

**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO:

**CANNABINOIDES FRENTE A LA TOXICIDAD
DEL β -AMILOIDE EN LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER**

Autor: David Cano Gómez

DNI: 50333037K

Tutor: José María Sánchez Montero

Convocatoria: junio 2016

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia en la madurez y se asocia con neurodegeneración y deterioro cognitivo. Los cerebros de pacientes de Alzheimer revelan la existencia de placas seniles de β -amiloide, cuya acumulación origina la muerte neuronal progresiva, deterioro de la memoria, así como pérdida de facultades que conducen a la incapacidad del individuo y, finalmente, la muerte. Esta patología también se asocia con neuroinflamación, estrés oxidativo y excitotoxicidad. La falta de eficacia de las terapias actuales en el tratamiento de la enfermedad hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para frenar su avance. Durante los últimos años, el potencial terapéutico de los cannabinoides, compuestos derivados de la planta *Cannabis sativa*, ofrece una posibilidad en el tratamiento del Alzheimer. Se han descrito alteraciones en el sistema cannabinoide endógeno de enfermos de Alzheimer, indicando un posible rol en la enfermedad. Numerosos estudios indican que los cannabinoides son capaces de reducir la neurotoxicidad inducida por el β -amiloide, actuando sobre los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂. El sistema cannabinoide aparece, de esta manera, como un nuevo blanco terapéutico en el tratamiento de esta patología. En este trabajo abordaremos la capacidad de los cannabinoides para reducir la neuroinflamación, estrés oxidativo y excitotoxicidad, así como para potenciar la neurogénesis en modelos experimentales de Alzheimer.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo, lento y progresivo caracterizado por un deterioro de las funciones cognitivas e intelectuales, siendo la principal causa de demencia en la madurez, especialmente importante en personas de más de 80 años y en la franja de 65 a 80 años. La EA se caracteriza por las cuatro "A": amnesia (falta de recuerdos), afasia (pérdida del habla), agnosia (pérdida de las funciones cognoscitivas) y apraxia (incapacidad de ejecutar movimientos coordinados). Además, también le acompañan síntomas neuropsiquiátricos como depresión, apatía, agresividad y psicosis. El declive cognitivo finaliza con la muerte del paciente en un período medio comprendido entre los 2 y 10 años tras el diagnóstico.

Las dos principales señas de identidad de esta enfermedad son: por un lado, la existencia de placas extracelulares (placas seniles) constituidas por la proteína β -amiloide (β A) y, por otro, los ovillos neurofibrilares intracelulares, que consisten en lesiones asociadas a la proteína *tau* hiperfosforilada. Los depósitos de β A se originan por el procesamiento anormal del precursor

β A (β APP). La EA también se asocia con neuroinflamación, estrés oxidativo y excitotoxicidad.

Recientemente, los cannabinoides han mostrado propiedades neuroprotectoras en la EA *in vitro* e *in vivo* y se postulan como un nuevo enfoque terapéutico en el tratamiento del Alzheimer ante la ineficacia de las terapias actuales para combatir la enfermedad. El sistema cannabinoide endógeno (SCE) incluye los receptores cannabinoides, ligandos endógenos (endocannabinoides) y las diversas enzimas responsables de su síntesis y degradación. Hasta la fecha se han descrito dos tipos de receptores cannabinoides, CB₁ y CB₂, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, generalmente inhibitorias (Gi/o). Sin embargo, ciertos compuestos cannabinoides pueden unirse a otros receptores como GPR55, PPAR- α , PPAR- γ y el receptor potencial transitorio vanilloide 1 (TRPV1). El receptor CB₁ se encuentra en la mayoría de los tejidos, principalmente en el Sistema Nervioso Central (SNC), en regiones implicadas en funciones cognitivas, memoria, ansiedad, dolor, percepción visceral, coordinación motora y funciones endocrinas. El receptor CB₂ se localiza mayoritariamente a nivel periférico, pero también se ha observado su presencia en el SNC, tanto en microglía como en neuronas, y está implicado en el control de la supervivencia neuronal y en proporcionar neuroprotección a través de sus acciones antiinflamatorias.



Figura 1. Distribución de receptores CB₁ y CB₂.

Otros componentes del SCE son los ligandos endógenos de estos receptores, siendo los más importantes la araquidonoiletanolamina (anandamida o AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG). Son compuestos lipídicos que derivan de la degradación de fosfolípidos de membrana y actúan como neuromoduladores de la transmisión sináptica y liberación de neurotransmisores. El 2-AG es más abundante que la AEA en el cerebro y se comporta como agonista completo de CB₁ y CB₂, mientras que la AEA es un agonista parcial de CB₁. Los endocannabinoides se

inactivan rápidamente por transporte específico e hidrólisis enzimática. Estas enzimas son la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerolipasa (MAGL). La FAAH degrada tanto la AEA como el 2-AG y su distribución en el cerebro es similar a la del receptor CB₁.

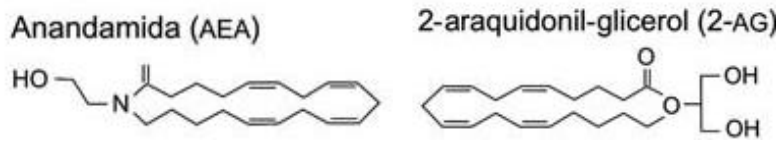


Figura 2. Estructuras químicas de los endocannabinoides AEA y 2-AG.

OBJETIVOS

- Realizar una revisión bibliográfica de los estudios de los cannabinoides en modelos experimentales de Alzheimer describiendo sus efectos beneficiosos sobre la neuroinflamación, estrés oxidativo, excitotoxicidad y mejora de la neurogénesis.
- Determinar si los cannabinoides pueden ser una estrategia terapéutica viable en el tratamiento de la EA.

MÉTODOS

Para la elaboración de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica en la base de datos científica PUBmed-NCBI, además de consultar publicaciones on-line en Google. Para ello, se introdujeron las siguientes palabras clave en el buscador: ``cannabinoide``, ``Alzheimer``, ``neuroinflamación``, ``excitotoxicidad``, ``sistema endocannabinoide``.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema cannabinoide en la EA

Se han observado alteraciones en la expresión de ciertos componentes del sistema cannabinoide endógeno en cerebros de pacientes con EA, lo que sugiere que este sistema contribuye o es alterado por la enfermedad. El análisis *postmortem* de cerebros de Alzheimer revela un aumento en la expresión de ambos receptores en la microglía dentro de las placas, mientras que la expresión del receptor CB₁ aparece disminuida en regiones cerebrales alejadas de la mismas (Ramírez et al., 2005).

En diversos estudios se ha evidenciado una sobreexpresión de la FAAH en la astrogliá alrededor de las placas seniles y en células mononucleares de enfermos de Alzheimer, lo cual

sugiere que esta enzima podría jugar un papel importante en la respuesta glial ante los depósitos de β A.

El trabajo de van der Stelt y colaboradores (2006) ha aportado datos interesantes acerca del potencial terapéutico del sistema endocannabinoide en la EA. Estos autores comprobaron que, tras administrar el péptido β A en la corteza cerebral de ratas, se incrementa la producción del endocannabinoide 2-AG, en un intento de proporcionar neuroprotección frente al daño del β A. Además, en este estudio, la administración del inhibidor de la recaptación VDM-11 fue capaz de revertir la neurotoxicidad y la pérdida de memoria inducida por el β A, aunque estos efectos fueron dependientes de una administración temprana del inhibidor. Además, la anandamida y el éter de noladina reducen la neurotoxicidad del β A *in vitro* mediante activación del receptor CB₁. En consecuencia, estos datos sugieren que un incremento del tono endocannabinoide (mediante la administración de inhibidores de la recaptación o inhibiendo la FAAH) es una estrategia terapéutica posible en el tratamiento de la EA.

Los mecanismos de acción que confieren a los cannabinoides propiedades neuroprotectoras frente al β A y, en última instancia, una mejoría de la memoria son diversos e interactúan entre ellos. Aunque la mayoría de estos mecanismos están relacionados con la capacidad de paliar indirectamente los efectos perjudiciales del β A (inflamación, estrés oxidativo, excitotoxicidad), se han descrito efectos directos de los cannabinoides en el procesamiento del β A. Así, la estimulación de los receptores CB₂ permite la eliminación del β A por los macrófagos, mientras que el receptor CB₁ no ha demostrado contribución alguna en el procesamiento, agregación o eliminación del β A en dos modelos transgénicos de Alzheimer. Además, el Δ^9 -THC incrementa significativamente la expresión de la neprilisina, una importante endopeptidasa para la degradación del β A, permitiendo un notable descenso del péptido en las placas seniles. Asimismo, el Δ^9 -THC se une al sitio aniónico periférico de la acetilcolinesterasa (AChE), región implicada en la agregación del β A (revisado de Aso y Ferrer, 2014).

Modulación de la neuroinflamación por cannabinoides

La neuroinflamación es uno de los rasgos característicos de los enfermos de Alzheimer que contribuye al daño celular y pérdida neuronal. Los cannabinoides han demostrado en diversos estudios *in vitro* e *in vivo* efectos beneficiosos en atenuar el proceso inflamatorio. El análisis *postmortem* de cerebros de Alzheimer muestra un elevado número de astrocitos y microglía alrededor de las placas seniles, así como elevados niveles de de citoquinas proinflamatorias

como IL-1, IL-6 y TNF- α . Además, los receptores CB₂ están regulados al alza en la microglía activada y astrocitos, donde las placas son abundantes. La activación *in vitro* del receptor CB₂ reduce la producción de mediadores proinflamatorios como la IL-1 β , especies reactivas de oxígeno (ROS) y prostaglandinas. Este control sobre la inflamación puede ser debido al impacto sobre factores de transcripción, como el NF- κ B. Asimismo, estos efectos neuroprotectores de los cannabinoides incluyen la producción de especies antiinflamatorias como la IL-1ra.

De esta manera, la manipulación de las rutas y señalización intracelular que median la inflamación es un objetivo en el tratamiento de la EA (revisado de Campbell y Gowran, 2007).

Marchalant y colaboradores (2009) estudiaron el efecto del agonista sintético no selectivo CB₁/CB₂ WIN55, 212-2 en ratas de edad avanzada. WIN redujo los niveles de la microglía activada mediante antagonismo del receptor TRPV1 y promovió neurogénesis en el hipocampo a través de los receptores CB₁ y CB₂. Además, este cannabinoide disminuyó los niveles del mRNA de la IL-6 (proinflamatoria) e incrementó IL-1ra (antiinflamatoria). Los niveles de TNF- α e IL-1 β también descendieron. En la activación patológica de la microglía está implicado el receptor CD40, cuya activación en estas células conduce a la producción de TNF- α y otras neurotoxinas no identificadas. En cultivos primarios de microglía el tratamiento con IFN- γ aumentó la expresión de CD40, que condujo a la activación de diferentes vías de señalización como JAK/STAT1. El agonista cannabinoide CB₂ JWH-015 anuló la expresión CD40 en la microglía e inhibió la fosforilación de STAT1 inducida por IFN- γ , evitando de este modo la señalización de la vía JAK/STAT1. De esta manera, la activación CB₂ suprimió la producción de TNF- α y óxido nítrico (NO) inducido por IFN- γ en presencia de CD40 (Erhart et al., 2005).

Para el estudio tanto del desarrollo de la patología como de posibles terapias es fundamental contar con buenos modelos animales y celulares que permitan analizar los mecanismos moleculares y efectividad de los posibles tratamientos. En este sentido, con el ánimo de desarrollar un modelo de EA, Ramírez y colaboradores (2005) inyectaron el péptido β A vía intracerebroventricular en ratas y observaron un incremento de la activación microglial junto con deterioro cognitivo y pérdida de marcadores neuronales. El cannabinoide WIN55, 212-2 mejoró estos efectos atribuidos a los receptores CB₁ y CB₂. Además, otros compuestos como

JWH-133 (agonista selectivo CB₂) y HU-210 (agonista CB₁/CB₂) fueron capaces de prevenir igualmente la activación microglial y controlar la liberación de TNF- α .

Las variaciones de las concentraciones intracelulares de calcio ([Ca²⁺]_i) participan en la respuesta inflamatoria y en la activación de la microglía. El incremento de ATP extracelular liberado por las neuronas que mueren y células gliales puede aumentar la [Ca²⁺]_i y activar la microglía. El cannabidiol (CBD), WIN55, 212-2 y JWH-133 redujeron el incremento de [Ca²⁺]_i inducido por ATP de una forma concentración-dependiente en la línea microglial N13. Por el contrario, HU-308, otro agonista selectivo CB₂, careció de este efecto. El efecto de WIN fue antagonizado por antagonistas selectivos CB₁ y CB₂, mientras que el del CBD no se alteró. En cambio el antagonismo sobre CB₂ sí bloqueó el efecto de ambos agonistas en cultivos de microglía primaria de ratón. Todos los cannabinoides estudiados (CBD, WIN, JWH, HU) redujeron la generación de nitritos a las 24 horas de la adición de lipopolisacárido (LPS). Por último, el CBD y WIN, tras la administración subcrónica durante 3 semanas en ratones que fueron inyectados con β A, fueron capaces de reducir la expresión de IL-6 (y parcialmente de TNF- α) y el déficit cognitivo que mostraban (Martín-Moreno et al., 2011).

Asimismo, se investigó *in vivo* los efectos del CBD sobre la neuroinflamación en ratones inyectados con β A. La administración del CBD durante 7 días inhibió el mRNA y la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y redujo la expresión y liberación de la iNOS e IL-1 β , evidenciando las propiedades antiinflamatorias de este compuesto (Esposito et al., 2007).

Wu y su grupo de trabajo (2013) estudiaron el efecto de otro agonista CB₂ en ratas en las que se inyectó fibrillas del β A en el hipocampo. El tratamiento con 1-(3-bencil-3-metil-2,3-dihidro-1-benzofuran-6-il) piperidina (MDA7) durante 14 días mostró los siguientes resultados: 1) disminución en la expresión de marcadores de la glía y astrocitos, 2) reducción de la IL-1 β , 3) descenso en la expresión de receptores CB₂, 4) estimulación de la eliminación del β A y 5) recuperación de la plasticidad sináptica, cognición y memoria. Estos hallazgos hacen del MDA7, por tanto, una innovación terapéutica en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Los animales transgénicos han permitido a los investigadores imitar la amiloidosis y neuroinflamación encontrados en la EA. Están basados en las diversas mutaciones que originan los casos de Alzheimer familiar. Los más utilizados son los modelos que incluyen, al menos, una mutación en el gen del APP y junto con ésta pueden llevar mutaciones en el gen

de las presenilinas (PS1 y PS2) y/o la proteína *tau*. En este sentido, Martín-Moreno y colaboradores (2012) estudiaron en ratones transgénicos APP los efectos de la administración oral de dos cannabinoides diferentes farmacológicamente (WIN55,212-2 y JWH-133). JWH-133 carece de efectos psicoactivos, lo que supone una gran ventaja para su uso clínico, aunque WIN a bajas dosis podría carecer igualmente de dichos efectos. Dado que los autores pretendían estudiar los efectos preventivos de dicho tratamiento, los cannabinoides fueron administrados a los 7 meses de edad, en una etapa presintomática, cuando los ratones todavía no exhibían el péptido β A en las placas. Los ratones mostraron deterioro cognitivo acompañado de activación microglial y liberación de citoquinas proinflamatorias causado por la elevada carga del β A, pero JWH-133 normalizó el déficit cognitivo (WIN fue inefectivo). Ambos cannabinoides consiguieron reducir los niveles de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la expresión del TNF- α . Asimismo, ambos compuestos disminuyeron la carga del β A en el cerebro y favorecieron su transporte a través del plexo coroideo *in vitro*. Estos autores concluyeron que los agonistas cannabinoides, especialmente del receptor CB₂, reducen la inflamación y sus consecuencias (déficit cognitivo) en la EA.

En diversos experimentos Aso y su grupo de trabajo usaron ratones doble transgénicos de APP/PS1 para dilucidar las funciones de los receptores cannabinoides en la neuroinflamación (Aso et al., 2012, 2013). La administración del agonista selectivo CB₁ araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA) en estadios presintomáticos de la enfermedad redujo el declive cognitivo en este modelo de ratón, aunque no tuvo efecto alguno en la producción, agregación o aclarado del β A. No obstante, ACEA consiguió reducir los efectos tóxicos de los oligómeros de β A₄₂ en cultivos de neuronas corticales, e inhibió la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK3 β) *in vitro* e *in vivo*. La GSK3 β es la principal enzima responsable de la hiperfosforilación de *tau* y, por tanto, de la formación de ovillos neurofibrilares, por lo que su inhibición es de gran interés terapéutico. Además, ACEA rebajó la expresión de la citoquina proinflamatoria IFN- γ en astrocitos y respuesta astrogial alrededor de las placas. Además, la estimulación selectiva CB₂ por JWH-133 en estadios presintomáticos mejoró la cognición en estos ratones. Este efecto se asoció con un descenso de la respuesta inflamatoria de la microglía y con la disminución de la expresión de las citoquinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , así como con la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10. En adición, JWH-133 también fue capaz de reducir la hiperfosforilación de *tau* cerca de las placas al inactivar la GSK3 β . De esta manera, Aso y sus colaboradores demostraron que la activación de los

receptores CB₁ y CB₂ permite combatir la neuroinflamación y la hiperfosforilación de *tau*, además de detener la pérdida de memoria en enfermos de Alzheimer.

Diversos estudios han identificado al receptor γ activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR- γ) como mediador de los efectos antiinflamatorios de los cannabinoides. Los receptores PPARs son una familia de factores de transcripción nucleares que participan en la expresión genética, metabolismo de lípidos y glucosa y respuesta inflamatoria. Esposito y colaboradores (2011) investigaron los efectos del CBD en ratas tratadas con β A. Se observó un incremento en la liberación de NO, IL-1 β , TNF- α y S100B, efectos que fueron contrarrestados por el CBD. Además, en lisados de astrocitos el CBD atenuó la expresión de la iNOS, GFAP y S100B inducida por el β A mediante inhibición del NF- κ B. El antagonista PPAR- γ GW9662 inhibió la actividad antiinflamatoria del CBD, sugiriendo una función esencial del PPAR- γ en los beneficios de este cannabinoide.

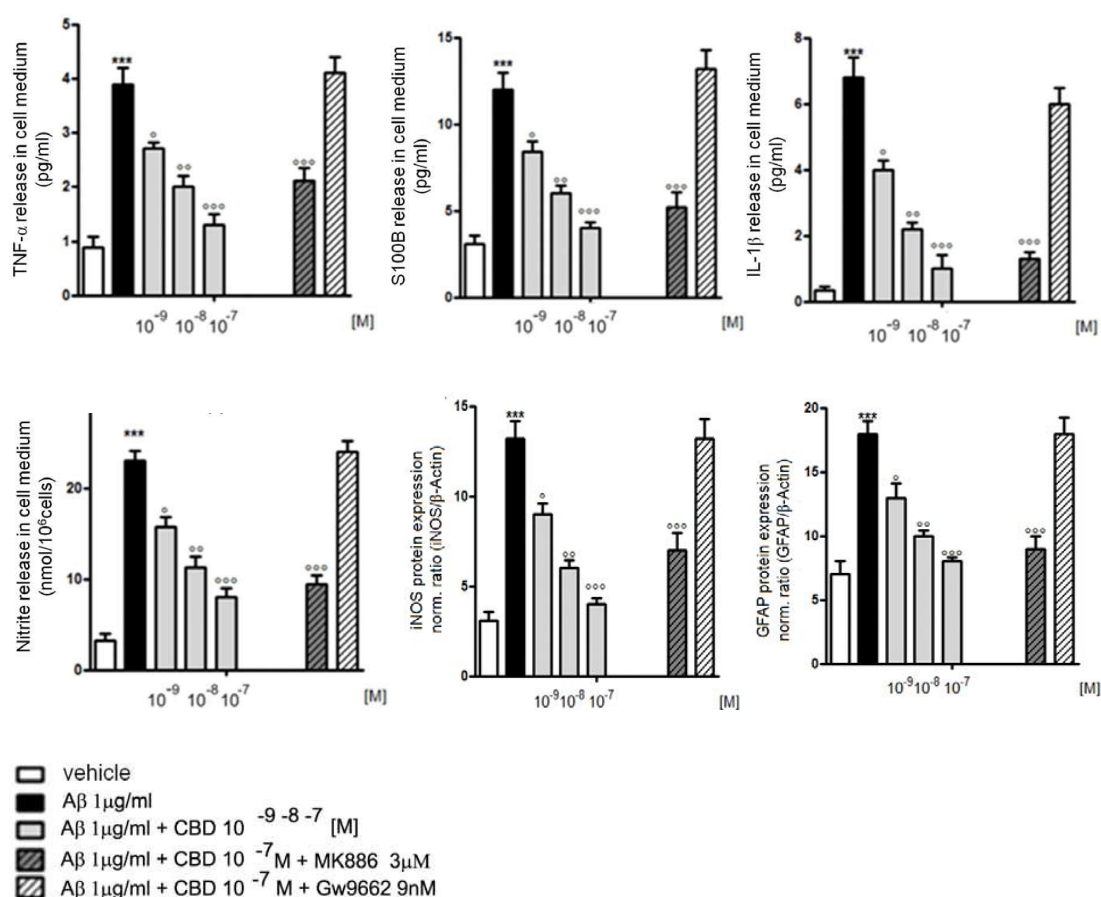


Figura 3. Efectos del CBD sobre la liberación y expresión de mediadores inflamatorios por astrocitos *in vitro* e *in vivo*.

Fakhfouri y colaboradores (2012) también investigaron la actividad del cannabinoide WIN55, 212-2. Se administró el péptido β A por vía intracerebroventricular en el hipocampo de ratas causando deterioro de la memoria y elevación brusca de los niveles de TNF- α , caspasa 3 y NF-k β . La administración de WIN mejoró significativamente la memoria y redujo las concentraciones de los marcadores anteriores, mientras que el antagonismo ya sea de receptores CB₁ o CB₂ atenuó en parte estos efectos neuroprotectores. Curiosamente, WIN incrementó los niveles de PPAR- γ , así como su actividad transcripcional, aunque este efecto fue inhibido por AM251 (antagonista CB₁ selectivo), sugiriendo que la potenciación de esta vía fue crucial en la neuroprotección observada por WIN. Además, el antagonista selectivo PPAR- γ GW9662 revirtió parcialmente los efectos mostrados por WIN. La coadministración de GW9662 junto con AM251 y SR144528 (antagonista selectivo CB₂) eliminó por completo los beneficios de WIN. Por tanto, estos autores concluyeron que WIN es un cannabinoide prometedor para evitar el daño por el β A, ejerciendo sus acciones neuroprotectoras y antiinflamatorias a través de los receptores CB₁ y CB₂. Asimismo, la potenciación de la señalización de PPAR- γ , ya sea directamente o mediante activación del receptor CB₁, contribuye a la neuroprotección de WIN.

Por otro lado, las enzimas de degradación de los endocannabinoides AEA y 2-AG también contribuyen a modular el proceso inflamatorio en modelos de EA. Estas enzimas son la FAAH y la MAGL. La expresión permanente de la FAAH en astrocitos conlleva una disminución del tono endocannabinoide y agrava los efectos tóxicos del β A. Sin embargo, astrocitos de ratones sin FAAH genéticamente modificados muestran un fenotipo inflamatorio caracterizado por aumento de citoquinas proinflamatorias y muerte celular si se exponen al β A (Benito et al., 2012). La expresión de TNF- α , iNOS y COX-2 también aumentó con respecto a los astrocitos de ratones controles. En estos cambios observados participaron el PPAR- α , PPAR- γ y TRPV1 (pero no CB₁ ni CB₂). Estos datos sugieren que una potenciación prolongada del tono endocannabinoide puede ser contraproducente en la modulación del proceso inflamatorio.

Recientemente, se ha descubierto la MAGL, enzima que degrada el endocannabinoide 2-AG en ácido araquidónico, precursor de eicosanoides en el cerebro. Piro y colaboradores (2012) mostraron que la inactivación genética de la MAGL en ratones APP/PS1 redujo la neuroinflamación y la carga amiloide en este modelo de EA. La inactivación genética de la MAGL conllevó un notable descenso de la IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Asimismo, descendió el número de placas de β A y los niveles totales del péptido en el cerebro.

Cannabinoides y estrés oxidativo

El estrés oxidativo es uno de los eventos centrales en los enfermos de Alzheimer y puede estar causado por la respuesta inmune, la excitotoxicidad y el β A. El β A puede generar estrés oxidativo por sí mismo, pero también puede hacerlo a través de la generación de NO en la microglía y astrocitos. El NO es fundamental en la etiopatogenia de la EA, pues promueve directamente la hiperfosforilación de *tau* y, por consiguiente, la formación de ovillos neurofibrilares (Esposito et al., 2006a). De hecho, la microglía es la mayor fuente de ROS en el cerebro, principalmente a través de la NADPH oxidasa, enzima muy activa en un cerebro de Alzheimer (Fagan y Campbell, 2015). El estrés oxidativo también está estrechamente relacionado con la alteración de la homeostasia del calcio y disfunción mitocondrial.

Las propiedades antioxidantes de los derivados del cannabis, mayormente del CBD, se evidenciaron en cultivos celulares expuestos a niveles tóxicos del neurotransmisor glutamato. El CBD demostró mayor protección que el α -tocoferol o la vitamina C frente a la neurotoxicidad por glutamato, indicando su potente efecto antioxidante (Booz, 2011). En este sentido, el CBD aumentó significativamente la supervivencia neuronal en células PC12 (una línea celular de feocromictoma de ratas) expuestas al β A. Asimismo, el CBD disminuyó la producción de ROS, peroxidación lipídica, niveles de caspasa 3, fragmentación del DNA y $[Ca^{2+}]_i$. La actividad antioxidante del CBD para reducir ROS no fue modificada por el antagonismo sobre CB_1 , de tal manera que las acciones antioxidantes de este cannabinoide fueron independientes de este receptor (Iuvone et al., 2004). El CBD mostró también neuroprotección en células neuronales PC12 expuestas al β A inhibiendo la hiperfosforilación de *tau*, en un efecto mediado por la señalización de la vía Wnt- β -catenina. Al reducir la fosforilación de la GSK3 β , enzima que potencia el procesamiento anómalo del APP, se reduce la carga amiloide en el cerebro (Esposito et al., 2006b). Asimismo, en esta misma línea celular expuesta a los efectos tóxicos del β A, el CBD demostró inhibición concentración-dependiente tanto en la producción de NO como en la expresión de la iNOS. Este efecto ocurrió como consecuencia de la inhibición del NF- κ β y la p38MAP quinasa (Esposito et al., 2006c).

Aparte del CBD, otros cannabinoides han mostrado su capacidad antioxidante en modelos animales de EA. Así, WIN55, 212-2 y ACEA, por activación CB_1 , redujeron la expresión de la iNOS y NO en células C6 de glioma de ratas expuestas al β A. Además, ambos

cannabinoides inhibieron concentración-dependiente la producción de NO en cultivos celulares PC12, aminorando la hiperfosforilación de *tau* vía CB₁ (Esposito et al., 2006a).

El agonista selectivo CB₂ JWH-133 redujo la expresión de aductos hidroxinonales (HNE), que derivan de la peroxidación lipídica, e incrementó los niveles de las superóxido dismutasas SOD1 y SOD2 en ratones APP/PS1 alrededor de las placas (Aso et al., 2013). Estos datos indican la capacidad de los receptores CB₂ en la defensa frente al daño oxidativo.

En el modelo de ratón transgénico PK^{-/-}/Tau^{VLW} (un modelo que combina la sobreexpresión de *tau* junto con deposición amiloide), se investigaron los efectos de Sativex[®], una mezcla de Δ⁹-THC y CBD. Sativex[®] combina diversos efectos neuroprotectores, tales como la estimulación de los receptores CB₁ y CB₂ por el Δ⁹-THC y las acciones antioxidantes del CBD. En comparación con placebo, Sativex[®] disminuyó la activación microglial y la expresión de la iNOS en la corteza cerebral, con el consiguiente descenso en la producción de NO. Los niveles de la chaperona Hsp-70, proteína que aparece elevada en situaciones de estrés, disminuyeron significativamente. Además, Sativex[®] redujo los niveles de oligómeros de βA y el número de placas en el hipocampo y corteza cerebral (Casarejos et al., 2013).

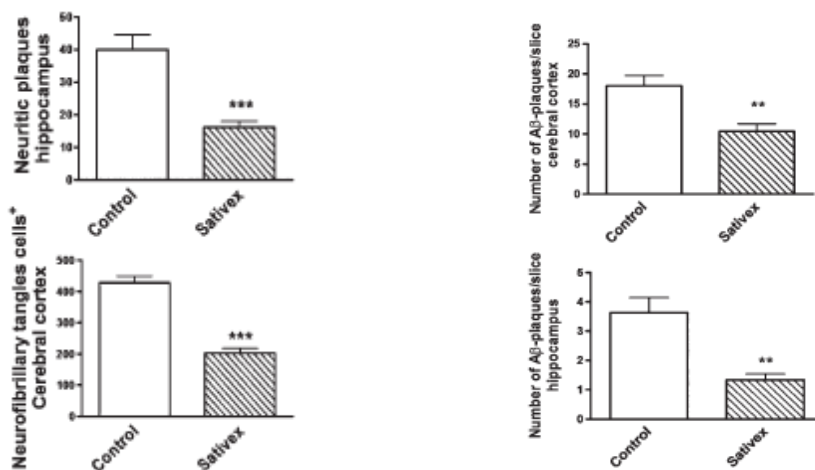


Figura 4. Efectos de Sativex[®] sobre el número de placas de βA y ovillos neurofibrilares.

Apoyando la evidencia de los cannabinoides frente al estrés oxidativo, Chung y colaboradores (2012) investigaron los efectos de WIN55,212-2 y HU-210 en ratas inyectadas con lipopolisacáridos (LPS). Los LPS indujeron pérdida neuronal, activación de la microglía y de la NADPH oxidasa, así como producción de ROS y elevación de citoquinas proinflamatorias. Tanto WIN55,212-2 como HU-210 inhibieron la elevación de citoquinas proinflamatorias y la activación de la NADPH oxidasa y, por tanto, la producción de ROS en las ratas.

Cannabinoides y excitotoxicidad

La excitotoxicidad es otro de los procesos patológicos que contribuye a la muerte neuronal en la EA y resulta de la excesiva estimulación de receptores ionotrópicos, como el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), por glutamato y otros aminoácidos excitatorios. El β A puede por sí mismo activar al receptor NMDA y reducir la recaptación de glutamato por los astrocitos, agravando la excitotoxicidad. Igualmente, el β A es capaz de activar canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y formar poros permeables a este ión en las membranas lipídicas, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como mecanismo excitotóxico. Las neuronas, en su intento de reducir el calcio citosólico, consumen energía mediante bombas iónicas en el retículo endoplásmico, membrana plasmática y mitocondria. Este descenso de los niveles ATP se asocia con excitotoxicidad. Además, el aumento de calcio genera ROS y activa enzimas apoptóticas Ca^{2+} dependientes como la calcineurina y catepsina (Fagan y Campbell, 2015). Por tanto, toda estrategia capaz de reducir el flujo de calcio al interior celular y limitar la excitotoxicidad puede conferir neuroprotección en la EA.

Los efectos neuroprotectores de ciertos cannabinoides se asocian a la regulación de la excitotoxicidad del receptor NMDA. El HU-211 demostró ser un inhibidor estereoselectivo del NMDA y confirió protección en cultivos neuronales de ratas (revisado de Campbell y Gowran, 2007). Estudios *in vivo* e *in vitro* manifiestan la síntesis y liberación de endocannabinoides tras reproducir modelos de excitotoxicidad (como la aplicación del ionóforo del calcio o por despolarización de la membrana inducido por ácido kaínico). La síntesis Ca^{2+} dependiente de anandamida y 2-AG sugiere que los endocannabinoides se generan como consecuencia del incremento de Ca^{2+} intracelular con el fin de controlar la excitotoxicidad. La activación del receptor CB_1 confiere protección frente a la excitotoxicidad en cultivos neuronales de médula espinal e hipocampo de ratón, posiblemente por inhibición presináptica de la entrada de calcio, con el consiguiente descenso de la actividad glutamatérgica (revisado de Campbell y Gowran, 2007). En sinaptosomas cultivados de ratas, la 4-aminopiridina facilitó la entrada de calcio al interior celular e indujo la liberación de glutamato, pero el cannabinoide WIN55,212-2, por activación del receptor CB_1 , inhibió este efecto (Fagan y Campbell, 2015). Utilizando cultivos de neuronas corticales de ratones, la estimulación por NMDA provocó la muerte en un 70% de las células; pero la co-incubación de WIN contrarrestó este efecto. La neuroprotección de WIN fue frustrada por el antagonismo sobre el receptor CB_1 . Además, la estimulación del receptor NMDA incrementó la producción

de NO, efecto que fue contrarrestado por WIN. De nuevo, el antagonismo CB₁ revirtió el efecto beneficioso (Fagan y Campbell, 2015).

La excitotoxicidad inducida por ácido kaínico activa el sistema cannabinoide endógeno y aumenta la supervivencia neuronal en áreas de la corteza e hipocampo, mediante la activación del receptor CB₁. Pero, ¿cómo reduce la excitotoxicidad la activación CB₁? Marsicano y su grupo de trabajo (2003) inyectaron ácido kaínico en ratones *knockout* de receptores CB₁ y observaron una reducción significativa en la fosforilación de la p-42 y p-44 ERK, así como en *c-fos* y *zif268*, dos genes conocidos por su protección frente a la excitotoxicidad y que son inducidos mediante fosforilación de ERK.

La activación del receptor CB₁ también afecta a la homeostasis de calcio regulando su liberación de los depósitos intracelulares. Utilizando cultivos neuronales de hipocampo, la activación del receptor NMDA causó un incremento de [Ca²⁺]_i, pero el tratamiento con WIN55,212-2 revirtió este efecto. Además, la rianodina, ligando que regula la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, redujo el incremento de [Ca²⁺]_i causado por NMDA. La coadministración con WIN potenció este efecto inhibitorio. El antagonismo CB₁ de SR141716A anuló estos efectos neuroprotectores. Además, estos autores observaron que tanto WIN como CP55,940 (agonista CB₁) disminuyeron la muerte neuronal dosis y tiempo dependiente mediante inhibición de la vía AMPc/PKA (Fagan y Campbell, 2015).

Cannabinoides y neurogénesis

Otro mecanismo que podría ser responsable del potencial de los cannabinoides para conferir neuroprotección es su capacidad para inducir neurogénesis en el cerebro adulto. De hecho, existe amplia evidencia de que los procesos de aprendizaje y memoria dependen de la neurogénesis. En varios modelos animales de Alzheimer se ha visto disminución de la neurogénesis, aunque el análisis *postmortem* de cerebros de pacientes con EA mostró un aumento de la misma, siendo insuficiente para frenar el avance de la enfermedad. Durante el progreso de la enfermedad se observa un marcado descenso de la expresión de receptores para neurotrofinas en neuronas colinérgicas, así como del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Por ello, los mecanismos que potencian la expresión tanto del BDNF como del factor de crecimiento nervioso (NGF) han demostrado una mejora en la cognición, memoria y supervivencia neuronal en modelos animales de Alzheimer.

Diversos estudios han mostrado que los cannabinoides son capaces de modificar los niveles de factores tróficos que pueden contribuir a la neuroprotección. Por ejemplo, el Δ^9 -THC administrado de forma crónica puede aumentar los niveles del BDNF en diversas zonas cerebrales. En el ratón *knockout* CB₁ la expresión del BDNF se encontró reducida *in vivo* como consecuencia de la excitotoxicidad inducida por ácido kaínico (Marsicano et al., 2003) e *in vitro*, resultando en una mayor pérdida neuronal (revisado de Campbell y Gowran, 2007). En líneas celulares fuera del SNC, el Δ^9 -THC y la anandamida indujeron la liberación del NGF mediante la activación de la vía PI3K/PKB (revisado de Campbell y Gowran, 2007). El agonista HU-210, por activación CB₁, promovió proliferación, aunque no diferenciación, en el hipocampo de ratas adultas, efecto atribuido a la señalización por ERK y proteínas G (Fagan y Campbell, 2015). Además, demostró efectos ansiolíticos y antidepresivos, posiblemente debidos a la mejora de la neurogénesis (revisado de Campbell y Gowran, 2007).

Por otro lado, los modelos animales manipulados genéticamente ponen de manifiesto el papel de ciertas proteínas del sistema endocannabinoide en la neurogénesis. Gao y colaboradores (2010) generaron ratones *knockout* de diacilglicerol lipasa α (DGL $\alpha^{-/-}$) y diacilglicerol lipasa β (DGL $\beta^{-/-}$); la DGL es la enzima que sintetiza el 2-AG, el cannabinoide más abundante en el cerebro. Estos autores observaron una reducción del 80% y 50% en los niveles de 2-AG en los ratones DGL $\alpha^{-/-}$ y DGL $\beta^{-/-}$, respectivamente. Asimismo, se observó un deterioro de la neurogénesis, efecto atribuido a la pérdida de la supresión gabaérgica en el hipocampo por el 2-AG.

La excitotoxicidad inducida por ácido kaínico provoca la proliferación de células progenitoras neurales *in vivo*, las cuales generan los diferentes fenotipos celulares del Sistema Nervioso. Ratones deficientes del receptor CB₁ no conservan esta capacidad neuroprotectora y, además, mostraron una reducción del factor de crecimiento para fibroblatos básico en el cerebro (bFGF). El bFGF y el BDNF aumentan su expresión en el hipocampo tras la administración de ácido kaínico *in vivo* por activación CB₁, efecto que no reprodujeron estos ratones *knockout*. Estos autores concluyeron que el receptor CB₁ está implicado en la proliferación de progenitores neurales y neurogénesis tras provocar un daño excitotóxico. La señalización por el bFGF juega un papel central en este proceso (Aguado et al., 2007).

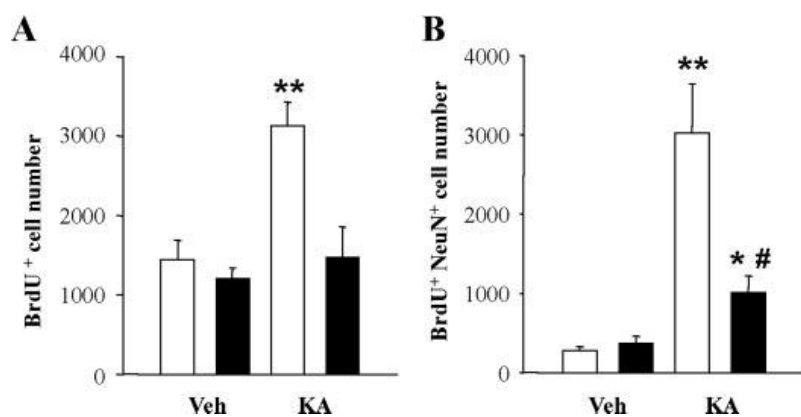


Figura 5. La excitotoxicidad induce neurogénesis por activación del receptor CB₁. La imagen A representa el número de células nuevas, identificadas como BrdU⁺, tras el tratamiento con placebo (veh) o ácido kaínico (KA) en ratones controles (barras blancas) y deficientes en receptores CB₁ (barras negras). B muestra el proceso de neurogénesis en estos mismos animales determinado por el número de células BrdU⁺ NeuN⁺.

Cannabinoides: utilidad en la práctica clínica

El potencial terapéutico de los cannabinoides para la EA sólo se ha explorado en unos pocos estudios. En un ensayo clínico de 15 pacientes con Alzheimer, el tratamiento con dronabinol (una preparación oleosa de Δ^9 -THC) durante 6 semanas mejoró el apetito y el comportamiento de estos pacientes. Los efectos adversos asociados a la administración de este cannabinoide fueron mínimos y se limitaron a euforia, cansancio y somnolencia. Asimismo, dos estudios pilotos de 8 pacientes con demencia tratados con dronabinol mostraron una disminución de la agitación nocturna y alteraciones del comportamiento, sin efectos adversos asociados. En esta misma línea, la nabilona, un agonista CB₁, demostró efectos beneficiosos en la severidad de la agitación y agresividad en un paciente con Alzheimer avanzado y refractario a tratamientos ansiolíticos y antipsicóticos. Además, están en marcha dos ensayos clínicos en fase II para evaluar la eficacia y seguridad del namisol, comprimidos orales de Δ^9 -THC, en pacientes con Alzheimer y demencia vascular (Fagan y Campbell, 2015).

CONCLUSIONES

La EA es un trastorno cerebral caracterizado por la pérdida progresiva de memoria y funciones cognitivas. Hasta ahora, ninguna terapia ha resultado efectiva para detener la progresión de la enfermedad. Sin embargo, los cannabinoides han demostrado en modelos

animales efectos beneficiosos sobre los procesos patológicos característicos de la enfermedad, como inflamación, estrés oxidativo, excitotoxicidad y pérdida neuronal.

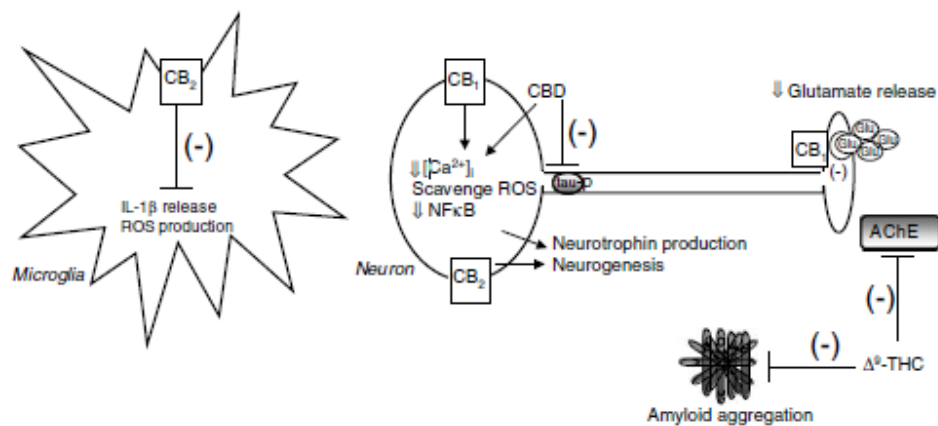


Figura 6. Dianas del sistema cannabinoide en el tratamiento de la EA.

A pesar de los efectos psicoactivos de ciertos cannabinoideos (especialmente el Δ^9 -THC), son sustancias bastante seguras en el contexto de su aplicación clínica. El éxito de una terapia cannabinoide podría implicar el uso combinado de agonistas CB₁ y CB₂ con el fin de cubrir el amplio abanico terapéutico mostrado por estos compuestos, junto con CBD, que exhibe gran parte de sus propiedades neuroprotectoras independiente de la señalización endocannabinoide. Igualmente, será de vital importancia un diagnóstico precoz y administrar cuanto antes el tratamiento para frenar el avance de la enfermedad.

De esta manera, el sistema endocannabinoide emerge como un nuevo blanco terapéutico prometedor en el tratamiento de la EA, aunque es necesario llevar a cabo una investigación básica más profunda y ensayos clínicos más exhaustivos para considerar la eficacia del tratamiento cannabinoide en la EA.

BIBLIOGRAFIA

Aguado T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G et al. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(33):23892-23898.

Aso E, Palomer E, Juvés S, Maldonado R., Muñoz F.J , Ferrer I.(2012). CB1 agonist ACEA protects neurons and reduces the cognitive impairment of A β PP/PS1 mice. *J. AlzheimersDis*. 30, 439–459.

Aso E, Juvés S, Maldonado R, Ferrer I.(2013).CB2 cannabinoid receptor agonist ameliorates Alzheimer-like phenotype in A β PP/PS1 mice. *J. Alzheimers Dis.* 35, 847- 858.

Aso E, Ferrer I. Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Frontiers in Pharmacology.* 2014;5.

Benito C, Tolón R, Castillo A, Ruiz-Valdepeñas L, Martínez-Orgado J, Fernández-Sánchez F et al. β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB1 or CB2 receptors. *British Journal of Pharmacology.* 2012;166(4):1474-1489.

Booz G. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine.* 2011;51(5):1054-1061.

Casarejos MJ, Perucho J,Gómez A, Muñoz MP, Fernández-Estévez M, Sagredo O et al.(2013).Natural cannabinoids improve dopamine neurotransmission and tau and amyloid pathology in a mouse model of tauopathy. *J. Alzheimers Dis.* 35, 525–539.

Campbell V, Gowran A. Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids? *British Journal of Pharmacology.* 2007;152(5):655-662.

Chung E, Bok E, Chung Y, Baik H, Jin B. Cannabinoids prevent lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra in vivo through inhibition of microglial activation and NADPH oxidase. *Brain Research.* 2012;1451:110-116.

Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y et al. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *Journal of Neuroinflammation.* 2005;2(1):29.

Esposito G, De Filippis D, Maiuri M, De Stefano D, Carnuccio R, Iuvone T. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in β -amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF- κ B involvement. *Neuroscience Letters.* 2006c;399(1-2):91-95.

Esposito G, De Filippis D, Steardo L, Scuderi C, Savani C, Cuomo V et al. CB1 receptor selective activation inhibits β -amyloid-induced iNOS protein expression in C6 cells and

subsequently blunts tau protein hyperphosphorylation in co-cultured neurons. *Neuroscience Letters*. 2006a;404(3):342-346.

Esposito G, De Filippis D, Carnuccio R, Izzo A, Iuvone T. The marijuana component cannabidiol inhibits β -amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/ β -catenin pathway rescue in PC12 cells. *Journal of Molecular Medicine*. 2006b;84(3):253-258.

Esposito G, Scuderi C, Savani C, Steardo L, Filippis D, Cottone P et al. Cannabidiol in vivo blunts β -amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. *British Journal of Pharmacology*. 2007;151(8):1272-1279.

Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna G, Latina V, De Filippis D et al. Cannabidiol reduces A β - induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR- γ involvement. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28668.

Fagan S, Campbell V. Endocannabinoids and Alzheimer's disease. *Cannabinoids in neurologic and mental disease*. 1st ed. Cagliari: Liana Fattore; 2015. p. 15-27.

Fakhfouri G, Ahmadiani A, Rahimian R, Grolla A, Moradi F, Haeri A. WIN55212-2 attenuates amyloid-beta-induced neuroinflammation in rats through activation of cannabinoid receptors and PPAR- γ pathway. *Neuropharmacology*. 2012;63(4):653-666.

FarmacologiaBasica < Cannabis < Web Fundació Institut Català de Farmacologia [Internet]. W3.icf.uab.es. 2016. Disponible en:

<http://w3.icf.uab.es/ficf/es/bin/view/Cannabis/FarmacologiaBasica?skin=print.cannabis>

Gasque MJ, Romero C. Enfermedad de Alzheimer. Facultad de Farmacia, UCM.

Gao Y, Vasilyev D, Goncalves M, Howell F, Hobbs C, Reisenberg M et al. Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(6):2017-2024.

Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo A. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*. 2004;89(1):134-141.

Marchalant Y, Brothers H, Norman G, Karelina K, DeVries A, Wenk G. Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis. *Neurobiology of Disease*. 2009;34(2):300-307.

Maroof N, Pardon M, Kendall D. Endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(6):1583-1587.

Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*. 2003;302(5642):84-88.

Martín-Moreno A, Reigada D, Ramírez B, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A et al. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Molecular Pharmacology*. 2011;79(6):964-973.

Martín-Moreno A, Brera B, Spuch C, Carro E, García-García L, Delgado M et al. Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers β -amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9(1):8.

Piro J, Benjamin D, Duerr J, Pi Y, Gonzales C, Wood K et al. A dysregulated endocannabinoid-eicosanoid network supports pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Reports*. 2012;1(6):617-623.

Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(8):1904-1913.

van der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Matias I, Petrosino S, Filippis D et al. Endocannabinoids and β -amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2006;63(12):1410-1424.

Wu J, Bie B, Yang H, Xu J, Brown D, Naguib M. Activation of the CB2 receptor system reverses amyloid-induced memory deficiency. *Neurobiology of Aging*. 2013;34(3):791-804.