



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



**INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN**

**EXPRESIÓN DE RECEPTORES
CANNABINOIDES EN EL DESARROLLO
EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA**

Virginia Florido García

(2009)

TUTORA: Dra. Raquel Rodríguez Rodríguez

INDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>1. CANNABIS. HISTORIA E INFLUENCIA.</u>	1
1.1 DESCUBRIMIENTO DE LOS CANNABINOIDES Y RECEPTORES CANNABINOIDES.	3
<u>2. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.</u>	4
2.1 LIGANDOS	4
2.1.1 SINTESIS	5
2.1.2 DEGRADACIÓN:	6
<u>3. DIANAS MOLECULARES.</u>	7
3.1 RECEPTORES CANNABINOIDES	7
3.1.1 RECEPTOR CANNABINOIDE 1: CB1	8
3.1.2 RECEPTOR CANNABINOIDE 2: CB2	9
<u>4. FUNCIONES DEL SISTEMA CANNABINOIDE</u>	10
<u>5. RELACIÓN ENTRE SISTEMA OPIOIDE Y CANNABINOIDE</u>	11
<u>6. PEZ CEBRA</u>	12
6.1 PEZ CEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL	12
6.2 RECEPTORES CANNABINOIDES EN EL PEZ CEBRA	14
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	15
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	16
<u>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</u>	16
1.1 OBTENCIÓN DE EMBRIONES	16
<u>2. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE EMBRIONES:</u>	16
<u>3. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS</u>	17
<u>4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (RT- QPCR)</u>	18
<u>RESULTADOS</u>	22

<u>1. RECEPTOR CB1</u>	<u>22</u>
<u>2. RECEPTOR CB2</u>	<u>23</u>
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>25</u>
<u>1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN</u>	<u>26</u>
1.1 EXPRESION DE zFCB1	26
1.2 EXPRESION DE zFCB2	27
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>28</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>29</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>I</u>
<u>ANEXO 1</u>	<u>I</u>
<u>ANEXO 2</u>	<u>III</u>

INTRODUCCIÓN

1. CANNABIS. HISTORIA E INFLUENCIA.

El *Cannabis* es una planta que constituye junto al *Hummulus* la familia *Cannabaceae* (Mayoral et al. 2007), se considera originaria de Asia Central y de ella se extraen los cannabinoides. Existen tres variedades principales, *Cannabis Sativa* (Europa y Asia Central), *Indica* (Sur de Asia, África y America del Sur) y *Ruderalis* (Asia Central).

A lo largo de los años, esta planta ha sido utilizada por diferentes culturas y con diversos fines. En ocasiones trataban de buscar el beneficio de sus propiedades curativas, algunas culturas lo empleaban con fines religiosos o sociales, y otras veces solamente por la búsqueda del placer. El hombre ha utilizado el cannabis en diversas formas, para combatir el dolor, en trastornos del estado de ánimo y otras afecciones.

Se conocen diversos tipos de preparaciones de Cannabis, conocidos por sus nombres indios como *Bhang* (triturado de semillas, del cannabis y otras plantas, hojas y tallo seco, conocido como marihuana o hierba en Estados Unidos) *Ganja* (sin semillas, formada por las extremidades florales de la planta femenina) *Charas* (es la resina pura, más conocido como *hashish* en Arabe).

Las primeras evidencias documentadas sobre el uso de cannabis se remontan a China 4000 a.C. El primer documento en el que se hace referencia a las aplicaciones médicas del cannabis, es un libro de medicina china titulado “*Nei Ching*”, del cual se considera como autor al emperador Huang Ti (2600 a.C) (Li y Lin, 1974).

En la India los Vedas sagrados hacen mención al cannabis, el cual relacionan con el dios Siva. En el Atharvaveda, cuarto libro de los vedas que data del 1500-1200 a.C, la planta se describe como sagrada. Los hindúes alcanzaron un amplio conocimiento sobre las propiedades curativas de los componentes del *Cannabis Sativa*. El uso de los cannabinoides estuvo muy extendido para calmar el dolor y como febrífugo. En algunas regiones de la India su uso se amplió a la mejora del estado físico y mental. (Chopra y Chopra, 1957)

El uso del cannabis se extendió desde la India a Persia y Asiria. En Asiria era conocido como “quanabu” o “kanabas”. En varias tablas que se han conservado desde el reinado de Asurbanipal (669 a 626 a.C.) aparecen en escritura cuneiforme diversos nombres para el cannabis, principalmente asociado al término “azallu” (Campbell-Thompson, 1949).

No hay ninguna evidencia directa de que el cannabis fuera conocido en la antigua Judea (Harrison, 1966). Sin embargo la influencia del imperio asirio sobre Judea fue muy importante durante diversos periodos de tiempo, lo que hace pensar que el cannabis debió de ser empleado como medicina o como droga. Pero si el hachís se encontraba entre los símbolos de la laxitud moral asiria, no es de extrañar que esa palabra hubiera sido borrada de la Biblia, lo que explicaría la ausencia de este símbolo en el libro sagrado para los judíos (Mechoulam, 1986).

En la edad media, Plinio, Dioscórides y Galeno, principal fuente de conocimiento farmacológico para los médicos del Oriente Próximo y de Europa durante siglos, indicaron los usos medicinales del cannabis. Durante el periodo del apogeo islámico, los médicos árabes describieron otros usos, aparte de los indicados por Dioscórides y Galeno. En una farmacopea del siglo XVII era prescrito para una amplia variedad de dolencias, siendo también mencionadas la euforia y la letargia producidas por la droga (Rosenthal, 1971).

En el siglo XIX es cuando aparecen los primeros datos contrastados sobre el cannabis. Los estudios de O`Shaughnessy, médico del ejército colonial inglés que residió en la India, facilitaron la incorporación del cáñamo hindú a la farmacopea inglesa y en menor extensión a la de otros países europeos y Estados Unidos (Nahas, 1973; O`Shaughnessy, 1842).

Hasta principios del siglo XX estuvo incluido en el Formulario Nacional y Farmacopea de los Estados Unidos. Al no haberse aislado aun los componentes del cannabis tenía que utilizarse la planta cruda o sus extractos que presenta variabilidad en su composición química, lo que suponía un obstáculo para la obtención de una dosis fija que produjese resultados clínicos reproducibles. A diferencia del opio, en el cual se produce una clara distinción entre su presentación medicinal y la empleada con otros fines, para el cannabis no existían diferencias entre la hierba medicinal y la empleada por sus propiedades recreativas. Posiblemente debido a esto, junto a la adicción,

dependencia y los efectos adversos que produce el consumo frecuente del cannabis y sumado a las restricciones gubernamentales, el cannabis dejase de emplearse en terapéutica limitándose su uso a fines recreativos. Hasta que la identificación y síntesis de los cannabinoides hizo que el interés científico por estos compuestos reapareciese (McCarberg y Barkin, 2007; Russo, 2007; Manzanares *et al*, 2006; Ramos Atance *et al*, 2000).

Actualmente, existen formulaciones, que emplean compuestos del cannabis, cuyo uso ha sido aprobado en algunos países y esta en ensayo clínico en otros. Este es el caso de SativexTM, formulación oral de extracto de cannabis con trazas de Δ^9 -THC y cannabidiol en su composición, que ya cuenta con licencia de uso para el dolor en pacientes de esclerosis múltiple (Anand *et al*, 2009).

1.1 DESCUBRIMIENTO DE LOS CANNABINOIDES Y RECEPTORES CANNABINOIDES.

Los cannabinoides son compuestos lipofílicos de bajo peso molecular, extraídos originalmente de *Cannabis Sativa*, la cual contiene más de 60 clases de cannabinoides. El primer cannabinoide aislado fue el cannabinoil (CBN) (Wood *et al*, 1899). Más adelante, los avances en química orgánica permitieron a los científicos israelíes Raphael Mechoulam, Yuval Shvo y Yheiel Gaoni determinar su estructura y estereoquímica en 1963. El Δ^9 -THC, principio activo y principal componente psicoactivo del cannabis, fue caracterizado un año más tarde (Gaoni y Mechoulam, 1964), aunque su metabolito, el cannabinoil, fue el primer cannabinoide aislado (Wood *et al*, 1899). Este descubrimiento abrió las puertas a la investigación científica de las propiedades biológicas y médicas de la marihuana y sirvió para el desarrollo de derivados con capacidad terapéutica, en los que se trató de separar las propiedades farmacológicas de los efectos psicoactivos. En un principio se pensó que los efectos de los cannabinoides, debido a su naturaleza hidrófoba, se debían a la interacción no específica con componentes lipídicos de las membranas celulares. Posteriormente experimentos con análogos sintéticos de cannabinoides que mostraban estereoselectividad, bioensayos en los que se medía la actividad de la enzima adenilato ciclasa, y el empleo de radioligandos de estos compuestos, sugerían que sus efectos estaban mediados por receptor y llevó a pensar en la presencia de un receptor específico para los ligandos cannabinoides (Hosking y

Zajicek, 2008). La evidencia llegó cuando se demostró la unión específica y selectiva del derivado cannabinoide sintético CP55940 marcado radiactivamente, a membranas de cerebro de rata (Devane *et al*, 1988).

En 1990, se aisló un cDNA (SKR6), (procedente de una genoteca de cDNA de corteza cerebral de rata) que codifica para un receptor putativo acoplado a proteínas G de 473 aminoácidos (Matsuda *et al*, 1990). Simultáneamente, Herkenham *et al*, (1990), estaban utilizando el 3H-CP55940 para describir un mapa de la distribución de receptores cannabinoides en el cerebro de rata mediante autorradiografía. Ello proporcionó la pista para sospechar que el nuevo receptor clonado podría unir compuestos cannabinoides, ya que el patrón de distribución del mRNA de SKR6 coincidía con el descrito por el grupo de Herkenham. Cuando células transfectadas con el cDNA de SKR6 se trataron con compuestos cannabinoides, aparecía la esperada respuesta de disminución de la concentración intracelular de cAMP. Todo ello corroboraba que se había clonado y caracterizado el receptor cannabinoide en rata. En 1993, se identificó una segunda secuencia de un receptor cannabinoide acoplado a proteínas G (CX5) entre los cDNAs de una línea celular leucémica promielocítica humana (HL-60) (Munro *et al*, 1993). Este nuevo receptor se expresaba en la periferia. Para poder distinguir los dos tipos de receptores cannabinoides, Munro propuso que el que se expresaba en cerebro se denominara CB1 y el que aparecía en la periferia CB2 (Munro *et al*, 1993).

El descubrimiento de los receptores cannabinoides llevó a la identificación de sus ligandos endógenos, los endocannabinoides.

2. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.

El sistema endocannabinoide está formado por los receptores cannabinoides, sus ligandos endógenos y las enzimas implicadas en la biosíntesis y degradación de estos (Svíženská *et al*, 2008).

2.1 LIGANDOS

Los endocannabinoides son compuestos de naturaleza lipídica derivados del ácido araquidónico que actúan como ligandos endógenos de los receptores cannabinoides (Manzanares *et al*, 2006; Rodríguez de Fonseca *et al*, 2004).

Se comportan como moduladores retrógrados de la señal sináptica en el SNC. (Harkany *et al*, 2006)

Estos ligandos son: Anandamida (N-araquidoniletanolamida, AEA), Virodamina, N-araquidonildopamina, 2-araquidonilglicerol (2-AG), Noladin eter (Di Marzo *et al*; De Fonseca *et al*, 2004). De los cuales la anandamida y el 2-araquidonilglicerol han sido los más estudiados hasta el momento (Howlett *et al*, 2002).

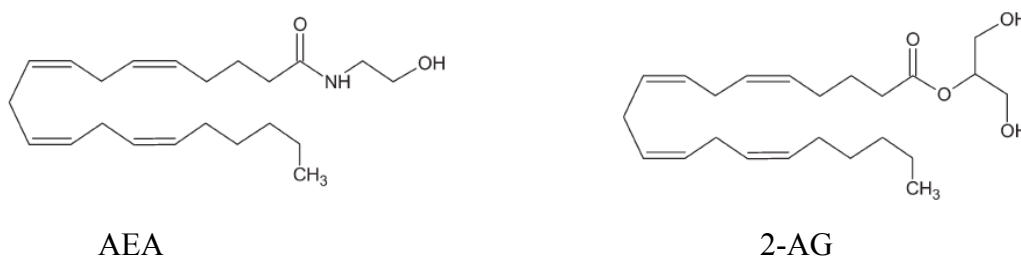


Figura 1. Estructura química de la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Taylor *et al*, 2007).

Una función común a todos ellos es la de suprimir la sensación dolorosa (Svíženská *et al*, 2008).

Son sintetizados y liberados en la región y en el momento que se requieran, según las necesidades del organismo. A diferencia de otros neurotransmisores no se almacenan como tal en vesículas, sino como sus precursores. Su liberación es Ca^{2+} dependiente. Una vez liberados son rápidamente inactivados por recaptación o por degradación enzimática. Su recaptación se produce por transporte pasivo y saturable (Pacher *et al*, 2006; Grotenhermen, 2006; Manzanares *et al*, 2004).

2.1.1 SINTESIS

La Anandamida (AEA) fue el primer endocannabinoides aislado y caracterizado, en 1992, a partir de cerebro de cerdo. Es un compuesto formado por la unión, mediante enlace amida, de ácido araquidónico y etanolamida (Devane, 1992). Resulta de la hidrólisis, catalizada por la fosfolipasa D (PLD), de un fosfolípido de membrana que actúa como precursor, el N-araquidonil- fosfatidiletanolamina (NAPE). La síntesis de dicho precursor esta mediada por la enzima N-aciltransferasa (NAT), que cataliza la transferencia de ácido araquidónico en posición 1 de la fosfatidilcolina, al grupo

principal de fosfatidiletanolamina. La actividad de ésta enzima está regulada por Ca^{2+} y AMPc (Pacher *et al*, 2006; de Fonseca *et al*, 2004; Piomelli, 2003).

Aunque NAPE-PLD se ha considerado la enzima principal en la síntesis de anandamida, recientemente se ha visto que otras enzimas como la α/β hidrolasa 4 (ABHD 4) y las fosfatasas (PTPN22) también podrían estar implicadas. (Watson *et al*, 2008; Simon y Cravatt, 2006; Harkany *et al*, 2007)

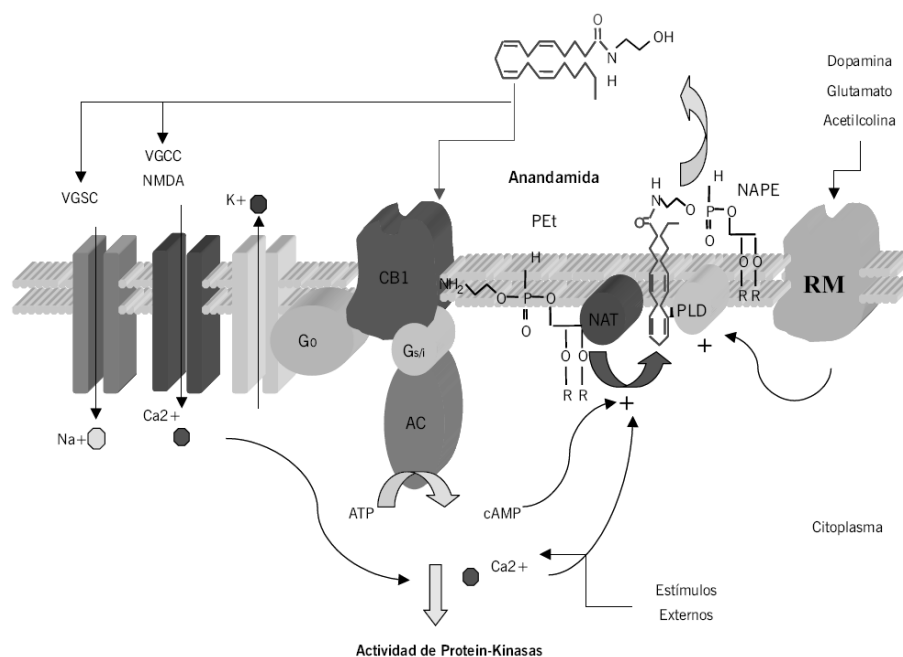


Figura 2. Síntesis y actuación de Anandamida (Obtenida de Rodríguez de Fonseca, 2008).

El 2-Araquidonilglicerol es un monoacilglicerido formado por ácido araquidónico esterificado con glicerol. Se genera como producto del metabolismo lipídico, por activación de un receptor metabotrópico acoplado a fosfolipasa C y por actuación de la diacilglicerol lipasa (DAGL) (Fonseca *et al*, 2008; Pacher *et al*, 2006; Piomelli, 2003). En la síntesis de 2-AG participan las isoformas α y β de sn-1 diacilglicerol lipasa (DAGL α y DAGL β). La localización postsináptica de estas enzimas hace que el 2-AG actúe como mensajero retrógrado pudiendo activar receptores CB1 que se encuentren a nivel presináptico. Lo que llevaría a la inhibición de neurotransmisores excitatorios e inhibitorios (Watson *et al*, 2008)

2.1.2 DEGRADACIÓN:

Se han observado dos posibles vías de inactivación, para anandamida, en el cerebro. Una de ellas es la hidrólisis intracelular mediante FAAH (también asociada a la

hidrólisis de 2-AG y oleamida, además de otros ácidos grasos) y la otra vía sería la recaptación presináptica mediada por un transportador transmembrana (Beltramo *et al*, 1997).

El 2-AG, es metabolizado principalmente por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) aunque en su inactivación intervienen también otras enzimas como son las $\alpha\beta$ hidrolasas 6 y 12 y la FAAH. (Di Marzo, 2008, Blankman et al, 2007).

En determinadas condiciones anandamida y 2-AG pueden ser sustrato de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) dando los correspondientes hidroperóxidos y posteriormente convertidos en prostaglandina-etanolamidas y prostaglandinas glicerol esterres respectivamente (Di Marzo, 2008; Zhang y Chen, 2008).

3. DIANAS MOLECULARES.

Hay dos receptores cannabinoides bien identificados: CB1 y CB2. Su activación conlleva a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (ADC) y por tanto de la conversión de ATP en AMP_c. Recientemente se han descrito receptores similares (receptor-like) a los cannabinoides, entre los que se encuentra el receptor huérfano acoplado a proteína G, GPR55 (G protein-coupled orphan receptor) que aparentemente es activado por una serie de agonistas y antagonistas cannabinoides, convirtiéndose en candidato a ser un receptor cannabinoide adicional. (Alexander et al, 2008; Szabo, 2008). También se ha observado la interacción de anandamida con receptores no cannabinoides, como es el caso del receptor vanilloide potencial transitorio (TRPV1).

3.1 RECEPTORES CANNABINOIDES

Los receptores cannabinoides, CB1 y CB2, pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. Concretamente estos están acoplados a proteína G_{i/o}.

Al ser receptores acoplado a proteína G_{i/o}, por activación de la subunidad α , pueden dar origen a procesos de señalización típicos de estas proteínas, lo cual incluye el cierre de canales de Ca²⁺, apertura de canales de K⁺, inhibición de la adenilato ciclasa y por tanto disminución de la concentración de AMP_c en el citosol, y la estimulación de quinasas activadas por mitógeno (MAPK) que fosforilan residuos de tirosina, serina y treonina (Hosking y Zajicek, 2008). Estos mecanismos parecen tener distintas funciones

en la traducción de la ocupación de los receptores cannabinoides en respuestas biológicas. (Svíženská *et al.*, 2008).

3.1.1 RECEPTOR CANNABINOIDE 1: CB1

CB1 se encuentra ampliamente distribuido a nivel del sistema nervioso, tanto central como periférico. Este receptor se localiza predominantemente en terminales presinápticas, aunque también se ha encontrado en estructuras postsinápticas y glía (Rodríguez *et al.*, 2001). Se localiza preferentemente en axones terminales, se ha detectado la presencia de receptores CB1 a nivel presináptico en terminaciones nerviosas inhibitorias y excitatorias. (Harkany *et al.*, 2007). El receptor CB1 es altamente expresado en hipocampo, regiones olfatorias, caudado, putamen, núcleo *accumbens*, *sustancia nigra pars reticulata* (SNr), *globulus palidus*, áreas involucradas en la modulación del dolor, incluyendo la sustancia gris periacueductal (Svíženská *et al.*, 2008). También se ha visto que este receptor esta presente en glándula adrenal, corazón, pulmón, próstata, testículos y médula ósea (Szabo, 2008).

En SNC murino se ha detectado el receptor CB1 a partir del día 11 de gestación, lo que equivaldría a la 5-6 semanas de gestación en humanos, y dándose un incremento gradual en sus niveles en cerebro, así como de su mRNA, durante toda la etapa prenatal. Se han podido detectar la presencia de CB1 en áreas donde no se da en el adulto (Berrendero *et al.*, 1998; Harkany *et al.*, 2007)

Se requiere la expresión de CB1 para un crecimiento axonal normal y fasciculación. (Watson *et al.*, 2008)

En ocasiones los efectos terapéuticos de agonistas de CB1 pueden venir acompañados de efectos psicoactivos indeseables a nivel del sistema nervioso central. Por lo que el empleo de agonistas selectivos de receptor CB2 parece ser una alternativa prometedora para el tratamiento del dolor (Anand *et al.*, 2008; Palazuelos *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2004)

a) AGONISTAS SELECTIVOS DE CB-1

ACEA (araquidonoilcloro etanolamida), ACPA (Araquidonoilciclopropilamida), metanandamida, O-1812

3.1.2 RECEPTOR CANNABINOIDE 2: CB2

El receptor CB2 se localiza mayoritariamente a nivel periférico, principalmente en células del sistema inmune, pero también se ha observado su presencia en SNC, tanto en microglía como en neuronas. Este receptor está implicado en el control de la diferenciación, proliferación y supervivencia de neuronas y otros tipos celulares. (Svíženská *et al*, 2009)

La expresión del receptor CB2 por células T y monocitos está implicado en el control de la neuroinflamación. También se ha visto un papel de este receptor en células de la microglía donde inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Palazuelos, 2008)

Se sabe que CB2 está implicado en procesos de dolor. Se ha visto que el empleo con agonistas selectivo de CB2 (MDA7) podría ser interesante en el tratamiento de dolor neuropático (Naguib *et al*, 2008). Puesto que la mayoría de los efectos adversos de los cannabinoides son producidos por actuación de CB1, la aplicación de agonistas selectivos de CB2 que evitan los inconvenientes de los efectos adversos a nivel central, presentan una prometedora alternativa en terapia analgésica. Además se cree que CB2 podría estar implicado en el mecanismo de la alodinia (Leichsenring *et al*, 2009).

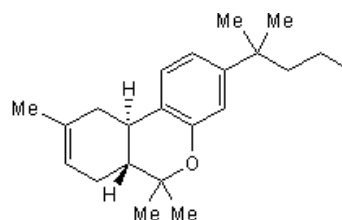
a) AGONISTAS SELECTIVOS DE CB-2

Los compuestos agonistas selectivos de CB2 podrían solucionar algunos de los problemas producidos por la actuación de CB1. Entre estos compuestos, se conocen hasta el momento: AM1241, JWH-139, JWH-133, JWH-015, GW405833 (también conocido como L768242), L759656, L759633, HU308, Sch35966 (Alexander *et al*, 2008; Guindon y Hohmann, 2008; Szabo, 2008)

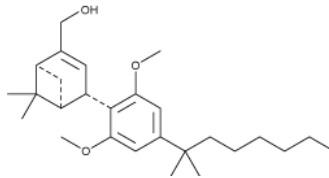
La estructura química de alguno de ellos es la siguiente (imágenes y nomenclatura obtenidas de Alexander *et al*, 2008; www.tocris.com y www.biotrend.com):

- JWH-133

Nomenclatura química: (6aR,10aR)-3-(1,1-Dimetilbutil)-6a,7,10,10a-tetrahidro-6,6,9-trimetil-6H-dibenzo [b,d]pirano

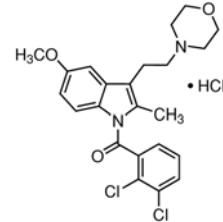


- HU-308



- GW405833

Nomenclatura química: 1-(2,3-Diclorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-3(morfolin-4-il)etil)-1H-indol hidroclore.



4. FUNCIONES DEL SISTEMA CANNABINOIDE

La señal endocannabinoide parece regular la proliferación, migración y supervivencia de progenitores neuronales durante el desarrollo del SNC, así como la diferenciación de neuronas y control del establecimiento de comunicaciones sinápticas. También se cree que los endocannabinoides pueden estar implicados, en adulto, en la proliferación y diferenciación de progenitores neurales hacia glía o neuronas. (Harkany *et al*, 2006; Watson *et a.*, 2008).

Estos compuestos, mediante unión a sus receptores son capaces de modular la señal sináptica y generar neuroprotección. Se ha visto que 2-AG ejerce un efecto neuroprotector, frente a estímulos inflamatorios y excitotóxicos, al evitar el incremento de la expresión de COX-2. Este efecto parece estar mediado vía receptor CB1 (Zhang y Chen, 2008).

La señalización retrógrada mediada por los cannabinoides endógenos estaría implicada en la inhibición de la liberación de neurotransmisores producida por los cannabinoides (Svíženská *et al*, 2008)

Se han detectado cambios en la concentración de endocannabinoides en numerosas patologías de tipo neurológico, inmunológico, cardiovascular, gastrointestinales, metabólicas, en obesidad, cáncer y también en dolor e inflamación. En diversos modelos de dolor neuropático se han observado incremento en los niveles de estos compuestos (Di Marzo, 2008).

En procesos inflamatorios en los que son liberados mediadores de la inflamación, se produce un incremento en los niveles de AMP_c que llevaría a la

activación de la proteína kinasa A (PKA) y esta a su vez a la fosforilación del receptor TRPV1. Además, la activación de PKA en fibras nociceptivas originaría hiperalgesia e hipersensibilidad. Se ha visto que agonistas de CB2, al inhibir la enzima adenilato ciclasa, evitarían el incremento de AMP_c y por tanto la activación de TRPV1. Este mecanismo de acción analgésica de agonistas CB2 es compartido por agonistas μ opioides. De esta manera la activación del receptor CB2 produciría una acción antinociceptiva periférica sin los efectos adversos que se daban a nivel del receptor CB1 (Ibrahim *et al*, 2005, Anand *et al*, 2008).

Los endocannabinoides acompañando a su aceptado efecto antiinflamatorio, también pueden ejercer acciones proinflamatorias (ej: por migración de neutrófilos y natural killer...) (Kishimoto *et al*, 2005, Svíženská *et al*, 2008).

Los agonistas cannabinoides están implicados en una amplia variedad de procesos a nivel de SNC, como son memoria y aprendizaje, coordinación motora, control del apetito, neuroprotección y desarrollo (Leichsenring *et al*, 2009; Harkany *et al*, 2007).

Los cannabinoides pueden atravesar tanto la placenta como pasar a la leche materna, pudiendo por tanto influir en el desarrollo neuronal prenatal y del lactante debido al consumo maternal de cannabis (Sundram, 2006).

5. RELACIÓN ENTRE SISTEMA OPIOIDE Y CANNABINOIDE

Los sistemas cannabinoide y opioide comparten una serie de efectos farmacológicos como son la hipotermia, hipotensión, sedación, inmunomodulación, depresión motora, inhibición de la motilidad intestinal y antinocicepción (Berrendero y Maldonado, 2002).

Se ha observado que el cannabidiol es un modulador alostérico de los receptores opioide μ y δ , propiedad que también comparte el THC (Kathmann *et al*, 2006). En ratas se ha visto que la administración de la combinación de bajas dosis de morfina y THC, producen una respuesta sinérgica antinociceptiva equiparable a la que se da con dosis mayores de ambos compuestos por separado. Sin embargo dicha combinación carece de los efectos de desensibilización de receptores y desarrollo de tolerancia, lo

que sería de gran utilidad en la práctica clínica (Cox *et al*, 2007; Smith *et al*, 2007). También se ha podido apreciar una interacción del sistema opioide – cannabinoide al administrar la combinación a bajas dosis de antagonistas de receptores opioides y CB1, dándose también una disminución de los efectos adversos que se producirían con dosis mayores de las drogas por separado (Tallet *et al*, 2008).

La acción antinociceptiva de los agonistas de CB2 puede estar mediada por la estimulación de la liberación de β -endorfinas, por células que expresan CB2, que actuarían sobre receptores opioides mu (Ibrahim *et al*, 2005).

Además, tanto el sistema opioide como el cannabinoide están implicados en los procesos de neurogénesis y neuroprotección (Narita *et al*, 2006; Sagredo *et al*, 2007).

6. PEZ CEBRA

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pequeño pez actinoptergio del Superorden *Teleostei*, Orden *Cypriniformes*, perteneciente a la Familia *Cyprinidae*. Este organismo de entre 3 y 5 cm de largo, posee un característico patrón de bandas de pigmentación a las que debe su nombre. Es originario de aguas dulces del sudeste asiático (Ganges y Brahmaputra).



Figura 3. pez cebra (*Danio rerio*)

6.1 PEZ CEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL

El pez cebra es un importante modelo experimental en la realización de estudios genéticos, desarrollo embrionario, neurofisiología y en biomedicina. Su pequeño tamaño permite mantener gran número de ellos en un espacio razonable. La transparencia y tamaño de los huevos, y su fertilización externa, permiten una fácil manipulación de los mismos (Spence *et al*, 2008). Además su rápido desarrollo permite distinguir fácilmente estructuras como notocorda, cerebro, corazón y ojos a las 24 horas tras la fertilización y a los cinco días ya se pueden observar la mayoría de los órganos internos.

Puesto que el pez cebra es un vertebrado, se puede emplear en el estudio del desarrollo de estructuras típicas de este grupo, como el sistema excretor, el corazón con varias cámaras, la hematopoyesis con múltiples líneas celulares, así como la formación

de la notocorda, tubo neural y crestas neurales. En otros modelos de vertebrados, que también son adecuados para llevar a cabo este tipo de estudios, no podrían realizarse técnicas de mutagénesis a gran escala, ya que estos animales presentan unos requerimientos mayores de espacio, mantenimiento y cría que encarecen los costes y los sitúan en desventaja frente al pez cebra (Dooley y Zon, 2000). El pez cebra fue el primer modelo en el que se realizó estudios de mutagénesis a gran escala, estos estudios fueron llevados a cabo principalmente por dos grupos de investigadores en Tübingen y Boston (Haffter *et al*, 1996; Driever *et al*, 1996).

Debido a su capacidad para incorporar moléculas disueltas en agua, el pez cebra también puede emplearse para estudiar las interacciones entre el genoma y el medio ambiente (Fishman, 2001). Asimismo, el pez cebra está siendo utilizado como organismo modelo para el descubrimiento y validación de nuevas dianas farmacológicas, así como en la búsqueda de nuevas drogas y estudios toxicológicos (Goldsmith, 2004).

También se ha señalado que el pez cebra es un sistema adecuado para determinar la funcionalidad de proteínas codificadas por el genoma humano, así como para estudiar el desarrollo del sistema nervioso e identificar anomalías metabólicas. También se está empleando para el estudio de ciertas enfermedades humanas, como desórdenes hematopoyéticos, anomalías cardiovasculares, problemas renales y algún tipo de sordera (Dooley y Zon, 2000). Enfermedades con un gran impacto en la sociedad, como la adicción, susceptibilidad a enfermedades infecciosas, cardiopatías y cáncer, parecen presentar un modo complejo de herencia poligenética. Una de las ventajas del pez cebra como modelo en el estudio de enfermedades es la posibilidad de hacer pruebas de supresión y potenciación genética de los genes que se cree que participan en la enfermedad, lo que permitiría localizar los genes que influyen en la susceptibilidad a dicha enfermedad.

Además, el pez cebra proporciona la oportunidad de estudiar la influencia genética sobre la integración de funciones neurológicas que afectan al comportamiento. Varios agentes farmacológicos que alteran la transmisión sináptica y la estabilidad de la membrana neuronal en humanos muestran actividades análogas en pez cebra, lo que sugiere la existencia de redes neuronales similares en estos organismos (Lieschke *et al*, 2007).

Existe una gran controversia en cuanto a los mecanismos intracelulares involucrados en el control del dolor crónico y en la aparición de tolerancia y dependencia a drogas de abuso (Corbett *et al*, 2006). Hasta el momento, los estudios realizados con otros modelos experimentales no han resuelto muchas de las discrepancias existentes.

Por todo lo mencionado anteriormente, el pez cebra puede ser extraordinariamente útil en investigación básica como modelo para el estudio de los mecanismos que controlan el dolor y median la analgesia y puede ser una herramienta muy valiosa en el diseño de nuevos analgésicos que carezcan de los indeseables efectos adversos que hoy en día presentan este tipo de drogas.

6.2 RECEPTORES CANNABINOIDES EN EL PEZ CEBRA

Los receptores cannabinoides fueron clonados por primera vez en rata (Matsuda *et al*, 1990; Munro *et al*, 1993), pero también han sido caracterizados en otras especies animales, entre ellas en peces, incluido el pez cebra (Yamaguchi *et al*, 1996; Rodríguez Martín *et al*, 2007), mostrando una alta conservación filogenética.

Para emplear este teleosteo como un organismo modelo para el estudio del dolor y de la drogodependencia, es necesario el estudio tanto del sistema cannabinoide como del sistema opioide, cuyo abordaje está siendo ampliamente acometido por nuestro grupo de investigación.

En los últimos años se han clonado y caracterizado en nuestro laboratorio el receptor cannabinoide zfCB2 (a/b), que presenta homología con el receptor cannabinoide CB2 en mamíferos (Rodríguez Martín *et al*, 2007) y cinco receptores de pez cebra semejantes a los receptores opioides de mamíferos, a los que se han denominado: zfDOR1 (ZFOR1) (*ZebraFish Opioid Receptor 1*), que presenta homología con el receptor opioide delta de mamíferos (Barrallo *et al*, 1998a y 1998b; Rodríguez *et al*, 2000); zfMOR (ZFOR2), que presenta homología con el receptor opioide mu (Barrallo *et al*, 2000); zfKOR (ZFOR3), que presenta homología con el receptor opioide kappa (Alvarez *et al*, 2006); zfDOR2 (ZFOR4), que parece ser un duplicado de zfDOR1 y, por ello, presenta mayor homología con el receptor opioide delta (Pinal-Seoane *et al*, 2006) y zfORL, que presenta homología con el receptor ORL (Rivas-Boyer, Tesis doctoral, 2003).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los receptores cannabinoides median la respuesta ejercida por los compuestos cannabinoides. Además de por sus efectos farmacológicos, estas sustancias son consumidas con fines lúdicos, dando lugar a la aparición de tolerancia y dependencia. Un mayor conocimiento del mecanismo de acción y función de los receptores cannabinoides en el Sistema Nervioso podría llevar a una mejor comprensión de los mecanismos endógenos que controlan el dolor, la tolerancia y la dependencia.

La exposición prenatal a cannabinoides produce modificaciones en los procesos de maduración de diversos neurotransmisores (Fernandez-Ruiz *et al*, 1999). El consumo materno de cannabis, durante el embarazo, puede originar déficits cognitivos, motores y sociales en la edad adulta del gestante (Migliarini *et al*, 2009). También existen evidencias de la influencia del sistema cannabinoide en la embriogénesis y el desarrollo del sistema nervioso de diversas especies animales, pero aún no están claros los mecanismos moleculares por los que se produce (Cottone *et al*, 2008; Watson *et al*, 2008).

Teniendo en consideración lo expuesto anteriormente nos planteamos como hipótesis la posibilidad de que el estudio de la influencia de los receptores cannabinoides en el desarrollo embrionario del pez cebra permita esclarecer los mecanismos por los que el sistema endocannabinoide actúa en el desarrollo.

Para comprobar esta hipótesis nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1- Cuantificar la expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*).
- 2- Aportar información sobre la implicación de los receptores cannabinoides en el desarrollo, que mediante otros modelos experimentales no se ha podido estudiar.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los peces zebra adultos pertenecen a la estirpe AB y proceden de *Zebrafish International Resource Center* (ZIRC) en la Universidad de Oregón, Estados Unidos. Dichos peces se mantienen a una temperatura de 26°C y ciclos de luz-oscuridad de 12h, en un sistema de peceras diseñado por ZFbiolabs (Madrid).

La manipulación de los animales se hizo acorde a lo establecido en la directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de julio del 2003, así como según lo sugerido en la Declaración de Helsinki, y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio, adoptada y promulgada por el *U.S. National Institute of Health* y el Comité Ético Español

1.1 OBTENCIÓN DE EMBRIONES

Para la obtención de embriones de pez cebra empleamos un sistema de cría en parideras. La puesta tiene lugar tras el primer estímulo luminoso del día, el cual desencadena el desove de las hembras y liberación de esperma por los machos, de manera que al regular el fotoperíodo, estableciendo el momento de exposición a la luz, se puede controlar la puesta. Se recogen los embriones, del fondo de las parideras, en un tamiz, pasándose a placa Petri con medio E₃ (compuesto por sales y agua destilada). Los embriones se mantienen en un incubador, a 28 °C (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002), hasta alcanzar la edad correspondiente.

Se utilizaran embriones correspondientes a 12 estadios diferente (0.5, 2.75, 3, 8, 16, 19, 22, 24, 30, 48, 60, 72 horas postfertilización, hpf).

2. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE EMBRIONES:

Para la extracción de RNA total de embriones se utilizó como reactivo TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del protocolo establecido por el fabricante, que es una modificación del método de extracción en un solo paso de Chomczynski y Sacchi (1987). Este reactivo protege el RNA de contaminación por

RNAsas. Se homogeneizaron las muestras de embriones en *Trizol* con un homogeneizador (*Polytron 2100*, kinematica) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, por adición de cloroformo (200 µl por ml de *Trizol*) y centrifugación a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, se realizó la extracción selectiva de RNA por separación de fases. El RNA, obtenido en la fase acuosa, se precipitó con un volumen de isopropanol igual a la mitad del *Trizol* utilizado en el primer paso y se centrifugó a 12000 g durante 10 min. a 4 °C. A continuación tras retirar el isopropanol, el pellet obtenido se lavó con un volumen de etanol 70 % y se centrifugó a 7000 g durante 5 min a 4 °C. Finalmente, el pellet lavado se resuspendió en agua DEPC (dietilpirocarbonato 0.1 %, Sigma), incubando a 60 °C durante 10 min para favorecer la resuspensión del RNA. La concentración de RNA obtenido fue determinada mediante análisis por Bioanalyzer de Agilent por la unidad de genómica y proteómica del CIC (Centro de investigación del cáncer).

3. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para el diseño de oligonucleótidos primero debemos seleccionar y copiar la secuencia del gen a estudiar (ZFIN), y posteriormente buscar la ORF y los exones que la componen (*Ensembl*). Después seleccionamos las secuencias sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) según el tamaño de amplicón que nos interese. Mediante un programa bioinformático (*Sequence manipulation suite*) comprobamos que cumpla una serie de requisitos respecto a temperatura, anillamientos inespecíficos y contenido en guaninas y citosinas. Los oligonucleótidos y tamaño de amplicón utilizados fueron los siguientes:

Gen	Oligonucleótido <i>forward</i>	Oligonucleótido <i>reverse</i>	Amplicón (pares de bases)
CB1	5'-ATCGCTGATGTCCATGTAAGC-3'	5'-CATTGGAGCCGATGTACTGC-3'	180
CB2	5'-TAGCACACTGTGTCTGGTGAAC-3'	5'-TAGCACACTGTGTCTGGTGAAC-3'	202
EF1α	5'-GTACTTCTCAGGCTGACTGTG-3'	5'-ACGATCAGCTGTTTCACTCC-3'	136

Tabla 1. Secuencias correspondiente a los oligonucleotidos empleados en la amplificación de los genes a estudiar CB1 y CB2 y para el gen control EF1α. Tamaño de amplicón en número de pares de bases.

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (RT- qPCR)

Hemos estudiado la expresión temporal de los receptores cannabinoides durante el desarrollo embrionario del pez cebra mediante la técnica de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa. Esta técnica presenta una serie de ventajas respecto a la PCR básica o tradicional ya que la detección de la amplificación se produce en la primera fase de la reacción, en la fase exponencial, donde la reacción es más precisa y específica y permite detectar una concentración menor de producto. En la PCR básica la detección se da al final de la reacción que es menos precisa y se utilizan geles de agarosa que tienen una menor resolución.

La PCR a tiempo real consta de varias etapas: una vez extraído el RNA total se realizará un retrotranscripción para obtener cDNA (DNA copia) y posteriormente se efectúan las qPCRs, se obtendrán unos valores Ct (threshold cycle) y finalmente se analizan los resultados. Denominamos valor Ct al ciclo en el cual la reacción alcanza el umbral de detección de fluorescencia. Mediante ésta técnica extrapolamos el valor Ct, obtenido para las muestras experimentales, en una recta estándar de la cual conocemos el número de copias. Además debemos normalizar la expresión de los genes a estudiar, para la normalización empleamos EF1 α como control positivo en su calidad de gen constitutivo, que se expresa por igual en todas las células del organismo.



Figura 4. Representación de amplificación. La línea umbral (Threshold) representa el momento a partir del cual se detecta la fluorescencia (Rn) emitida durante la amplificación. Ct es el ciclo en el cual la reacción cruza dicha línea. La señal detectada se asocia al incremento exponencial del producto de PCR.

Por tanto, para cuantificar el producto de PCR es necesario establecer, a partir de DNAs de concentración conocida, una recta estándar para cada uno de los genes que queremos estudiar. Se considera que ésta es adecuada cuando el valor de su pendiente se encuentra entre -3 y -4, siendo el valor ideal de -3.3, que indicaría una variación del valor C_t de 3.3 unidades entre dos diluciones de concentración consecutiva y una eficiencia de la reacción del 100%, es decir que la cantidad de producto de PCR es exactamente el doble en cada ciclo.

Para la elaboración de la recta patrón primero tenemos que obtener cDNA a partir de RNA total, mediante retrotranscripción. Para ello se utilizó el Kit *Reverse Transcription System* (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. El kit está compuesto por transcriptasa inversa AMV, $MgCl_2$ 25mM, Buffer, una mezcla de dNTP (dinucleósidos trifosfato), inhibidor de ribonucleasas *Recombinant RNasin*[®], oligonucleótido oligo(dt)₁₅ y agua libre de RNasas. Inicialmente se desnaturalizó, a 70°C durante 10 min, una mezcla de RNA total y oligonucleotido, después se añadió 15 µl de la mezcla del resto de componentes y la reacción se sometió durante 5 min a 25 °C, lo que permite que el cebador anille con el RNA molde; posteriormente se incubó a 42 °C durante 1 h, para que la retrotranscriptasa sintetice el cDNA. Finalmente la enzima se inactivó incubando la mezcla 15 min a 70 °C.

Sobre el cDNA obtenido realizamos una PCR básica o tradicional empleando *PCR Master Mix* (Promega). Se mezcló la solución *Master Mix*, con el cDNA y un par de oligonucleótidos previamente diseñados para amplificar el fragmento correspondiente al gen que queremos cuantificar.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 de Applied Biosystem. Siempre se realizó una reacción sin DNA molde como control negativo.

Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa del 1.8%. Como tampón de electroforesis utilizamos TBE 0.5X. Junto con los productos de electroforesis se separó en paralelo un marcador de peso molecular, DanaMarker Beethoven (GeneDan), que permite discriminar fragmentos de pares de bases de distinto tamaño. Para monitorizar la migración del DNA en el gel se utilizó un tampón de carga, *GelPilot DNA Loading Dye* (QIAGEN), que contenía tres colorantes: azul de bromofenol, cianol de xileno y naranja G. La electroforesis se llevó a cabo bajo una

diferencia de potencial constante de 100-120V. La visualización del DNA tras la migración se debe a un agente intercalante, el bromuro de etidio (BIORAD), que se añade al gel antes de su polimerización. Este reactivo actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emitiendo fluorescencia al exponerse a la luz ultravioleta (Johnson y Grosman, 1977) del transiluminador (BIORAD).

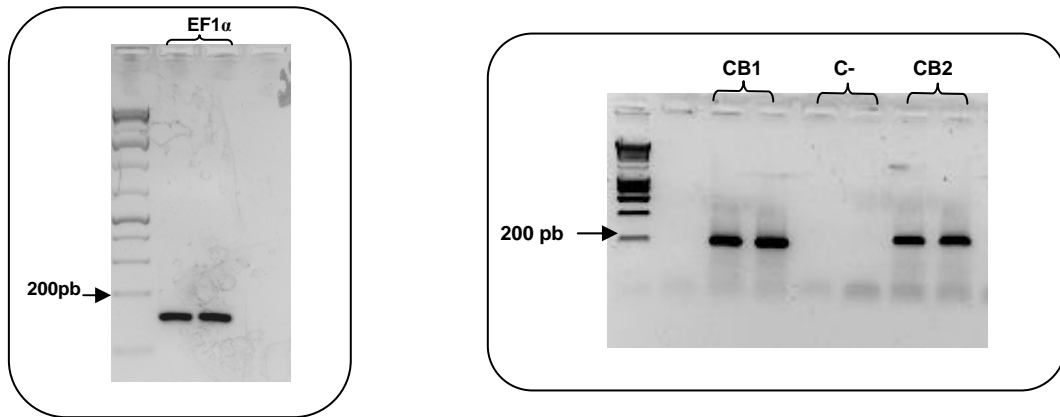


Figura 5. Producto de PCR. Amplificación de los dos receptores cannabinoides y del gen control EF1 α , con los oligonucleótidos que se utilizarán en la qPCR.

Los fragmentos de DNA amplificados se presentan como bandas en el gel de agarosa. Aislamos y recortamos dichas bandas para proceder a su purificación con el *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Después medimos la concentración del producto de PCR purificado, correspondiente a los receptores cannabinoides de pez cebra CB1 y CB2, mediante el método de *Quant-It™ PicoGreen® ds DNA reagent Kit* (Invitrogen), que permite detectar pequeñas cantidades de DNA por fluorescencia. Hacemos diluciones seriadas 1:10, de los productos que hemos medido, con un espectro de concentración que vaya desde 1ng/ μ l hasta 1x10⁻⁹ng/ μ l.

Estas diluciones las utilizaremos como muestras para realizar qPCRs y así obtener finalmente la recta patrón para cada receptor; hemos empleado las 4 diluciones consecutivas que mejor pendiente proporcionaban. Para estas reacciones se utilizó *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), este reactivo incluye *AmpliTaq Gold®* DNA polimerasa, nucleótidos, *buffer*, MgCl₂ y el colorante *SYBR® Green*, que tiene gran afinidad por el DNA de doble cadena y a medida que transcurre la reacción incrementa su fluorescencia al unirse a los productos de PCR. Cada reacción lleva 10 μ l de *Power SYBR® Green* (2X), 1 μ l de la dilución correspondiente, 0.8 μ l de

oligonucleótido sentido y 0.8µl de oligonucleótido antisentido y 7.4µl de agua libre de nucleasas. El programa de amplificación consiste 50°C durante 2 minutos y 95°C 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C 1 minuto (excepto para CB1 que la temperatura de anillamiento es de 58°C).

Para las reacciones correspondientes a los estadios embrionarios se empleó *Power SYBR® Green RNA-to-Ct™ 1 step kit* (Applied Biosystems), que además de contener *Power SYBR® Green PCR Master Mix* también incluye una retrotranscriptasa, de manera que permite realizar la retrotranscripción para obtener el cDNA de los estadios y la qPCR en el mismo programa. Para lo cual se añade al programa de amplificación descrito anteriormente una etapa inicial de 30 minutos a 48°C. Las qPCRs se hicieron por triplicado en cada experimento.

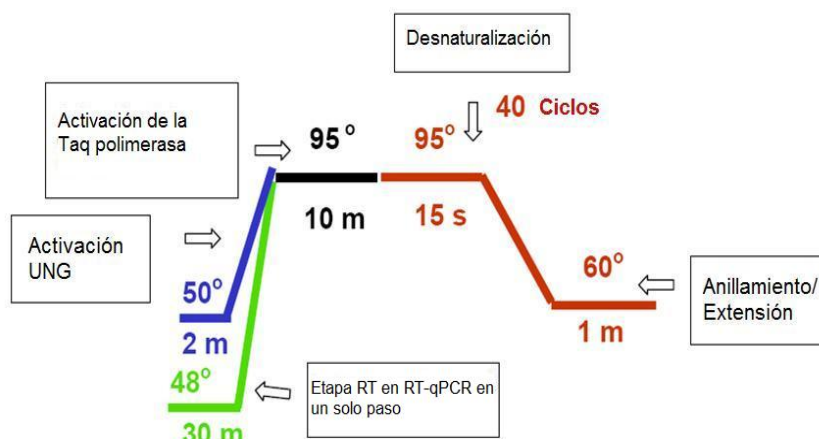


Figura 6. Esquema que representa el programa y las condiciones térmicas recomendadas para una reacción estándar de PCR cuantitativa a tiempo real. Para la RT-qPCR en un solo paso, la etapa de activación UNG se sustituirá por la etapa RT. Adquirida de Applied Biosystem.

Para calcular el número de copias (g/molécula) de producto final de PCR que hay en cada reacción emplearemos la siguiente fórmula:

- $\text{g/mol} = \text{N}^\circ \text{ de pares de bases del amplicon} \times (330 \text{ Da} \times 2 \text{ nucleótidos/par de bases})$
- $(\text{g/mol}) / \text{n}^\circ \text{ avogadro } 6.023 \times 10^{23} = \dots \text{g/molécula} \approx \text{N}^\circ \text{ de copias}$
- $\text{Concentración amplicón purificado } (\text{ng}/\mu\text{l} \times 10^{-9} \text{g/ng}) / (\text{N}^\circ \text{ copias}) = \text{moléculas}/\mu\text{l cDNA de cada estadio embrionario sobre el cual amplificaremos cada receptor en estudio.}$

RESULTADOS

1. RECEPTOR CB1

En la representación del perfil de expresión de CB1 (figura 7), podemos observar un pico muy claro a las 8 hpf. Después la expresión decae considerable y progresivamente hasta las 30 hpf y no vuelve a detectarse incremento hasta las 48 hpf. Se empleó como gen control EF1 α (figura 9).

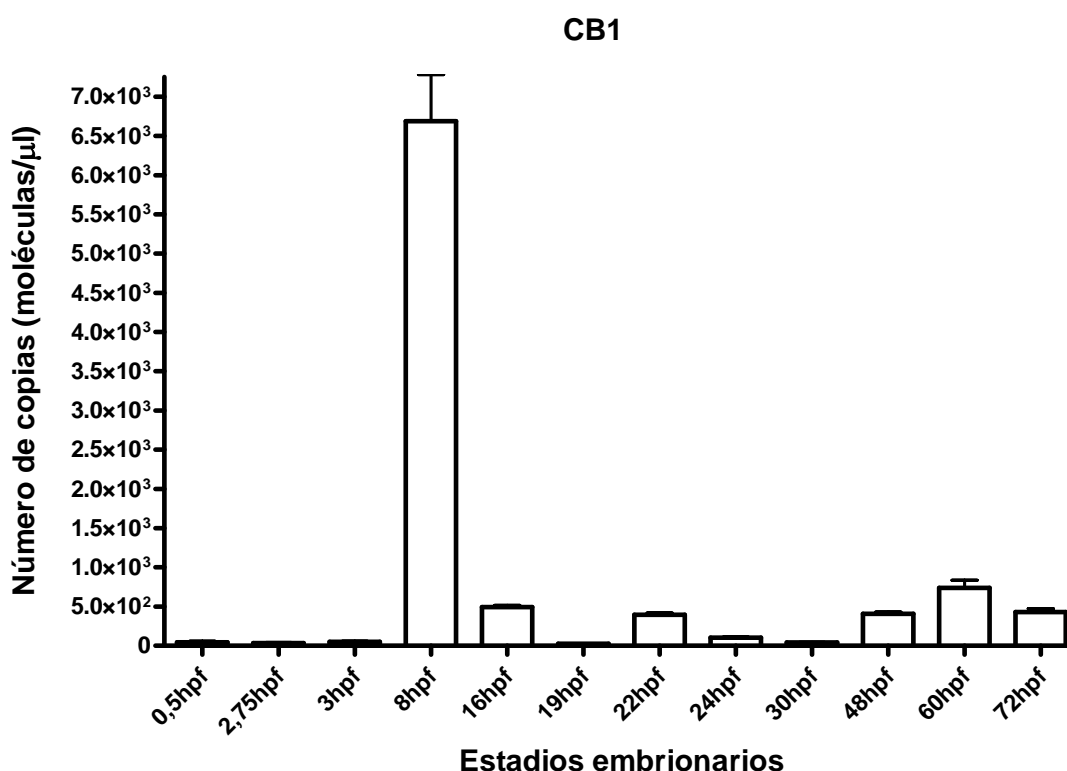


Figura 7. Representación gráfica del número de copias del receptor CB1 en 100 ng de RNA de cada uno de los 12 estadios embrionarios en estudio. Cada barra representa la media del número de copias de mRNA de CB1 en cada estadio \pm SEM.

Estadios	0.5 hpf	2.75 hpf	3 hpf	8 hpf	16 hpf	19 hpf
Nº Copias	45.794	34.823	49.506	6688.273	493.598	24.05

Estadios	22 hpf	24 hpf	30 hpf	48 hpf	60 hpf	72 hpf
Nº Copias	393.776	103.286	41.982	406.176	737.999	430.561

Tabla 2. Cuantificación absoluta del número de transcritos del receptor CB1 amplificados en 100ng de RNA de cada estadio embrionario.

2. RECEPTOR CB2

El perfil de expresión de CB2 presenta cierta similitud con CB1, con la diferencia de que el número de copias para CB2 es mucho menor. Dándose también un pico de expresión a las 8 hpf y produciéndose un aumento progresivo de la expresión a partir de las 30 hpf. Como gen control se utilizó EF1 α (figura 9)

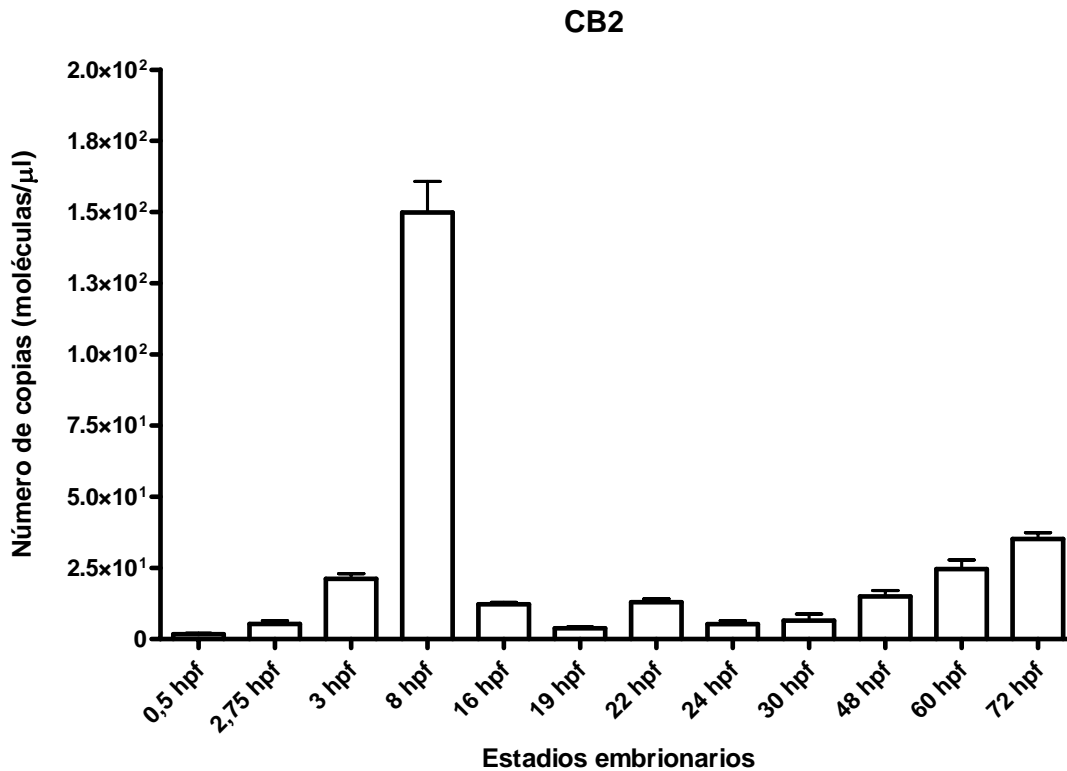


Figura 8. Representación gráfica del número de copias del receptor CB2 en 100 ng/ μ l de RNA de cada uno de los 12 estadios embrionarios en estudio. Cada barra representa la media del número de copias de mRNA de CB2 en cada estadio \pm SEM.

Estadios	0.5 hpf	2.75 hpf	3 hpf	8 hpf	16 hpf	19 hpf
Nº Copias	1.709	5.346	21.104	149.798	12.210	3.789

Estadios	22 hpf	24 hpf	30 hpf	48 hpf	60 hpf	72 hpf
Nº Copias	12.927	5.298	6.539	14.929	24.573	35.118

Tabla 3. Cuantificación absoluta del número de transcritos del receptor CB2 amplificados en 100ng de RNA de cada estadio embrionario.

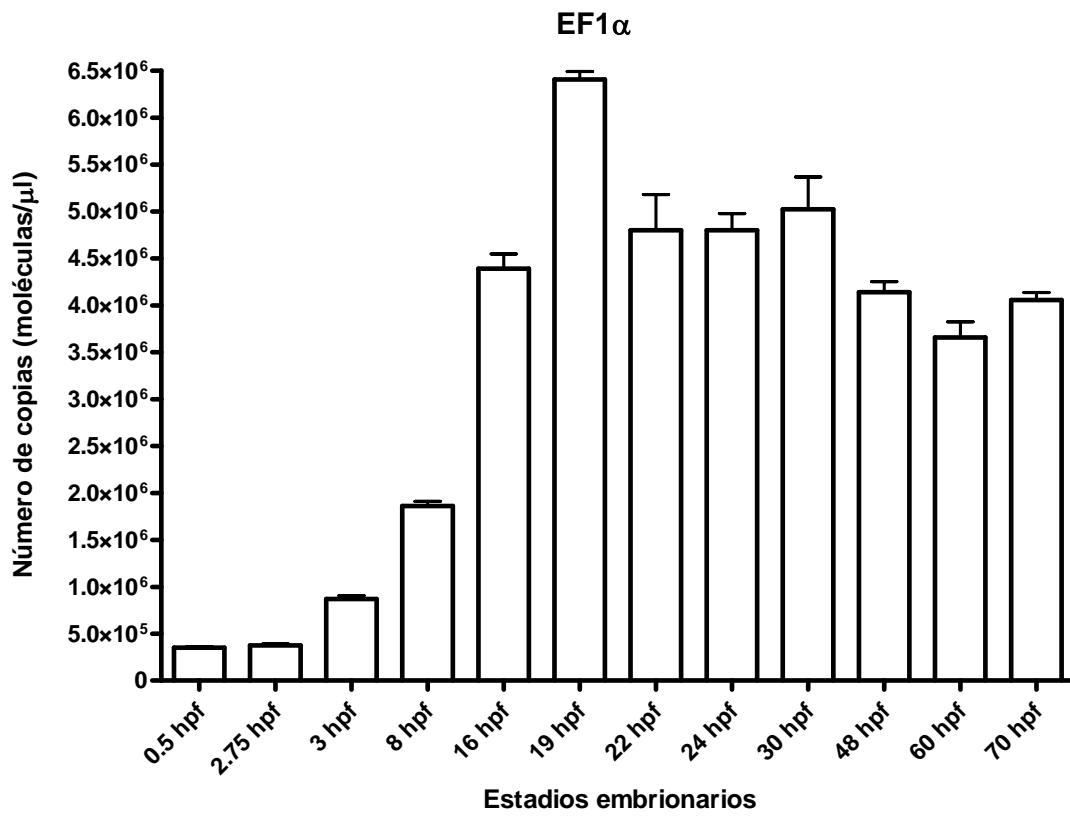


Figura 9. Representación gráfica del número de copias del gen control EF1 α en 100 ng/ μ l de RNA. Cada barra representa la media del número de copias de mRNA de EF1 α en cada estadio \pm SEM.

DISCUSIÓN

El sistema cannabinoide interviene de alguna manera en el desarrollo embrionario, la neurogénesis y neuroprotección, además de estar involucrado en procesos de tolerancia y dependencia a drogas. Los modelos experimentales utilizados hasta el momento no han logrado esclarecer por completo los mecanismos moleculares que se dan en estos procesos. Por ello, con el objeto de contribuir al conocimiento de los mecanismos por los que se produce esta implicación, en este trabajo nos propusimos estudiar la expresión de los receptores cannabinoide durante los diferentes estadios embrionarios del pez cebra. Trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado la relación que existe en la caracterización molecular y farmacológica entre receptores opioides y cannabinoide de pez cebra y de mamíferos, probando así la conveniencia del pez cebra como modelo experimental en el estudio de los mecanismos de dolor y drogodependencia.

Comparando las secuencias proteicas de los receptores cannabinoide CB1 y CB2 del pez cebra (*Danio rerio*), observamos que presentan cierta homología con los receptores cannabinoide del ratón (*Mus musculus*), la rata (*Rattus norvegicus*), la rana (*Xenopus laevis*), pez (*Takifugu rubripes*) y el hombre (*Homo sapiens*). La homología que presenta el receptor CB1 de pez cebra (zfCB1) con los receptores cannabinoide de mamíferos es mucho mayor que la que se da con zfCB2. En la tabla 4 están representados, en porcentaje, estos valores.

mCB1	hCB1	xpCB1	zfCB1	tfCB1b	mCB2	rtCB2	hCB2	zfCB2	
99	97	84	70	61	43	38	40	36	rCB1
	97	84	70	61	43	38	40	36	mCB1
		83	69	60	42	36	39	36	hCB1
			69	60	42	35	39	36	xCB1
				64	44	37	41	37	zfCB1
					40	35	39	36	tfCB1b
						92	82	40	mCB2
							80	35	rtCB2
								39	hCB2

Tabla 4. Valores de homología entre receptores cannabinoide. Obtenida tras realizar la comparación tipo *Clustal W*, de las secuencias proteicas de dichos receptores

En el filograma (figura 9) podemos ver las diferencias evolutivas de los receptores cannabinoides. El receptor CB1 del pez cebra, se separa en una misma rama junto a los receptores CB1 de mamíferos.

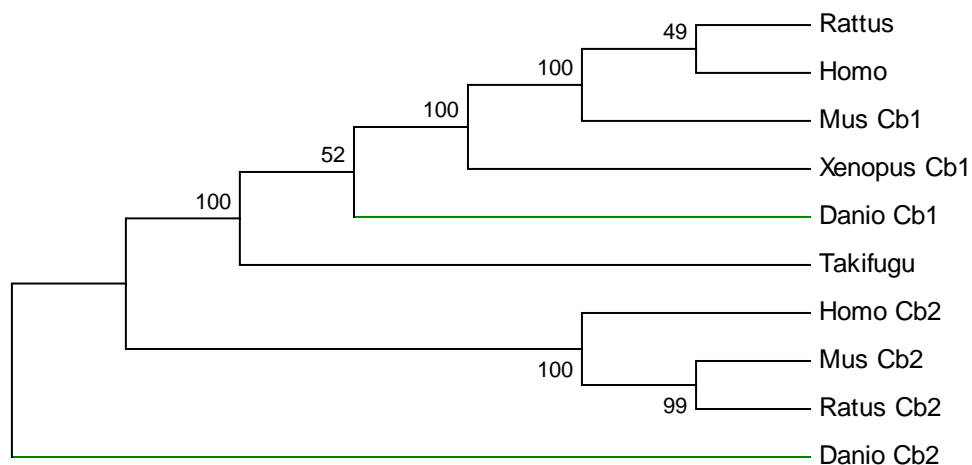


Figura 10. Filograma generado mediante el método “neighbor joining” a partir del alineamiento de las secuencias proteicas de los receptores cannabinoides de distintas especies. La numeración indica el número de veces que, de cada 100 replicas del agrupamiento, las ramas se separan de igual forma. Para hacer el filograma se utilizó el programa MEGA versión 4.0.2.

1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN

Lo primero que hay que destacar es la escasa expresión que se manifiesta tanto para el receptor CB1 como para CB2.

En el pez cebra, la maquinaria de transcripción del embrión no se activa hasta las 2.75 hpf (transición midblástula), los transcritos que aparecen antes de este momento serán de origen materno.

1.1 EXPRESION DE zfCB1

La expresión de zfCB1 estudiada mediante RT-qPCR varía a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra. En las primeras horas del desarrollo el número de copias es muy bajo, por lo que la influencia de mRNA materno es mínima. El primer aumento de la expresión, que se corresponde con el mayor número de copias que se da en todo el estudio, aparece a las 8 hpf. En este momento ya no hay transcritos maternos, la maquinaria de transcripción embrionaria esta completa, todo el mRNA detectado es propio. Este estadio corresponde con el periodo de gastrulación, en el cual se produce

involución celular por movimientos morfogenéticos y se originaran el disco germinal, las capas germinales y los ejes embrionarios. El epiblasto formará al término de la gastrulación al ectodermo el cuál posteriormente dará origen a tejidos como la epidermis y el sistema nervioso central. Y el hipoblasto originará el mesodermo y ectodermo. Después la expresión disminuye notablemente, siendo mínima a las 19, 24 y 30 hpf. Durante el periodo de segmentación (10-24 hpf) empiezan a desarrollarse los somitas y a hacerse visible la aparición de los órganos primarios, tubo neural, el brote de la cola se hace más prominente, se da la diferenciación de neuronas motoras y aparecen los primeros movimientos. Dentro del periodo de segmentación la mayor expresión se observa a las 16 y 22 hpf. A las 16hpf (14-19 somitas) ya podemos distinguir las cuatro subdivisiones encefálicas, el telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo; y algunos somitas empiezan a transformarse en miotomos que posteriormente originaran la musculatura. Observando la gráfica de expresión (figura 7) podríamos decir que apenas se produce en el periodo de farínula. En el periodo de eclosión (48-72 hpf) vuelve a manifestarse un aumento del número de copias. En este periodo finaliza la morfogénesis de los órganos, que ya es casi completa, se forman los cartílagos de la mandíbula, las branquias y el aparato circulatorio se hace visible por lo que este receptor esta relacionado con la morfogénesis de estos órganos.

1.2 EXPRESION DE zfCB2

El perfil de expresión de zfCB2 es muy similar al que se da para zfCB1, por lo que podemos aplicar para este receptor lo dicho en el apartado anterior para el receptor cannabinoide CB1 de pez cebra. No obstante, el nivel de expresión es mucho menor, siendo prácticamente nulo desde el periodo de cigoto hasta la transición midblastula. Lo que querría decir que no hay transcritos maternos, y todos los que se detecten posteriormente serán de origen embrionario. Por tanto el que comiencen a aparecer estas copias, hace pensar que este receptor si desempeñaría un papel en el desarrollo.

Debido al bajo nivel de expresión que hemos obtenido no podemos hacer ninguna afirmación con certeza. Sin embargo el aumento de expresión que empieza a darse en los últimos estadios embrionarios, para ambos receptores, hace que nos planteemos si están relacionados con el desarrollo de órganos que se forman en esta última etapa, a partir de las 48 hpf, y si esto se seguirá produciendo más adelante, para lo cual habría que ampliar el estudio a estadios más avanzados.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados y los objetivos propuestos nos llevan a las siguientes conclusiones:

Objetivo 1: Cuantificar la expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*).

1a. Los receptores cannabinoides CB1 y CB2 exhiben expresión semejante en los estadios embrionarios.

1b. El aumento de los niveles de expresión de CB1 y CB2, producidos a partir de las 48 hpf sugieren un papel de dichos receptores en los acontecimientos que se dan en la última etapa del desarrollo embrionario.

1c. El bajo nivel de expresión detectado para los receptores cannabinoides en estadios embrionarios hace necesario seguir investigando y ampliar el estudio a estadios larvarios.

Objetivo 2: Aportar información sobre la implicación de los receptores cannabinoides en el desarrollo, que mediante otros modelos experimentales no se ha podido estudiar.

Debido al escaso nivel de expresión de los receptores cannabinoides en los estadios embrionarios del pez cebra hace que este modelo experimental, a diferencia con otro tipo de receptores, tampoco pueda aportar nueva información en relación a otros modelos experimentales

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA** (2008). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edn. *Br J Pharmacol.* 153 (Suppl. 2): S1–S209.
- Anand P, Whiteside G, Fowler CJ, Hohmann AG.** (2009). Targeting CB(2) receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. *Brain Res Rev.* 60(1):255-66.
- Anand U, Otto WR, Sanchez-Herrera D, Facer P, Yiangou Y, Korchev Y, Birch R, Benham C, Bountra C, Chessell IP, Anand P.** (2008). Cannabinoid receptor CB2 localisation and agonist-mediated inhibition of capsaicin responses in human sensory neurons. *Pain.* 138(3):667-80.
- Atance Ramos JA y Fernández Ruíz JJ.** (2000b). Uso de los cannabinoides a través de la historia. En Monografía cannabis. *Adicciones.* 12(2):31-41.
- Barrallo A., Gonzalez-Sarmiento R., Alvar F., Rodríguez R.E.** (2000). ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 48(1-2): 1-6.
- Barrallo A., Gonzalez-Sarmiento R., Porteros A., García-Isidoro M., Rodríguez, R.E.** (1998a). Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245(2): 544-548.
- Begbie J, Doherty P, Graham A.** (2004). Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo. *J Anat.* 205(3):213-8.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D.** (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 277:1094–7.
- Berrendero F, Maldonado R.** (2002). Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl).* 163(1):111-7.
- Berrendero F, García-Gil L, Hernández ML, Romero J, Cebeira M, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ.** (1998). Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development.* 125(16):3179-88.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF.** (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol.* 14(12):1309-11.
- Brown AJ.** (2007). Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 152(5):567-75.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E.** (1998). Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience.* 82(4):1131-49.
- Cacciola G, Chioccarelli T, Ricci G, Meccariello R, Fasano S, Pierantoni R, Cobellis G.** (2008). The endocannabinoid system in vertebrate male reproduction: a comparative overview. *Mol Cell Endocrinol.* 16;286(1-2 Suppl 1):S24-30.
- Campbell JM, Thompson R.** (1949). A dictionary of Assyrian Botany. *The British Academy*, London.
- Chopra IC y Chopra RN.** (1957). The use of cannabis drugs in India. *Bull. Narc.* 9: 4-29.
- Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B.** (2008). Antihyperalgesic effect of a Cannabis sativa extract in a rat model of neuropathic pain: mechanisms involved. *Phytother Res.* 22(8):1017-24.
- Corbett AD, Henderson G, McKnight AT, Paterson SJ.** (2006) 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1:S153-62.
- Cottone E, Guastalla A, Mackie K, Franzoni MF.** (2008). Endocannabinoids affect the reproductive functions in teleosts and amphibians. *Mol Cell Endocrinol.* 16;286(1-2 Suppl 1):S41-5.
- Cox ML, Haller VL, Welch SP.** (2007). Synergy between delta9-tetrahydrocannabinol and morphine in the arthritic rat. *Eur J Pharmacol.* 567(1-2):125-30.
- De Fonseca FR, Schneider M.** (2008). The endogenous cannabinoid system and drug addiction: 20 years after the discovery of the CB1 receptor. *Addict Biol.* 13(2):143-6.

- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A and Mechoulam R.** (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor". *Science (Wash DC)*; 258: 1946-1949.
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, y Howlett AC.** (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34: 605-613.
- Di Marzo V.** (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov.* 7(5):438-55.
- Dooley, K., Zon, L.I.** (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 10:252-256.
- Driever W, Solnica-Krezel L, Shier AF, Neuhauss SCF, Malicki J, Stemple DL, Stainier DYR, Zwartkruis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J, Boggs C.** (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development.* 123: 37-46.
- Fattore L, Deiana S, Spano SM, Cossu G, Fadda P, Scherma M, Fratta W.** (2005). Endocannabinoid system and opioid addiction: behavioural aspects. *Pharmacol Biochem Behav.* 81(2):343-59.
- Fernández-Ruiz JJ, Berrendero F, Hernández ML, Romero J, Ramos JA.** (1999) Role of endocannabinoids in brain development. *Life Sci.* 65(6-7):725-36.
- Fishman MC.** (2001). Zebrafish – the canonical vertebrate. *Science* 294: 1290–1291.
- Gaoni Y and Mechoulam R.** (1964). Isolation, structure, elucidation and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1646-7.
- Grotenhermen F.** (2004). Pharmacology of cannabinoids. *Neuro Endocrinol Lett.* 25(1-2):14-23.
- Guindon J, Hohmann AG.** (2008). Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol.* 153(2):319-34.
- Goldsmith P.** (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr. Op. In Pharmacol.* 4: 504-512.
- Habayeb OM, Taylor AH, Bell SC, Taylor DJ, Konje JC.** (2008). Expression of the endocannabinoid system in human first trimester placenta and its role in trophoblast proliferation. *Endocrinology.* 149(10):5052-60.
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nusslein-Volhard C,** (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio.* *Development* 123: 1-36.
- Haller VL, Stevens DL, Welch SP.** (2008). Modulation of opioids via protection of anandamide degradation by fatty acid amide hydrolase. *Eur J Pharmacol.* 14; 600(1-3):50-8.
- Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J.** (2008). Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol.* 286(1-2 Suppl 1):S84-90.
- Harkany T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K.** (2007). The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci.* 28(2):83-92.
- Harrison RH.** (1966). Healing herbs of the Bible, E.J. Brill. *Leiden.*
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC.** (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1932-1936.
- Hosking RD and Zajicek JP.** (2008). Therapeutic potential of cannabis in pain medicine. *British Journal of Anaesthesia.* 101 (1): 59–68
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG.** (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54(2):161-202.
- Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan TP Jr.** (2005). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(8):3093-8.

- Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C, Schlicker E.** (2006). Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 372(5):354-61.
- Kimmael CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 203(3):253-310.
- Kishimoto S, Muramatsu M, Gokoh M, Oka S, Waku K, Sugiura T.** (2005). Endogenous cannabinoid receptor ligand induces the migration of human natural killer cells. *J Biochem.* 137:217-23.
- Leichsenring A, Andriske M, Bäcker I, Stichel CC, Lübbert H.** (2009). Analgesic and antiinflammatory effects of cannabinoid receptor agonists in a rat model of neuropathic pain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 379(6):627-36.
- Lieschke GJ, Currie PD.** (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 8(5):353-67.
- Li HL and Lin H.** (1974). An archaeological and historical account of cannabis in China. *Econ. Bot.* 28: 437-48.
- Manzanares J, Julian M, Carrascosa A.** (2006). Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr Neuropharmacol.* 4(3):239-57.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI.** (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346: 561-4.
- Mayoral M, Calderón H, Cano R, Lombardero M.**(2008). Allergic rhinoconjunctivitis caused by Cannabis sativa pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 18(1):73-4.
- McCarberg BH, Barkin RL.** (2007). The future of cannabinoids as analgesic agents: a pharmacologic, pharmacokinetic, and pharmacodynamic overview. *Am J Ther.* 14(5):475-83.
- Mechoulam R.** (1986). The pharmacohistory of Cannabis sativa. *En Cannabinoids as therapeutic agents.* Mechoulam R, ed., CRC Press. Boca Raton FL, pgs. 1-19.
- Migliarini B, Carnevali O.** (2009). A novel role for the endocannabinoid system during zebrafish development. *Mol Cell Endocrinol.* 27;299(2):172-7.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M.** (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature (Lond).* 365: 61-65.
- Naguib M, Diaz P, Xu JJ, Astruc-Diaz F, Craig S, Vivas-Mejia P, Brown DL.** (2008) MDA7: a novel selective agonist for CB2 receptors that prevents allodynia in rat neuropathic pain models. *Br J Pharmacol.* 155(7):1104-16.
- Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y, Suzuki T.** (2006). Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem.* 97(5):1494-505.
- Nüslein-Volhard C, Wieschaus E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 287: 795-801.
- O'Shaughnessy WB.** (1842). On the preparation of Indian hemp or gunjah. *Trans. Med. Phys. Soc.* Bombay, 8: 421-61.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G.** (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 58(3):389-462.
- Palazuelos J, Davoust N, Julien B, Hatterer E, Aguado T, Mechoulam R, Benito C, Romero J, Silva A, Guzmán M, Nataf S, Galve-Roperh I.** (2008). The CB(2) cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. *J Biol Chem.* 9;283(19):13320-9.
- Páldyová E, Bereczki E, Sántha M, Wenger T, Borsodi A, Benyhe S.** (2008) Noladin ether, a putative endocannabinoid, inhibits mu-opioid receptor activation via CB2 cannabinoid receptors. *Neurochem Int.* 52(1-2):321-8
- Piomelli D.** (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 4(11):873-84.
- Rivas Boyero A.A.** (2003). Clonación y caracterización del receptor ORL en pez cebra (*Danio rerio*). Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.

- Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M.** (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* 40(1):2-14.
- Rodríguez JJ, Mackie K, Pickel VM.** (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in m-opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus. *J Neurosci.* 21:823.
- Rodríguez-Martin I, de Velasco EM, Rodríguez RE.** (2007). Characterization of cannabinoid-binding sites in zebrafish brain. *Neurosci Lett.* 21;413(3):249-54.
- Rodríguez-Martin I, Herrero-Turrion MJ, Marron Fdez de Velasco E, Gonzalez-Sarmiento R, Rodríguez RE.** (2007). Characterization of two duplicate zebrafish Cb2-like cannabinoid receptors. *Gene.* 389(1):36-44.
- Rosenthal F.** (1971). The Herb: Hashish versus medieval Muslim society. *Brill.* The Netherlands
- Russo EB.** (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers.* 4(8):1614-48.
- Sagredo O, García-Arencibia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J.** (2007). Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol.* 36(1):82-91.
- Sanchez-Simon FM, Rodríguez RE.** (2008) Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. *Neuroscience.* 151(1):129-37.
- Smith PA, Selley DE, Sim-Selley LJ, Welch SP.** (2007). Low dose combination of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol circumvents antinociceptive tolerance and apparent desensitization of receptors. *Eur J Pharmacol.* 571(2-3):129-37.
- Spence R., Jordan W.C., Smith C.** (2006). Gene análisis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. *Front Zool.* 5: 3-5.
- Sundram S.** (2006) Cannabis and neurodevelopment: implications for psychiatric disorders. *Hum Psychopharmacol.* 21(4):245-54.
- Svíženská I, Dubový P, Sulcová A** (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures — A short review, *Pharmacol Biochem Behav* 90(4):501-11.
- Szabo B.** (2008). Pharmacology of cannabinoid receptors. *Biotrends review* No.2.
- Tallett AJ, Blundell JE, Rodgers RJ.** (2008). Endogenous opioids and cannabinoids: system interactions in the regulation of appetite, grooming and scratching. *Physiol Behav.* 94(3):422-31.
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A.** (2008) The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci.* 38(1):89-97.
- Wilson RI, Nicoll RA.** (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature (Lond)* 410:588–92.
- Wood TB, Spivey WT, Easterfield TH.** (1899).Cannabinol, Part 1. *J. Chem. Soc.* 75: 20-36.
- Yamaguchi F, Macrae AD, Brenner S.** (1996). Molecular cloning of two cannabinoid type 1-like receptor genes from the puffer fish *Fugu rubripes*. *Genomics.* 35: 603-605.
- Zhang J, Chen C.** (2008). Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation. *J Biol Chem.* 283(33):22601-11.

ANEXOS

ANEXO 1

Clustal W de los receptores cannabinoides en distintas especies animales. El asterisco (*) indica los residuos idénticos, los dos puntos (:) un cambio conservativo y el punto (.) un cambio semiconservativo.

```
Rattus CB1 -----MKSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIKGDMSKLGYPQKFPPLT 51
Mus CB1 -----MKSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIKGDMSKLGYPQKFPPLT 51
Homo CB1 -----MKSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIKGDMSKLGYPQKFPPLT 51
Xenopus CB1 -----MKSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIKGDMSKLGYPQKFPPLT 51
Danio CB1 MLFPASKSDVKSVDLGVAEITTFRTITSGLQYIGSNDIGYDDHIIDGDFSKSGYPLPKPFA 60
Takifugu CB1 -----MKLALHRIAGATMAALTTEVQYLGSDASYEDPQADAALMKSFRNFKEKPY 51
Mus Cb2 -----
Ratus Cb2 -----
Homo Cb2 -----
Danio Cb2 -----MKNKLEQDQEAT 12
```

```
Rattus CB1 SFRGSPFQEKMTAGDNSPLVPAGDTTNNITFYNKSLSSFKENEENIQCGENFMD-MECFM 110
Mus CB1 SFRGSPFQEKMTAGDNSPLVPAGDTTNNITFYNKSLSSFKENEDNIQCGENFMD-MECFM 110
Homo CB1 SFRGSPFQEKMTAGDNPQLVPA-DQVNITFYNKSLSSFKENEENIQCGENFMD-IECFM 109
Xenopus CB1 SLRGDPLHEKMTIIDPPLSIPLDQINATDFYNKSII-FKDTPDDNVQCGKNFMD-MECFM 109
Danio CB1 AYRRSSFADKVAP--DEELIVKGLPFYPTNSSDVFGNWSHAEDGSLQCGENFMD-MECFM 117
Takifugu CB1 ---ASSSLHRLIPGNKELIYGLSTILPTNASDFPLS--NGSGEATQCGEDIVDNMECFM 106
Mus Cb2 --MEGRETEVTN-----GSNGGLEFNP-----MKEYM 26
Ratus Cb2 --MAGCRELELTN-----GSNGGLEFNP-----MKEYM 26
Homo Cb2 --MEECWVTEIAN-----GSKDGLDSNP-----MKDYM 26
Danio Cb2 TVLYSNLSTQNIS-----TTDKSLCYS-----LQCYM 39
. . . . . : : *
```

```
Rattus CB1 ILNPSQQLAIAVLSLTLGTFVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVI 170
Mus CB1 ILNPSQQLAIAVLSLTLGTFVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVI 170
Homo CB1 VLNPSQQLAIAVLSLTLGTFVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVI 169
Xenopus CB1 ILTPSQQLVIAALSIIILGTFVLENMLLVVIVQSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVI 169
Danio CB1 ILTPSQQLAIAVLSLTLGTFVLENLVLCVILQSRTLRCRPSYHFIGSLAIAVADLLGSVI 177
Takifugu CB1 ILTPAQQLVIVILAITLGTFTVLENFVVLVLCVILHSHTLRSRPSYHFIGSLAVADLIGSII 166
Mus Cb2 ILSSGQQAIAVAVLCTLMGLLSALENMAVLYIILSSRRLRRKPSYLFISSLAGADFLASVI 86
Ratus Cb2 ILSDAQQAIAVAVLCTLMGLLSALENMAVLYLILSSQRLRRKPSYLFISSLAGADFLASVI 86
Homo Cb2 ILSGPQKTAVAVLCTLLGGLLSALENMAVLYLILSSHQLRRKPSYLFISSLAGADFLASV 86
Danio Cb2 VLTTEQQAIAISSICFLAGPVTFANILVLLTIASSTALRRRPSYLFISSLALADMFASCF 99
:*. .: .: . * .: * * . ** * * * * :*** **.* ** :*:.* .
```

```
Rattus CB1 FVYSFVDFHVFHRKDSNPVFLFKLGGVTASFTASVGSFLFLTAIDRYISIHRLPLAYKRIVT 230
Mus CB1 FVYSFVDFHVFHRKDSNPVFLFKLGGVTASFTASVGSFLFLTAIDRYISIHRLPLAYKRIVT 230
Homo CB1 FVYSFIDFHVFHRKDSRNVFLFKLGGVTASFTASVGSFLFLTAIDRYISIHRLPLAYKRIVT 229
Xenopus CB1 FVYSFVDFHVFHRKDSNPVFLFKLGGVTASFTASVGSFLFLTAIDRYISIHRLPMSYKRIVT 229
Danio CB1 FVYSFLDFHVFHRKDSNPVFLFKLGGVTASFTASVGSFLFLTAIDRYVSIHRLPLSYRRIVT 237
Takifugu CB1 FVYSFLDFHVLHRKDSPIFLFKLAGVIASFTASVGSFLFLTAIDRYVSIHRLPMAYKRIT 226
Mus Cb2 FACNFVIFHVFHGVDSNAIFLLKIGSVTMTFTASVGSLLLTAVDRYLCLCYPPTYKALVT 146
Ratus Cb2 FACNFVIFHVFHGVDSRNIFLLKIGSVTMTFTASVGSLLLTAVDRYLCLCYPPTYKALVT 146
Homo Cb2 FACSFVNFHVFHGVDSKAVFLKIGSVTMTFTASVGSLLLTAIDRYLCLCYPPTYKALLT 146
Danio Cb2 FTISFLDFHLLSQRDDANLYLFLKGGVTMAFTGTVGSVGSLLLTAIDRYLCLYQASNYKLLLT 159
* . .: ** : * . :*:*:.* :**.***:*:***:***: . * : **
```

Rattus CB1	RPKAVVAFCLMWTIAIIVIAVLPPLLGWNCKKLS-VCSDFPLIDETYLFWIGVTSVLLL	289
Mus CB1	RPKAVVAFCLMWTIAIIVIAVLPPLLGWNCKKLS-VCSDFPLIDETYLFWIGVTSVLLL	289
Homo CB1	RPKAVVAFCLMWTIAIIVIAVLPPLLGWNCKKLS-VCSDFPLIDETYLFWIGVTSVLLL	288
Xenopus CB1	RTKAVIAFCMMWTIAIIVIAVLPPLFGWNCIKLRS-VCSDFPLIDETYLFWIGVTSVLLL	288
Danio CB1	RTKAVIAFCMMWAISIIIAVLPPLLGWNCKRLNS-VCSDFPLIDENYLMFWIGVTSVLLV	296
Takifugu CB1	RTKAVIAFVSVMWAISIEFSLPLLGWNCKRLHS-VCSDFPLIDEKYLFWIGMTTVLLL	285
Mus Cb2	RGRALVALCVMWVLSALISYLPMLGWTCCPSP---CSELFPLIPNDYLLGWLLFAILFS	203
Ratus Cb2	RGRALVALGVMWVLSALISYLPMLGWTCCPSP---CSELFPLIPNDYLLGWLLFAILFS	203
Homo Cb2	RGRALVTLGIMWVLSALVSYPMLGWTCCPRP---CSELFPLIPNDYLLSWLLFAIFLFS	203
Danio Cb2	RTRAKLAILLLWCVTIILSFLPLMGWRCKTWLDRPCSRLFPYVDRHYLASWTGLQLVMLF	219
	: :* :: : :* :: : . : ***** * ** : ** : . ** *	
Rattus CB1	FIVYAYMYILWKAHSHAVRMIQRGTQKSIIHTSEDGKVQVTRPDQARMDIRLAKTLVLI	349
Mus CB1	FIVYAYMYILWKAHSHAVRMIQRGTQKSIIHTSEDGKVQVTRPDQARMDIRLAKTLVLI	349
Homo CB1	FIVYAYMYILWKAHSHAVRMIQRGTQKSIIHTSEDGKVQVTRPDQARMDIRLAKTLVLI	348
Xenopus CB1	FIVYAYMYILWKAHSHAVRMLQRGTQKSIIHTSEDGKVHITRPDQTRMDIRLAKTLVLI	348
Danio CB1	FIIYAYMYILWKAHHAVRMLRRTSQKSLVHVSADGTVQVTRPDQARMDIRLAKTLVLI	356
Takifugu CB1	FIIYAYMFILWKSHHHAVRMLSRSSQRSIIVYTSEGTKVQTVRPEQARMDLRRLAKTLVLI	345
Mus Cb2	GIIYTYGYVLWKAHRHVATLAHQDR-----QVPGIARMRLDVRRLAKTLGLV	250
Ratus Cb2	GIIYTYGYVLWKAHQHVASLTHEQDR-----QVPGIARMRLDVRRLAKTLGLV	250
Homo Cb2	GIIYTYGHVLWKAHQHVASLSGHQDR-----QVPGMARMRLDVRRLAKTLGLV	250
Danio Cb2	LIIVAYPLILWKANRHEANMGGPKLGRQ-----SVKQGARMRMDIQLAHTFSLI	268
	: : :*:*:* * . : : *:*:*:*:* * :	
Rattus CB1	LVVLIICWGPELLAIMVYDVFVKMKNLIKTVFAFCMSMLCLLNSTVNP I IYALRSKDLRHAF	409
Mus CB1	LVVLIICWGPELLAIMVYDVFVKMKNLIKTVFAFCMSMLCLLNSTVNP I IYALRSKDLRHAF	409
Homo CB1	LVVLIICWGPELLAIMVYDVFVKMKNLIKTVFAFCMSMLCLLNSTVNP I IYALRSKDLRHAF	408
Xenopus CB1	LVVLIICWGPELLAIMVYDVFVKINKTIKTVFAFCMSMLCLLNSTVNP I IYALRSKDLRRAF	408
Danio CB1	LVVLIICWGPELLAIMVYDLFWRMGDNIKTVFAFCMSMLCLLNSTVNP I IYALRSKDLRRAF	416
Takifugu CB1	LVALIICWGPELLAIMVYDLFGRVNDFIKTVFAFCMSMLCLLNSTINPVIYAMRSKDLRRAF	405
Mus Cb2	LAVLLICWFPALALMGHSLVTTLSQVKEAFVFAFCMSMLCLVNSMVNP I IYALRSGEIRSAA	310
Ratus Cb2	MAVLLICWFPALALMGHSLVTTLSQVKEAFVFAFCMSMLCLVNSMINP I IYALRSGEIRSAA	310
Homo Cb2	LAVLLICWFPVLAALMAHSLATVTTLSQVKKAFVFAFCMSMLCLVNSMVNPVIYALRSGEIRSAA	310
Danio Cb2	LLILAICWLPVLSFMLVDVRVTLTNKQQRMFVFAFCSTLCLVNSCVNPLLYALRCREL R GEM	328
	: * * * * * : : * . : . : * * * * * * * * * * : * * * * * : : *	
Rattus CB1	RSMFPSCGTAQP---LDNSMGDSCLHKHANNTASMHRAAESC-IKSTVKIAKVTMS-V	464
Mus CB1	RSMFPSCGTAQP---LDNSMGDSCLHKHANNTASMHRAAESC-IKSTVKIAKVTMS-V	464
Homo CB1	RSMFPSCGTAQP---LDNSMGDSCLHKHANNTASMHRAAESC-IKSTVKIAKVTMS-V	463
Xenopus CB1	CSMFPSCGTAQP---LDNSM-ESDCQNRHVNSN-AHRAAESC-IKSTVKIAKVTMS-V	461
Danio CB1	LAACQGCRTSTTPLQLDNSL-ESDCHRN-----QHRAAESC-VKTTVKIAKLTMS-V	466
Takifugu CB1	VNICHMCRGTTQS---LDSSA-ESDWNRSRSTGGGRAGKDRSVGGKPVKVAQVTVSGV	461
Mus Cb2	QHCLIGWKKYLQG---LGPEG-KEEGPRSSVTETEADVKT-----	347
Ratus Cb2	QHCLTGWKKYLQG---LGSEG-KEEAPKSSVTETEAE TLVLKDKQELGGDCLLRTSSIHS	366
Homo Cb2	HHCLAHWKKCVRG---LGSEA-KEEAPRSSVTETEADGKITPWPDSRD-----	354
Danio Cb2	LALIECKACREH-----ALGHTHGQITDSSSGKSKNPAVSGSNPEIVSRSD--	377
Rattus CB1	STDTSAEAL-----	473
Mus CB1	STDTSAEAL-----	473
Homo CB1	STDTSAEAL-----	472
Xenopus CB1	STDTSAEAV-----	470
Danio CB1	SAETSAEAV-----	475
Takifugu CB1	TASSPAEAV-----	470
Mus Cb2	-----	
Ratus Cb2	PMLSLADSANRQDVRPHCPPEELTWCSVRRPISLPNKAGQSTLL	410
Homo Cb2	--LDLSDC-----	360
Danio Cb2	---RQQNSI-----	383

ANEXO 2

Secuencias genómicas de los receptores cannabinoides de pez cebra, señalando en azul las secuencias sobre las que se diseñaron los oligonucleótidos:

Exon 1
Exon 2

zfCB1

ggtgggagtggaacaatttcaattaaacacaggagaaataactcaagggttcggggaacggt
 ggaaaggggtggtgatgtaatcacgtgcatttacatttagtcattaggcagacgctttaat
 caaaggcgacttacaattgaggccaaggaagcaatttacacaactataagagcaacaatg
 aagaagtgctgtaggcaagtttcaagttgtgtaaagtgtgaagaagcaaaacattagtc
 tttttttttttgtaaaacagtttcttgaagacagcgagtgactctgctgttctgatgc
 agttagggagttcattccaccaactgggcagattgaacgcgagagttcgggaaagtgatt
 tcttccctcttgggatggaaccacgaggcgagcttcatcacagaacgcaagtttctgg
 agggcacatacatctgcagaagtgagagcagataagaaggagcaaagccagaaatcgctt
 tgaagcaaacatcagagcttgaatttgatgagcagcaactggcagccagtgcaaac
 ggatgagcagcggagtgacatgtgctcttttaggttcattaagaccactcgtgctgct
 gcgttctgcacatgttaatcagtgactggaagaggtcaatcagggagcatgaaaggaat
 atcaaaaagcaactcatataagcaccttaagggatagttcacgcaaaaatcaaaatttg
 ctactattgactctccctcaaccttaatgtgttcttcttctggtgagcgcaagagaa
 gatattttaagaatgctgaaaacctgtaaccactgacttccattgcagggaaaacaaata
 ctatggaagtcaatgaaagttctctcttcttcatcagatcttcttttgggttgggagca
 aattatgggtgctcagaattttcagtttaggtgaaactgcccttactcatatcattgct
 cattcagatttagctgaataatttgatcgctgatgtccatgtaagcgtagtcattctctc
 catttctccgacaggttctcttagagcatctctgaccatgctgttccggcctcaaag
 tccgatgttaaactctgtcctggacggagtgccggaaccaccttcagaaccatcacctcc
 ggctgagctacatcggtcaccacattattgacggagac
 ttctccaaaagcggataccctctgcccagccggttcgcagcctaccgcagaagctccttc
 gcgataaagtagccccagatgaggagctgatcgtcaaaggctcctcccttttatccact
 aacagctctgatgttttcggtaattggagccatgctgaagacggcagctctgcagtgcggg
 gagaactttatggatatggagtgttcatgatactgactcccagtcagcagctagccata
 gcggtgttatcttaactctggggacgtttacggtgttgagaatttgggtgtgtgtgt
 gtgattctgcagtcgctactctgcgctgcaggccgtcctaccacttcattggcagctta
 gccatcgcagatctcctoggcagtggtatattcgtctacagcttcttagactttcacgct
 tttcacggaaaagacagccctaacgtttttctgttcaagctaggaggcgttacggcatcc
 ttcaccgcttctgtgggaagcctgttctcactgccatcgaccgatatgtgtccatccac
 cgccgctgtcgtaccggcgcacgtgacgcgcacgaaagcagtgatcgcttctgcagt
 atgtgggogatctctattatcctgcgctgctgctctgctgggctggaactgcaaacgg
 ctcaactcgggtgtgctccgacatcttcccgctcatcgatgagaattatctgatgttctgg
 atcggcgtgaccagcgttctggtcttattcatcatctacgcgtacatgtacatcctctgg
 aaggcccaccatcatgcagtgaggatgctgaggcgcacgtcacagaagagcctggctg
 cactcggcggacggcacaaggtgcagacccccgaccggaccaggcacgcatggacatc
 cgtctggccaagacgctgggtgctgatcctgggtggtgctggtgatctgctgggggctctg
 ctggccatcatgggtgatgatctgttctggcggatgggggacaacatcaagaccggtgtt
 gcgttctgcagcatgctgacgctgctcaactccaccgtcaacccatcatctacgcactg
 cggagtaaagacctgcgcgggcttctggccgcatgtcagggctgcccgggcacctcc
 accacccccctgcagctggataacagcctggagtccgactgccataggaaccagcaccgc
 gctgctgagagctgcgtcaagaccactgtgaaaatcgccaaactgacaatgtccgtctca
 ggggagacctcggccgaagccgtctgattgtatgagcagcgcagggctgtggaaagtgca
 tgtagaaatctgttatatagatgtgtgtatttatatacacactacctgtacctgacaa
 aagtcttgtgggtgattccagtttaagagcaacaaataatcttgacttcttgggtgatc
 atttggaaaagtgtcagaaggtggattaatcccatgaatcatctgctgatctgcatccca
 atcatcaccaatactgcagaagacctactggaaccagcatagaccaagattctcagagaa
 atcagtcagctggtgaaggagaaatcatggtttgggggtggaggagatgacttttgtca
 ggcattgtgtaatgggttttccagtcgcgacgctgcagaacgagaactaagct

zfCB2

atggagaacaaactggaacaagatcaagaagctacgactgtgctttactcaaatttgagt
acacagaacatttcaaccacagataaaaagcttatgctatagcctacagtgctacatggtt
ttgaccacacaagagcagaaagctatcagctcaatttgctttctagccggcccagtgact
ttcctggcaaacattttggctctgctgaccattgcaagctccacagcactgcgagacgc
ccatcgctacctgtttatcagcagcctggcactggccgacatgtttgccagctgtttctc
accatcagttttctagatttccatcttctcagtcagagagacgatgctaacctctatctc
ttcaagcttgggtggcgtcacaatggcggttacgggctctgtgggaagcctttgctgaca
gagctggaccgatatctttgcatctaccaggcttccaattacaagctgctactgacacgc
actagagccaaactggccatattattattatgggtgtgtgactattattctctcattcctc
cctttgatgggggtggagggtgcaaaacctgggtggatcgtccatgctcacgtctcttccg
tacgtggatcgtcactatttggccagctggacgggtctgcagcttgtgatgctttttctt
atcatagtggcttatcctcttatcctgtggaaagcaaatcgccatgaagcaaatatgggt
ggaccaaagttagggaggcagagcgtgaaaggacaggctcgaatgcgaatggacattcag
ctcgcacacacttttagtttgatccttctaatectggcgatctgttggctgcccgtcctg
tcctttatgctagtggacgtcagagtgacctgacaaacaacaacagcgaatgttcgct
ttctgtagcacactgtgtctggtgaaatccttgtgtgtaaaccctcttctctatgcctgcg
tgccgagagctgaggggagaaatgctggcattgatagaatggttgaaggcatgcagggaa
catgctttgggtcatactcatggccaaataactgatagcagttctggcaaaaagagcaaa
aatccgtagtgagtggtagtaacccaataattgtttctaggagtgacagcagggcagcaa
aacagcatatgataaatgtctaaaagtcatatttacttgtgattttgtttatggaagcac
aatatattggtggccacaacgatatcgg