolismo de los endocannabinoides en el músculo.

Sistema endocannabinoide y mitocondria

Como ya hemos dicho, los receptores de cannabinoides CB₁ se localizan en diferentes tipos celulares, y a nivel subcelular, se encuentran en las membranas plasmáticas y en compartimentos intracelulares (Rozenfeld y Devi, 2008; Benard y cols., 2012; Hebert-Chatelain y cols., 2014a). Sin embargo, todavía apenas se conoce las funciones que estos receptores controlan en estas localizaciones subcelulares. Nuestros resultados previos demostraron que los CB₁ están presentes y son funcionales en membranas de mitocondrias de células nerviosas (Benard y cols., 2012; Morozov y cols., 2013, 2014; Hebert-Chatelain y cols., 2014a,b; Piomelli, 2014 Vallee y cols., 2014). El hecho de que el cerebro que supone el 2% del peso corporal consuma el 20% del total de la energía del organismo, indica que los procesos bioenergéticos juegan un papel especial en este órgano, más allá de los procesos metabólicos establecidos (Mattson y cols., 2008; MacAskill y Kittler, 2010; Rangaraju y cols., 2014). Las mitocondrias, los principales orgánulos encargados del proceso de suministro de energía y su transformación en ATP, tiene un papel central en la modulación de la plasticidad sináptica y en los procesos fisiológicos y patológicos cerebrales asociados (Kann y Kovacs, 2007; Mattson y cols., 2008). Por medio del suministro local de ATP, tamponado de calcio intracelular y otros iones, modulación de la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS), metabolismo de la síntesis de esteroides, producción de varios neurotransmisores y otras muchas funciones celulares clave, las mitocondrias están directamente implicadas en la gran mayoría de las funciones cerebrales (MacAskill y Kittler, 2010; Mattson y cols., 2008; Rangaraju y cols., 2014). De tal modo, la disfunción mitocondrial contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y a déficits de memoria (Mattson y cols., 2008; Gibson y Shi, 2010; Papa y De Rasmio, 2013). Sin embargo, aun conociendo que la activación por cannabinoides del CB₁ en mitocondrias desciende la respiración mitocondrial, lo que conlleva a una disminución de la producción de ATP en las células nerviosas (Benard et al., 2012; Hebert-Chatelain et al., 2014a; Vallee et al., 2014), el impacto de estos procesos en los efectos centrales de los cannabinoides permanece todavía desconocido. A nivel muscular, la presencia y el papel funcional de CB₁ en mitocondrias es por el momento una incógnita.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hemos descubierto recientemente que el receptor de cannabinoides CB₁ está presente en la mitocondria de las neuronas del sistema nervioso central (Bénard y cols., 2012; Hebert-Chatelain y cols., 2014a,b). El cerebro de los mamíferos es uno de los órganos con mayor demanda energética y las mitocondrias son las determinantes clave de sus funciones. Lo que observamos en esos trabajos fue que CB₁ está en las membranas de mitocondrias neuronales desde donde controla directamente la respiración celular y la producción de energía. Por medio de la activación de estos receptores CB₁, los cannabinoides exógenos y los producidos *in situ* endógenamente descienden la concentración de AMP cíclico, la actividad de la proteína quinasa A, la actividad enzimática del complejo I y la respiración de las mitocondrias neuronales (Bénard y cols., 2012). Además, estos receptores CB₁ intracelulares y los mecanismos mitocondriales contribuyen a una forma concreta de plasticidad sináptica en el hipocampo: la supresión de la inhibición inducida por despolarización dependiente de endocannabinoides (Bénard y cols., 2012). De tal forma, los CB₁ mitocondriales modulan directamente el metabolismo energético, desvelando así un nuevo mecanismo de acción de la señalización de un receptor unido a proteínas G en el cerebro.

Datos relativamente recientes han demostrado que la activación CB₁ de desciende la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético (así como en el hígado y en el tejido adiposo blanco), lo que sugiere que el sistema endocannabinoide regula no sólo la actividad mitocondrial, sino que también sus niveles de presencia (Tedesco y cols., 2010). Las implicaciones que estas observaciones tienen en el papel de los endocannabinoides en el desarrollo de la diabetes son significativas, ya que una defectuosa fosforilación oxidativa en la mitocondria del músculo esquelético se asocia con una resistencia a la insulina (Abdul-Ghani y DeFronzo, 2010).

En este contexto, nuestra hipótesis se fundamenta en que por la inequívoca presencia de CB₁ en las membranas mitocondriales del hipocampo cerebral, donde ejerce una función fundamental en la regulación del metabolismo bioenergético, y

a la vista de su implicación funcional en el músculo esquelético, este receptor cannabinoide debe de estar localizado en las mitocondrias musculares del mismo modo y manera que lo está en las mitocondrias de las neuronas cerebrales.

OBJETIVOS

En base a la hipótesis planteada de acuerdo con los antecedentes sobre la cuestión de esta Tesis Doctoral, los objetivos propuestos son:

1. Estudiar a nivel subcelular la localización del receptor CB₁ en las mitocondrias de diferentes músculos esqueléticos del ratón.
2. Investigar el efecto de la falta del receptor CB₁ sobre el contenido mitocondrial en los músculos esqueléticos sometidos a estudio.
3. Identificar con precisión la presencia de las dos enzimas de síntesis DAGL- α y NAPE-PLD de los endocannabinoides principales 2-AG y anandamida, respectivamente, en mitocondrias musculares.

MATERIAL Y METODOS

PLAN DE TRABAJO

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos, hemos utilizado anticuerpos específicos en combinación con una técnica inmunocitoquímica preinclusión de inmuno-oro intensificado con plata para microscopía electrónica. Además, hemos llevado a cabo controles de especificidad de los anticuerpos mediante técnicas inmunocitoquímicas y realizado la cuantificación y los correspondientes análisis estadísticos de los datos obtenidos en los experimentos de microscopía electrónica.

ANTICUERPOS

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

Anticuerpos primarios:

- **CB₁** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal, producido en cabra, que reconoce 31 aminoácidos del extremo C-terminal (NM007726) del receptor CB₁ de ratón.
- **NAPE-PLD** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal, producido en cobaya, que reconoce los aminoácidos 1-41 del extremo N-terminal (AB112350) de la NAPE-PLD de ratón.
- **DAGL- α** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal, producido en conejo, que reconoce 42 aminoácidos del extremo C-terminal (NM198114) de la DAGL- α de ratón.

Anticuerpo	Casa comercial y código	Especie	Concentración
CB ₁	Frontier Science Cat. No. CB1-Go-Af450-2	Cabra	2 µg/ml
NAPE-PLD	Frontier Science Cat. No. NAPE-PLD-GP-Af720-1	Cobaya	4 µg/ml
DAGL-α	Frontier Science Cat. No. DGLa-Rb-Af380-1	Conejo	2 µg/ml

Tabla . Resumen de los anticuerpos primarios utilizados.

Caracterización de los anticuerpos primarios:

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

La especificidad de los anticuerpos empleados frente a CB₁ fue analizada en tejido de ratones knock-out para CB₁ (CB₁-KO). En el caso de los demás anticuerpos empleados en este trabajo de Tesis Doctoral, también dispusimos de tejido *knock-out* para NAPE-PLD y DAGL-α. La utilización de este material es preceptiva, obligada y necesaria al suponer la garantía de especificidad de los anticuerpos empleados.

- **CB₁** (Frontier Science co. Ltd.): El inmunoblot reconoce una única banda proteica de 52kDa y marca de forma selectiva terminales y preterminales nerviosas de neuronas excitadoras e inhibitoras (Hoja de datos del anticuerpo, Frontier Science). Referencias: Yoshida y cols., 2006; Uchigashima y cols., 2007; Puente y cols., 2010.
- **NAPE-PLD** (Frontier Science co. Ltd.): El inmunoblot detecta una banda proteica de unos 45kDa y se observa mediante inmunohistoquímica un marcado selectivo en el cerebro de ratones silvestres, que no aparece en el cerebro de ratones *NAPE-PLD-KO* (Hoja de datos del anticuerpo, Frontier Science). Referencias: Nyilas y cols., 2008; Puente y cols., 2011.

La especificidad de la inmunotinción observada con el anticuerpo frente a NAPE-PLD fue evaluada en tejido nervioso utilizando hipocampo de ratón normal como control positivo, e hipocampo de ratón NAPE-PLD knockout, es decir, que carece de esta proteína. El tejido *NAPE-PLD-KO* lo obtuvimos del Dr. Juan Suárez (Laboratorio de Medicina Regenerativa, IBIMA-Hospital Carlos Haya, Málaga, Spain) que amablemente nos dio unas secciones de hipocampo. La producción de los ratones *NAPE-PLD-KO* fue de la siguiente manera (Leung y cols., 2006): el constructo con el gen alterado se obtuvo usando fragmentos homólogos recombinantes 5' y 3' amplificados por PCR situados alrededor del exón 4 del gen de NAPE-PLD. Después se generaron ratones quiméricos con base C57BL/6. Estos ratones fueron segunda o tercera generación de crías cruzadas de ratones 129SvJ-C57BL/6 PLD+/- (Leung y cols., 2006).

- **DAGL- α** (Frontier Science co. Ltd.): El inmunoblot reconoce una banda de 105 o 120kDa en hipocampo y cerebelo respectivamente (Yoshida y cols., 2006). Otras referencias: Uchigashima y cols., 2007; Puente y cols., 2011. La especificidad de este anticuerpo ha sido testada en varios trabajos previos, uno de ellos hecho en nuestro laboratorio (Yoshida y cols., 2006; Uchigashima y cols., 2007; Puente y cols., 2011). Asimismo, la especificidad de este anticuerpo frente a DAGL- α ha sido comprobada muy recientemente por nuestro equipo en hipotálamo de ratón carente de DAGL- α (Reguero y cols., 2013). Este tejido nos fue cedido amablemente por el Dr. Masahiko Watanabe (Department of Anatomy, Hokkaido University School of Medicine Sapporo, Japón). Estos ratones *DAGL- α -KO* se obtuvieron a partir de una cepa de C57BL/6N generada por la alteración de los exones 3 y 4 del gen de la DAGL- α (Tanimura y cols., 2010).

Anticuerpos secundarios:

- **Nanogold anti-cabra** (Nanoprobes, Inc.): Corresponde a la fracción Fab' de una IgG producida en conejo frente a cabra, marcada con una partícula de oro de 1,4nm de diámetro.

- **Nanogold anti-conejo** (Nanoprobes, Inc.): Corresponde a la fracción Fab' de una IgG producida en cabra frente a conejo, marcada con una partícula de oro de 1,4nm de diámetro.
- **Nanogold anti-cobaya** (Nanoprobes, Inc.): Corresponde a la fracción Fab' de una IgG producida en cabra frente a cobaya, marcada con una partícula de oro de 1,4nm de diámetro.

Anticuerpo	Casa comercial y código	Especie	Concentración
Nanogold anti-cabra	Nanoprobes Cat. No. 2006	Conejo	1:100
Nanogold anti-conejo	Nanoprobes Cat. No. 2004	Cabra	1:100
Nanogold anti-cobaya	Nanoprobes Cat. No. 2055	Cabra	1:100

Tabla . Resumen de los anticuerpos secundarios utilizados.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los procedimientos experimentales realizados en este estudio se han regido según la Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de Julio de 2003 y el Real Decreto español 1201/2005, de 10 de Octubre (BOE 21 de Octubre de 2005) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos; la Ley 32/2007, de 7 de Noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE 8 de Noviembre de 2007), el R.D. 53/2013 y la Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea 2010/63/UE de 22 de Septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

El protocolo para el uso y cuidado de los animales de experimentación ha sido aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (CEBA/93/2010/GRANDESMORENO). Además, se ha realizado un gran esfuerzo para minimizar el número de animales utilizados así como evitar su sufrimiento.

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

- **CB₁-WT**: Ratones hembra C57BL/6N de 3-5 meses de edad silvestres o también denominados *CB₁-wild-type* y presentan una distribución normal del receptor CB₁.
- **CB₁-KO**: Ratones machos y hembras *CB₁-knock-out* (3-5 meses de edad) que carecen del receptor CB₁. Estos ratones fueron suministrados por el Dr. Giovanni Marsicano (Neurocentre Magendie, INSERM U862, Burdeos, Francia), en el marco de la colaboración establecida con su laboratorio. En general, para los diferentes estudios hemos utilizado al menos 3 animales de cada condición experimental.

Todos los animales fueron mantenidos *ad libitum* en condiciones estándar (ciclos de 12h de luz/oscuridad) con agua y comida habitual para ratón (Global Diet 2014S, Harlan).

Generación de los ratones CB₁-KO

La generación, genotipado y caracterización comportamental de los ratones *CB₁-KO* ha sido descrita previamente por Giovanni Marsicano (Marsicano y cols., 2002, información suplementaria).

En resumen, se generó un constructo que contenía el gen CB₁ flanqueado por dos sitios *loxP* y se electroporó a células madre embrionarias de ratón E14 (día embrionario 14) para obtener así el alelo *floxed-neo*. Los ratones que portaban este alelo *floxed-neo* (CB₁^{f/f}) fueron cruzados con ratones transgénicos que expresaban la recombinasa Cre de forma ubicua. A continuación, se cruzaron los ratones que portaban una delección transmisible de línea germinal de CB₁ durante 5

generaciones con ratones C57BL/6N (Charles River) y se obtuvieron ratones homocigotos deficientes de CB1 (denominados $CB1^{-/-}$ o $CB1$ -KO) y sus correspondientes ratones *wild-type* o silvestres (denominados $CB1^{+/+}$ o $CB1$ -WT).

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA INMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

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

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

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



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

PROCESADO DEL TEJIDO

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

Perfusión transcardíaca de los animales

1. Los ratones fueron anestesiados en el periodo comprendido entre las 10 h y 12 h de la mañana. La anestesia fue con ketamina/xilacina (80/10 mg/kg) por vía intraperitoneal.
2. Perfusión transcardíaca con tampón fosfato salino (TFS 1X, pH 7,4) durante 20 segundos (s), seguido por 250 ml de una solución fijadora compuesta por paraformaldehído 4%, ácido pícrico saturado 0,2% y glutaraldehído 0,1% en tampón fosfato (TF) 0,1M (pH 7,4) durante 10-15 minutos (min), estando todas las soluciones a temperatura ambiente (20-25°C).
3. Disección de los músculos e inmersión en fijador puro durante 1 semana a 4°C.
4. Conservación en fijador diluido 1:10 y ácida sódica 0,025% a 4°C, hasta su utilización.

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

1. Cortes en vibrotomo, secciones de 50µm recogidas en TF 0,1M.
2. Bloqueo de uniones inespecíficas durante 30 min a temperatura ambiente con la solución de bloqueo compuesta por TBS 1X, BSA 10%, azida sódica 0,1% y saponina 0,02%.
3. Incubación con el anticuerpo primario correspondiente: CB1 (2µg/ml, Frontier Science), NAPE-PLD (4µg/ml), DAGL-α (2µg/ml) en la misma solución del bloqueo pero con saponina 0,004% durante 2 días a 4°C y agitación constante.
4. Lavados en TBS 1X y BSA 1% durante 30 min.
5. Incubación con el correspondiente anticuerpo secundario nanogold (1:100) en TBS 1X, BSA 1% y saponina 0,004% durante 3 h a temperatura ambiente.
6. Lavados en TBS 1X y BSA 1% durante 24 h a 4°C y agitación constante.
7. Postfijación en glutaraldehído al 1% en TBS 1X durante 10 min.
8. Lavados en agua bidestilada durante 30 min.
9. Intensificación de las partículas de oro, utilizando el intensificador comercial HQ Silver kit (Nanoprobes), durante 12 min en oscuridad.
10. Lavados en agua bidestilada durante 30 min.
11. Lavados en TF 0,1M durante 30 min.
12. Osmificación con tetróxido de osmio al 1% en TF 0,1M durante 20 min.
13. Lavados en TF 0,1M durante 30 min.
14. Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96° y 100°) durante 5 min cada uno y 3 pasos de 5 min para el de 100°.
15. Aclarado en óxido de propileno en tres pasos de 5 min cada uno.
16. Inclusión en resina Epon 812 y óxido de propileno 1:1 durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación suave.
17. Inclusión en resina Epon 812.
18. Polimerización de la resina en una estufa a 60°C durante 2 días.
19. Obtención de secciones semifinas de 1µm en el ultramicrotomo.
20. Obtención de secciones ultrafinas de 80nm en el ultramicrotomo, recogidas en

rejillas de níquel.

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

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

Método de la avidina-biotina peroxidasa para microscopía de luz: control de especificidad del anticuerpo frente a NAPE-PLD

1. Cortes en criotomo, secciones cerebrales coronales de 30µm recogidas en TF 0,1M.

2. Bloqueo de uniones inespecíficas durante 30 min a temperatura ambiente con la solución de bloqueo compuesta por tampón tris-HCl salino (TBS 1X), albúmina de suero bovino (BSA) 10%, azida sódica 0,1% y tritón X-100 0,5%.

3. Incubación con el anticuerpo primario frente a NAPE-PLD (4µg/ml) en la misma solución del bloqueo durante 2 días a 4°C y agitación constante.

4. Lavados en TBS 1X, BSA 1% y tritón X-100 0,5% durante 30 min.

5. Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (1:200) en la solución de lavado durante 1 hora (h) a temperatura ambiente y agitación constante.

6. Lavados en TBS 1X, BSA 1% y tritón X-100 0,5% durante 30 min.

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

8. Lavados en TBS 1X, BSA 1% y tritón X-100 0,5% durante 30 min. Los últimos lavados en TF 0,1M y tritón X-100 0,5%.

9. Revelado con DAB al 0,05% en TF 0,1M y tritón X-100 0,5% y peróxido de hidrógeno al 0,01% durante 5 min a temperatura ambiente.

10. Lavados en TF 0,1M y tritón X-100 0,5% durante 30 min.

11. Montar las secciones sobre portaobjetos gelatinizados y dejar secar.

12. Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96°, 100°) durante 5 min cada uno.

13. Aclarado en xilol (3 veces de 5 min).

14. Cubrir los portaobjetos con el medio de montaje DPX.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, obtuvimos micrograffias con el microscopio electrónico (18.000-28.000X) a partir de las rejillas que portaban las secciones ultrafinas de 80nm. Es de destacar que todas las secciones mostraban una intensidad de marcado semejante, lo que indica que estaban cortadas a un mismo nivel de profundidad del tejido. Además, para evitar falsos negativos, sólo examinamos las secciones ultrafinas de las primeras 1,5 μ m desde la superficie del tejido.

En los estudios de localización subcelular de CB₁ y DAGL- α , consideramos marcado positivo la presencia de al menos 1 inmunopartícula situada en un rango extendido desde la inmediata proximidad a membrana hasta aproximadamente un máximo de 30nm alejada de la misma. Este mismo criterio fue aplicado en el estudio de distribución subcelular de la enzima NAPE-PLD. Estimamos la proporción de mitocondrias positivas normalizando el número de mitocondrias marcadas respecto del número total de mitocondrias observadas en las imágenes (Benard, 2012; Hebert-Chatelain, 2014). Analizamos los porcentajes de los perfiles positivos para cada proteína de estudio, presentando los datos como la media \pm SEM, utilizando un programa estadístico (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc, San Diego, USA) y estudiamos las diferencias entre los grupos mediante el test de chi-cuadrado. Utilizamos el mismo programa estadístico en la estimación de la densidad del inmunomarcado (inmunopartículas/ μ m membrana para CB₁ y DAGL- α e inmunopartículas/ μ m² para NAPE-PLD y DAGL- α) mostrada como la media \pm SEM. Finalmente, analizamos las diferencias entre los grupos, siempre que fue posible, mediante el test de Mann Whitney, $p < 0,05$, tras observar que no se cumplía el requisito de normalidad.

RESULTADOS

Localización subcelular del receptor CB₁ en músculo estriado

En primer lugar estudiamos la localización del receptor de cannabinoides CB₁ en los diferentes compartimentos subcelulares de las fibras musculares de determinados músculos esqueléticos estriados. Uno de los analizados fue el **músculo gastrocnemio** que está bien desarrollado en el roedor. Encontramos inmunopartículas que indican la presencia y distribución del receptor, a lo largo del sarcolema (o membrana plasmática) de las fibras musculares (Fig. 23). Apenas observamos alguna partícula de oro intensificada con plata en los límites del sarcómero, es decir, en la extensión de la fibra muscular que va desde una línea Z situada en la banda clara (banda I) a la siguiente línea Z (Fig. 23-A). Lo mismo ocurrió en el retículo sarcoplásmico. Sin embargo, la mayor acumulación de marcado se dio en las mitocondrias (Fig. 23-B). De hecho, cerca del 26% de ellas fueron CB₁ inmunopositivas con una disposición de las inmunopartículas orientadas hacia la superficie de la membrana externa. Es importante la desaparición casi completa del inmunomarcado con el anticuerpo frente a CB₁ en el músculo gastrocnemio de ratones que carecen del receptor CB₁ (CB₁-KO). En este caso, sólo apenas un 0,37% de mitocondrias presentan alguna partícula (Fig. 23-C), que por encontrarse en el músculo del ratón CB₁-KO son catalogadas como fondo (*background*) o marcado inespecífico.

MÚSCULO GASTROCNEMIO RATÓN (CB₁)

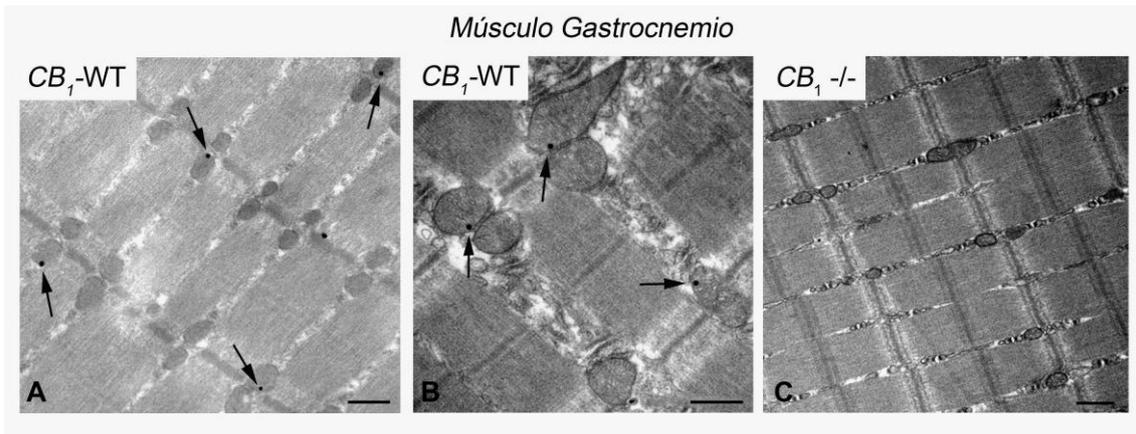


Figura 23. Localización ultraestructural de CB₁ en el músculo gastrocnemio del ratón silvestre (CB₁-WT) y en el ratón carente de CB₁ (CB₁-KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas de CB₁ (flechas) se localizan sobre todo en membranas mitocondriales (flechas en A, B), pero no así en las mitocondrias del ratón CB₁-KO (C), lo que indica la especificidad del anticuerpo empleado frente a CB₁. Barras de escala: 0,5µm.

Prácticamente el mismo patrón de distribución de CB₁ se repite en otros músculos estudiados. En el **músculo abdominal**, por ejemplo, el porcentaje de mitocondrias inmunopositivas fue discretamente menor (~21%), con un nivel de fondo que no alcanza el 1,5% de estos orgánulos con alguna partícula metálica (Fig. 24).

MÚSCULO ABDOMINAL RATÓN (CB₁)

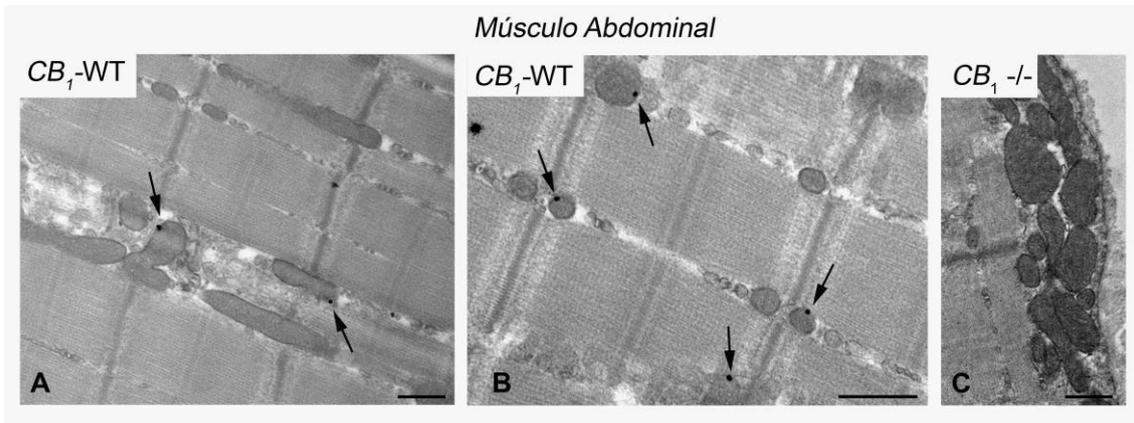


Figura 24. Localización ultraestructural de CB₁ en el músculo abdominal del ratón silvestre (CB₁-WT) y en el ratón carente de CB₁ (CB₁-KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas de CB₁ (flechas) se localizan sobre todo en membranas mitocondriales (flechas en A, B), pero no así en las mitocondrias del ratón CB₁-KO (C), lo que indica la especificidad del anticuerpo empleado frente a CB₁. Barras de escala: 0,5μm.

Por su parte, la inmunolocalización de CB₁ en el **músculo cardiaco** se comporta de forma similar a la observada en el gastrocnemio y en el músculo abdominal. De hecho, en este caso la presencia de CB₁ es sobre todo en mitocondrias (~17% del total de ellas; *background*: ~2,8% de mitocondrias con oro/plata) (Fig. 25).

CORAZÓN RATÓN (CB₁)

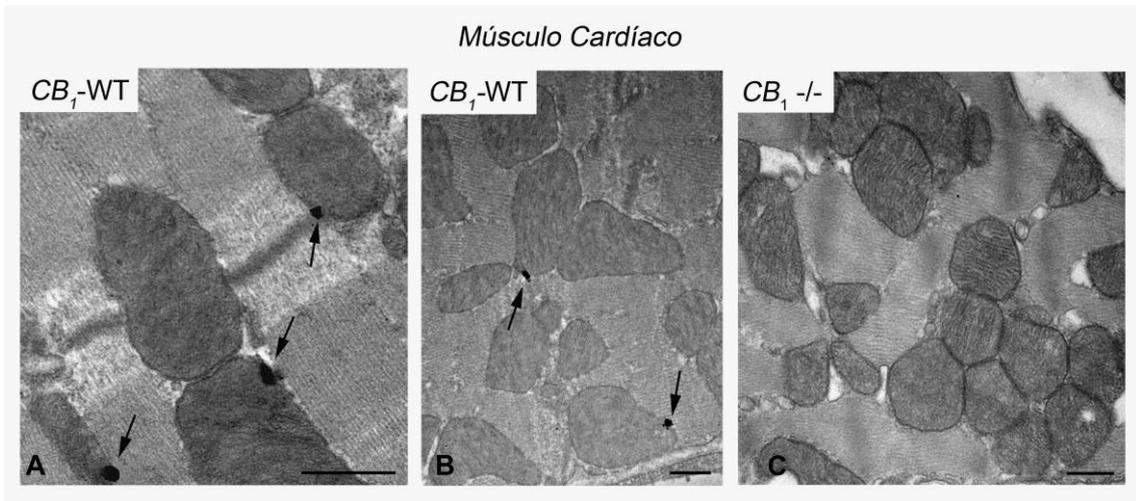


Figura 25. Localización ultraestructural de CB₁ en el músculo cardíaco del ratón silvestre (CB₁-WT) y en el ratón carente de CB₁ (CB₁-KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas de CB₁ (flechas) se localizan en membranas mitocondriales (flechas en A, B), pero no así en las mitocondrias del ratón CB₁-KO (C), lo que indica la especificidad del anticuerpo empleado frente a CB₁. Barras de escala: 0,5µm.

Es de resaltar un aspecto de vital importancia que debe tenerse siempre en cuenta: el patrón observado con el anticuerpo frente a CB₁, prácticamente desaparece por completo en los distintos músculos (gastrocnemio, abdominal y cardíaco) del ratón CB₁-KO analizados en paralelo con los mismos músculos de ratón silvestre (CB₁-WT) (Fig. 26). Además, la densidad de inmunomarcado de CB₁, esto es, el número de partículas por micra de membrana de mitocondria, resulta ser en el músculo gastrocnemio de aproximadamente 0,25, siendo este valor prácticamente nulo en el músculo de CB₁-KO (Fig. 27-28). Como consecuencia de todo ello, podemos concluir que el anticuerpo empleado frente a CB₁ es altamente específico.

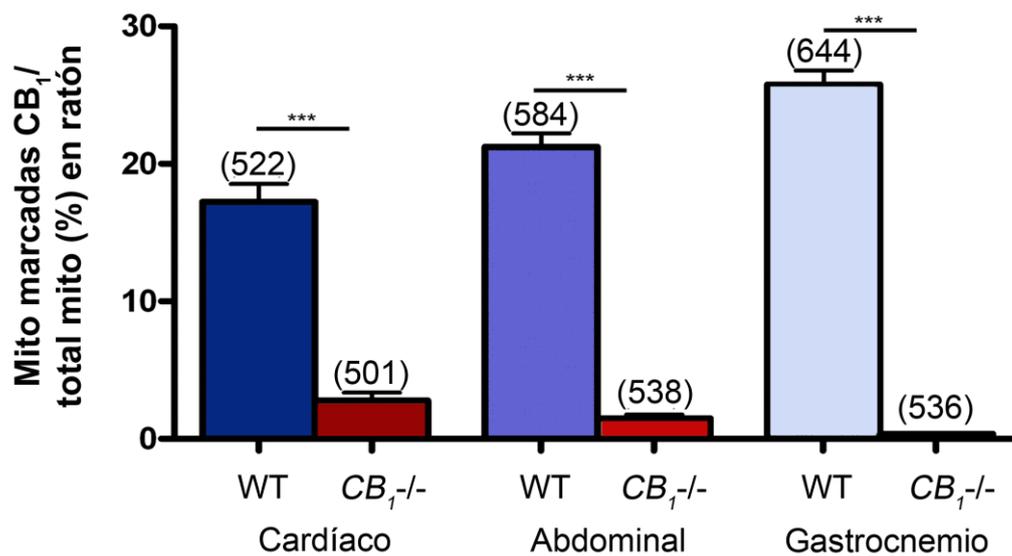


Figura 26. Proporción de mitocondrias CB₁ inmunopositivas en los tres músculos esqueléticos estudiados de ratón silvestre (CB₁-WT) y de ratón sin CB₁ (CB₁-KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Del total de mitocondrias analizadas en cada músculo (números entre paréntesis), el músculo **gastrocnemio** presenta el mayor porcentaje de mitocondrias marcadas (25,77% ± 1,0219), seguido del músculo **abdominal** (21,29% ± 0,9819) y finalmente el músculo **cardiaco** (17,24% ± 1,2932). Los valores son muy bajos en los correspondientes músculos abdominal (1,45% ± 0,2891) y cardiaco (2,79% ± 0,5715) y prácticamente nulos en el músculo gastrocnemio (0,37% ± 0,0404) de CB₁-KO, lo que manifiesta la especificidad del anticuerpo frente a CB₁ empleado en este estudio. La diferencia de mitocondrias marcadas en CB₁-WT respecto a CB₁-KO es estadísticamente muy significativa (***) P < 0.001).

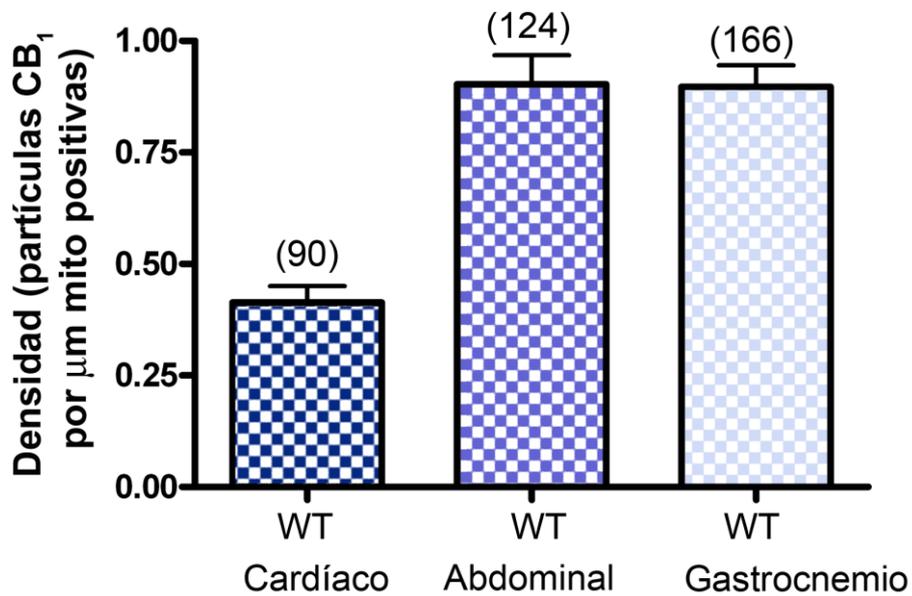


Figura 27. Densidad de inmunomarcado de CB₁ (inmunopartículas de CB₁ por micrómetro de mitocondria positiva) en las mitocondrias de los tres músculos esqueléticos estudiados de ratón silvestre (CB₁-WT). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Del total de mitocondrias analizadas en cada músculo (números entre paréntesis) de CB₁-WT, el músculo abdominal presenta la mayor densidad de marcado (0,9025 ± 0,6515), seguido del músculo gastrocnemio (0,8972 ± 0,0479) y finalmente el músculo cardíaco (0,4137 ± 0,0369).

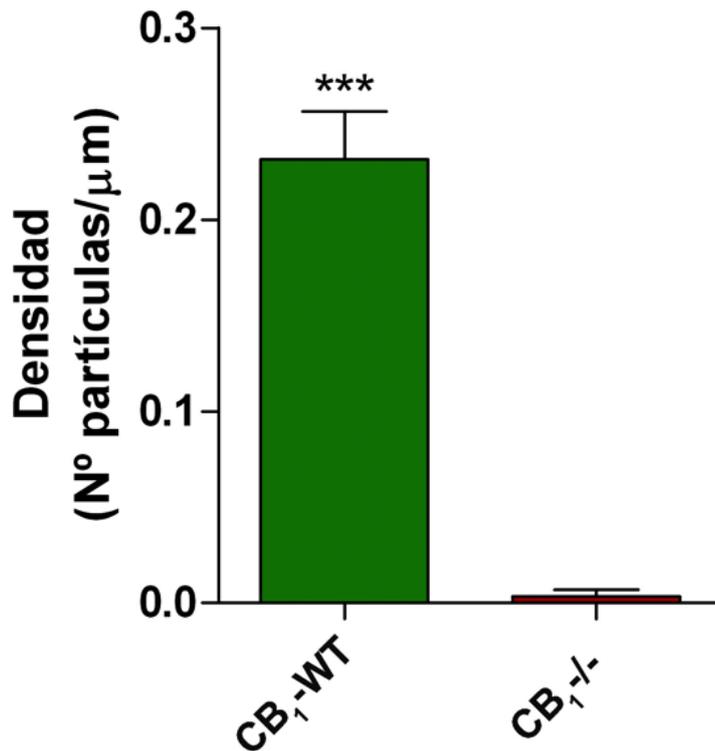


Figura 28. Densidad global de inmunomarcado de CB₁ (inmunopartículas de CB₁ por micrómetro de mitocondria positiva) en las mitocondrias de los tres músculos esqueléticos estudiados de ratón silvestre (CB₁-WT) y de ratón sin CB₁ (CB₁-KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Obsérvese que a pesar de ser bajo el número de inmunopartículas por micra de membrana de mitocondria marcada, la diferencia con la prácticamente nula densidad en CB₁-KO es muy significativa (***) P < 0.001).

Por otra parte, analizamos el efecto de la falta de CB₁ sobre el número y el tamaño de las mitocondrias en el músculo gastrocnemio, al ser éste el que presentaba mayor proporción de mitocondrias inmunopositivas para CB₁. Sorprendentemente, el número de ellas en el WT es de alrededor 1,1/µm² de tejido muscular reduciéndose alrededor del 72% en el gastrocnemio del ratón CB₁-KO, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Fig. 29). Este descenso

drástico de la cantidad mitocondrial en el músculo gastrocnemio se ve además acompañada por una tendencia no significativa de un menor tamaño de las mitocondrias, pasando de alrededor de $0,1 \mu\text{m}^2$ a tener un área que no alcanza $0,075 \mu\text{m}^2$ (Fig. 30).

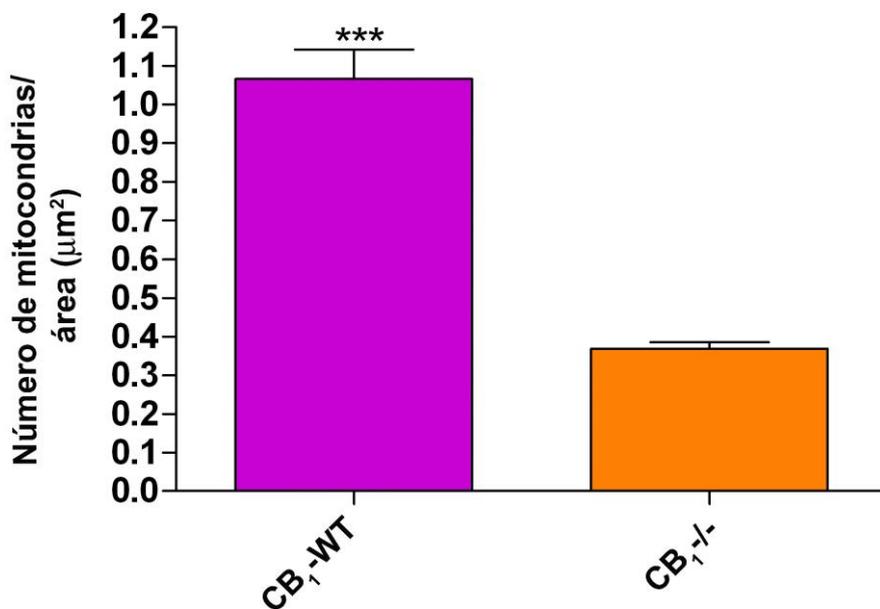


Figura 29. Número de mitocondrias por área de músculo gastrocnemio de ratón silvestre (CB_1 -WT) y de ratón sin CB_1 (CB_1 -KO). Hay una disminución muy significativa en el número de mitocondrias contadas en el músculo de CB_1 -KO respecto a CB_1 -WT (*) $P < 0.001$.**

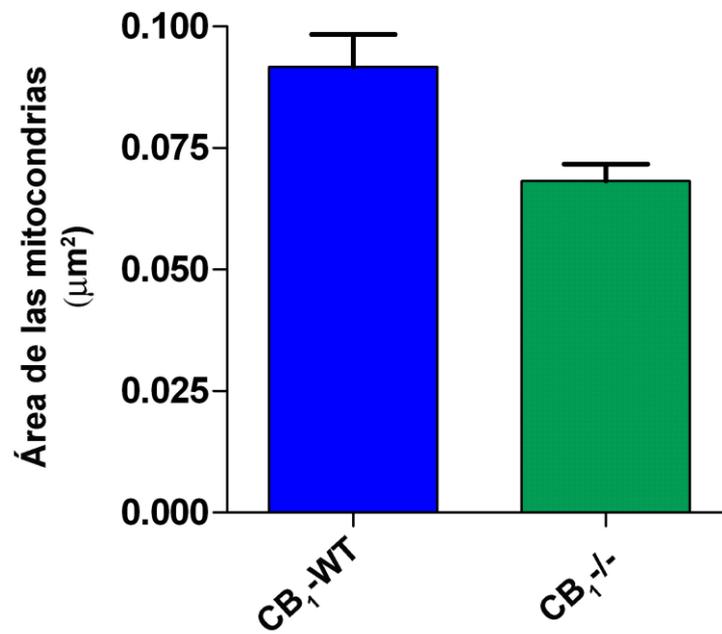


Figura 30. Tamaño de las mitocondrias por área de músculo gastrocnemio de ratón silvestre (CB_1 -WT) y de ratón sin CB_1 (CB_1 -KO). Hay tendencia a un menor tamaño de las mitocondrias del músculo de CB_1 -KO respecto a CB_1 -WT, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

Localización subcelular de DAGL- α en músculo estriado

Controles de especificidad

En primer lugar, con la idea de conocer la especificidad del anticuerpo frente a DAGL- α empleado en este estudio, analizamos la porción dorsomedial del núcleo ventromedial del hipotálamo, una región cerebral en la que se conoce la localización específica de esta enzima de síntesis del 2-AG (Reguero y cols., 2013). En este tejido vimos con el mismo método de inmuno-oro preinclusión para microscopía electrónica utilizado en el músculo, que las inmunopartículas de DAGL- α están en posición perisináptica y más alejadas de la densidad postsináptica de membranas dendríticas y espinas dendríticas que reciben sinapsis asimétricas excitadoras de botones axónicos (Fig. 31-A). El patrón de marcado descrito para DAGL- α desaparece completamente en el mismo tejido de ratón DAGL- α knockout (Fig. 31-B). Por tanto, estos resultados demuestran que el anticuerpo frente a DAGL- α utilizado en el presente trabajo doctoral es altamente específico en su reconocimiento de esta proteína enzimática. Desafortunadamente, no dispusimos de músculo de ratón DAGL- α knockout, por lo que no pudimos testar directamente nuestro anticuerpo en este tejido. Sin embargo, es asumible que la localización específica de DAGL- α por el anticuerpo por nosotros empleado en tejido nervioso, debe ser igualmente específica en músculo.

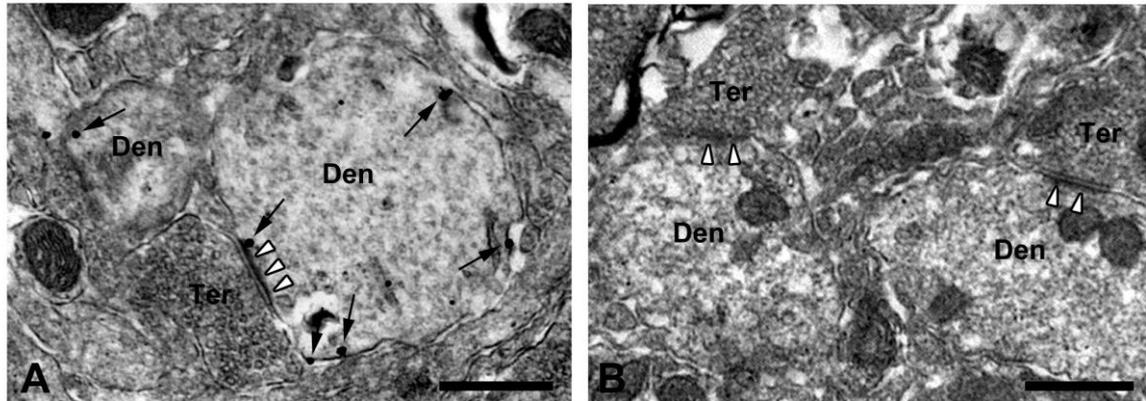


Figura 31. Control de especificidad del anticuerpo frente a DAGL- α . Localización ultraestructural de DAGL- α en el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratón *DAGL α -WT* (A) y *DAGL α -KO* (B). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. (A) Las inmunopartículas de DAGL- α (flechas) se localizan en dendritas postsinápticas que reciben sinapsis asimétricas de terminales (Ter) excitadoras (obsérvese claramente la gruesa densidad postsináptica indicada con puntas de flecha blancas en A y B). El patrón de marcado de DAGL- α completamente desaparece en *DAGL α -KO* (B), indicando la especificidad del anticuerpo empleado en este estudio, como ya hemos descrito (Reguero y cols., 2014). Barras de escala: 0,5 μ m.

Localización subcelular de DAGL- α en músculo estriado

Una vez conocida la alta especificidad de la herramienta empleada, investigamos la distribución de DAGL- α en los mismos músculos estudiados para CB₁. De tal modo, esta enzima se localiza sobre todo en las mitocondrias de los músculos gastrocnemio (aproximadamente en el 9,6% de ellas) (Fig. 32 y 35), abdominal (~8,5%) (Fig. 33 y 35) y cardíaco (~4,2%) (Fig. 34 y 35). Además, alguna partícula dispersa aparece por otros componentes de las fibras musculares, como es en la proximidad de las líneas Z de las miofibrillas o por el retículo sarcoplásmico.

MÚSCULO GASTROCNEMIO RATÓN (DAGL- α)

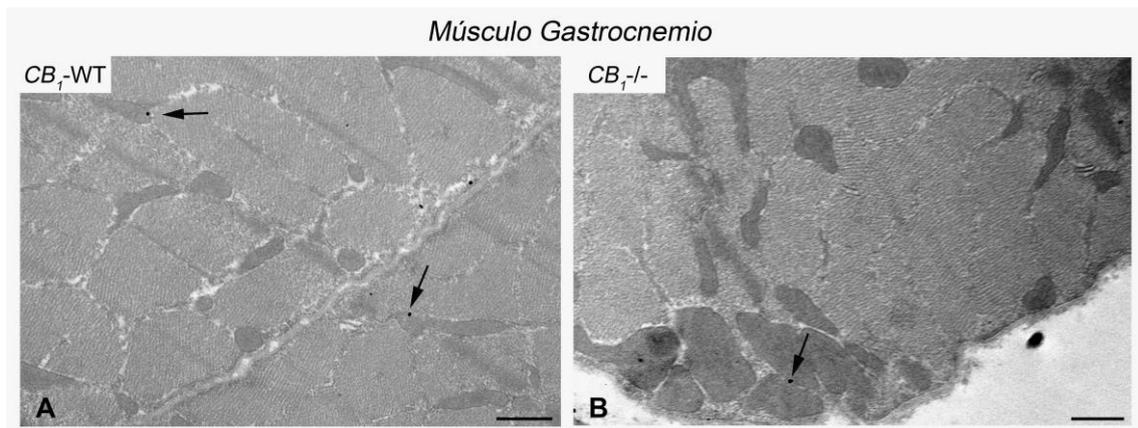


Figura 32. Localización ultraestructural de DAGL- α en el músculo gastrocnemio del ratón silvestre (CB_1 -WT) y en el ratón carente de CB_1 (CB_1 -KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas que indican la presencia de DAGL- α (flechas) se localizan en membranas externas de mitocondrias (flechas) de CB_1 -WT (A) y CB_1 -KO (B). Barras de escala: 0,5 μ m.

MÚSCULO ABDOMINAL RATÓN (DAGL- α)

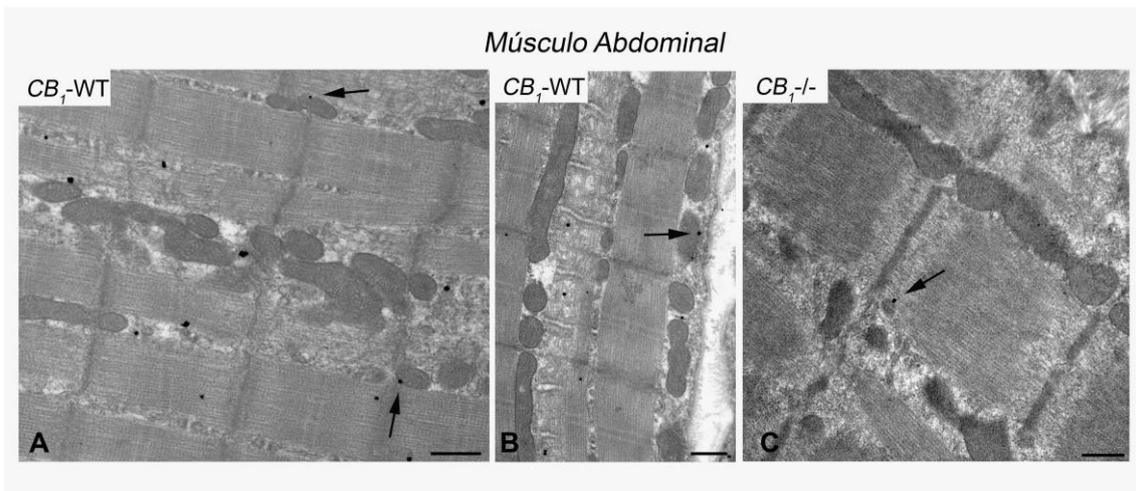


Figura 33. Localización ultraestructural de DAGL- α en el músculo abdominal del ratón silvestre (CB_1 -WT) y en el ratón carente de CB_1 (CB_1 -KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas que indican la presencia de DAGL- α (flechas) se localizan en membranas externas mitocondriales (flechas), tanto en CB_1 -WT (A, B) como en CB_1 -KO (C), aunque también hay algunas distribuidas por el retículo sarcoplasmático (A). Barras de escala: 0,5 μ m.

CORAZÓN RATÓN (DAGL- α)

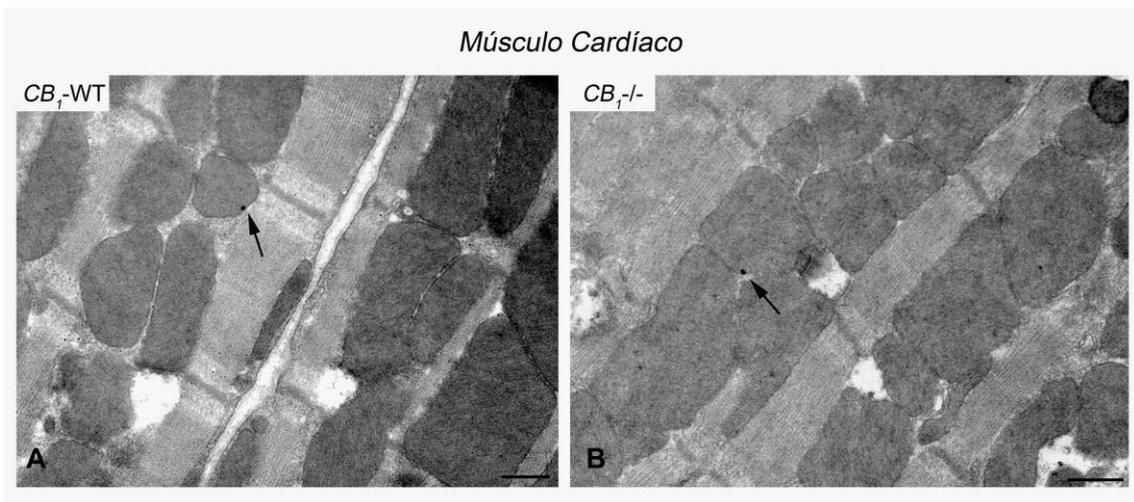


Figura 34. Localización ultraestructural de DAGL- α en el músculo cardíaco del ratón silvestre (*CB₁-WT*) y en el ratón carente de *CB₁* (*CB₁-KO*). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las pocas inmunopartículas que apuntan la localización de DAGL- α (flechas) se encuentran en membranas externas mitocondriales (flechas) de *CB₁-WT* (A) y *CB₁-KO* (B). Barras de escala: 0,5 μ m.

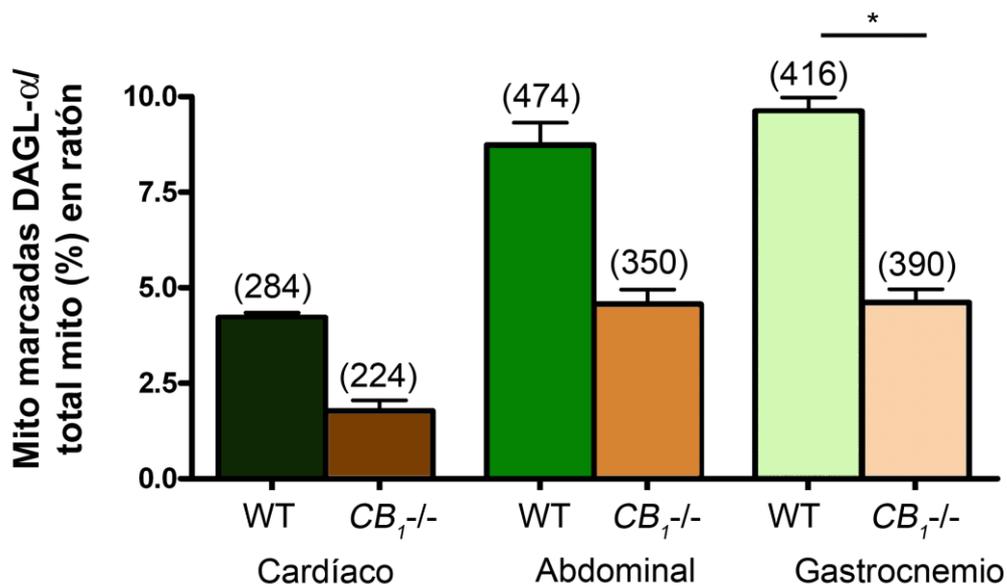


Figura 35. Proporción de mitocondrias DAGL- α inmunopositivas en los tres músculos esqueléticos estudiados de ratón silvestre (CB₁-WT) y de ratón sin CB₁ (CB₁-KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Del total de mitocondrias analizadas en cada músculo (números entre paréntesis), el músculo **gastrocnemio** presenta el mayor porcentaje de mitocondrias marcadas (**9,62% ± 0,3579**), seguido del músculo **abdominal** (**8,74% ± 0,5797**) y finalmente el músculo **cardiaco** (**4,22% ± 0,1270**), al igual que ocurre con CB₁. Es de destacar que los porcentajes de mitocondrias positivas para DAGL- α **son menores en los 3 músculos de CB₁-KO**: gastrocnemio (4,61% ± 0,3521), abdominal (4,57% ± 0,3868), cardiaco (1,78% ± 0,2771), siendo la diferencia estadísticamente significativa en el caso del músculo gastrocnemio (* P < 0,05).

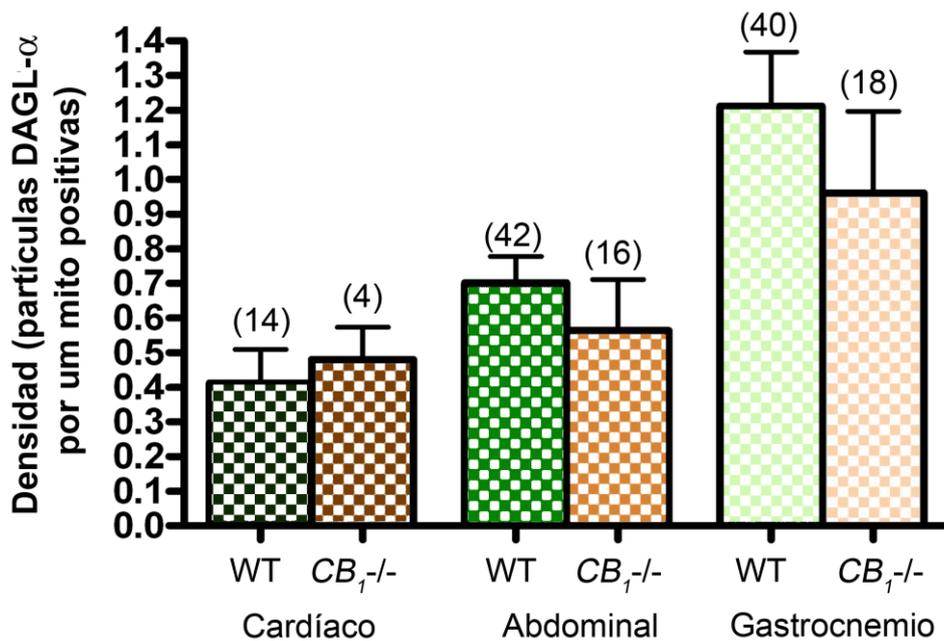


Figura 36. Densidad de inmunomarcado de DAGL- α (inmunopartículas de DAGL- α por micrómetro de mitocondria positiva) en las mitocondrias de los tres músculos esqueléticos estudiados de ratón silvestre (CB_1 -WT) y de ratón sin CB1 (CB_1 -KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Del total de mitocondrias analizadas en cada músculo (números entre paréntesis) de CB_1 -WT, el músculo gastrocnemio presenta la mayor densidad de marcado ($1,21 \pm 0,1561$), seguido del músculo abdominal ($0,70 \pm 0,0754$) y finalmente el músculo cardiaco ($0,41 \pm 0,9726$). No hay diferencias significativas con la densidad observada en las mitocondrias de CB_1 -KO (gastrocnemio: $0,96 \pm 0,2363$; abdominal: $0,56 \pm 0,1467$; cardiaco: $0,09 \pm 0,7061$).

Llama la atención que en el músculo del ratón CB_1 -KO, la expresión de DAGL- α en las mitocondrias es menor, pues sólo cerca del 4,6% de ellas están marcadas en el gastrocnemio (Fig. 35), ~4,5% en el músculo abdominal (Fig. 35) y ~1,8% en el miocardio (Fig. 35).

Localización subcelular de NAPE-PLD en músculo estriado

Controles de especificidad

Con el fin de conocer la especificidad de la herramienta empleada en la localización de NAPE-PLD, esto es, la calidad de los anticuerpos frente a esta enzima, investigamos en primer lugar la inmunotinción para NAPE-PLD en el giro dentado de hipocampo de cerebro de ratones silvestres (Fig. 37-A) y de *NAPE-PLD-KO* (Fig. 37-B). Observamos el típico patrón de marcado intenso en el hilo del giro dentado de los ratones silvestres que no existe en el hipocampo de *NAPE-PLD-KO*, lo que confirma la especificidad del anticuerpo. Al igual que en el caso del anticuerpo frente a DAGL- α , no dispusimos de músculo de ratón *NAPE-PLD-KO* aunque, a pesar de esta limitación, es razonable asumir que el patrón de especificidad observado en el hipocampo se da también en el músculo.

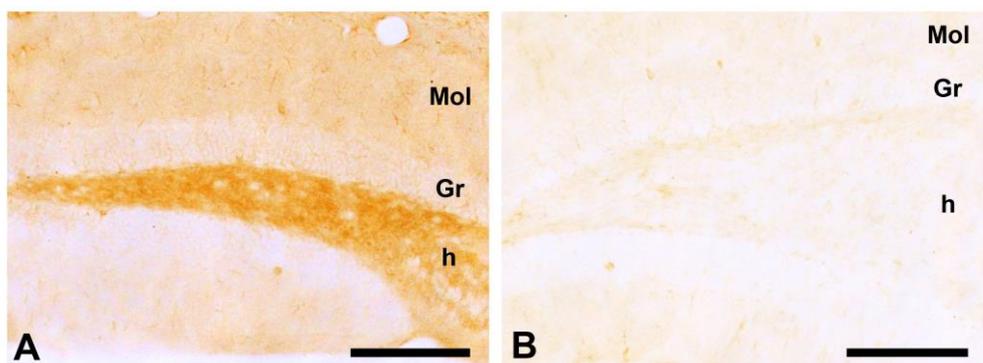


Figura 37. Control de especificidad de la inmunotinción observada con el anticuerpo frente a NAPE-PLD en las capas molecular (Mol), granular (Gr) e hilus (h) del giro dentado del hipocampo de ratón NAPE-PLD silvestre (A) y carente de NAPE-PLD (B). Método de inmunoperoxidasa preinclusión para microscopía de luz. La fuerte inmunorreactividad observada en el hilus del ratón silvestre (h en A) desaparece en el ratón *NAPE-PLD-KO* (B), lo que indica la especificidad del anticuerpo empleado en este estudio. Barras de escala: 200 μ m (Reguero y cols., 2014).

La localización de NAPE-PLD en los músculos analizados es sobre todo en mitocondrias, al igual que CB₁ y DAGL- α . Sin embargo, en este caso cerca del 14% de las mitocondrias son inmunopositivas para esta enzima (Figs. 38-39-40).

Localización subcelular de NAPE-PLD en músculo estriado

Estudiamos en esta sección la arquitectura subcelular de NAPE-PLD, enzima de síntesis de la anandamida. En el caso del músculo gastrocnemio (Fig. 38-A y 38-B) se encuentra en alguna línea Z, pero sobre todo está distribuido en las mitocondrias. De hecho, casi el 14% de ellas son inmunopositivas para esta enzima. Es de resaltar que el patrón de NAPE-PLD disminuye en mitocondrias del animal CB₁-KO, quedando en un valor de menos del 8% de ellas inmunomarcadas para NAPE-PLD en estos animales carentes del receptor CB₁ (Fig. 38-C).

MÚSCULO GASTROCNEMIO RATÓN (NAPE-PLD)

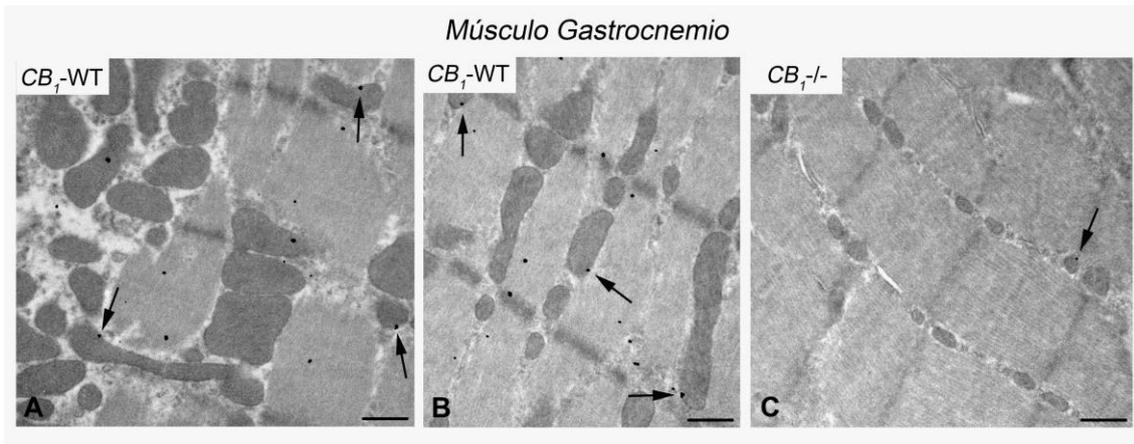


Figura 38. Localización ultraestructural de NAPE-PLD en el músculo gastrocnemio del ratón silvestre (*CB₁-WT*) y del ratón carente de *CB₁* (*CB₁-KO*). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas que indican la presencia de NAPE-PLD (flechas) se localizan en membranas de mitocondrias (flechas) de *CB₁-WT* (A, B) y *CB₁-KO* (C). Obsérvense en A y B algunas inmunopartículas dispersas por las miofibrillas. Barras de escala: 0,5μm.

Respecto al músculo abdominal (Fig. 39-A), el inmunomarcado de NAPE-PLD se encuentra en algo más de 14% de las mitocondrias. Sin embargo, aumenta el porcentaje de mitocondrias que expresan la enzima de síntesis de anandamida en este músculo del ratón *CB₁-KO* (alrededor del 16,5%) (Fig. 39-B).

MÚSCULO ABDOMINAL RATÓN (NAPE-PLD)

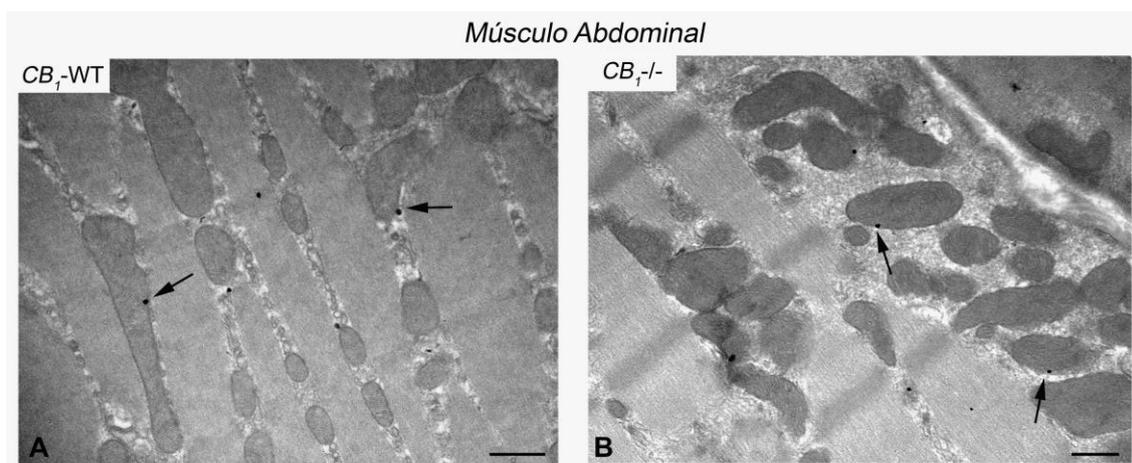


Figura 39. Localización ultraestructural de NAPE-PLD en el músculo abdominal del ratón silvestre (CB_1 -WT) y del ratón carente de CB_1 (CB_1 -KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas que apuntan la colocación de NAPE-PLD (flechas) se disponen sobre todo en membranas de mitocondrias (flechas) de CB_1 -WT (A) y CB_1 -KO (B). Barras de escala: 0,5 μ m.

En el músculo cardiaco (Fig. 40), más del 20% de las mitocondrias expresan la enzima NAPE-PLD (Fig. 40-A y 40-B), sin verse estadísticamente afectado este porcentaje en el corazón del ratón carente de CB_1 (Fig. 40-C).

CORAZÓN RATÓN (NAPE-PLD)

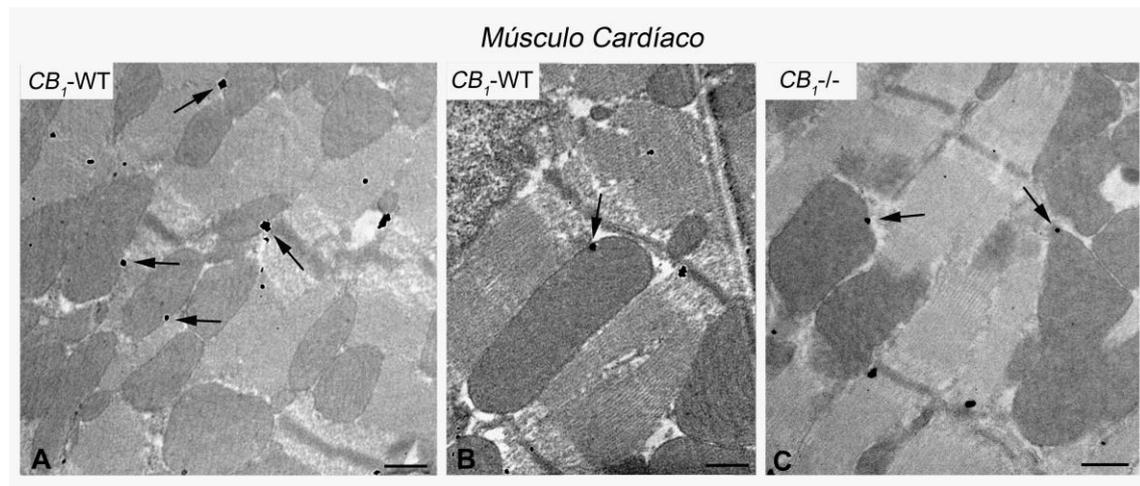


Figura 40. Localización ultraestructural de NAPE-PLD en el músculo cardíaco de ratón silvestre (CB_1 -WT) y de ratón carente de CB_1 (CB_1 -KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las inmunopartículas que indican la distribución de NAPE-PLD (flechas) se disponen sobre todo en membranas de mitocondrias (flechas) de CB_1 -WT (A, B) y CB_1 -KO (C), aunque algunas también se aprecian en la proximidad de los discos Z. Barras de escala: 0,5 μ m.

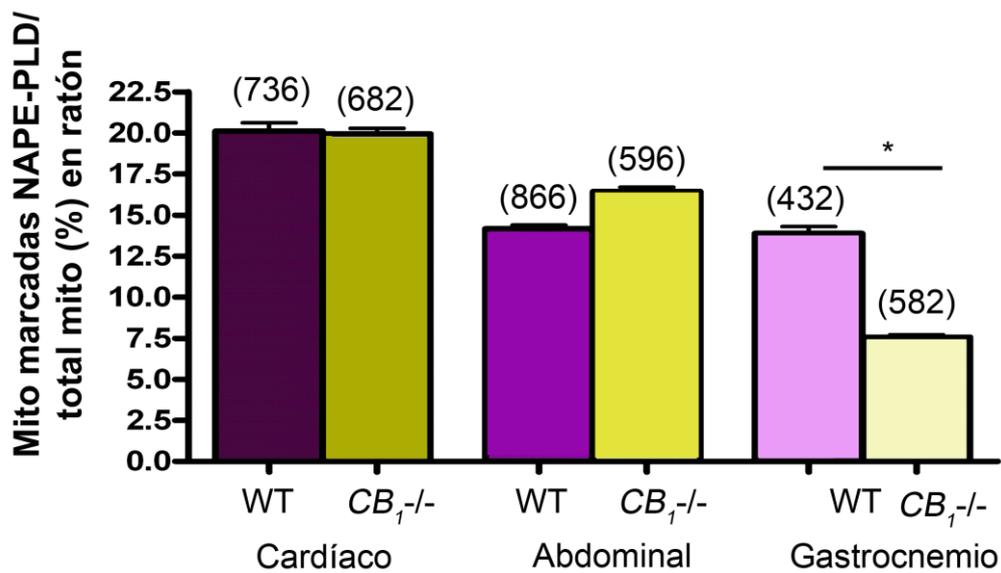


Figura 41. Proporción de mitocondrias NAPE-PLD inmunopositivas en los tres músculos esqueléticos estudiados de ratón silvestre (*CB₁-WT*) y de ratón sin *CB₁* (*CB₁-KO*). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Del total de mitocondrias analizadas en cada músculo (números entre paréntesis), el músculo **cardíaco** presenta el mayor porcentaje de mitocondrias marcadas (**20,11% ± 0,5138**), seguido del músculo **abdominal** (**14,16% ± 0,2309**) y finalmente el músculo **gastrocnemio** (**13,89% ± 0,3983**). Es de destacar que el porcentaje de mitocondrias positivas para NAPE-PLD es similar en el corazón (19,94% ± 0,3464), ligeramente superior en abdominal (16,44% ± 0,2540) y francamente menor en gastrocnemio (7,56% ± 0,1501) de *CB₁-KO*, siendo la diferencia sólo en este último caso estadísticamente significativa (* $P < 0,05$).

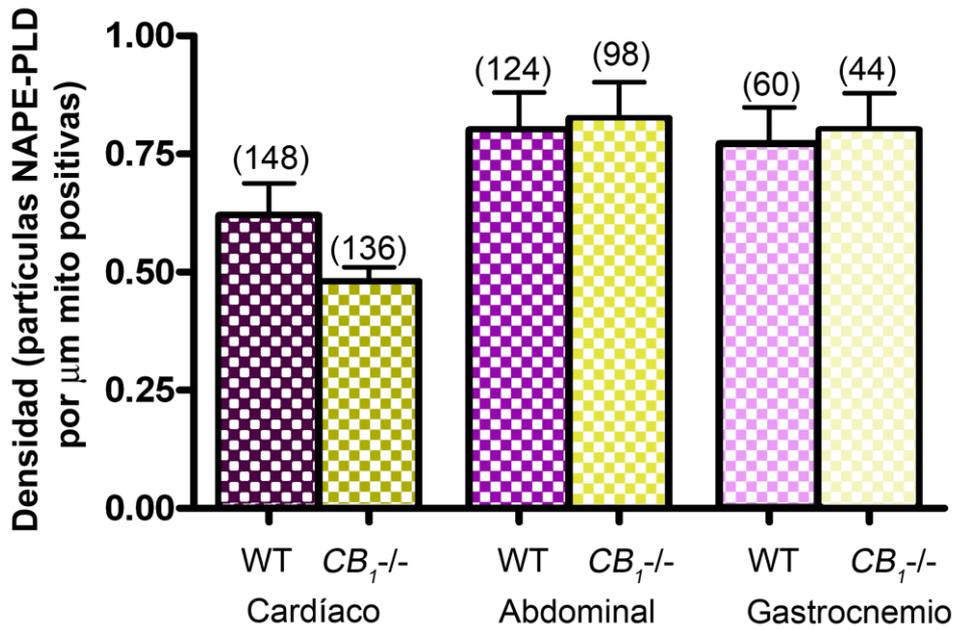


Figura 42. Densidad de inmunomarcado de NAPE-PLD (inmunopartículas de NAPE-PLD por micrómetro de mitocondria positiva) en las mitocondrias de los tres músculos esqueléticos estudiados de ratón silvestre (CB_1 -WT) y de ratón sin CB1 (CB_1 -KO). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Del total de mitocondrias analizadas en cada músculo (números entre paréntesis) de CB_1 -WT, el músculo abdominal tiene sólo un poco más de densidad de marcado ($0,80 \pm 0,0794$) que el músculo gastrocnemio ($0,77 \pm 0,0771$), mientras que es menor en el músculo cardiaco ($0,62 \pm 0,0675$). No hay en ningún músculo diferencias significativas con la densidad observada en las mitocondrias de CB_1 -KO (gastrocnemio: $0,80 \pm 0,0781$; abdominal: $0,82 \pm 0,0763$; cardiaco: $0,48 \pm 0,0304$).

DISCUSIÓN

En este trabajo doctoral se ha demostrado por primera vez la existencia de componentes clave del sistema endocannabinoide en las mitocondrias del músculo esquelético. En particular, hemos observado que el receptor CB₁ y los enzimas de síntesis DAGL- α y NAPE-PLD de los dos principales cannabinoides endógenos 2-AG y anandamida, respectivamente, se encuentran relacionados con la membrana externa de las mitocondrias de los músculos gastrocnemio, abdominal y cardiaco del ratón.

La fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS) convierte la mayoría de la energía contenida en los nutrientes en ATP necesario para las reacciones celulares. Las mitocondrias también regulan otros importantes procesos fisiológicos, tales como la homeostasis de calcio, estrés oxidativo, apoptosis y esteroidogénesis. La estructura y funciones mitocondriales se ajustan constantemente con el fin de mantener la homeostasis metabólica celular. De hecho, defectos en las funciones mitocondriales aparecen en diferentes patologías, como obesidad, diabetes tipo 2 o enfermedades neurodegenerativas (Hojlund y cols., 2008; Bournat y Brown, 2010; Dietrich y cols., 2013; Schneeberger y cols., 2013). En tejidos periféricos, la resistencia a la insulina se asocia con disfunciones mitocondriales en miocitos, hepatocitos, adipocitos e islotes de células β pancreáticos (Hojlund y cols., 2008; Sivitz y Yorek, 2010).

Las mitocondrias en el sistema nervioso central son importantes en la coordinación de la toma y gasto de energía. Por ejemplo, la dinámica mitocondrial en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo, implicado en la homeostasis de la energía corporal, regula la obesidad inducida por la dieta (Dietrich y cols., 2013; Schneeberger y cols., 2013). Por lo tanto, el estudio de la actividad y la regulación mitocondrial cerebral es un importante paso con el fin de entender la función del cerebro, en general, y el control central del balance energético corporal, en particular (Abizaid y Horvath, 2008; Diano y Horvath, 2012).

Los receptores CB₁ fueron identificados como las dianas moleculares de los cannabinoides exógenos y endógenos y están presentes en diferentes tejidos, como

el cerebro, hígado, músculo esquelético, páncreas y grasa, donde su activación participa en las funciones celulares y metabólicas del organismo (Piomelli, 2003; Silvestri y Di Marzo, 2013). Por ejemplo, la deficiencia genética o el bloqueo farmacológico de los receptores CB₁ son beneficiosos en alteraciones metabólicas, tales como la obesidad y el síndrome metabólico (Vickers y cols., 2003; Pagotto y cols., 2006; Nam y cols., 2012; Silvestri y Di Marzo, 2013).

Los CB₁ son receptores unidos a proteínas G que se encuentran en abundancia en las membranas plasmáticas de las neuronas, desde donde controlan la actividad neuronal, el metabolismo y funciones (Piomelli, 2003; Marsicano y Lutz, 2006; Kano y cols., 2009). El impacto de los cannabinoides exógenos sobre los procesos mitocondriales se conoce desde los años setenta (Bartova y Birmingham, 1976), mucho antes del descubrimiento de los receptores cannabinoides (Matsuda y cols., 1990). Esos estudios ya sugirieron que el cannabinoide THC derivado de la marihuana (*Cannabis sativa*) afecta las funciones mitocondriales (Bartova y Birmingham, 1976).

Con la identificación de los receptores de cannabinoides como típicos receptores GPCRs de membrana (Matsuda y cols., 1990; Munro y cols., 1993; Piomelli, 2003), los efectos de los cannabinoides en la mitocondrias fueron interpretados como una consecuencia indirecta de la activación de CB₁ en la membrana plasmática, o como alteraciones inespecíficas de las membranas mitocondriales por estos componentes lipídicos (Martin, 1986; Howlett y cols., 2002; Athanasiou y cols., 2007).

Diferentes agonistas exógenos de CB₁ (THC, WIN55,212-2, HU210 o JZL195 (un inhibidor de las dos enzimas responsables de la degradación de los dos principales endocannabinoides) disminuyen las tasas de respiración en mitocondrias purificadas de cerebro de ratón silvestre, pero no en ratón carente de CB₁ (Benard y cols., 2012). Estos datos sugieren la existencia de un vínculo directo entre los endocannabinoides, los receptores CB₁ y la bioenergía celular en el cerebro, lo que puede constituir una nueva diana en el tratamiento de los desórdenes metabólicos (Hebert-Chatelain y cols., 2014a,b).

Evidencias recientes indican que la señalización del receptor CB₁ tiene la capacidad de regular la biogénesis mitocondrial en tejidos periféricos no neuronales (Aquila y cols., 2010; Tedesco y cols., 2010). La naturaleza lipofílica de la mayoría de cannabinoides (Piomelli, 2003) implica que las interacciones ligando-receptor podrían ocurrir, no sólo a nivel de las membranas plasmáticas, sino también en el interior de las células. De hecho, diversos compartimentos intracelulares intervienen en la regulación del metabolismo endocannabinoide (Gulyas y cols., 2004; Marsicano y Kuner, 2008) y también se ha demostrado que los receptores CB₁ señalizan funcionalmente en membranas intracelulares de lisosomas y endosomas (Rozenfeld y Devi, 2008).

La presencia de estos receptores unidos a proteínas G en las mitocondrias de las neuronas junto con su capacidad de modular la energía y función neuronal permanece todavía una cuestión abierta (Belous y cols., 2006). Sin embargo, existen hoy en día evidencias sólidas de que las mitocondrias contienen proteínas G (Lyssand y Bajjalieh, 2007; Andreeva y cols., 2008). Además, varios trabajos han demostrado la localización intramitocondrial de efectores de la señalización de proteínas G, tales como la adenilciclase soluble (Zippin y cols., 2003), fosfodiesterasa (Acin-Perez y cols., 2009, 2011) y la proteína quinasa A (PKA) (Ryu y cols., 2005). De tal manera, el AMP cíclico puede ser producido en el interior de la mitocondria, lo que determinaría la activación de PKA y la fosforilación de proteínas mitocondriales, regulando de este modo la respiración mitocondrial y la producción de energía (Chen y cols., 2004; Helling y cols., 2008; Acin-Perez y cols., 2009, 2011).

Nosotros con el método de inmuno-oro preinclusión para microscopía electrónica utilizado en esta Tesis, demostramos hace poco la localización de CB₁ en membranas de mitocondrias de neuronas de la región CA1 del hipocampo de ratones silvestres, la cual no observamos en ratones CB₁-KO (Benard y cols., 2012). Cerca del 30% de las mitocondrias distribuidas en porciones somatodendríticas y terminales axónicas de las neuronas tenían marcado de CB₁, mientras que el background sólo fue del 3% (Benard y cols., 2012). Sin embargo, los perfiles de las mitocondrias pueden encontrarse en la proximidad de densidades lineales de las membranas plasmáticas o del retículo endoplásmico, haciendo posible que las

partículas de oro presentes en estas estructuras sean identificadas erróneamente como marcado mitocondrial (Hebert-Chatelain y cols., 2014a,b). Para evitar esta distorsión, llevamos a cabo en el hipocampo una cuantificación más restrictiva, considerando sólo las partículas metálicas localizadas a más de 80 nm de esas densidades lineales, teniendo en cuenta que el diámetro medio de las partículas de oro intensificadas con plata resultó ser alrededor de 30 nm. De tal modo, vimos que $21,6 \pm 1,4\%$ de las secciones mitocondriales eran inmunopositivas para CB₁ en el ratón CB₁-WT, mientras que sólo el $2,9 \pm 0,6\%$ de ellas lo fueron en el ratón CB₁-KO (Hebert-Chatelain y cols., 2014a,b). Los porcentajes de mitocondrias que tienen CB₁ en el músculo son similares a éstos que observamos en el cerebro, por lo que podemos concluir que la subpoblación de mitocondrias con CB₁ se mantiene a nivel central y en órganos periféricos, al menos en el músculo estriado. Por el contrario, la densidad de inmunopartículas de CB₁ es mucho más baja en mitocondrias musculares que hipocampales. En el cerebro, la densidad de inmunomarcado fue de aproximadamente 18 partículas por μm^2 de mitocondria (Benard y cols., 2012) y alrededor del 15% del total de inmunomarcado de CB₁ neuronal en CA1 estaba localizado en las mitocondrias (Benard y cols., 2012). Asimismo, pudimos confirmar por medio de inmunoblots la presencia específica de inmunorreactividad para CB₁ en mitocondrias purificadas de cerebros de ratones silvestres (Benard y cols., 2012). La proporción de receptores CB₁ localizados en la membrana mitocondrial de neuronas del hipocampo (alrededor del 15% del total de receptores CB₁) podría parecer bajo. Sin embargo, esta expresión es responsable de una reducción del 30% de la respiración dependiente de CB₁ mitocondrial en mitocondrias purificadas de cerebro (Benard y cols., 2012). Recordamos que algo más del 20% de las mitocondrias neuronales contiene CB₁ (Hebert-Chatelain y cols., 2014a,b), lo que sugiere que hay un fuerte impacto de la señalización cannabinoide en el subgrupo de orgánulos que expresan CB₁ mitocondrial. Además, un CB₁ poco abundante puede tener un significado funcional de extraordinaria importancia en ciertas localizaciones. Por ejemplo, aunque una pequeña cantidad (menos del 10%) del total de proteína CB₁ cortical se expresa en neuronas glutamatérgicas (Marsicano y Kuner, 2008; Bellocchio y cols., 2010), muchas de las funciones del sistema endocannabinoide son realizadas por este limitado porcentaje de receptores.

Además, alrededor del 95% de las inmunopartículas estaban localizadas en la membrana externa mitocondrial, lo que confirmamos en Western blots de mitocondrias purificadas tratadas con tripsina con o sin presolubilización con digitonina, sugiriendo que la porción del terminal N del CB₁ mitocondrial está expuesto hacia el citosol, mientras que el terminal C está probablemente localizado en el espacio intermembrana. En resumen, una porción sustancial del receptor CB₁ está presente en la superficie de la mitocondria neuronal (Benard y cols., 2012). En este trabajo doctoral, hemos observado una localización similar de las inmunopartículas que indican la presencia de CB₁ en la membrana externa de la mitocondria. Sin embargo, tanto en nuestro trabajo previo (Benard y cols., 2012) como en el actual no es posible discernir la localización subcelular exacta del receptor, ya que la técnica de inmuno-oro preinclusión empleada aquí tiene la limitación de que las partículas de oro de 1,4 nm son amplificadas con plata, resultando un partícula de metal lo suficientemente grande como para ser capaz de desdibujar la distancia del epítipo, en este caso, la distancia de la secuencia del terminal carboxilo de CB₁ reconocida por el anticuerpo. En teoría, la distancia entre el epítipo y el centro de la partícula de oro es equivalente a la suma del diámetro correspondiente al anticuerpo primario (IgG: ~8 nm), al anticuerpo secundario (fragmento Fab: ~4 nm o IgG: ~8 nm) y el radio de la partícula de oro previa a la intensificación con plata.

La hipótesis de que los GPCRs podrían regular directamente la actividad mitocondrial ha sido propuesta previamente (Belous y cols., 2006; Papa, 2006). El programa de uso abierto MitoProt II (Claros y Vincens, 1996) predijo que el receptor CB₁ tenía una probabilidad de localización en mitocondria del 39,3%. Este valor teórico es más alto que para otros GPCRs y es comparable con los valores de diversas proteínas mitocondriales conocidas o recientemente identificadas. Nuestros datos experimentales demostraron que CB₁ está en membranas de mitocondrias neuronales, donde regula con precisión el metabolismo energético y contribuye a la expresión de DSI (ver más abajo) (Benard y cols., 2012). De tal modo, los receptores CB₁ en la mitocondria neuronal regulan de forma directa la respiración mitocondrial. Esta función se ejerce a través de la modulación de la actividad del complejo I mitocondrial por medio de la regulación de los niveles de AMPc y de la actividad de PKA, los cuales se sabe desde no hace mucho que están

en la mitocondria donde modulan la respiración del orgánulo y la producción de energía (Chen y cols., 2004; Papa, 2006; Lyssand y Bajjalieh, 2007; Andreeva y cols., 2008; Helling y cols., 2008; Acin-Perez y cols., 2009).

Los receptores CB₁ intracelulares están implicados en la denominada DSI (depolarization-induced suppression of inhibition), una forma de plasticidad sináptica inhibitoria a corto plazo dependiente de endocannabinoides en el hipocampo, la cual también se da tras la inhibición directa de la actividad del complejo I mitocondrial. Por lo tanto, nuestros datos en cerebro indican la existencia de CB₁ mitocondrial y su papel en la regulación de la bioenergía neuronal, lo que podría estar implicado en la plasticidad sináptica dependiente de endocannabinoides (Benard y cols., 2012). Queda por determinar el papel funcional de los receptores CB₁ en la mitocondria muscular. Algunas indicaciones se dan más adelante en este sentido.

Respecto a la maquinaria enzimática de síntesis de los dos principales cannabinoides endógenos, 2-AG y anandamida, decir que en este estudio hemos localizado inmunocitoquímicamente las enzimas DAGL- α y NAPE-PLD, respectivamente, en las mitocondrias musculares, al igual que se ha identificado la existencia de ambos endocannabinoides en las mitocondrias hipocampales (Benard y cols., 2012). Las mitocondrias del cerebro tienen niveles sustanciales de actividad degradadora de endocannabinoides. En nuestro trabajo previo (Benard y cols., 2012), se midieron los niveles de endocannabinoides mitocondriales y la respiración mitocondrial en mitocondrias cerebrales purificadas tratadas con JZL195 (un inhibidor dual de la FAAH y de la MAGL, las dos principales enzimas de degradación de endocannabinoides). Así se detectó anandamida, pero su nivel estaba por debajo de los límites reproducibles de detección (Benard y cols., 2012). Sin embargo, el JZL195 aumentó el 2-AG mitocondrial de forma dosis dependiente, y redujo la respiración mitocondrial en ratones CB₁-WT pero no en CB₁-KO (Benard y cols., 2012). Estos datos claramente indican que las mitocondrias están equipadas con endocannabinoides capaces de activar los receptores CB₁ mitocondriales *in situ* (Benard y cols., 2012). La presencia de las enzimas de síntesis DAGL- α y NAPE-PLD en las mitocondrias musculares concuerdan con estos hallazgos en el hipocampo. Además, el descenso significativo que

observamos de la proporción de mitocondrias inmunopositivas para estas enzimas en el músculo gastrocnemio del ratón *CB₁-KO*, apunta la posibilidad de una estrecha correlación entre la actividad de los receptores CB₁ mitocondriales que regulan la función respiratoria, y la necesidad del “fuel” sintetizado por las mitocondrias que active dichos receptores, en definitiva, de los endocannabinoides mitocondriales.

IMPORTANCIA FUNCIONAL

Como ya hemos dicho, diversas líneas de evidencia sostienen la hipótesis de que una disfunción mitocondrial es clave en obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Valerio y cols., 2006; Patti y Corvera, 2010) y podría contribuir a la reducción de la oxidación lipídica y la acumulación de grasa y/o lípidos intramiocelulares (Jacob y cols., 1999). Además, los endocannabinoides tienen un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética a nivel central y periférico (Di Marzo y Matias 2005; Pagotto y cols., 2006). En concreto, los endocannabinoides son un importante lazo de unión entre el metabolismo energético celular y la obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Di Marzo, 2008). Por ejemplo, niveles elevados de endocannabinoides circulantes y en tejido adiposo en obesos y sujetos con diabetes tipo 2 se correlacionan con resistencia a la insulina (Di Marzo y cols., 2009a). Además, la infusión de agonistas de CB₁ en roedores y humanos induce una resistencia a la insulina en hígado, músculo y tejido adiposo (Di Marzo y Després, 2009) e inhibe la actividad enzimática respiratoria en diferentes tejidos de roedores (cerebro, hígado, músculo esquelético y corazón) (Bartova y Birmingham, 1976), causando una reducción de las tasas de consumo de oxígeno (Chiu y cols., 1975).

El músculo esquelético es el lugar primario de oxidación de los nutrientes, incluyendo la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa. Se ha visto que la resistencia a la insulina y la alteración de la captación de la insulina, se asocian con una pérdida de la capacidad oxidativa muscular en respuesta a un aumento de la ingesta rica en grasa (Cavuoto y cols., 2007). La resistencia a la insulina en el músculo esquelético juega un papel destacado en la patogénesis del síndrome

metabólico y la diabetes tipo 2 (Kelley y cols., 2002; Kelley, 2005), por lo que el bloqueo de los receptores CB₁ en el músculo esquelético tiene un efecto directo sobre el gasto de energía y el metabolismo oxidativo (Liu y cols., 2005; Ravinet Trillou y cols., 2003). Crespillo y cols., (2011) confirmaron por medio de inmunohistoquímica, Western blots y qRT-PCR que las células musculares esqueléticas contienen CB₁ y CB₂, y también expresan DAGL α , DAGL β y MAGL. Estas observaciones dan soporte biológico a una regulación endocannabinoide de genes que controlan el metabolismo en el músculo esquelético (Crespillo y cols., 2011). Además, nosotros en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que CB₁, DAGL α y NAPE-PLD están presentes en las mitocondrias de los músculos estriados.

La expansión de la grasa y, en particular, la grasa visceral, en individuos obesos está ligado a un aumento del riesgo cardiovascular. Recientes estudios han demostrado que la biogénesis y función mitocondrial disminuyen en tejido adiposo blanco, hígado y músculo esquelético de animales obesos/diabéticos así como en humanos (Patti y Corvera, 2010). Cabe mencionar que el óxido nítrico generado por la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) aumenta la biogénesis mitocondrial en adipocitos blancos y miocitos (Nisoli y cols., 2003, 2004) mientras que la delección genética de eNOS disminuye la biogénesis mitocondrial (Nisoli y cols., 2003, 2004). Los receptores CB₁ controlan el metabolismo energético a través de la modulación de muchos procesos centrales y periféricos (Pagotto y cols., 2006). De tal modo, los ratones que carecen de CB₁ son delgados (Cota y cols., 2003) y resistentes a una dieta rica en grasa (Ravinet Trillou y cols., 2004). De manera similar, el antagonista SR141716 (rimonabant) selectivo de CB₁, reduce de forma persistente el peso corporal en ratones obesos (Ravinet Trillou y cols., 2003), aumentando el metabolismo del tejido adiposo blanco, revirtiendo la esteatosis hepática (Jourdan y cols., 2010) y aumentando la captación de glucosa en el músculo esquelético (Esposito y cols., 2008). El bloqueo genético y farmacológico del receptor CB₁ aumenta la actividad de MAPK y la función y biogénesis mitocondrial en tejido adiposo blanco alcanzando los niveles de los animales controles alimentados con una dieta normal (Tedesco y cols., 2008). Ello se ve acompañado de una reducción del peso corporal y de la adiposidad. Algunos resultados previos sugieren que la sobre-estimulación de los receptores CB₁, a

través de la disminución de la biogénesis mitocondrial en tejidos metabólicamente activos, podría justificar un aumento de depósitos grasos y la aparición de disfunciones metabólicas en obesos, puesto que el sistema endocannabinoide está hiperactivo en órganos periféricos, en particular en la grasa visceral de los sujetos obesos, y los niveles circulantes de endocannabinoides están elevados en pacientes con diabetes tipo 2 (Matias y cols., 2006).

Se ha demostrado que los endocannabinoides y los agonistas de CB₁, descienden varios marcadores de la biogénesis mitocondrial y reducen la función mitocondrial en tejidos metabólicamente activos (Tedesco y cols., 2010) y, como también ya hemos mencionado, el bloqueo del receptor CB₁ aumenta la función y biogénesis mitocondrial (Tedesco y cols., 2008). En concreto, la estimulación de CB₁ por ACEA, AEA y 2-AG disminuye la biogénesis mitocondrial en cultivos de adipocitos blancos de ratón. Además, la estimulación crónica de CB₁ durante 4 semanas desciende el contenido de mitocondrias y la respiración mitocondrial en ratones obesos inducidos por la dieta, no dándose estos cambios en ratones delgados sometidos a dieta normal (Tedesco y cols., 2010). Por el contrario, el tratamiento con una única dosis relativamente elevada de anandamida durante 24h aumenta la expresión de PGC1- α (un regulador fundamental de la biogénesis mitocondrial muscular) en células musculares humanas de sujetos delgados (Cavuoto y cols., 2007). Nosotros hemos observado en este estudio que el número de mitocondrias disminuye de forma estadísticamente muy significativa ($P < 0.001$) en el músculo gastrocnemio del ratón carente de CB₁ (CB₁-KO) respecto al animal silvestre (CB₁-WT). Además, hemos detectado un descenso significativo del inmunomarcado de DAGL- α y NAPE-PLD en el mismo músculo gastrocnemio carente de CB₁, lo que está en consonancia con la falta de necesidad de endocannabinoides al no estar presente el receptor. Esta aparente contradicción con lo publicado hasta ahora (Tedesco y cols., 2010) puede significar que el efecto de los endocannabinoides y de los agonistas de CB₁ sobre la biogénesis mitocondrial se deba a su acción a través de receptores CB₁ localizados en compartimentos extramitocondriales, mientras que, en nuestro caso, la disminución mitocondrial puede ser una consecuencia directa de la falta de CB₁ en las mitocondrias. Como alternativa, hay cerca de un 75% menos de mitocondrias

en el gastrocnemio de *CB₁-KO*, por lo que se podría especular que el 25% de mitocondrias restantes suponen la subpoblación de mitocondrias con *CB₁* que no lo tienen en el *CB₁-KO*. Queda este aspecto pendiente de investigaciones ulteriores.

PAPEL DEL *CB₁* MITOCONDRIAL EN LOS EFECTOS ADVERSOS DEL CANNABIS

Nuestro equipo ha colaborado en una investigación reciente del laboratorio del Dr. Giovanni Marsicano de Burdeos (Herbert-Chatelain y cols., 2014, en preparación) en la que hemos observado que el control directo de la actividad mitocondrial cerebral por los receptores *CB₁* en mitocondrias de diferentes regiones cerebrales, es responsable de dos de los efectos conductuales adversos más conocidos del consumo de cannabis, como son la catalepsia y el deterioro de la memoria. La catalepsia y la amnesia son dos efectos secundarios limitantes muy serios a la hora de pensar en el uso de los cannabinoides con fines potencialmente terapéuticos (Pacher y cols., 2006). Hemos visto que estos efectos dependen de la señalización del receptor *CB₁* mitocondrial, mientras que la antinocepción, uno de los efectos potencialmente beneficiosos de los cannabinoides, sólo requiere de los receptores *CB₁* localizados en membrana plasmática. Por lo tanto, estos datos aportan una base mecanística para el desarrollo futuro de fármacos cannabinoides sin efectos adversos. Los receptores *CB₁* en mitocondrias cerebrales estimulan la señalización de proteínas G en el interior del orgánulo, lo que sugiere que este mecanismo subyace en los efectos catalépticos y amnésicos de los cannabinoides en el sustancia negra (catalepsia) y en el hipocampo (amnesia). Estos resultados coinciden con la idea de que las mitocondrias están bajo el control intrínseco de proteínas G y la señalización del AMPc (Kuyznierewicz y Thomson, 2002; Lyssand y Bajjalieh, 2007; Andreeva y cols., 2008; Acin-Perez y cols., 2009b; Papa y cols., 2010; Beninca y cols., 2014). Los cambios observados en los niveles de AMPc mitocondrial son sensibles a la toxina pertúsica, lo que indica que el *CB₁* mitocondrial modula la respiración del orgánulo a través del descenso de la actividad de la adenilciclase soluble en forma dependiente de la proteína *G_{ai/o}*.

Todavía no se conocen los efectos post-mitocondriales que aúnan la activación de CB₁ mitocondrial con la alteración de las funciones sinápticas y cerebrales, que llevan a la catalepsia y la amnesia. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que incluso una interrupción temporal del suministro local de ATP, altera profundamente las funciones sinápticas neuronales (Rangaraju y cols., 2014). Teniendo en cuenta que la expresión presináptica de los receptores CB₁ es muy alta (Marsicano y Kuner, 2008) tanto en membranas plasmáticas como mitocondriales (Benard y cols., 2012; Hebert-Chatelain y cols., 2014a), la demostración de que la activación de CB₁ mitocondrial descende la producción de ATP permite pensar que este mecanismo podría estar implicado en la catalepsia y la amnesia inducida por cannabinoides. De hecho, la liberación sináptica es un proceso que requiere mucha energía (Mattson y cols., 2008) y el control ejercido por el CB₁ mitocondrial sobre la disponibilidad presináptica de ATP podría representar un mecanismo racional sobre su impacto en la función cerebral (Rangaraju y cols., 2014).

En conclusión, los procesos bioenergéticos son clave en la compleja regulación de los mecanismos cerebrales y periféricos; de tal modo, la activación de una proteína G unida a receptor puede influenciar la conducta a través de la alteración directa de las funciones mitocondriales. Finalmente, la dicotomía entre los efectos dependientes e independientes mitocondriales de los cannabinoides abre nuevas esperanzas en el uso específico del gran potencial terapéutico de esta clase de compuestos, posiblemente evitando los efectos adversos indeseados y limitantes. Queda por averiguar si la presencia de CB₁, DAGL- α y NAPE-PLD en mitocondrias del músculo esquelético tiene la misma relevancia funcional que la que empieza a vislumbrarse para CB₁ en las mitocondrias del cerebro.

CONCLUSIONES

- 1.- El receptor de cannabinoides CB_1 y las enzimas de síntesis de endocannabinoides DAGL- α y NAPE-PLD están presentes en las mitocondrias del músculo esquelético del ratón.
- 2.- Alrededor del 26% de las mitocondrias del músculo gastrocnemio, 22% del músculo abdominal y 17% del músculo cardiaco expresan el receptor CB_1 en las membrana externa mitocondrial. El patrón de marcado prácticamente desaparece en los músculos del ratón CB_1 -KO.
- 3.- Los porcentajes de mitocondrias positivas para CB_1 en el músculo esquelético están en consonancia con los observados en el cerebro.
- 4.- El contenido de mitocondrias desciende cerca del 72% en el músculo gastrocnemio del ratón CB_1 -KO respecto al CB_1 -WT, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$).
- 5.- Las mitocondrias del músculo gastrocnemio de CB_1 -KO tienden a ser de menor tamaño que en CB_1 -WT, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.
- 6.-El músculo gastrocnemio presenta cerca del 10% de mitocondrias marcadas para DAGL- α , seguido del músculo abdominal (alrededor del 9%) y del músculo cardiaco (cerca del 4%).
- 7.- Sólo el 4% de las mitocondrias del músculo gastrocnemio del ratón CB_1 -KO expresan DAGL- α , siendo la diferencia con el ratón CB_1 -WT estadísticamente significativa ($P < 0,05$).
- 8.- Respecto a NAPE-PLD, cerca del 20% de las mitocondrias están marcadas en el músculo cardiaco, mientras que los músculos abdominal y gastrocnemio tienen alrededor del 14%.

9.- Sólo el 7,5% de las mitocondrias del músculo gastrocnemio del ratón *CB₁-KO* son inmunopositivas para NAPE-PLD, siendo la diferencia con el ratón *CB₁-WT* estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

10.- Finalmente, las mitocondrias del músculo esquelético están equipadas con los componentes de síntesis y de señalización del sistema endocannabinoide, del mismo modo que ha sido demostrado este sistema en las mitocondrias cerebrales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010; **2010**: 476279
- Abizaid A, Horvath TL. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Reg Pep* 2008; **149**: 3-10
- Acin-Perez, R, Salazar E, Brosel S, Yang H, Schon EA, Manfredi G. Modulation of mitochondrial protein phosphorylation by soluble adenylyl cyclase ameliorates cytochrome oxidase defects. *EMBO Mol Med* 2009a; **1**: 392-406
- Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR, Manfredi G. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2009b; **9**: 265-276
- Acin-Perez R *et al.* A phosphodiesterase 2A isoform localized to mitochondria regulates respiration. *J Biol Chem* 2011; **286**: 30423-30432
- Addy C, Wright H, Van Laere K *et al.* The acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metab* 2008; **7**: 68-78
- Agudo J, Martin M, Roca C *et al.* Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia* 2010; **53**: 2629-2640
- Anderson GR, Aoto J, Tabuchi K, Földy C, Covy J, Yee AX, Wu D, Lee SJ, Chen L, Malenka RC, Südhof TC. *Cell* 2015 Jul 30; **162**(3): 593-606
- Andreeva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA. G alpha12 is targeted to the mitochondria and affects mitochondrial morphology and motility. *FASEB J* 2008; **22**: 2821-2831
- Aquila S *et al.* Human sperm anatomy: ultrastructural localization of the cannabinoid1 receptor and a potential role of anandamide in sperm survival and acrosome reaction. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; **293**: 298-309
- Athanasiou A, Clarke AB, Turner AE, Kumaran NM, Vakilpour S, Smith PA *et al.* Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death. *Biochem Biophys Res Comm* 2007; **364**: 131-137
- Bartova A, Birmingham MK. Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on mitochondrial NADH-oxidase activity. *J Biol Chem* 1976; **251**: 5002-5006
- Belous AE *et al.* Mitochondrial calcium transport is regulated by P2Y1- and P2Y2-like mitochondrial receptors. *J Cell Biochem* 2006; **99**: 1165-1174
- Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A *et al.* Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 2010; **13**: 281-283
- Benard G, Massa F, Puente N, Lourenço J, Bellocchio L, Soria-Gómez E, Matias I, Delamarre A, Metna-Laurent M, Cannich A, Hebert-Chatelain E,

- Mulle Ch, Ortega-Gutierrez S, Martín-Fontecha M, Klugmann M, Guggenhuber S, Lutz B, Jürg Gertsch J, Chaouloff F, López-Rodríguez ML, Grandes P, Rossignol R, Marsicano G. Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci* 2012; **15**: 558-564
- Beninca C, Planaguma J, de Freitas Shuck A, Acin-Perez R, Munoz JP, de Almeida MM, Brown JH, Murphy AN, Zorzano A, Enriquez JA et al. A new non-canonical pathway of Galpha(q) protein regulating mitochondrial dynamics and bioenergetics. *Cell Signal* 2014; **26**: 1135-1146
 - Berrendero F. En: Guía Básica sobre los Cannabinoides. Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides. I.S.B.N.: 84-699-8658-9. Capítulo 2: Elementos que forman el sistema cannabinoide endógeno 2002; Págs: 23-31
 - Blüher M, Engeli S, Klöting N et al. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* 2006; **55**: 3053-3060
 - Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol* 2005; **517**: 174-178
 - Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Op Endocr Diab Ob* 2010; **17**: 446-452.
 - Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci* 1996; **16**: 3934-3942
 - Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 2012; **76**:70-81
 - Cavuoto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Cameron-Smith D, Wittert GA. Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2007; **267**: 63-69
 - Cavuoto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Janovská A, Game P, Wittert GA. The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **364**: 105-110
 - Cavuoto P, Wittert GA. The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy expenditure. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; **23**: 79-86
 - Chabowski A, Zendzian-Piotrowska M, Nawrocki A, Gorski J. Not only accumulation, but also saturation status of intramuscular lipids is significantly affected by PPARg activation. *Acta Physiol* 2012; **205**: 145-158
 - Chen R, Fearnley, IM, Peak-Chew SY, Walker JE. The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 2004; **279**: 26036-26045
 - Chevaleyre V, Takahashi KA, Castillo, PE. Endocannabinoid mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 2006; **29**: 37-76.

- Chiu P, Karler R, Craven C, Olsen DM, Turkanis SA. The influence of δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol on tissue oxygen consumption. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1975; **12**: 267-286
- Claros MG, Vincens P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 1996; **241**: 779-786
- Cote M, Matias I, Lemieux I et al. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)* 2007; **31**: 692-699
- Cota D, Marsicano G, Tschoep M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003; **112**: 423-431
- Crespillo A, Suárez J, Bermúdez-Silva FJ et al. Expression of the cannabinoid system in muscle: effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade. *Biochem J* 2011; **433**: 175-185
- Dainese E, Oddi S, Maccarrone M. Interaction of endocannabinoid receptors with biological membranes. *Curr Med Chem* 2010; **17**: 1487-1499
- Di Marzo V. The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2008; **51**: 1356-1367
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004; **3**: 771-784
- Di Marzo V, Coté M, Matias I et al. Changes in plasma endocannabinoid levels in viscerally obese men following a 1 year lifestyle modification programme and waist circumference reduction: associations with changes in metabolic risk factors. *Diabetologia* 2009a; **52**: 213-217
- Di Marzo V, Després JP. CB1 antagonists for obesity—what lessons have we learned from rimonabant? *Nat Rev Endocrinol* 2009b; **5**: 633-638
- Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 2005; **8**: 585-589
- Di Marzo V, Verrijken A, Hakkarainen A et al. Role of insulin as a negative regulator of plasma endocannabinoid levels in obese and nonobese subjects. *Eur J Endocrinol* 2009b; **161**: 715-722
- Diano S, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends Mol Med* 2012; **18**: 52-58.
- Dietrich A, McDaniel WF. Endocannabinoids and exercise. *Br J Sports Med* 2004; **38**: 536-541
- Dietrich MO, Liu ZW, Horvath TL. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate Agrp neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell* 2013; **155**: 188-199

- Eckardt K, Sell H, Taube A et al. Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle. *Diabetologia* 2009; **52**: 664-674
- Ehrenborg E, Krook A. Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Rev* 2009; **61**: 373-393
- Esposito I, Proto MC, Gazzero P et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant stimulates 2-deoxyglucose uptake in skeletal muscle cells by regulating the expression of phosphatidylinositol-3-kinase. *Mol Pharmacol* 2008; **74**: 1678-1686
- Feuerecker M, Hauer D, Toth R et al. Effects of exercise stress on the endocannabinoid system in humans under field conditions. *Eur J Appl Physiol* 2012; **112**: 2777-2781
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003; **83**: 1017-1066
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guijarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* 2011; **15**: 64-69
- Fujii N, Aschenbach WG, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ. Regulation of glucose transport by the AMP-activated protein kinase. *Proc Nutr Soc* 2004; **63**: 205-210
- Fuss J, Steinle J, Bindila L, Auer MK, Kirschherr H, Lutz B, Gass P. A runner's high depends on cannabinoid receptors on mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; Oct 20; **112** (42): 13105-8
- Gatta-Cheriffi B, Cota D. *Handb Exp Pharmacol* 2015; **231**: 367-391
- Gibson GE, Shi Q. A mitocentric view of Alzheimer's disease suggests multifaceted treatments. *J Alzheimers Dis* 2010; **20** Suppl 2: S591-607
- Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 2459-2464
- Gulyas AI et al. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 2004; **20**: 441-458
- Hardie DG. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr* 2011; **93**: 891S-8916
- Hebert-Chatelain E, Reguero L, Puente N, Lutz B, Chaouloff F, Rossignol R, Piazza PV, Benard G, Grandes P, Marsicano G. Cannabinoid control of brain bioenergetics: exploring the subcellular localization of the CB1. *Mol Metabol* 2014a; **3**: 495-504
- Hebert-Chatelain E, Reguero L, Puente N, Lutz B, Chaouloff F, Rossignol R, Piazza PV, Benard G, Grandes P, Marsicano G. Studying mitochondrial CB1 receptors: yes we can. *Mol Metabol* 2014b; **3**: 339

- Heifets BD, Castillo PE. (2009). Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 2009; **71**: 283-306.
- Helling S *et al.* Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase. *Mol Cell Proteomics* 2008; **7**: 1714-1724
- Herling AW, Kilp S, Elvert R, Haschke G, Kramer W. Increased energy expenditure contributes more to the body weightreducing effect of rimonabant than reduced food intake in candyfed Wistar rats. *Endocrinology* 2008; **149**: 2557-2566
- Heyman E, Gamelin FX, Goekint M *et al.* Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans—possible implications for reward and depression. *Psychoneuroendocrinology* 2012; **37**: 844–851
- Hill MN, Karatsoreos IN, Hillard CJ, McEwen BS. Rapid elevations in limbic endocannabinoid content by glucocorticoid hormones in vivo. *Psychoneuroendocrinology* 2010b; **35**: 1333-1338
- Hill MN, McEwen BS. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010a; **34**: 791-797
- Hill MN, Titterness AK, Morrish AC *et al.* Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus* 2010; **20**: 513-523
- Hillard CJ. Endocannabinoids and the endocrine system in health and disease. *Handb Exp Pharmacol* 2015; **231**: 317-339
- Hojlund K, Mogensen M, Sahlin K, Beck-Nielsen H. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes and obesity. *End Met Clin North America* 2008; **37**: 713-731.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; **54**: 161–202
- Hu SS, Mackie K. Distribution of the endocannabinoid system in the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 2015; **231**: 59-93
- Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Claussen CD, Häring HU. Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 1999; **48**: 1113-1119
- Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M *et al.* The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 2005; **19**: 1567–1569
- Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Verges B, Degrace P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2010; **59**: 926-934

- Kann O, Kovács R. Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; **292**: C641-C657
- Kano M. Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2014; **90**: 235-250
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 2009; **89**: 309-380
- Kelley DE. Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1699-1702
- Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 2002; **22**: 325-346
- Krylatov AV, Maslov LN, Lasukova OV, Pertwee RG. Cannabinoid receptor antagonists SR141716 and SR144528 exhibit properties of partial agonists in experiments on isolated perfused rat heart. *Bull Exp Biol Med* 2005; **139**: 558-561
- Kunz I, Meier MK, Bourson A, Fisseha M, Schilling W. Effects of rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor ligand, on energy expenditure in lean rats. *Int J Obes (Lond)* 2008; **32**: 863-870
- Kuyznierewicz I, Thomson M. GTP-binding proteins G(salpa), G(ialpha), and Ran identified in mitochondria of human placenta. *Cell Biol Int* 2002; **26**: 99-108
- Lendoye E, Sibille B, Rousseau AS, Murdaca J, Grimaldi PA, Lopez P. PPARbeta activation induces rapid changes of both AMPK subunit expression and AMPK activation in mouse skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 2011; **25**: 1487-1498
- Lesniak KT, Dubbert PM. Exercise and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2001; **16**: 356-359
- Leung D, Saghatelian A, Simon GM, Cravatt BF. Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* 2006; **45**: 4720-4726
- Lindborg KA, Jacob S, Henriksen EJ. Effects of chronic antagonism of endocannabinoid-1 receptors on glucose tolerance and insulin action in skeletal muscles of lean and obese Zucker rats. *Cardiorenal Med* 2011; **1**: 31-44
- Lindborg KA, Teachey MK, Jacob S, Henriksen EJ. Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes Obes Metab* 2010; **12**: 722-730
- Lipina C, Stretton C, Hastings S et al. Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells. *Diabetes* 2010; **59**: 375-385

- Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)* 2005; **29**: 183-187
- Luo Z, Ma L, Zhao Z et al. TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1alpha upregulation in mice. *Cell Res* 2012; **22**: 551-564
- Lyssand JS, Bajjalieh SM. The heterotrimeric G protein subunit G alpha i is present on mitochondria. *FEBS Lett* 2007; **581**: 5765-5768
- Ma L, Jia J, Niu W, Jiang T, Zhai Q, Yang L, Bai F, Wang Q, Xiong L. Mitochondrial CB1 receptor is involved in ACEA-induced protective effects on neurons and mitochondrial functions. *Sci Rep* 2015 Jul 28; **5**:12440
- MacAskill AF, Atkin TA, Kittler JT. Mitochondrial trafficking and the provision of energy and calcium buffering at excitatory synapses. *Eur J Neurosci* 2010; **32**: 231-240
- Maccarrone M, Gasperi V, Catani MV *et al.* The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. *Annu Rev Nutr* 2010; **30**: 423-440
- Mackie K. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obes (Lond)* 2006; **30 (Suppl. 1)**: S19-S23
- Mackie K. Introduction to the Endocannabinoid System. Cell Biology of the Endocannabinoid System. In: *The Endocannabinoid System Handbook*. Contributors: Brewer HB, Cota D, Cravatt BF, Di Marzo V, Ginsberg HN, Howlett A, Reggio PH, Woods SC. Beth Israel Medical Center & Scientiae, LLC, 2008; 3-12 & 15-26
- Marsicano G, Kuner R. Anatomical distribution of receptors, ligands and enzymes in the brain and the spinal cord: circuitries and neurochemistry. In *Cannabinoids and the Brain* (ed. Kofalvi, A.) 2008; 161–202 (Springer, New York);
- Marsicano G, Lutz B. Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest* 2006; **29**: 27-46
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 2002; **418**: 530-534.
- Martin BR. Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacol.Rev* 1986; **38**: 45-74
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P *et al.* Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 3171–3180

- Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo AA, Di Marzo V. Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol* 2008; **286**: S66-S78
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 2008; **60**: 748-766
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; **346**: 561-564
- Mazier W, Saucisse N, Gatta-Cheriffi B, Cota D. *Trends Endocrinol Metab* 2015 Oct **26**(10) : 524-537
- McFarland MJ, Barker EL. Lipid rafts: a nexus for endocannabinoid signaling? *Life Sci* 2005; **77**: 1640-1650
- Micale V, Cristino L, Tamburella A, Petrosino S, Leggio GM, Drago F, Di Marzo V. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology* 2009; **34**: 593-606
- Morozov YM, Dominguez MH, Varela L, Shanabrough M, Koch M, Horvath TL, Rakic P. Antibodies to cannabinoid type 1 receptor co-react with stomatin-like protein 2 in mouse brain mitochondria. *Eur J Neurosci* 2013; **38**: 2341-2348
- Morozov YM, Horvath TL, Rakic P. A tale of two methods: Identifying neuronal CB1 receptors. *Mol Metabol* 2014; **3**: 338
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; **365**: 61-66
- Nam DH, Lee MH, Kim JE, Song HK, Kang YS, Lee JE *et al.* 2012. Blockade of cannabinoid receptor 1 improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in db/db mice. *Endocrinol* 2012; **153**: 1387-1396
- Newman Z, Malik P, Wu TY, Ochoa C, Watsa N, Lindgren C. Endocannabinoids mediate muscarine-induced synaptic depression at the vertebrate neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 2007; **25**: 1619-163
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003; **299**: 896-899
- Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, Pisconti A, Brunelli S, Cardile A, Francolini M, Cantoni O, Carruba MO, Moncada S, Clementi E. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 16507-16512
- Nogueiras R, Diaz-Arteaga A, Lockie SH *et al.* The endocannabinoid system: role in glucose and energy metabolism. *Pharmacol Res* 2009; **60**: 93-98
- Nyilas R, Dudok B, Urbán GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I. Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis

- associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J Neurosci* 2008; **28**: 1058-1063.
- O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 2007; **152**: 576-582
 - Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1298-1305
 - Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 389-462
 - Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 2006; **27**: 73-100
 - Papa S. Does cAMP play a part in the regulation of the mitochondrial electron transport chain in mammalian cells? *IUBMB Life* 2006; **58**: 173-175
 - Papa S, De Rasmio D. Complex I deficiencies in neurological disorders. *Trends Mol Med* 2013; **19**: 61-69
 - Papa S, Scacco S, De Rasmio D, Signorile A, Papa F, Panelli D, Nicastro A, Scaringi R, Santeramo A, Roca E et al. cAMP-dependent protein kinase regulates post-translational processing and expression of complex I subunits in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1797**: 649-658
 - Patti ME, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2010; **31**: 364-395
 - Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K et al. International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* 2010; **62**: 588-631
 - Petrosino S, Ligresti A, Di Marzo V. Endocannabinoid chemical biology: a tool for the development of novel therapies. *Curr Opin Chem Biol* 2009; **13**: 309-320
 - Phielix E, Mensink M. Type 2 diabetes mellitus and skeletal muscle metabolic function. *Physiol Behav* 2008; **94**: 252-258
 - Phinney SD. Arachidonic acid maldistribution in obesity. *Lipids* 1996; **31**(Suppl.): S271-S274
 - Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003; **4**: 873-884
 - Piomelli, D. A mighty (ochondrial) fight? *Mol Metabol* 2014; **3**: 345-346
 - Placzek EA, Okamoto Y, Ueda N, Barker EL. Membrane microdomains and metabolic pathways that define anandamide and 2-arachidonyl glycerol biosynthesis and breakdown. *Neuropharmacology* 2008; **55**: 1095-1104

- Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C *et al.* The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab* 2005; **7**: 65–72
- Puente N, Cui Y, Lassalle O, Lafourcade M, Georges F, Venance L, Grandes P, Manzoni OJ. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci* 2011; **14**: 1542-1547.
- Puente N, Elezgarai I, Lafourcade M, Reguero L, Marsicano G, Georges F, Manzoni OJ, Grandes P. Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PLoS One* 2010; **5**: e8869.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM. Sistema Motor Visceral. En: Neurociencia, 3ª edición. Editorial Médica Panamericana 2008; 484-486
- Raichlen DA, Foster AD, Gerdeman GL, Seillier A, Giuffrida A. Wired to run: exercise-induced endocannabinoid signaling in humans and cursorial mammals with implications for the ‘runner’s high’. *J Exp Biol* 2012; **215**: 1331-1336
- Rangaraju V, Calloway N, Ryan TA. Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell* 2014; **156**: 825-835
- Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrié P. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **284**: R345-R353
- Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrié P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; **28**: 640-648
- Reguero L, Puente N, Elezgarai I, Ramos-Uriarte A, Gerrikagoitia I, Bueno-López JL, Doñate F, Grandes P. Subcellular localization of NAPE-PLD and DAGL- α in the ventromedial nucleus of the hypothalamus by a preembedding immunogold method. *Histochem Cell Biol* 2014; **141**: 543-550.
- Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2003; **140**: 790-801
- Rowles J, Scherer SW, Xi T *et al.* Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J Biol Chem* 1996; **271**: 22376-22382
- Rozenfeld R, Devi LA. Regulation of CB1 cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein AP-3. *FASEB J* 2008; **22**: 2311-2322
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007; **152**: 1092-1101

- Ryu H, Lee J, Impey S, Ratan RR, Ferrante RJ. Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 13915-13920
- Schneeberger M, Dietrich MO, Sebastian D, Imbernon M, Castano C, Garcia A *et al.* Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 2013; **155**: 172-187.
- Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Met* 2013; **17**: 475-449
- Silvestri C, Ligresti A, Di Marzo V. Peripheral effects of endocannabinoid system in energy homeostasis: adipose tissue, liver and skeletal muscle. *Rev Endocr Metab Disord* 2011; **12**:153–162
- Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antiox & Red Sign* 2010; **12**: 537-577
- Sparling PB, Giuffrida A, Piomelli D, Roskopf L, Dietrich A. Exercise activates the endocannabinoid system. *Neuroreport* 2003; **14**: 2209–2211
- Soria-Gómez E, Busquets-Garcia A, Hu F, Mehidi A, Cannich A, Roux L, Louit I, Alonso L, Wiesner T, Georges F, Verrier D, Vincent P, Ferreira G, Luo M, Marsicano G. Habenular CB1 receptors control the expression of aversive memories. *Neuron* 2015 Oct 21; **88**(2): 306-313
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 2006; **45**: 405-446
- Sun Y, Alexander SP, Garle MJ *et al.* Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol* 2007; **152**: 734-743
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimoto Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 2010; **65**: 320-327
- Tedesco L, Valerio A, Dossena M *et al.* Cannabinoid receptor stimulation impairs mitochondrial biogenesis in mouse white adipose tissue, muscle, and liver: the role of eNOS, p38 MAPK and AMPK pathways. *Diabetes* 2010; **59**: 2826-2836
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M. Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci* 2007, **27**: 3663-3676.
- Valerio A, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Pisconti A, Palomba L, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO, Nisoli E. TNF- α down-

- regulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest* 2006; **116**: 2791-2798
- Viader A, Blankman JL, Zhong P, Liu X, Scholsburg JE, Joslyn CM, Liu QS, Tomarchio AJ, Lichtman AH, Selley DE, Sim-Selley LJ, Cravatt BF. Cell Rep 2015 Aug 4; 12(5): 798-808
 - Vickers SP, Webster LJ, Wyatt A, Dourish CT, Kennett GA. Preferential effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716, on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats. *Psychopharmacol* 2003; **167**: 103-111
 - Watkins BA, Hutchins H, Li Y, Seifert MF. The endocannabinoid signaling system: a marriage of PUFA and musculoskeletal health. *J Nutr Biochem* 2010; **21**: 1141-1152
 - Wei D, Lee D, Cox CD, Karsten CA, Peñagarikano O, Geschwind DH, Gall CM, Piomelli D. Endocannabinoid signaling mediates oxytocin-driven social reward. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; Oct **26**. pii:201509795 (Epub ahead of print)
 - Wood PD, Stefanick ML, Dreon DM *et al*. Changes in plasma lipids and lipoproteins in overweight men during weight loss through dieting as compared with exercise. *N Engl J Med* 1988; **319**: 1173-1179
 - Xin H, Tanaka H, Yamaguchi M, Takemori S, Nakamura A, Kohama K. Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **332**: 756-762
 - Yan ZC, Liu DY, Zhang LL *et al*. Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-delta. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **354**: 427-433
 - Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M. Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 2006; **26**: 4740-4751.
 - Zippin JH *et al*. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J* 2003; **17**: 82-84
 - Zurlo F, Larson K, Bogardus C, Ravussin E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1423-1427
 - Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA *et al*. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; **400**: 452-457