

Revisión

EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE MEDIA LA INHIBICIÓN EJERCIDA POR AGENTES PRO-INFLAMATORIOS SOBRE LA LIBERACIÓN DE LA HORMONA LIBERADORA DE HORMONA LUTEINIZANTE (LHRH)

Javier Fernández-Solari y Valeria Rettori

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET / UBA)

Los cannabinoides

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos presentes en la resina de las hojas y brotes florecidos de la planta de marihuana, *Cannabis sativa*. El principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), aislado por Mechoulam y Gaoni en 1964 (1).

En cuanto a los efectos neuroendócrinos de la marihuana, se ha demostrado que la administración intracerebroventricular (icv) del THC produce una disminución significativa en los niveles plasmáticos de prolactina, hormona de crecimiento y hormona luteinizante (LH) en ratas macho adultas, sin cambios significativos sobre los niveles de hormona folículo estimulante (FSH) (2).

Los trabajos publicados en el tema (2-4) indican que el efecto inhibitorio del THC sobre el eje reproductivo es ejercido principalmente a nivel hipotalámico, donde inhibe la liberación de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), con la consecuente disminución de la secreción adenohipofisaria de la LH.

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación (5) demostraron que el THC (10^{-11} a 10^{-8} M) no modifica la liberación basal de LHRH desde explantes de hipotálamo medio basal (HMB) incubados *in vitro*. Sin embargo, el THC (10^{-8} M) es capaz de inhibir la liberación de la LHRH, estimulada tanto por noradrenalina (5×10^{-5} M) como por dopamina (5×10^{-5} M).

El Sistema Endocannabinoide

Existen evidencias de la existencia de varios tipos de receptores para cannabinoides (CB), pero hasta el momento se han clonado y caracterizado dos: el CB1, densamente expresado en el sistema nervioso (6) y el CB2 (7), principalmente localizado en tejidos periféricos, fundamentalmente en células del sistema inmune. Ambos receptores se encuentran acoplados a una proteína G_i y responden inhibiendo la actividad de la enzima AC (8). La identificación de estos receptores

de membrana que median los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides, llevó a los investigadores a buscar ligandos endógenos que los activen. A partir de un extracto lipídico de cerebro de cerdo se aisló la anandamida (AEA), el primer endocannabinoide conocido (9). Posteriormente, a partir de un extracto de intestino de perro, se aisló otro ligando endógeno, el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (10). Los últimos ligandos endógenos identificados fueron el 2-araquidonil gliceril eter (noladin eter), aislado de cerebro de porcino (11) y la virodhamina, purificada por primera vez de hipocampo humano (12). Estos compuestos son derivados del ácido araquidónico y producen efectos similares al THC, especialmente la AEA (9,13,14). También es importante destacar que algunos endocannabinoides son capaces de activar receptores vanilloides (VR1), canales de cationes involucrados en la captación del dolor, inflamación neurogénica y contracción del músculo liso, cuyo ligando endógeno más conocido es la capsaicina.

Posteriormente, se desarrollaron antagonistas sintéticos selectivos para cada tipo de receptor. Entre los más utilizados en investigación se destacan el AM251 (15), el AM281 (16), el SR141716A (17) y el LY320135 (18) para los CB1, y el AM630 (19) y el SR144528 (20) para los CB2.

En el presente trabajo se analizan algunos mecanismos desencadenados por los endocannabinoides sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico, así como su participación en la respuesta al LPS. Sin embargo, los endocannabinoides también participan en la regulación de otros procesos controlados por el SNC como la actividad motora (21), el aprendizaje y la memoria (22), la nocicepción (23), así como también desempeñan un papel notable durante el desarrollo cerebral (24).

Efectos de la AEA sobre la liberación de LHRH

Curvas dosis respuesta de AEA (de 10^{-5} M a 10^{-11} M) indicaron que la concentración de 10^{-9} M

del endocannabinoide fue la única de las estudiadas que tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre la liberación hipotalámica basal de LHRH. Adicionalmente, se estudió el efecto de AEA (10^{-9} M) *in vitro* sobre la liberación de LHRH estimulada por ácido N-metil-D-aspartico (NMDA, 2×10^{-2} M), observándose una inhibición de mayor magnitud a la obtenida sobre la liberación basal (Figura 1). Además, el efecto inhibitorio de AEA fue prevenido parcialmente al incubar los HMBs en presencia de AM251 (10^{-5} M), un antagonista selectivo de receptores CB1, evidenciando que este efecto es mediado, al menos en parte, a través estos receptores.

Estudios inmunohistoquímicos realizados por nuestro grupo de investigación, no evidenciaron la presencia de receptores CB1 en neuronas de LHRH ni en las terminales nerviosas de las mismas (25). A partir de estudios de hibridación *in situ* realizados por Herkenham y col., tampoco se identificó la presencia del RNA mensajero de CB1 en neuronas de LHRH ni en sus fibras nerviosas (comunicación personal, Herkenham M., Section of Functional Neuroanatomy National Institutes of Mental Health, Bethesda). Sin embargo, se demostró la localización de receptores CB1 en neuronas GABAérgicas hipotalámicas por medio de estudios de hibridación *in situ* (comunicación personal, Herkenham, M.). Por otro lado, se identificó la presencia de receptores GABA_A en neuronas de LHRH (26,27). Es probable que los cannabinoides actú-

en sobre los CB1 localizados en neuronas GABAérgicas incrementando la liberación de GABA, que finalmente actuaría sobre receptores GABA_A en neuronas de LHRH, inhibiendo la liberación del decapeptido. Por lo tanto procedimos a determinar el efecto de AEA sobre la liberación de GABA desde HMBs incubados *in vitro*. AEA (10^{-9} M) estimuló significativamente la liberación hipotalámica del GABA (Figura 2A). Es probable que este aumento de GABA en el medio de incubación se deba adicionalmente a una inhibición de la recaptación del mismo por parte de las neuronas GABAérgicas. Una vez determinado el efecto de la AEA como estimulador GABAérgico, y teniendo en cuenta el rol del GABA como neurotransmisor inhibitorio de la liberación de LHRH, se estudió el efecto de un antagonista específico de receptores GABA_A, la bicuculina, sobre la liberación de LHRH inhibida por AEA. La bicuculina 10^{-4} M bloqueó completamente la disminución que provoca AEA sobre la liberación de LHRH estimulada por NMDA (Figura 2B).

El sistema endocannabinoide como mediador de los efectos de agentes pro-inflamatorios sobre la liberación de LHRH

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es una endotoxina liberada por las bacterias Gram-negativas, que ejerce un poderoso efecto inductor de la síntesis y de la liberación de citoquinas, no sólo de las células inmunes, sino también de células del SNC y endocri-

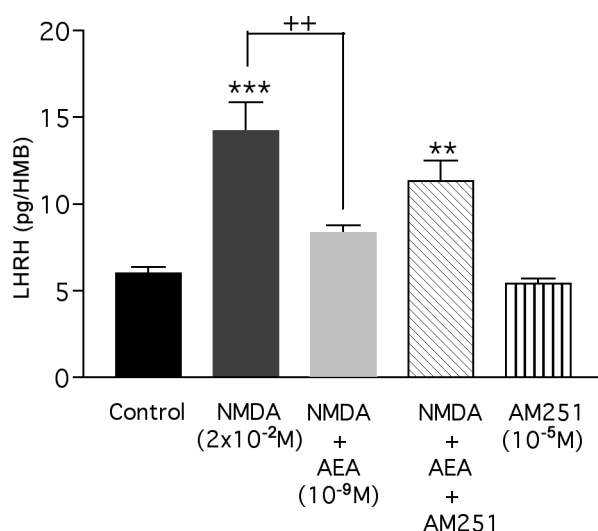


Figura 1. Efecto de AEA sobre la liberación de LHRH estimulada por NMDA. Los resultados se expresan en pg de LHRH liberados al medio de incubación por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de 6-7 HMBs. Los ensayos fueron realizados 2 veces. **= $p < 0.01$ y ***= $p < 0.001$ vs. Control. y += $p < 0.01$ entre los grupos unidos por el conector. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

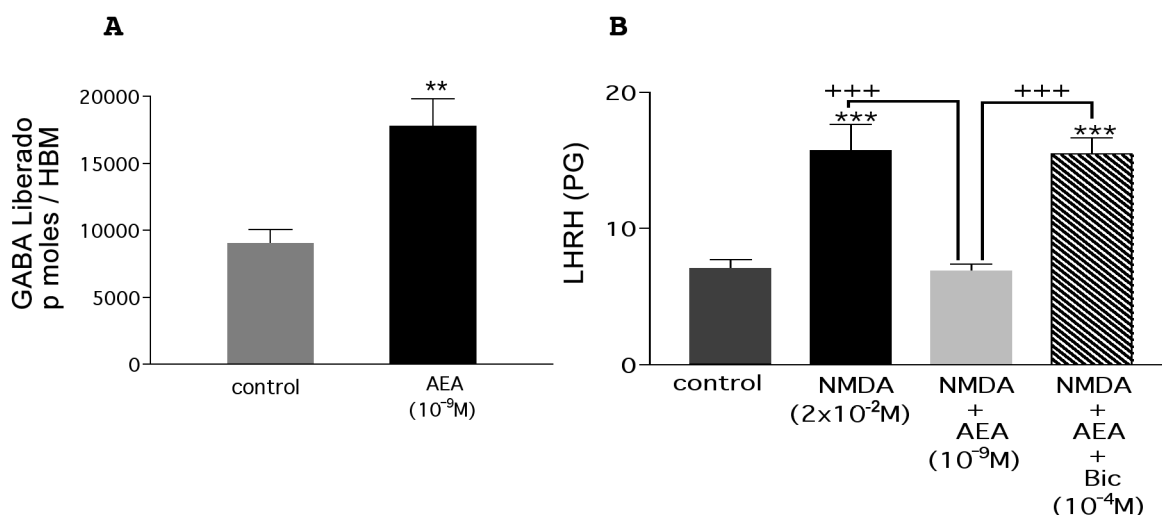


Figura 2. A. Efecto de AEA sobre la liberación del GABA. Los resultados se expresan en pmoles de GABA liberados al medio de incubación por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de 6-7 HMB. Los ensayos fueron realizados 2 veces. **= $p < 0.01$ vs. Control. Análisis estadístico: Test t de Student. **B. Efecto de bicuculina (Bic) sobre la liberación de la LHRH inhibida por AEA.** Los resultados se expresan en pg de LHRH liberados al medio de incubación por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de 6-7 HMB. Los ensayos fueron realizados 3 veces. ***= $p < 0.001$ vs. Control y +++= $p < 0.001$ vs. NMDA+AEA. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

nas (28,29). Las principales citoquinas involucradas en la respuesta al LPS son: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina (IL)-1 y la IL-6. El TNF- α cumple un papel importante en la respuesta neuroendocrina ante situaciones de infección, inflamación y endotoxemia.

Alteraciones en el sistema inmune generalmente van acompañadas de alteraciones en el eje reproductivo. Como consecuencia de la alteración de parámetros fisiológicos, los procesos infecciosos/inflamatorios generan un patrón de secreción hormonal alterado. Situaciones de estrés, infección e inflamación activan el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, mientras que inhiben el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (HHG). Con respecto al HHG, el LPS inhibe la liberación de LHRH y de gonadotrofinas. La inhibición de la liberación de LHRH en respuesta al LPS sería consecuencia de la acción conjunta de citoquinas como el TNF- α , la IL-1 y la IL-6.

Por otro lado, el LPS estimula la liberación de taurina y GABA desde el hipotálamo, mientras que inhibe la liberación de glutamato (30). Dado que estos neurotransmisores intervienen en la regulación de la liberación de LHRH, estos resultados sugieren que tanto el GABA como el glutamato podrían estar involucrados en la respuesta neuroendocrina en situaciones de estrés o inflamación (31).

La presencia de CB1 y CB2, así como la producción de endocannabinoides, en linfocitos y macró-

fagos ha sugerido que el sistema endocannabinoide opera de manera activa en el sistema inmune. Estudios en animales de experimentación confirmaron que los cannabinoides a dosis elevadas reducen la capacidad de defensa del organismo. Se ha reportado que los cannabinoides pueden suprimir las respuestas proliferativas de los linfocitos B a la estimulación con LPS. Además, se observó que la AEA inhibe la producción de NO y TNF- α y aumenta la producción de la IL-6 en astrocitos de ratón estimulados con LPS (32).

Con respecto a la conexión entre el sistema inmune y el endocannabinoide, en los últimos años se ha observado un incremento en el número de estudios que examinan los efectos de los endocannabinoides sobre la biología de las citoquinas en distintos sistemas celulares (33). La AEA, además de modular la respuesta celular a distintas citoquinas, puede incrementar o disminuir la producción de las mismas en diferentes condiciones experimentales. Por ejemplo, cultivos de astrocitos de corteza cerebral murina, infectados con el virus de encefalomiелitis de Theiler, incrementan la producción de IL-6 en presencia de AEA (32). Adicionalmente, se han reportado estudios con células mononucleares de sangre humana que demuestran que la AEA, dependiendo de su concentración, puede incrementar o disminuir la liberación de citoquinas. Por ejemplo, la liberación de IL-6 e IL-8 disminuye con bajas concentraciones de AEA, mientras que el TNF α , el INF γ y la IL-4 disminuyen a altas concentraciones de la misma

(34). Es conocido que durante la endotoxemia inducida por LPS, el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal se encuentra inhibido. La inhibición de la liberación de LHRH desencadenada por el LPS parece involucrar los mismos mediadores que intervienen durante la activación del sistema endocannabinoide, principalmente la potenciación de la actividad GABAérgica (35). Por lo tanto, propusimos que el mecanismo de inhibición de la liberación de la LHRH desencadenado por la administración de LPS podría involucrar al sistema endocannabinoide. De hecho, se ha reportado que el LPS estimula la síntesis de AEA en macrófagos peritoneales de ratón por inducción de su síntesis (36). Además, se ha observado un incremento en los niveles de AEA en linfocitos humanos expuestos al LPS (37).

Nuestros resultados demuestran la conexión entre los sistemas inmune y endocannabinoide a nivel hipotalámico, a partir de la observación de un incremento en la actividad de la AEA sintasa en HMBs removidos 3 hs después de inyectar las ratas con LPS ip (5 mg/Kg) o con $\text{TNF}\alpha$ ivc (100 ng/rata) con respecto a ratas que recibieron vehículo (38). Dado que es conocido que el $\text{TNF}\alpha$ es liberado rápidamente luego de la administración del LPS (39), y que esta citoquina media una serie de efectos atribuidos a la administración de la endotoxina sobre el eje hipotálamo-hipofisario, decidimos trabajar con el $\text{TNF}\alpha$ en los experimentos *in vitro*. Más aún, se ha reportado que la liberación de $\text{TNF}\alpha$ inducida por el LPS es controlada por el SNC (40). El $\text{TNF}\alpha$ (2.9×10^{-9} M)

incrementó la actividad de la AEA sintasa en HMBs incubados *in vitro* (Fig 3A). Por lo tanto, es posible que el LPS, a través de un incremento de la producción de $\text{TNF}\alpha$, active al sistema endocannabinoide para inhibir la liberación de la LHRH. Para confirmar esta hipótesis se midió el efecto del $\text{TNF}\alpha$ sobre la liberación de la LHRH en HMBs incubados *in vitro*. El $\text{TNF}\alpha$ no tuvo efecto sobre la liberación basal de LHRH (dato no mostrado), sin embargo, redujo significativamente la liberación de LHRH estimulada con la forskolina (8×10^{-5} M) (Figura 3B), y este efecto fue totalmente bloqueado por el AM251 (10^{-5} M), un antagonista selectivo para CB1.

Teniendo en cuenta los efectos inmunosupresores ejercidos por los endocannabinoides, el incremento en la síntesis de AEA inducido por el LPS podría ser una respuesta fisiológica del organismo para atenuar los efectos nocivos desencadenados durante la inflamación. La inhibición del eje reproductivo durante la inflamación estaría mediada, al menos en parte, por el sistema endocannabinoide (Figura 4). Por lo tanto, el sistema neuroinmuno-endocannabinoide tiene un rol clave en la regulación de eje cerebro-inmunológico.

Referencias

1. Mechoulam R, Gaoni Y, Hashish IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 1965;21:1223-9
2. Wenger T, Rettori V, Snyder GD, Dalterio S, McCann SM. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on the

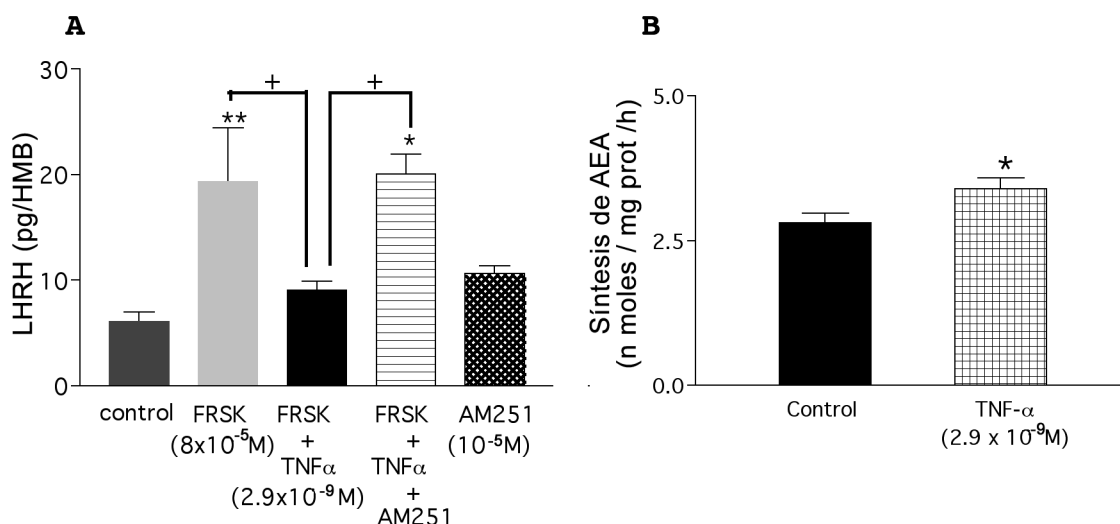


Figura 3. A. Efecto del $\text{TNF}\alpha$ sobre la liberación de LHRH estimulada por FRSK. Los resultados se expresan en pg de LHRH liberados por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de 6-7 HMB. Los ensayos fueron realizados 3 veces. $*=p<0.05$, $**=p<0.01$ vs. Control y $+p<0.05$ vs FRSK + $\text{TNF}\alpha$. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. **B. Efecto del $\text{TNF}\alpha$ *in vitro* sobre la actividad de la AEA sintasa.** Los resultados se expresan en nmoles de AEA por mg de proteína por hora. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de 8 HMB. Los ensayos fueron realizados 2 veces. $*=p<0.05$ vs. Control. Los datos fueron analizados por test t de Student.

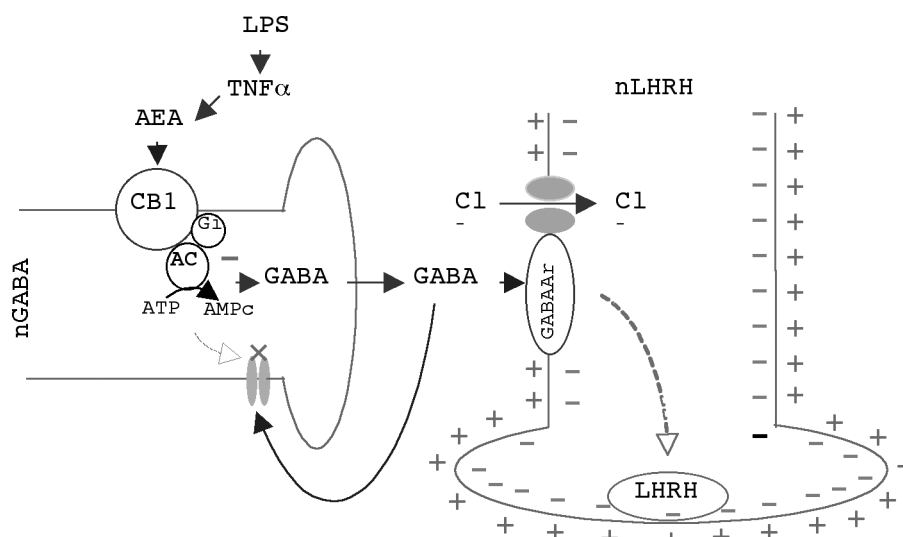


Figura 4. Esquema que resume los mecanismos involucrados en la inhibición de la liberación hipotalámica de LHRH desencadenados por agentes pro-inflamatorios que activan el sistema endocannabinoide. Cl $^-$, canal de cloruro; nLHRH, neurona de LHRH; nGABA, neurona GABAérgica; +/–, membrana hiperpolarizada; AC, adenilato ciclasa. Las flechas discontinuas indican efectos inhibitorios.

hypothalamic-pituitary control of luteinizing hormone and follicle-stimulating-hormone secretion in adult male rats. *Neuroendocrinology* 1987;46:488-93

3. Ayalon D, Nir I, Cordova T, Bauminger S, Puder M, Naor Z, Kashi R, Zor U, Harell A, Lindner HR. Acute effect of delta1-tetrahydrocannabinol on the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in the rat. *Neuroendocrinology* 1977;23:31-42

4. Almirez RG, Smith CG, Asch RH. The effects of marijuana extract and delta 9-tetrahydrocannabinol on luteal function in the rhesus monkey. *Fertil Steril* 1983;39:212-7

5. Rettori V, Aguila MC, Gimeno MF, Franchi AM, McCann SM. In vitro effect of delta-9-tetrahydrocannabinol to stimulate somatostatin release and block that of luteinizing hormone-releasing hormone by suppression of the release of prostaglandin E $_2$. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:10063-6

6. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561-4

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

8. Howlett A, Fleming R. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 1984;26:532-8

9. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin GI, Gibson D, Mandelbaum A,

Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946-9

10. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50:83-90

11. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3662-5

12. Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:1020-4

13. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoli K, Yamashita A. 2-arachidonylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215:89-97

14. Ameri A, Wilhelm A, Simmet T. Effect of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 1999;126:1831-9

15. Gately SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, and Makriyannis A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid

CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 1996;307:331-8

16. Lan R, Gatley J, Lu Q, Fan P, Fernando SR, Volkow ND, Pertwee R, Makriyannis A. Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci* 1999;1:E4

17. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, Soubrie P, Breliere JC, Le Fur G. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* 1995;56:1941-7

18. Feleder C, Wuttke W, Moguilevsky JA. Hypothalamic relationships between interleukin-6 and LHRH release affected by bacterial endotoxin in adult male rats. Involvement of the inhibitory amino acid system. *Biol Signals Recept* 1998;7:7-14

19. Pertwee R, Griffin G, Fernando S, Li X, Hill A, Makriyannis A. AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* 1995;56:1949-55

20. Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, Martin BR, and Abood ME. Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* 1999;377:117-25

21. Fernandez-Ruiz J, Lastres-Becker I, Cabranes A, Gonzalez S, Ramos JA. Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:257-67

22. Lichtman AH, Varvel SA, Martin BR. Endocannabinoids in cognition and dependence. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:269-85

23. Rice AS, Farquhar-Smith WP, Nagy I. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:243-56

24. Fride E. Endocannabinoids in the central nervous system—an overview. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002;66:221-33

25. Rettori V, Lomniczi A, Mohn C, Scorticati C, Vissio P, Lasaga M, Franchi A, McCann SM. Mechanism of inhibition of LHRH release by alcohol and cannabinoids. *Prog Brain Res* 2002;141:175-81

26. Spergel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH. GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 1999;19:2037-50

27. Moragues N, Ciofi P, Lafon P, Tramu G, Garret M. GABAA receptor epsilon subunit expression in identified peptidergic neurons of the rat hypothalamus. *Brain Res* 2003;967:285-9

28. Gabellec MM, Griffais R, Fillion G, Haour F.

Expression of interleukin 1a, interleukin 1b and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Mol Brain Res* 1995;31:122-30

29. Abraham EJ, Morris-Hardeman JN, Swenson LM, Knoppel EL, Ramanathan B, Wight KJ, Grieger DM, Minton JE. Pituitary function in the acute phase response in domestic farm animals: cytokines, prostaglandins, and secretion of ACTH. *Dom Anim Endocrinol* 1998;15:389-96

30. Feleder C, Jarry H, Leonhardt S, Moguilevsky JA, Wuttke W. Effects of endotoxin on in vitro release of LHRH and amino acid neurotransmitters by preoptic mediobasal hypothalamic fragments. *Neuroimmunomodulation* 1996;3:76-81

31. De Laurentiis A, Pisera D, Lasaga M, Díaz MC, Theas S, Duvilanski B, Selicovich A. Effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α on GABA release from mediobasal hypothalamus and posterior pituitary. *Neuroimmunomodulation* 2000;7:77-83

32. Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C. The endogenous cannabinoid anandamide potentiates interleukin-6 production by astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway. *FEBS Lett*. 1998;433:139-42

33. Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H. The cannabinoid system and cytokine network. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000;225:1-8

34. Berdyshev EV, Boichot E, Germain N, Allain N, Anger JP, Lagente V. Influence of fatty acid ethanolamides and delta9-tetrahydrocannabinol on cytokine and arachidonate release by mononuclear cells. *Eur J Pharmacol* 1997;330:231-40

35. Feleder C, Reflojo D, Jarry H, Wuttke W, Moguilevsky J. Bacterial endotoxin inhibits LHRH secretion following the increased release of hypothalamic GABA levels. Different effects on amino acid neurotransmitter release. *Neuroimmunomodulation* 1996;3:342-51

36. Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B, Kunos G. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 2003;278:45034-9

37. Maccarrone M, De Petrocellis L, Bari M, Fezza F, Salvati S, Di Marzo V, Finazzi-Agro A. Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch Biochem Biophys* 2001;393:321-8

38. Fernández-Solari J, Prestifilippo JP, Stefan R, Bornstein SR, McCann SM, Rettori V. Participation of the endocannabinoid system in the effect of TNF- α on

hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone (LHRH). Ann NY Acad Sci 2006;1088:238-50

39. McCann SM, Kimura M, Karanth S, Yu WH, Mastronardi CA, Rettori V. The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. Ann NY Acad Sci 2000;917:4-18

40. Mastronardi CA, Yu WH, McCann SM. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha release is controlled by the central nervous system. Neuroimmunomodulation 2001;9:148-56