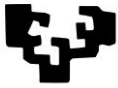
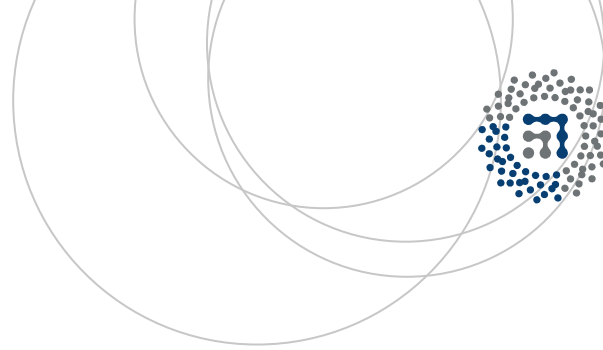


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Actividad de receptores muscarínicos y cannabinoides tras un tratamiento subcrónico con el agonista cannabinoide WIN55,212-2

Autor: Matxalen Madariaga Tapia
Director/a: Rafael Rodríguez Puertas

Leioa, 3 de septiembre de 2015

ÍNDICE

Introducción y objetivos.....	1
Enfermedad de Alzheimer. Pérdida de neuronas colinérgicas.....	1
El sistema colinérgico.....	2
El sistema cannabinoide.....	2
Los receptores cannabinoideos (RCB).....	3
Relación entre el sistema cannabinoide y la enfermedad de Alzheimer.....	4
Relación entre los sistemas cannabinoide y colinérgico.....	5
Materiales y métodos.....	5
Muestras de tejido de rata.....	5
Obtención y almacenamiento de las muestras en fresco.....	6
Fármacos utilizados para los tratamientos.....	6
Marcaje autorradiográfico del acople funcional de receptores a proteínas $G_{i/o}$	6
Radioligandos.....	6
Fármacos y reactivos utilizados en los ensayos de autorradiografía.....	7
Marcado autorradiográfico de la activación de proteínas $G_{i/o}$ con [35 S]GTP γ S.....	7
Cuantificación autorradiográfica.....	8
Análisis estadístico.....	8
Resultados.....	9
Representación gráfica de los resultados de WIN55,212-2.....	11
Representación gráfica de los resultados de carbacol.....	12
Discusión.....	13
Bibliografía.....	14

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. PÉRDIDA DE NEURONAS COLINÉRGICAS

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el desorden neurológico relacionado con la edad más común en la actualidad, ya que afecta a unos 20 millones de personas en el mundo, mientras que los casos que se diagnostican están aumentando de forma exponencial (Eubanks *et al.*, 2006). Se caracteriza por la neuroinflamación y por la pérdida de neuronas colinérgicas asociada a una disfunción progresiva de la memoria y de la cognición. En cuanto a su patogénesis molecular abarca acumulación extracelular de péptido β -amiloide ($A\beta$) en forma de depósitos o placas amiloides o placas seniles (PS) en diferentes regiones cerebrales, especialmente en el hipocampo. Además de éstas, la patofisiología del Alzheimer incluye la deposición de ovillos neurofibrilares, agregados protéicos anormales e insolubles que se forman en las neuronas debido a la hiperfosforilación de la proteína Tau relacionada con los microtúbulos.

Hace un cuarto de siglo, tras haber llevado a cabo autopsias de tejido cerebral de pacientes que habían fallecido debido a EA, se descubrió que el sistema relacionado con el neurotransmisor acetilcolina (ACh), el sistema colinérgico, posee un papel muy importante en el desarrollo de dicha enfermedad. En estas pruebas se identificaron déficits neuroquímicos en la actividad colinérgica cortical. Estos déficits se dan sobre todo en áreas cerebrales relacionadas con la memoria y la cognición, como el hipocampo, el lóbulo temporal y algunas áreas corticales frontales. La progresión del déficit colinérgico se correlaciona con la severidad clínica, aunque no tanto con la deposición de los ovillos neurofibrilares y las placas amiloides (L. Frölich., 2002). La denominada “Hipótesis Colinérgica” se fundamentó en estas observaciones. Además, en la EA se da una disminución de los niveles de un transportador de colina de alta afinidad. Esto se midió por autor radiografía en diferentes regiones cerebrales cuantificando la unión del marcador ^3H -hemicolinio-3 (^3H -HC-3) en pacientes con EA y en personas control (Rodríguez-Puertas R., 1995). Dicha hipótesis propone que las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal se ven afectadas durante el transcurso de la enfermedad. Ésto puede detectarse tanto de forma histopatológica por la pérdida de neuronas, como neuroquímicamente por la pérdida de marcadores (enzimas que sintetizan y degradan ACh). Sin embargo, estudios más recientes sobre la patofisiología del sistema colinérgico en la EA sugieren que el déficit colinérgico mencionado anteriormente se da solamente en el estado tardío de la enfermedad, que en las fases tempranas de la misma existe una sobrerregulación de la actividad colinérgica en el cerebro y que puede desarrollarse un incremento en la actividad del enzima acetil colinesterasa bajo terapia con inhibidores de la misma (L. Frölich., 2002).

1.2. EL SISTEMA COLINÉRGICO

El sistema colinérgico está compuesto por receptores acoplados a proteínas G (GPCR), concretamente por receptores metabotrópicos muscarínicos (RM) y receptores ionotrópicos nicotínicos (RN).

Los RM intervienen en la mayoría de los procesos, tanto inhibitorios como excitatorios, mediados por la adenilato ciclasa (AC). Se han identificado cinco subtipos de RM (M_1 - M_5), cada uno codificado por un gen diferente, aunque guardan una gran homología. Estos subtipos de RM se pueden clasificar en dos grupos en función de la señalización intracelular que desencadenan. El primer grupo lo forman M_1 , M_3 y M_5 , los cuales están acoplados a proteínas $G_{q/11}$, estimulando la actividad de la fosfolipasa- $C\beta$ y generando segundos mensajeros como el inositol fosfato-3 y el diacilglicerol. En el segundo grupo se encuentran M_2 y M_4 , acoplados a proteínas $G_{i/o}$ que inhiben la AC y, por lo tanto, disminuyen los niveles del segundo mensajero AMP cíclico (AMPC).

En este sistema neuronal han sido definidas dos principales vías de transmisión. La primera es el sistema colinérgico reticular ascendente, el cual surge de los núcleos reticulares y tegmentales del bulbo raquídeo y de algunos grupos de células del prosencéfalo. Dicho sistema se extiende hasta el tálamo, áreas corticales y subcorticales, hipotálamo y el núcleo

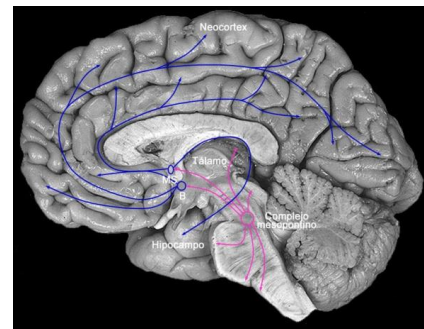


Figura 1. Principales vías de transmisión del sistema colinérgico.

límbico. La segunda vía de transmisión Neuronal colinérgica es el sistema colinérgico límbico, el cual tiene su origen en

el septo medial y en la banda diagonal y se proyecta primero hacia la formación hipocampal y el giro dentado. De allí se proyectará al córtex medial, al núcleo de los sistemas ascendentes y al cerebelo (**Figura 1**).

1.3. EL SISTEMA CANNABINOIDE

Este sistema es un sistema de neuromodulación. Está demostrado que los cannabinoides producen efectos psicoactivos a través de la activación de los receptores cannabinoides (CB), los cuales se encuentran en las membranas sobre todo de neuronas. Los cannabinoides que tienen su origen en el propio cuerpo humano reciben el nombre de endocannabinoides (eCB). Los eCB son un tipo de lípidos con función señalizadora que, junto con los enzimas que controlan tanto su síntesis como su degradación, forman el sistema endocannabinoide endógeno, siendo éste un sistema de comunicación cerebral que está cobrando gran importancia en la neurociencia y en la farmacología actuales.

Además de los eCB también existen cannabinoides exógenos. Éstos últimos pueden ser naturales, como el Δ^9 -THC procedente de la planta *Cannabis sativa*, o sintéticos. Entre éstos se descubrió una clase de moléculas estructuralmente diferentes denominada aminoalquilindoles que presenta una actividad farmacológica similar a la mostrada por el Δ^9 -THC (Compton., 1992), siendo WIN55,212-2 el principal representante de esta familia (**Figura 2**). Los eCB poseen enzimas de síntesis y degradación y un sistema de recaptación de sus ligandos, siendo los más importantes la anandamida (AEA) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG).

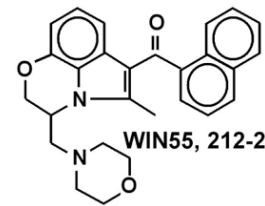


Figura 2. Estructura del cannabinoide sintético WIN55,212-2.

La síntesis de la AEA es mediada por una fosfolipasa D (NAPE-PLD)

(Di Marzo *et al.*, 1994). La vida media de la AEA es muy corta, debido a que un transportador de alta afinidad presente en neuronas y en células gliales la recapta muy rápido (Hillard *et al.*, 1997; Beltramo *et al.*, 1997). La AEA se degrada principalmente por la amino hidrolasa denominada FAAH.

La ruta de síntesis más probable para el 2-AG implica una diacilglicerol lipasa. El 2-AG, después de haber sido liberado, puede recaptarse gracias al transportador de AEA (Piomelli *et al.*, 1999) y después degradarse gracias a una monoacil glicerol lipasa (Stella *et al.*, 1997).

Una de las características más interesantes de este sistema es que debido a su capacidad moduladora es necesario que se sinteticen a demanda. Por último el componente de este sistema más importante y además más abundante en el sistema nervioso central son los receptores CB (Fernández-Ruiz, J., 2012).

1.3.1. Los receptores cannabinoides (RCB)

Han sido clonados y aislados dos tipos: CB₁ y CB₂, los cuales difieren a nivel molecular, farmacológico y anatómico. Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G_{i/o}. Cabe decir que se ha propuesto la existencia de otros RCB, como el GPR55 o el receptor específico para cannabidiol.

CB₁ es el responsable de la psicoactividad de algunos componentes de la planta *Cannabis sativa*. Se distribuye ampliamente en el SNC, siendo el receptor metabotrópico más abundante en el cerebro, de acuerdo con los efectos que producen los CB sobre la memoria, cognición, movimiento y nocicepción (Fride E., 2002). También se ha identificado, aunque en niveles inferiores, en tejidos

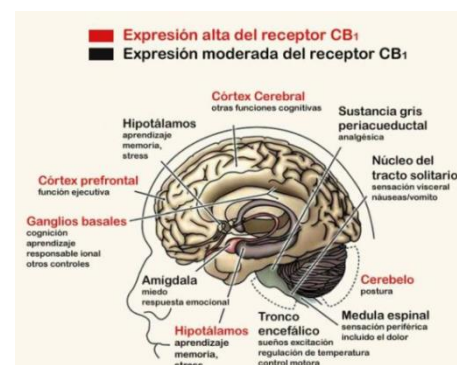


Figura 3. Localización cerebral del receptor cannabinoide CB₁.

periféricos. Se localizan preferentemente en neuronas, sobre todo GABAérgicas y glutamatérgicas, aunque también aparecen en neuronas peptidérgicas (opioides), serotoninérgicas o colinérgicas (Breivogel y Sim-Selley., 2009). La activación de CB₁ va seguida de una inhibición reversible de la AC, disminuyendo así la producción de AMPc. Asimismo, dicha activación inhibe la apertura de canales de Ca²⁺ voltaje dependientes y modifica la conductancia para el K⁺ facilitando su salida, reduciendo la actividad neuronal.

El receptor CB₂ fue el segundo tipo de receptor descrito. Inicialmente se relacionó casi exclusivamente con células del sistema inmune, debido a que participa en la modulación de dicho sistema (Munro S *et al.*, 1993). Posteriormente se ha identificado en otros tejidos, incluyendo el SNC (Benito *et al.*, 2008). Los CB₂ frenan los procesos de proliferación y migración microglial, reduciendo la neurotoxicidad de estas células.

1.3.2. Relación entre el sistema cannabinoide y la enfermedad de Alzheimer

Existen numerosas evidencias de que el sistema cannabinoide participa en EA. Los CB₁ del hipocampo contribuyen al efecto de los CB en el aprendizaje y en la memoria (Riedel y Davies., 2005), los cuales son procesos cognitivos que se interrumpen en la fase temprana de la EA. En estudios *post-mortem* utilizando muestras cerebrales de personas con EA se han detectado aumentos en la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en la microglía de las placas seniles (PS), mientras que la expresión de CB₁ se reduce en las neuronas más alejadas de la placa (Ramírez *et al.*, 2005). También se ha descrito que en astrocitos asociados a las PS existe una regulación al alza de la FAAH (Benito *et al.*, 2003). En suma, se ha observado que el sistema eCB puede ejercer neuroprotección debido a un aumento de la producción de eCBs cuando se produce un daño neurológico y que las células que carecen de CB₁ son más vulnerables a los daños (Marsicano *et al.*, 2003). Así que estos estudios indican que el tono cannabinoide neuronal influye en la supervivencia de las neuronas y que puede proteger frente a moléculas patógenas como el Aβ. Estos hallazgos sugieren que una acción farmacológica temprana sobre los niveles de eCB del cerebro puede proteger contra las consecuencias perjudiciales de Aβ, por lo que los inhibidores de FAAH, los cuales sirven para aumentar el tono cannabinoide, pueden ser fármacos potenciales en el tratamiento de la EA. Estos estudios, sin embargo, advierten que este tipo de tratamiento debe utilizarse en las etapas tempranas de la enfermedad debido a que cuando ésta está muy avanzada la utilización de CB empeora la memoria en roedores (Van Der Stelt *et al.*, 2006). Con los antagonistas CB₁ se corre el riesgo de aumentar el proceso neurodegenerativo de la enfermedad, anulando los efectos beneficiosos de tales fármacos en el tratamiento de la amnesia.

Los CB regulan la neurogénesis (Galve-Roperh *et al.*, 2007), por lo que éste podría ser otro mecanismo interesante responsable de la capacidad neuroprotectora de los mismos. Algunos

estudios demuestran que los ratones knockout (KO) de CB₁ tienen una neurogénesis defectuosa (Jin *et al.*, 2004) y que el CB sintético WIN55,212-2 estimula la neurogénesis adulta (Kim *et al.*, 2006).

Un estudio ha revelado que el fitocannabinoide Δ^9 -THC es capaz de inhibir competitivamente la acetil colinesterasa (AChE), incrementando los niveles de ACh. La AChE es el enzima que degrada la acetilcolina, aumentando los niveles de ésta en la hendidura sináptica, por lo que el THC, al ser muy lipofílico y poseer una estructura tricíclica, podría unirse a la AChE, impidiendo la agregación de A β promovida por dicho enzima y disminuyendo la cantidad y tamaño de las PS (Eubanks *et al.*, 2006).

1.4. RELACIÓN ENTRE LOS SISTEMAS CANNABINOIDE Y COLINÉRGICO

La relación entre los sistemas eCB y colinérgico se ha analizado desde el punto de vista funcional y estructural en distintas áreas cerebrales, como el prosencéfalo basal, septo, hipocampo, amígdala, corteza prefrontal y núcleo acumbens.

Hay datos contradictorios acerca de la relación de los CB₁ y el sistema colinérgico en el núcleo basal de Meynert (nbM). En el hipocampo la activación de los RM aumenta la supresión de la neurotransmisión inhibitoria por eCB y potencia su producción. Parece que las interacciones entre los mecanismos muscarínicos y glutamatérgicos responsables de la liberación de eCB se producen a nivel intracelular, y no a nivel receptorial (Kim *et al.*, 2002). Otros resultados apuntan que la activación de RM M₁ y M₃ facilita la liberación de eCB (Ohno-Shosaku *et al.*, 2003).

Otros experimentos muestran interacciones entre los sistemas eCB, colinérgico y GABAérgico. Desde el punto de vista fisiológico las aferencias colinérgicas del septo hacia el hipocampo regulan la actividad de las aferencias excitatorias a esta área a través de la liberación de eCB (Colgin *et al.*, 2003).

A la vista de los antecedentes mencionados se plantearon los **objetivos** de este trabajo que son, por un lado, observar cómo afecta un tratamiento subcrónico mediante agonistas cannabinoides a la actividad de los receptores muscarínicos y cannabinoides y, por otro, estudiar la interacción entre estos dos sistemas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTRAS DE TEJIDO DE RATA

Para la experimentación realizada *in vivo* se emplearon ratas macho Sprague-Dawley de un peso que oscilaba entre 225-275 g. Las muestras se obtuvieron del animalario de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). Los animales se mantuvieron en unas

condiciones de luz, temperatura y humedad controladas (ciclo de luz y oscuridad de 12 horas, 22°C y 65-70% de humedad relativa) y recibieron agua y comida *ad libitum*. El cuidado animal y los protocolos de investigación fueron realizados según las directrices aprobadas por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la UPV siguiendo la legalidad vigente española (RD 1201/2005) y las directivas internacionales (86/609/EEC) (ver anexos).

2.1.1. Obtención y almacenamiento de las muestras en fresco

Durante la experimentación en que se precisó el sacrificio de ratas, se anestesió con ketamina/xilacina (80 mg/kg y 50 mg/kg, respectivamente, i.p.). A continuación, se procedió a la disección del cerebro y se mantuvo a 4°C hasta el momento en que se envolvió en papel de aluminio y se precintó con parafilm para evitar la deshidratación del tejido. Tras ésto, se congeló a -80°C. Las muestras se cortaron en secciones de 20 µm en un microtomo (Microm HM550) a -25°C y se montaron sobre portaobjetos previamente gelatinizados. Las secciones coronales que se obtuvieron corresponden a áreas y vías colinérgicas afectadas en la EA. Éstas se guardaron a dicha temperatura hasta el momento de la realización de los ensayos de autorradiografía de [³⁵S]GTPγS.

2.2. FÁRMACOS UTILIZADOS PARA LOS TRATAMIENTOS

Se realizó un tratamiento subcrónico mediante el agonista cannabinoide WIN55,212-2 (0,5 mg/kg), vehículo (DMSO:Cremofor:salino [1:1:18]) donde se disuelve el WIN55,212-2 y un tratamiento agudo de escopolamina (2 mg/kg). En todos los tratamientos se administró una inyección intraperitoneal de 5 ml a cada rata. En el caso de la escopolamina, se dio únicamente una inyección, 48 horas antes del sacrificio del animal. La administración del WIN55,212-2 se realizó durante 5 días, al igual que su vehículo, y 48 horas después de la última administración se procedió al sacrificio de los animales (**Figura 4**).

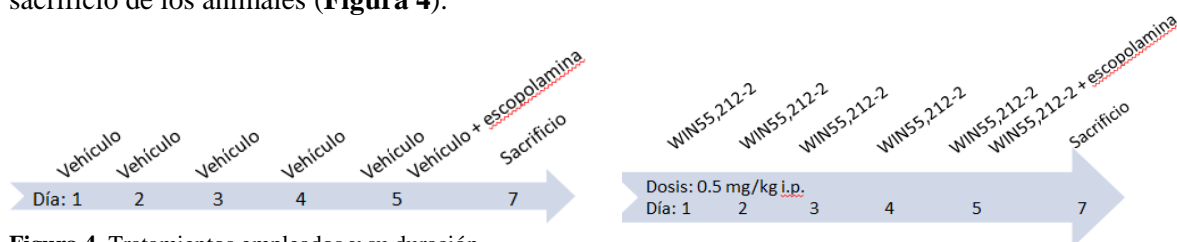


Figura 4. Tratamientos empleados y su duración.

2.3. MARCAJE AUTORADIOGRÁFICO DEL ACOPLAMIENTO FUNCIONAL DE RECEPTORES A PROTEÍNAS G_{I/O}

2.3.1. Radioligandos

En el estudio de la actividad inducida por los RM y RCB a las proteínas G_{i/o}, se utilizó [³⁵S]GTPγS (actividad específica = 1250 Ci/mmol). El presente ligando fue alicuotado en tampón DTT-tricina

(10 mM; pH = 7,4). Este radioligando fue administrado por Perkin Elmer, New England Nuclear (Boston, EE.UU.) y almacenado a -20°C en el momento de recepción y a -80°C una vez alicuotado.

Las [¹⁴C]-microescalas utilizadas como estándares en los experimentos autorradiográficos fueron suministrados por Amersham Biosciences (Barcelona, España).

2.3.2. Fármacos y reactivos utilizados en los ensayos de autorradiografía

Los fármacos utilizados fueron carbacol (C4382, Sigma), WIN55,212-2 (1038, Tocris), también se usó DL-ditiotreitol (DTT), guanosina-5'-difosfato (GDP), guanosina-5'-o-3-tiotrifosfato (GTP γ S). Todos estos reactivos fueron suministrados por Sigma (St. Louis, EE.UU.). Las películas β -sensibles Kodak Biomax MR provienen también de Sigma. Para la preparación de tampones de incubación, tratamiento de portaobjetos y revelado de los films autorradiográficos se utilizaron diversos reactivos que fueron obtenidos de diferentes casas suministradas con un grado de pureza adecuado a las necesidades para los estudios neuroquímicos.

2.3.3. Marcado autorradiográfico de la activación de proteínas G_{i/o} con [³⁵S]GTP γ S

El experimento de cuantificación del acople de RM y RCB a las proteínas G se realizó incubando las secciones de tejido con el radioligando [³⁵S]GTP γ S en presencia de los ligandos para estos receptores. Como agonista de los RM se usó carbacol (100 μ M) y como agonista de los CB se utilizó WIN55,212-2 (10 μ M). El procedimiento utilizado fue similar para todos los tipos de receptores: los portaobjetos con las muestras de tejido se dejaron secar a temperatura ambiente (t.a.) durante 20 minutos. Posteriormente, se preincubaron en tampón de ensayo a pH 7,4 (HEPES 50 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 0,2 mM, NaCl 100 mM) durante 20 minutos a 30°C para eliminar, en lo posible, la presencia de neurotransmisores endógenos. Tras ésto se procedió a preincubar de nuevo las secciones en tampón de ensayo con GDP (2 mM), DTT (1 mM) y adenosina 3 mU/mL, necesaria para disminuir la actividad constitutiva excesiva observada en estos animales. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron durante 2 h a 30°C en el mismo tampón de ensayo en presencia de [³⁵S]GTP γ S (0,04 nM) y con los diferentes ligandos a ensayar. El tampón de incubación para los fármacos cannabinoides contenía 0,5 % de BSA, asimismo los fármacos cannabinoides fueron disueltos en DMSO hasta obtener la concentración final requerida, ambos reactivos son utilizados para aumentar la solubilidad de los fármacos cannabinoides, debido a su carácter lipofílico. La fijación no específica se determinó añadiendo GTP γ S (10 μ M) en cortes consecutivos. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a realizar dos lavados de 15 minutos en tampón HEPES 50 mM (pH 7,4) a 4°C. Tras el segundo lavado se sumergieron las secciones en agua destilada a 4°C para eliminar las sales y se procedió al secado rápido de los portaobjetos mediante la aplicación de una corriente de aire frío.

Posteriormente, los portaobjetos con las secciones correspondientes fueron expuestos a una película radiosensible (Kodak Biomax MR) que se reveló de forma similar a una película fotográfica. El marcaje se cuantificó transformando las diferentes densidades de grises a nCi/g de equivalente de tejido. Para ello cada película se expuso junto con [¹⁴C]-microescalas (Amersham), estándares comerciales previamente calibrados.

2.3.4. Cuantificación autorradiográfica

La cuantificación de los autorradiogramas se realizó mediante la medición de la densidad óptica utilizando un programa informático de análisis de imagen (NIH-image, Bethesda, MA, EE.UU.). Previamente los autorradiogramas se digitalizaron con un escáner de alta resolución. Este programa informático permite cuantificar los niveles de gris en el área anatómica que se pretende analizar y los transforma en densidades ópticas. Para ello los tejidos se exponen junto con unos patrones comerciales previamente calibrados para el ligando marcado con [³⁵S]. Estos estándares están compuestos por un polímero sintético que posee las mismas características de peso específico que el tejido cerebral, y constan de bandas que contienen concentraciones conocidas y crecientes del isótopo radiactivo. La impresión en las películas radiosensibles, generada por los estándares, se cuantifica por densitometría. Esta cuantificación densitométrica, junto con los valores correspondientes de las concentraciones del isótopo, nos permite obtener en cada experimento una curva de calibración, que posibilita una primera transformación de las densidades de gris tisulares en nCi/g t.e. Conociendo la actividad específica de cada radioligando, los valores expresados en nCi/g t.e. se convierten en unidades molares por unidad de tejido. Posteriormente, a cada una de las medidas obtenidas se le han de restar la señal de fondo, donde no hay muestra, y la fijación no específica para esa misma región.

Los datos obtenidos de los experimentos de [³⁵S]GTP γ S se pueden expresar en valores de estimulación neta, restando los valores de la actividad basal a la actividad inducida. Además, también se pueden expresar en porcentajes de estimulación sobre la actividad basal, de acuerdo con la fórmula [(agonista x 100)/basal]-100. Los cálculos de los datos obtenidos de las mediciones se realizaron con el programa informático Microsoft Office.

2.3.5. Análisis estadístico

Los datos se expresan como valores medios \pm error estándar de todas las muestras. Las comparaciones entre parejas de grupos experimentales se analizaron estadísticamente mediante el test *t* de Student (para datos paramétricos y no paramétricos). Para la realización de estos análisis estadísticos se utilizaron los programas Microsoft Office Excel y Prism® (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). En los experimentos de estimulación de la fijación de [³⁵S]GTP γ S con los

dos ligandos en rata, se comprobó que las estimulaciones eran estadísticamente significativas a través de una *t* de Student para datos pareados, considerando un nivel de probabilidad del 95%.

3. RESULTADOS

Tabla 1. Fijación de [³⁵S]GTPγS en tejido de rata control con y sin tratamiento inducida por WIN55,212-2 (10 μM) (media ± SEM)

Región cerebral		% Estimulación WIN55,212-2 sobre el basal	
		Vehículo	Tratamiento
Amígdala			
	Anterior	437 ± 99	336 ± 75
	Lateral	144 ± 55	168 ± 48
	Basolateral	152 ± 41	167 ± 49
	Central	247 ± 102	125 ± 59
	Medial	100 ± 33	98 ± 37
Hipocampo			
CA1 dorsal		230 ± 39	255 ± 68
CA1 ventral			
	Oriens	230 ± 39	178 ± 22
	Piramidal	203 ± 29	625 ± 150*
	Radial	246 ± 95	180 ± 14
	<i>Lacunosum moleculare</i>	204 ± 81	318 ± 63
CA2 dorsal		275 ± 50	234 ± 64
CA3 dorsal		364 ± 77	277 ± 65
CA3 ventral			
	Oriens	25 ± 23	23 ± 16
	Piramidal	321 ± 173	301 ± 145
	Radial	151 ± 62	222 ± 66
Giro dentado dorsal		546 ± 114	420 ± 79
Giro dentado ventral			
	Granular	410 ± 116	484 ± 139
	Molecular	263 ± 61	279 ± 85
	Polimórfico	324 ± 45	406 ± 82
<i>Ventral subiculum</i>		435 ± 97	397 ± 76
Corteza			
	Cingular	331 ± 66	298 ± 55
	Ectorrinal	341 ± 80	313 ± 73
	Entorrinal I-V	403 ± 73	296 ± 61
	Entorrinal VI	518 ± 121	547 ± 120
	Frontal	276 ± 61	304 ± 56
	Motora I-IV	194 ± 45	434 ± 76*
	Motora V	660 ± 58	1288 ± 44***
	Perirrinal	268 ± 56	376 ± 76
	Piriforme	340 ± 110	523 ± 162
	Somatosensorial I-V	213 ± 68	199 ± 49
	Somatosensorial VI	359 ± 77	378 ± 96
Prosencéfalo basal			
	Núcleo basal de Meynert	273 ± 44	553 ± 93**
	Banda diagonal horizontal	308 ± 86	259 ± 67
	Banda diagonal vertical	224 ± 58	777 ± 272*
	Septo medial	206 ± 37	312 ± 88
Núcleo olfatorio lateral		418 ± 121	294 ± 44
Tracto olfatorio lateral		356 ± 76	435 ± 125
Nervio óptico		108 ± 52	141 ± 35
Globo pálido		816 ± 104	964 ± 109
Estriado		394 ± 55	755 ± 152*
Sustancia negra		1674 ± 413	1631 ± 187

Vehículo: (DMSO:cremofofor:salino), tratamiento: WIN55,212-2 (0,5 mg/kg), n = 23, p<0,05*, p<0,01**, p<0,001***.

Tabla 2. Fijación de [³⁵S]GTPγS en tejido de rata control con y sin tratamiento inducida por carbacol (100 μM) (media ± SEM)

Región cerebral		% Estimulación carbacol sobre basal	
		Vehículo	Tratamiento
Amígdala			
	Anterior	73 ± 32	70 ± 26
	Lateral	52 ± 15	64 ± 20
	Basolateral	53 ± 14	57 ± 28
	Central	47 ± 23	30 ± 4
	Medial	72 ± 23	29 ± 10
Hipocampo			
CA1 dorsal		45 ± 9	47 ± 8
CA1 ventral	Oriens	45 ± 9	40 ± 6
	Piramidal	66 ± 19	76 ± 21
	Radial	34 ± 19	105 ± 48
	<i>Lacunosum moleculare</i>	46 ± 11	76 ± 15
CA2 dorsal		40 ± 10	34 ± 12
CA3 dorsal		42 ± 8	32 ± 6
CA3 ventral	Oriens	81 ± 33	77 ± 18
	Piramidal	20 ± 23	59 ± 26
	Radial	25 ± 6	77 ± 42
Giro dentado dorsal		113 ± 18	219 ± 35
Giro dentado ventral			
	Granular	8 ± 10	64 ± 19*
	Molecular	32 ± 15	81 ± 48
	Polimórfico	27 ± 10	28 ± 9
<i>Ventral subiculum</i>		26 ± 12	40 ± 20
Corteza			
	Cingular	99 ± 32	104 ± 21
	Ectorrinal	90 ± 11	117 ± 19
	Entorrinal I-V	82 ± 40	52 ± 18
	Entorrinal VI	64 ± 24	60 ± 30
	Frontal	47 ± 23	72 ± 17
	Motora I-IV	98 ± 27	110 ± 17
	Motora V	162 ± 21	164 ± 29
	Perirrinal	78 ± 35	97 ± 20
	Piriforme	71 ± 26	105 ± 41
	Somatosensorial I-V	112 ± 38	147 ± 39
	Somatosensorial VI	108 ± 41	151 ± 40
Prosencéfalo basal			
	Núcleo basal de Meynert	194 ± 26	367 ± 43**
	Banda diagonal horizontal	126 ± 21	171 ± 39
	Banda diagonal vertical	237 ± 22	374 ± 75*
	Septo medial	272 ± 41	312 ± 45
Núcleo olfatorio lateral		47 ± 8	53 ± 22
Tracto olfatorio lateral		79 ± 18	78 ± 26
Nervio óptico		25 ± 34	26 ± 17
Globo pálido		171 ± 51	119 ± 54
Estriado		163 ± 28	221 ± 43
Sustancia negra		53 ± 14	52 ± 20

Vehículo: (DMSO:cremofofor:salino), tratamiento: WIN55,212-2 (0,5 mg/kg), n = 23, p<0,05*, p<0,01**, p<0,001***.

Las tablas 1 y 2, una para el agonista cannabinoide WIN55,212-2 y otra para el agonista muscarínico carbacol, muestran los datos obtenidos tras cuantificar las diferentes áreas cerebrales con el programa NIH-image y realizar un análisis estadístico. En dicho análisis se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, que se muestran en histogramas (**Figuras 6 y 7**). Los autorradiogramas correspondientes a las áreas del cerebro que han mostrado diferencias significativas se muestran en la **Figura 8**.

3.1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS DE WIN55,212-2

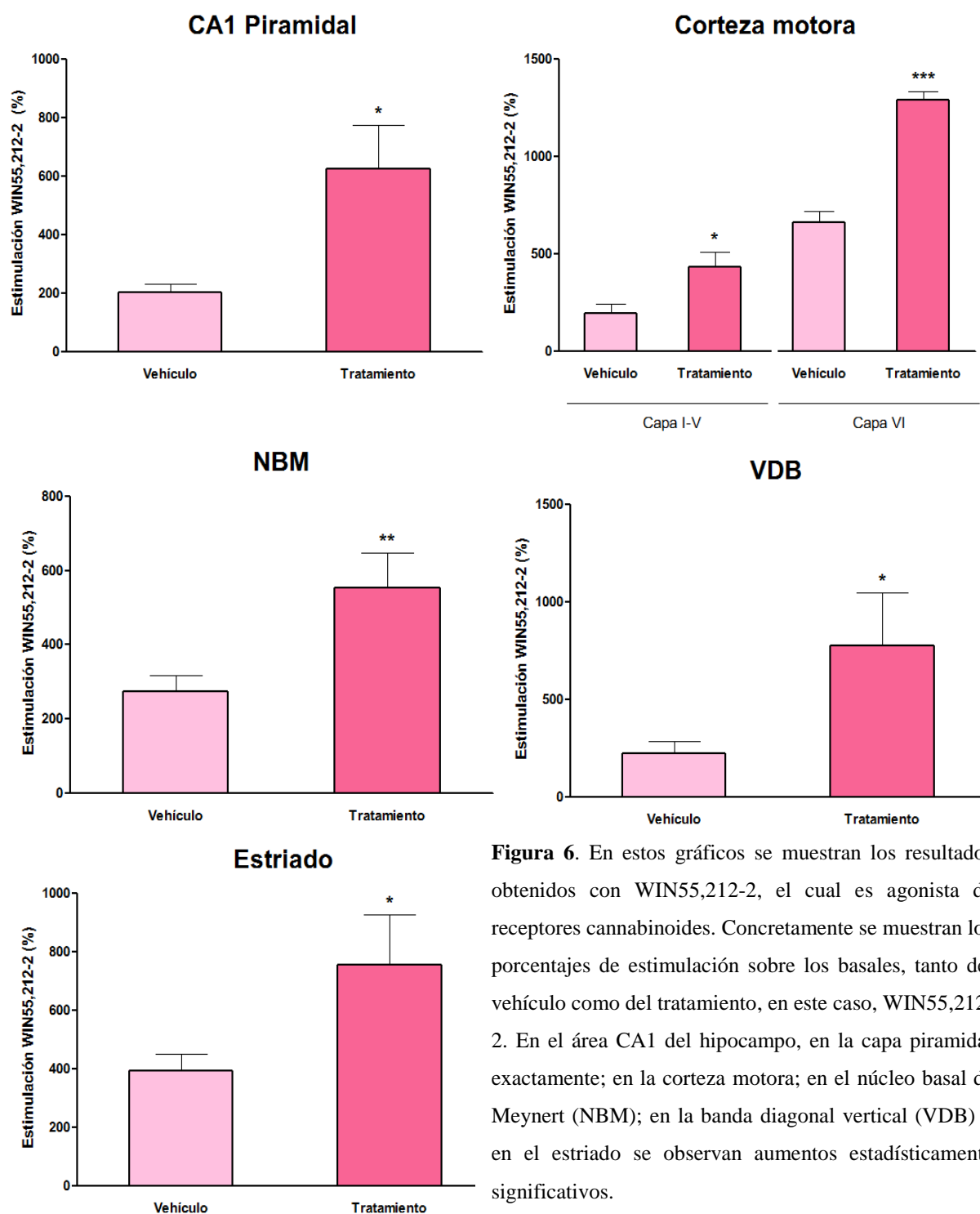


Figura 6. En estos gráficos se muestran los resultados obtenidos con WIN55,212-2, el cual es agonista de receptores cannabinoides. Concretamente se muestran los porcentajes de estimulación sobre los basales, tanto del vehículo como del tratamiento, en este caso, WIN55,212-2. En el área CA1 del hipocampo, en la capa piramidal exactamente; en la corteza motora; en el núcleo basal de Meynert (NBM); en la banda diagonal vertical (VDB) y en el estriado se observan aumentos estadísticamente significativos.

3.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS DE CARBACOL

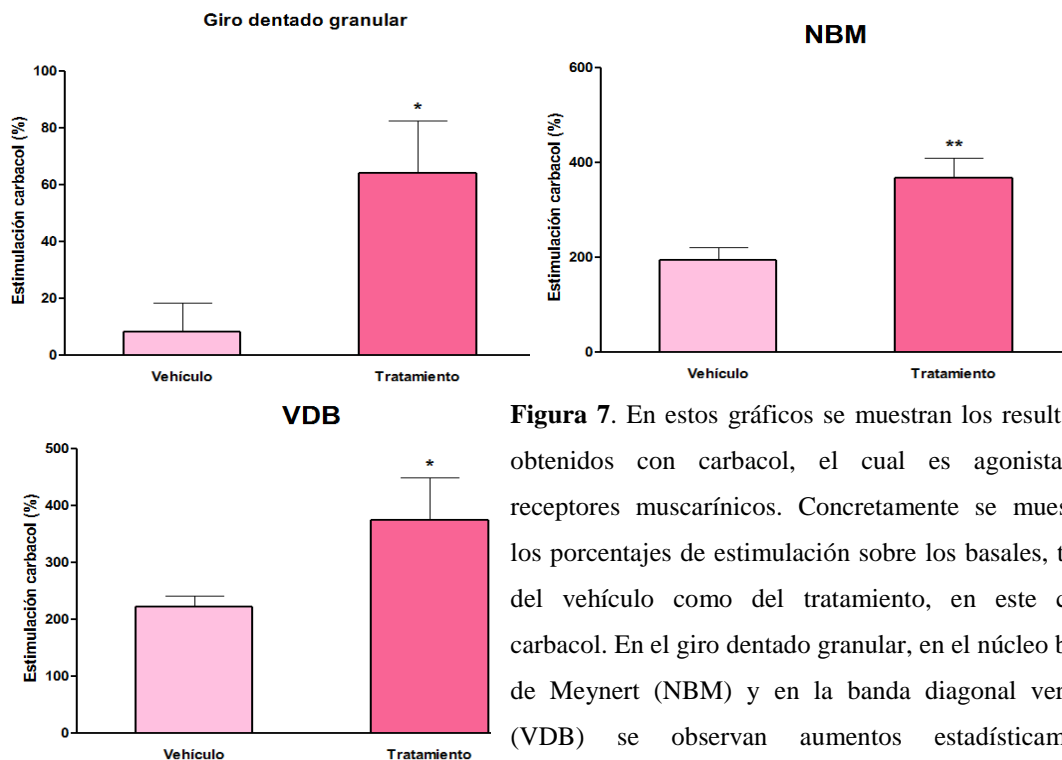


Figura 7. En estos gráficos se muestran los resultados obtenidos con carbacol, el cual es agonista de receptores muscarínicos. Concretamente se muestran los porcentajes de estimulación sobre los basales, tanto del vehículo como del tratamiento, en este caso, carbacol. En el giro dentado granular, en el núcleo basal de Meynert (NBM) y en la banda diagonal vertical (VDB) se observan aumentos estadísticamente significativos.

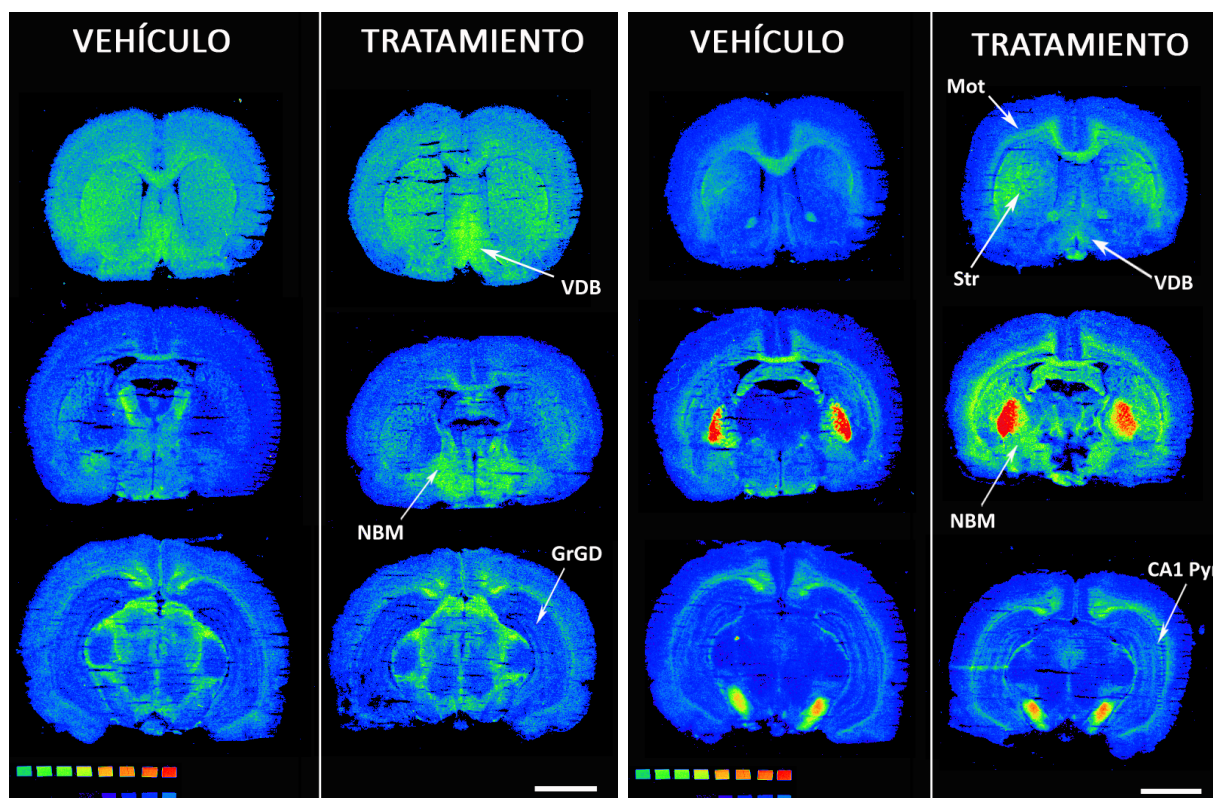


Figura 8. El tratamiento con el agonista cannabinoide WIN55,212-2 (derecha) aumenta la actividad de los receptores cannabinoide en zonas del prosencéfalo basal y en sus proyecciones. Por otro lado, también se observa un aumento de los receptores muscarínicos (izquierda).

4. DISCUSIÓN

En este estudio se llevó a cabo un tratamiento con una dosis baja (0,5 mg/kg) de agonista cannabinoide (WIN55,212-2) durante 5 días. Ésto a nivel neuroquímico provocó una regulación al alza de los receptores tanto cannabinoideos como colinérgicos. Por lo tanto, se corrobora que existe una interacción entre ambos sistemas. En el sistema cannabinoide se observaron aumentos significativos en el área CA1 del hipocampo, concretamente en la capa piramidal; en la corteza motora; en el núcleo basal de Meynert (NBM); en la banda diagonal vertical (VDB) y en el estriado. En cuanto al sistema colinérgico los aumentos se dieron en el giro dentado granular, en el núcleo basal de Meynert (NBM) y en la banda diagonal vertical (VDB). Todas estas áreas están relacionadas con el aprendizaje y la memoria. Todavía no se conoce el mecanismo a través del cual un tratamiento cannabinoide puede regular estos receptores. Sin embargo, dicha regulación se observa positivamente en el comportamiento de los animales utilizados en estudios previos del grupo de investigación. Se observó que tras la administración de un tratamiento subcrónico de WIN55,212-2 junto con una administración aguda de escopolamina el agonista cannabinoide revierte el efecto amnésico que produce este antagonista muscarínico. Estos resultados se obtuvieron a través de la prueba comportamental laberinto de Barnes, un test que mide la memoria espacial.

Otros autores apoyan que la administración crónica de escopolamina aumenta la actividad de receptores muscarínicos, probablemente como un mecanismo compensatorio del bloqueo muscarínico y que el tratamiento con cannabinoideos podría estar imitando (Pietrzak *et al.*, 1989).

Es conocido que la administración de agonistas cannabinoideos produce déficits de memoria. Existen estudios en los que la administración de 5 mg/kg WIN55,212-2 en roedores provoca déficits en la consolidación de la memoria y el aprendizaje. Este estudio difiere del que nosotros hemos realizado en algunos aspectos, por ejemplo la dosis que emplearon fue diez veces mayor a la nuestra (Anushka *et al.*, 2010). Con los resultados que hemos obtenido podría decirse que la dosis utilizada de WIN55,212-2 no provoca déficits cognitivos, quizás porque fue considerablemente menor a la de los estudios anteriores. Cabe decir que otros resultados anteriores del grupo indican que el sistema cannabinoide aumenta en los primeros estadios de la EA (Manuel *et al.*, 2015).

Otros autores proponen que una administración aguda de WIN55,212-2 produce una regulación dosis-dependiente de la neurotransmisión colinérgica del hipocampo. Dosis pequeñas de WIN55,212-2 (0,5 mg/kg) estimulan el flujo de ACh y dosis mayores (5 mg/kg) la inhiben (Tzavara *et al.*, 2003). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual el WIN55,212-2 produce esta modulación, varios estudios muestran que el sistema cannabinoide ejerce una regulación sobre

neuronas colinérgicas en algunas áreas cerebrales, lo que apoya los resultados obtenidos en este trabajo.

Además, el agonista sintético WIN55,212-2 parece ejercer cierta protección colinérgica que podría ser por mecanismos de neuroprotección, de manera similar a lo previamente descrito en modelos de encefalopatía inducida por hipoxiasquémica neonatal (Fernández-López *et al.*, 2006).

Por tanto, los cannabinoides sintéticos se muestran como potenciales herramientas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, sobre todo asociadas a déficits cognitivos, como podría ser la EA.

5. BIBLIOGRAFÍA

- **Anushka V, Goonawardena, Lianne Robinson, Robert E. Hampson, and Gernot Riedel.** *Cannabinoid and cholinergic Systems interact Turing performance of a short-term memory task in the rat.* 2010; Learn Mem. 28, 17 (10).
- **Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D.** *Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition.* Science. 1997 Aug 22;277(5329):1094-7.
- **Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J.** *Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains.* J Neurosci., 2003; 23:11136–11141.
- **Benito C, Tolón RM, Pazos MR, Núñez E, Castillo AI, Romero J.** *Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation.* Br J Pharmacol., 2008; 153:277-285.
- **Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR.** *Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain.* Mol Pharmacol 2001;60:155–63.
- **Carina Valenzuela, Carolina Aguirre, Valeska Castillo, Ana María Ronco, Miguel Llanos.** *A role for the endocannabinoid system in obesity.* Rev. méd. Chile v.138 n.5 Santiago mayo 2010
- **Colgin LL, Kramár EA, Gall CM, Lynch G.** *Septal modulation of excitatory transmission in hippocampus.* J Neurophysiol., 2003; 90(4):2358-2366.
- **Compton DR, Gold LH, Ward SJ, Balster RL, Martin BR.** *Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol.* J Pharmacol Exp Ther 1992;263:1118–26.
- **Di Marzo VI, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D.** *Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.* Nature. 1994 Dec 15;372(6507):686-91.
- **Eleni T. Tzavara, Mark Wade, and George G. Nomikos.** *Biphasic Effects of Cannabinoids on Acetylcholine Release in the Hippocampus: Site and Mechanism of Action.* The Journal of Neuroscience, October 15, 2003 • 23(28):9374–9384
- **Eubanks LM, Rogers CJ, Beuscher AE 4th, Koob GF, Olson AJ, Dickerson TJ, Janda KD.** *A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology.* Mol Pharm. 2006 Nov-Dec;3(6):773-7.
- **Fernández López D, Martínez Ortega J, Nuñez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I.** *Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonista WIN55,212-2 in a in Vitro modelo f hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats.* Pediatr Res., 2006; 60 (2): 169-73
- **Fernández-Ruiz J.** *Fármacos cannabinoides para las enfermedades neurológicas: ¿qué hay detrás?* Rev Neurol 2012; 54: 613-28.
- **Fride E.** *Endocannabinoids in the central nervous system—an overview.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002;66:221–33.
- **Frölich L.** *The cholinergic pathology in Alzheimer's disease - discrepancies between clinical experience and pathophysiological findings.* J Neural Transm. 2002 Jul;109(7-8):1003-13.
- **Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M.** *The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease.* Neuroscientist. 2007 Apr;13(2):109-14. Review.
- **Guzmán M, Galve-Roperh I.** *Endocannabinoides: un nuevo sistema de comunicación en el cerebro.* Real Academia Nacional de Farmacia.
- **Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A, Campbell WB.** *Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion.* J Neurochem. 1997 Aug;69(2):631-8.
- **Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA.** *Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice.* Mol Pharmacol. 2004 Aug;66(2):204-8.
- **Karczmar, A. G.** *Exploring the Vertebrate Central Cholinergic Nervous System.* 2007, XIV, 702 p. 142 illus., 17 illus. In color., Hardcover. ISBN: 978-0-387-28223-7.

- **Kim J, Isokawa M, Ledent C, Alger BE.** *Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus.* J Neurosci. 2002 Dec 1;22(23):10182-91
- **Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA.** *Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity.* Mol Pharmacol. 2006 Mar;69(3):691-6. Epub 2005 Nov 18.
- **Manuel I, González de San Román E, Giralt MT, Ferrer I, Rodríguez-Puertas R.** *Type-1 cannabinoid receptor activity during Alzheimer's disease progression.* J Alzheimers Dis. 2014;42(3):761-6.
- **Marchalant Y, Rosi S, Wenk GL.** *Anti-inflammatory property of the cannabinoid agonist WIN-55212-2 in a rodent model of chronic brain inflammation.* Neuroscience. 2007 Feb 23;144(4):1516-22. Epub 2006 Dec 18.
- **Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder m, Cannich A.** *CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity.* Science, 2003; 302:84-8
- **Mohamad, H., Villasmil, S y Espinoza, J.** (2011). *La Enfermedad de Alzheimer.* México: Trillas
- **Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M.** *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.* Nature 1993;365:61–5.
- **Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, Taketo MM, Manabe T, Kano M.** *Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus.* Eur J Neurosci., 2003; 18(1):109-116.
- **Pharmacologically induced hypothermia with cannabinoid receptor agonist WIN55, 212-2 after cardiopulmonary resuscitation.** Sun S, Tang W, Song F, Chung SP, Weng Y, Yu T, Weil MH. *Crit Care Med* 2010 Dec;38(12):2282-6.
Reviewers: Justin Knittel, MD, and Theodore A. Alston, MD, PhD
Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School
- **Pietrzak ER, Wilce PA, Shanley BC.** *Plasticity of brain muscarinic receptors in aging rats: the adaptative response to scopolamine and etanol treatment.* Neurosci Lett. 1989 ; 9,104(3):331-5
- **Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A.** *Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 May 11;96(10):5802-7.
- **Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML.** *Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: Neuroprotection mediated by blockade of microglial activation.* J Neurosci., 2005; 25:1904–1913.
- **Riedel G, Davies SN.** *Cannabinoid function in learning, memory and plasticity.* *Hand Exp Pharmacol.*, 2005; 168:445–477.
- **Rodríguez-Puertas R, Pazos A, Zarranz JJ, Pascual J.** *Selective cortical decrease of high-affinity choline uptake carrier in Alzheimer's disease: an autoradiographic study using 3H-hemicholinium-3.* J Neural Transm Park Dis Dement Sect 1995;9(2-3):249.
- **Stella N, Schweitzer P, Piomelli D.** *A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation.* Nature. 1997 Aug 21;388(6644):773-8.
- **Van Der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, et al.** *Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: Effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels.* Cell Mol Life Sci., 2006; 63:1410–1424.



Leioa, 31 de Agosto de 2015

A QUIEN PUEDA INTERESAR

Por la presente, el Dr. Rafael Rodríguez Puertas, como Investigador Principal del grupo de investigación de Neuroquímica y Neurodegeneración de la Universidad del País Vasco/E.H.U. ,

CERTIFICA

que Dña. **Matxalen Madariaga Tapia**, en calidad de estudiante de Trabajo de Fin de Grado (TFG) en Bioquímica y Biología Molecular, ha realizado el trabajo de investigación de TFG en el Dpto. de Farmacología de la UPV/EHU bajo mi dirección y que los animales utilizados en dicha experimentación se han ajustado a los proyectos "REF: CEEA 388/2014" y "REF: CEEA 366-1 y 2/ 2014" aprobados por el ente competente (Diputación Foral de Bizkaia).



Fdo. Dr. Rafael Rodríguez Puertas

Investigador Doctor

Director del grupo de investigación "Neuroquímica y Neurodegeneración" de la UPV/EHU



Sarrera/Entrada

10 MAR 2015

Irteera/Salida 2481

Jasotzailea / Receptor

Tokia Bilbao, 19-03-2015

Zure aipamena / Su referencia

Gure aipamena / Nuestra referencia

Gaia / Asunto

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO-
EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA
Att.: *Rafael Rodríguez Puertas*
DPTO. DE FARMACOLOGÍA
Bº Sarriena, s/n
48940-LEIOA

Una vez estudiada la solicitud presentada por la EHU/UPV, de fecha 16.02.2015, referencia CEEA 388/2014, a nombre de RAFAEL RODRÍGUEZ PUERTAS, correspondiente al proyecto “*Estudio neuroquímico de un modelo de lesión colinérgico en rata*”, conforme al R.D. 53/2013, de 1 de febrero, art. 33, punto 6, se informa favorablemente a dicha solicitud con los siguientes requisitos:

- Usuarios del proyecto: *Rafael Rodríguez Puertas – Iván Manuel Vicente – Estibaliz González de San Román.*
- La persona responsable señalada en el art. 32.3 y designada por el Centro es RAFAEL RODRÍGUEZ PUERTAS.
- La investigación se realizará en el Animalario campus de Bizkaia – Dpto. de Farmacología – Facultad de Medicina y Odontología.
- No es necesaria evaluación retrospectiva.
- Periodo de autorización: hasta el 19-03-2018.

Atentamente,



Fdo.: Iñaki Arrazola Madina
JEFE DEL SERVICIO DE GANADERÍA