

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**MECANISMOS DE LA ACCIÓN
NEUROPROTECTORA DE LOS CANNABINOIDES
EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana María Martín Moreno

Bajo la dirección de las doctora

María L. de Ceballos la Farga

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-1426-2

© Ana María Martín Moreno, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**MECANISMOS DE LA ACCIÓN NEUROPROTECTORA
DE LOS CANNABINOIDES EN LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER**

Tesis Doctoral

Ana María Martín Moreno

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**MECANISMOS DE LA ACCIÓN NEUROPROTECTORA
DE LOS CANNABINOIDES EN LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER**

Memoria presentada por
Ana María Martín Moreno
Para optar por el grado de Doctora

VºBº de la Directora:

Dra. María L. de Ceballos la Farga

A todos los que me han enseñado algo

Agradecimientos

Le agradezco a la Dra. María L. de Ceballos, la dirección de mi tesis doctoral, todos los consejos recibidos en estos años (científicos y personales), y el estar siempre cerca (a dos metros de distancia), para cualquier duda o problema.

Gracias por todo el apoyo recibido de Pilar López Larrubia, Sebastián Cerdán y el servicio del SIERMAC, en general, para la realización de las resonancias magnéticas y su análisis. A Luis García, Mercedes Delgado y Miguel A. Pozo, del centro PET por el estupendo trabajo realizado con nuestros animales.

A Jose Luis Trejo por enseñarme tanto sobre comportamiento y a manejar ciertos programas de informáticos.

A I. Torres-Aleman por los primeros animales de nuestra colonia de transgénicos. Y a sus técnicos (Lola, Isa) por enseñarme a perfundir, entre otras cosas.

A M^a Ángeles Arévalo por todas las clases de biología molecular, por ayudarme siempre que lo necesité. Y a Concha Torres por toda la ayuda con los cultivos.

A Jazz y el servicio de macromoléculas por toda vuestra ayuda.

A Laude y el personal de animalario por facilitarme el trabajo, por todos los animales.

También quiero agradecer a Nadia Innamorato y a Antonio Cuadrado el análisis de expresión de citoquinas. Y a la Dra. Eva Carro su ayuda en los estudios de transporte a través de plexos coroides. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

A Tibor Harkany por acogerme durante tres meses en su laboratorio de Escocia, a Jan Mulder por ayudarme durante mi estancia, y a Peppe Tortoriello por las PCRs, y toda la pasta.

Cuando se llega a este punto, ya has leído un poco: papers, tesis,... y la verdad es que todas te parecen iguales, incluso los agradecimientos son iguales, puede que cambien los nombres, pero la esencia es siempre la misma.

Yo, estoy perdida, ya ha acabado aquello que guió mi vida durante los últimos 6 años, 6 años hace ya... el primer día que entré a trabajar en el laboratorio era un 10 de septiembre del año 2004, y poco mas puedo decir de aquel día, salvo que olvidé todo lo que me dijeron. Allí estaban tres personas con las que pasaría la mayor parte del tiempo: María, Taty y Belén. Nombres llenos de buenos recuerdos, María, la jefa, mi primera jefa. Taty, el faro de sabiduría del laboratorio, gracias por darme tu punto de vista sobre la vida y por enseñarme a apreciarlo. Belén, mi amiga por encima de todo, gracias por los buenos consejos (eran muy buenos, aunque no te hiciera caso en todos). Y este era mi laboratorio (porque lo siento mío, como todos los becarios). Cuando era la única becaria me sentía sola, pero pronto me di cuenta de que las paredes del Instituto Cajal son muy finas, y me sentí parte de todo. Parte del laboratorio vecino, Bea, Edu, Diego, Wolfi, Vilma, Manolo Jr. gracias por hablar tan alto, por reiros tanto. Parte del laboratorio de Paty y Ale (o Laura y Carmen, como me gusta llamarlas), gracias por las charlas sobre los peores experimentos (la qPCR 2.0, la in situ 2.0,...), sobre los problemas y las soluciones, por los peces y los caracoles.

Recuerdo cuando Julia y MA. Arévalo estaban al fondo del pasillo, gracias por los divertidos congresos Julia.

Cada vez se iba haciendo más grande ese laboratorio virtual en el que me movía, y encontré nuevas caras, Jorge, Lau, Fer, Blanche, nuevas adquisiciones, como María, becarios de Laura (Lopez Mascaraque) y Juan (de Carlos), siempre

Agradecimientos

riendo, siempre ocupados, siempre con una sonrisa, tanto jefes como becarios y Nieves (la encantadora de roedores). Después llegó una amiga, Miriam y con ella todo su laboratorio (Miri miri, Leyre, Frida, Paula, Ana, Eli) que me dieron compañía y cariño durante un tiempo, muchas gracias a todas y a su jefa, Carmen, gracias por preocuparte, por ser encantadora.

Durante un tiempo tuve a David y Susi para hacerme compañía en las cuatro paredes de mi laboratorio, gracias a ambos por haber estado allí, por enseñarme a quitar importancia a las circunstancias en que conoces a la gente. Y sobre todo gracias a Bego porque sin ella nada habría sido lo mismo y a Taty (de nuevo), gracias a las dos por vuestra gran ayuda en los últimos meses.

Gracias por el trabajo en equipo a María y Bego, que han conseguido que terminara a tiempo y a Edu por animarme a cambiar la maquetación.

Cuanto tiempo ha pasado... iba llegando el final, y con ello las cosas se me complicaron, porque es complicado ver el final de una época tan importante y entonces llegaron Asun y Lorenzo, un remanso de paz y compañía, gracias a los dos. Lo que me recuerda a otras tres personas que me ayudaron a abrirme a este centro, Elsa, Josune y Carmen (confocal), muy al principio de esta aventura, gracias.

Y durante todo este tiempo siempre tuve a mi lado a mis, primero compañeros de facultad y ahora amigos, Rubén, Fátima, Tamara, Isa, Josué, Pedro, Miriam, Ricardo y por supuesto Marta, compañera inestimable y pareja de baile. Seguramente no lo habría hecho sin vosotros, sencillamente, ni siquiera se me habría ocurrido.

Gracias Antonio, por meterme en este lio tan genial, porque si pudiera te daría la mitad del título.

A mi familia, que hacen que me sienta en casa en cualquier sitio con su sola presencia (mis padres, Maite y Bernardo; mis hermanos, Diego y Bernardo), que aguantan mis disertaciones científicas estoicamente, y me dan los empujones que hagan falta. A mi abuelo Benigno, por tirar para adelante, siempre. Una mención especial a mi hermano Bernardo y a Antonio por la ayuda técnica, que han hecho que la escritura haya sido sencilla y amena. Un agradecimiento extra a mi hermano Diego por convencerme durante el primer y duro año de carrera para que no la dejara.

Y gracias a todas aquellas personas del Cajal con las que me he cruzado en estos seis años, gracias por saludar y tener una sonrisa para cualquiera, porque ese cualquiera pude haber sido yo, y porque pude necesitarla.



David Petersen © Mouse Guard

Ah! Y que no se me olviden mis preciosos ratones, gracias bichos.

2-AG	2- Araquidonoilglicerol
AC	Adenilato ciclasa
AChE	Acetilcolinesterasa
ADC	Coeficiente de difusión aparente del agua
AEA	Anandamida o Araquidonoil etanolamida
AICD	<i>Amyloid intracelular domain</i>
AMT	<i>Anandamide membrane transporter</i>
APH-1	<i>Anterior pharynx-defective-1</i>
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora del amiloide
APP ^{swe}	Mutación sueca del APP
A β	β -Amiloide
BACE	<i>β site APP cleaving enzyme</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BHE	Barrera hemato encefálica
CB _{1/2}	Receptor cannabinoide ^{1 ó 2}
CBD	Cannabidiol
Cho	Colina
COX	Ciclo oxigenasa
Crea	Creatina
DAG	Diacil glicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DCL	Deterioro cognitivo leve
EGF	Factor de crecimiento derivado de endotelio
FAAH	Amido hidrolasa de ácidos grasos
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluoro-deoxiglucosa
fMLP	Formil-Metionina leucina fenilalanina
GABA	Acido γ -aminobutírico
GSK	Glucogeno sintasa quinarasa
IDE	<i>Insuline-like derived enzyme</i>
IFN γ	Interferón γ
IL-6	Interleuquina 6
LCR	Líquido cefalorraquídeo

Abreviaturas

LPS	Lipopolisacárido
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mi	mio-Inositol
MRI	Imagen por resonancia magnética
MT	Transferencia de magnetización
NAA	N-acetilaspártato
NAPE	N-araquidonoil_fosfatidiletanolamina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
NSAID	Anti-inflamatorios no esteroídicos
PEA	Fosfatidil-etanolamina
PEN	Presenilina
PET	Tomografía por emisión de positrones
PI	Fosfatidil-inositol
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-quinasa
PIB	Compuesto de Pittsburgh
PLD/B/A	Fosfolipasa D / B / A
PS1/2	Presenilina 1 / 2
RAGE	Receptor para productos de glicosilación avanzada
RM	Resonancia magnética
SNC	Sistema nervioso central
SPECT	Tomografía por emisión de protón único
TgAPP	Transgénico APP
THC	Tetrahidrocannabinol
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TRPV1	<i>Transient Receptor Potencial Vanilloid 1</i> (receptor Vaniloide 1)

INTRODUCCIÓN	7
La Enfermedad de Alzheimer	9
1. Aspectos generales.....	9
1.1 Epidemiología y etiología	9
1.2 Síntomas	10
2. Neuropatología de la enfermedad	10
2.1 El APP, su procesamiento	12
2.2 El componente inflamatorio de la EA y la microglía.....	17
3. Diagnóstico	21
4. Tratamientos	23
5. Modelos de la enfermedad	26
5.1 Modelos farmacológicos.....	26
5.2 Modelos transgénicos.....	28
Los Cannabinoides	30
1. Historia de los cannabinoides.....	30
2. El sistema endocannabinoide.....	31
2.1 Biosíntesis y liberación de los endocannabinoides	32
2.2 Finalización de la señalización endocannabinoide	33
2.3 Receptores y señalización celular	35
2.4 Ligandos cannabinoides.....	37
2.5 Modulación de funciones microgliales por cannabinoides	38
3. Neuroprotección mediada por cannabinoides.....	40
Neuroimagen	44
1. Aspectos generales.....	44
2. Resonancia magnética nuclear (RMN) en EA	45
2.1 Imágenes estructurales.....	46
2.2 Coeficiente de la difusión aparente del agua (ADC).....	47
2.3 Transferencia de Magnetización (MT).....	48
3. Espectroscopía in vivo por Resonancia Magnética	49
3.1 Significado biológico de los metabolitos	50
4. Tomografía por Emisión de Positrones de FDG.....	51
4.1 EL PET en la EA	52
4.2 PET en animales transgénicos.....	53
4.3 Otros radioligandos para la EA	54
Objetivos	55
MATERIALES Y MÉTODOS	57
Ensayos in Vitro	59
1. Cultivos	59
1.1 Cultivos primarios de microglía	59
1.2 Cultivo de líneas microgliales.....	59
1.3 Ensayos de migración	60
1.4 Valoración de Nitritos:	63
1.5 Transporte a través de barrera hematoencefálica	63
Ensayos in Vivo	63
1. Animales	63
2. Genotipado de los transgénicos	64

3. Tratamiento subcrónico con agonistas cannabinoides ratones C57 inyectados con A β	65
4. Tratamiento oral prolongado de los animales Transgénicos APP	66
5. Tests de Comportamiento	67
5.1 Actividad Motora	67
5.2 Laberinto de agua de Morris (water maze)	67
5.3 Reconocimiento de objetos	68
6. Sacrificio de los animales y recogida de muestras	69
7. Análisis bioquímicos	69
7.1 Análisis de las proteínas por Western Blotting.....	69
7.2 Valoración de A β 1-40 y A β 1-42 mediante ELISA.....	70
7.3 Valoración de los niveles de Endocannabinoides.....	70
7.4 Análisis de la expresión génica	71
8. Estudios de neuroimagen	71
8.1 Imágenes por Resonancia Magnética (IRM).....	71
8.2 Espectroscopia in vivo por Resonancia Magnética.....	74
8.3 Captación de 18F-Fluorodeoxiglucosa (18-FDG) por Tomografía por Emisión de Positrones	75
9. Inmunohistoquímica.....	76
10. Estadística	77
RESULTADOS	79
Efectos de los cannabinoides sobre funciones de la microglía (ensayos in vitro)	81
1. Localización de receptores cannabinoides en microglía	82
2. Ensayos de Migración microglial en la línea N13	82
3. Ensayos de migración microglial en microglia primaria de rata	84
4. Migración de la línea microglial N13 sobre secciones de enfermos de Alzheimer e individuos control	86
5. Reducción de la producción de nitritos en microglia promovida por LPS mediante fármacos cannabinoides	87
Efectos in Vivo del tratamiento subcrónico con agonistas cannabinoides en ratones C57 inyectados con Aβ:.....	89
1. Efectos del tratamiento subcrónico con cannabinoides sobre distintos parámetros de comportamiento	90
2. Efectos del tratamiento con cannabinoides sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias en ratones inyectados con A β	92
Efectos in Vivo del tratamiento oral prolongado con agonistas cannabinoides en el modelo Tg APP:	95
1. Efecto del genotipo y de los cannabinoides sobre la actividad motora y parámetros cognitivos.....	96
1.1 Efecto agudo del WIN sobre la actividad motora:.....	96
1.2 Actividad motora	97
1.3 Prueba de navegación espacial (Water Maze):	99
1.4 Reconocimiento de Objeto Nuevo:	101
2. Estudios longitudinales de neuroimagen	102
2.1 Mapas de Coeficiente de Difusión Aparente del Agua (ADC):.....	103
2.2 Mapas de Transferencia de Magnetización (MT):	106

2.3 Espectroscopía in vivo por Resonancia Magnética:.....	108
2.4 Tomografía por Emisión de Positrones (PET) FDG a los 4 meses de tratamiento:	111
3. Análisis multivariante de los resultados in vivo	113
4. Estudios bioquímicos tras el tratamiento oral prolongado con agonistas cannabinoides en el modelo Tg 2576 de la enfermedad de Alzheimer:	115
4.1 Niveles de β -Amiloide y valores de P-GSK3 β en corteza cerebral.....	115
4.2 Modulación de parámetros inflamatorios en corteza cerebral.....	118
4.3 Modulación del sistema endocannabinoides en los Tg APP a los 12 meses de edad, tras 4 meses de tratamiento oral con WIN y JWH	120
4.4 Resultados de los análisis Inmuno histoquímicos:	122
<u>DISCUSIÓN</u>	129
1. Acción de los cannabinoides sobre funciones microgliales “in vitro”	131
2. Efectos del tratamiento ip subcrónico con cannabinoides sobre un modelo farmacológico de EA “in vivo”	134
3. Efectos del tratamiento crónico con cannabinoides sobre un modelo transgénico de EA	136
3.1 Pruebas de comportamiento	137
3.2 Estudios longitudinales de neuroimagen.....	140
3.3 Estudios bioquímicos	145
Conclusiones	153
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	155

INTRODUCCIÓN



La Enfermedad de Alzheimer

1. Aspectos generales

1.1 Epidemiología y etiología

La enfermedad de Alzheimer (EA), descrita por Alois Alzheimer en 1907, es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva. Es la causa más común de demencia, afecta a un 7% de las personas mayores de 65 años y al 40% de los mayores de 80 años.

En España el número de pacientes se ha duplicado en 7 años, probablemente debido a un cambio en el patrón diagnóstico por parte de los médicos, de tal forma que en los últimos años se han diagnosticado como EA casos que antes no eran catalogados como tales. En España en el año 2007, el Alzheimer estuvo implicado en el 2.6% de todas las defunciones (1.5% en hombres y 3.8% en mujeres). Desde 1990, el riesgo de mortalidad por esta enfermedad se ha multiplicado por 5 en hombres y por 7 en mujeres. El número de pacientes actualmente supera los 800.000, se calcula que en 15 años podría llegar a ser 1.2 millones en España y según las Naciones Unidas hay 50 millones de afectados en todo el mundo.

Existen dos tipos de EA, según su origen: la familiar y la esporádica.

La de origen familiar, es la menos frecuente (con una incidencia menor del 1% de todos los casos), la enfermedad se inicia entre los 40 y 60 años y su origen son mutaciones monogénicas. Estas mutaciones tienen lugar en tres genes principalmente, que expresan las siguientes proteínas: la proteína precursora del amiloide (APP) en el cromosoma 21; la presenilina-1 en el cromosoma 14 y la presenilina-2 en el cromosoma 1, las dos últimas son componentes esenciales de la γ -secretasa, enzima responsable del procesamiento aberrante del APP, para la producción de péptidos amiloides.

La enfermedad de origen esporádico se inicia más tarde que la familiar, a partir de los 65 años y es la que tiene mayor incidencia en la población (99%). Aunque su etiología es desconocida, sí se conocen algunos factores de riesgo: el género, ya que es más común en mujeres que en hombres, hecho probablemente relacionado con la disminución de los niveles de estrógenos post-menopáusicos (Farrer et al., 1997); el bajo nivel educativo; altos niveles de estrés oxidativo; infarto; hipertensión; diabetes; depresión; infecciones; tumores; deficiencias vitamínicas; exposición a químicos. Otros factores de riesgo incluyen la presencia de ciertos polimorfismos genéticos (Brown et al., 2005): apolipoproteína E4 (Apo E4, cromosoma 19), fundamental para el metabolismo de triglicéridos y del colesterol (Farrer et al., 1997); α 2-

macroglobulina (cromosoma 12); un componente de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (cromosoma 14); variante K de la butiril-colinesterasa por su interacción con la APO E4; así como mutaciones en el genoma mitocondrial relacionadas con susceptibilidad a estrés oxidativo (Law et al., 2001).

1.2 Síntomas

La principal característica de la enfermedad es una pérdida progresiva e insidiosa de la memoria. Al comienzo el paciente muestra incapacidad para realizar las actividades cotidianas, dificultades para escribir, hablar, desorientación espacial y una marcada reducción en la capacidad para resolver problemas. Más adelante van apareciendo síntomas comportamentales como hiperactividad, alteraciones en los ciclos del sueño, pérdidas de las capacidades sociales y agresividad, que aparecen de forma continuada y creciente. Además desarrollan síntomas no cognitivos, como ansiedad, depresión, delirio y alucinaciones.

Algunos de los síntomas clínicos son incontinencia, disfagia y pérdida de peso. En las etapas terminales de la enfermedad, los pacientes no son capaces de reconocer a nadie, están anclados a la cama y pierden la capacidad de comprensión. Normalmente la muerte sobreviene por complicaciones secundarias a la enfermedad y al debilitamiento que conlleva, como neumonía, embolia pulmonar o sepsis (Steele et al., 1990).

Desde el comienzo de los primeros síntomas, la enfermedad dura una media de 7 a 10 años, durante los cuales va aumentando la dependencia de los enfermos (Law et al., 2001), lo que conlleva un elevado gasto económico tanto para el sistema de salud, como para la familia. Por ello el desarrollo de nuevas terapias que permitiesen, no ya acabar con la enfermedad, sino retardar su establecimiento o alargar la vida, serían fundamentales en una sociedad como la nuestra cada vez más envejecida.

2. Neuropatología de la enfermedad

La enfermedad de Alzheimer es un proceso neurodegenerativo que se caracteriza por una serie de anomalías que afectan a regiones cerebrales específicas: neocórtex, área entorrinal, hipocampo, núcleos amigdalinos, núcleo basal de Meynert, tálamo anterior y núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico (*locus coeruleus* y complejo del rafe).

La disfunción y muerte de neuronas en las regiones afectadas se asocia con alteraciones citoesqueléticas y sinápticas en las regiones a las que proyectan. La distribución

de las anomalías sigue patrones característicos siendo las neuronas piramidales glutamatérgicas las más afectadas en corteza y, por ejemplo, las colinérgicas en el núcleo basal de Meynert.

En el cerebro de un enfermo de Alzheimer se pueden encontrar dos tipos de lesiones, los ovillos neurofibrilares y las placas seniles, así como lesiones axónicas y dendríticas (neuritas distróficas). Los ovillos (Figura 1, B) son inclusiones intracelulares, que contienen filamentos helicoidales apareados. Estos filamentos están compuestos por la forma hiperfosforilada de una proteína estabilizadora de microtúbulos, la proteína Tau, la cual en circunstancias normales no se encuentra anormalmente agregada (Michaelis et al., 2002).

Los ovillos neurofibrilares (ONF), no son exclusivos de la EA, también pueden encontrarse en la parálisis supranuclear, demencia pugilística, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, demencia frontotemporal... (Hardy and Orr, 2006). Estas lesiones, junto con las lesiones axo-dendríticas, afectan al transporte axonal y por tanto a la funcionalidad sináptica y la viabilidad celular.

Las otras lesiones que aparecen en los cerebros de los afectados por la enfermedad son las placas seniles (amiloides o neuríticas) (Figura 1, A). Estas lesiones son depósitos de péptidos amiloides que se encuentran rodeados de axones y dendritas distróficas, así como de astrocitos y microglía activada. Este tipo de lesiones se localizan principalmente en regiones límbicas (hipocampo y amígdala) y también en regiones corticales y subcorticales. Además de en el neuropilo el A β se deposita alrededor de los vasos sanguíneos afectando a su funcionalidad, lo que se denomina, angiopatía amiloidea.

Los péptidos amiloides resultan del corte proteolítico de la proteína precursora del

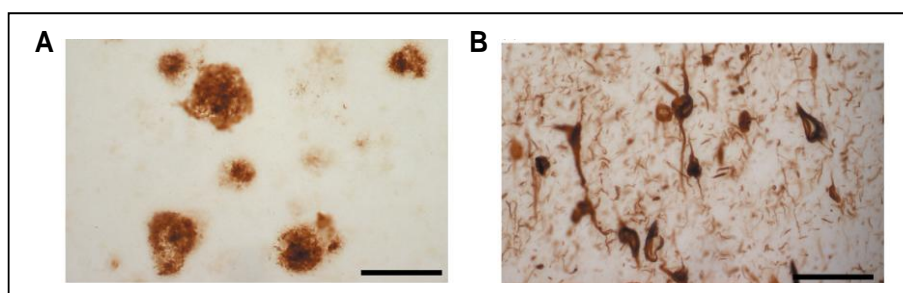


Figura 1. Placas seniles y ovillos neurofibrilares en un cerebro de un enfermo de EA. A, fotografía representativa de placas seniles marcadas con un anticuerpo específico anti-A β_{42} , barra de escala 125 μ m. B, fotografía representativa de ovillos neurofibrilares marcados con un anticuerpo específico anti-PHF1, barra de escala 62.5 μ m (LaFerla and Oddo, 2005).

amiloide (en inglés, *amyloid precursor protein*, APP), mediante dos proteasas (β y γ -secretasas).

INTRODUCCIÓN

Era un hecho conocido el que los pacientes de síndrome de Down acaban desarrollando Alzheimer de forma invariable, aunque se desconocía la relación. No fue hasta mediados de los años 70 cuando se descubrió el gen de la proteína APP, localizado en el cromosoma 21, y que un aumento en la dosis génica debida a la trisomía era responsable de la existencia de patología tipo EA en el síndrome de Down (Nagy, 2005). Posteriormente, en los años noventa, se descubrieron las primeras mutaciones relacionadas con el Alzheimer familiar, en este gen. Este fue el prelude de la formulación de la primera teoría que intentaba explicar el origen de la EA, “hipótesis de la cascada amiloide” (Selkoe, 1991). La cual considera la deposición de péptidos amiloides en el espacio extracelular como la causa primaria de la muerte neuronal asociada al Alzheimer (Figura 2).

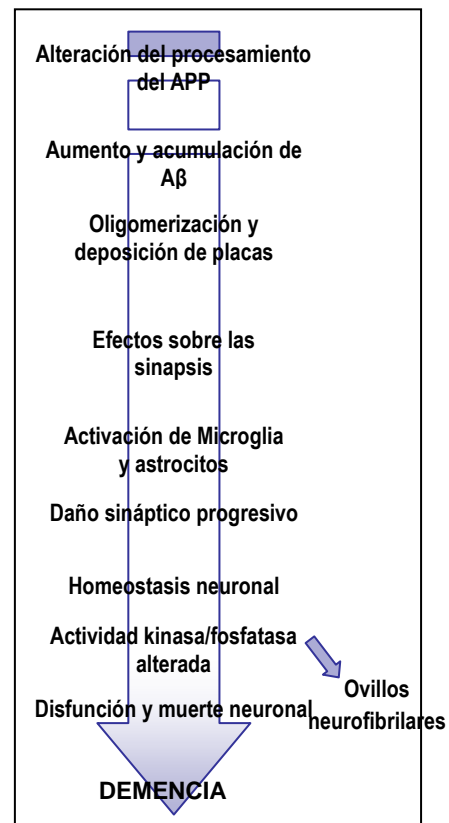


Figura 2. Hipótesis de la cascada amiloide. Secuencia de eventos patológicos que dan lugar a la EA.

2.1 El APP, su procesamiento

El APP es una proteína transmembrana tipo I, con un único dominio intramembrana cuya función es aún desconocida. Existen, al menos, 4 formas de la proteína APP en humanos, obtenidas por *splicing* alternativo de los exones 7 y 8, todas estas formas tienen alrededor de 700 aminoácidos. El APP se localiza en todos los tipos celulares y su RNAm representa el 0,2% del RNAm total en neuronas. Se puede encontrar en todos los mamíferos vertebrados e incluso se conoce una proteína APP-like en drosophila, es decir, está muy conservada evolutivamente. Por lo que podría ser un gen *house-keeping*, regulador. También existen otras 2 proteínas APP-like en humanos (APP1 y APP2). El dominio N-terminal es extracelular y más largo que el C-terminal. Entre la región extracelular y la transmembrana se localiza el dominio A β que dará lugar a los péptidos amiloides al ser procesada la proteína APP (de 40-42 aa).

APP es procesado proteolíticamente mediante secretasas (proteasas que se localizan en membrana plasmática): α , β y γ .

La α -secretasa corta al APP entre las posiciones 16/17 de la región A β , generando un fragmento N-terminal soluble, que contiene un fragmento de la región A β , y un fragmento C-

terminal transmembrana de 11,5 kDa que quedará anclado a la membrana. El fragmento transmembrana de 83 aminoácidos (C83) tiene una vida media de 4 horas, tras las cuales es internalizado por endosomas y degradado al fusionarse con lisosomas. Sufrirá un segundo corte por la γ -secretasa, liberando un fragmento que no posee la secuencia A β completa y que carece de potencial amiloidogénico (Panegyres, 1997) y un fragmento C-terminal intracelular al que se denomina AICD (APP *intracellular domain*).

La β -secretasa, cuya actividad se atribuye a una única proteína (*β site APP Cleavage Enzyme*; BACE), corta a la proteína APP dejando libre un fragmento N-terminal soluble y un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (C99) que contiene la secuencia A β completa. Este C-terminal puede sufrir un segundo corte proteolítico a través de la γ -secretasa (Gotz and Ittner, 2008). La actividad de la γ -secretasa depende de 4 proteínas: nicastrina, APH-1 (*Anterior pharynx-defective 1*), Presenilina-1 (PEN1) y Presenilina-2 (PEN2). PEN1 y PEN2 son componentes fundamentales de la región catalítica de la enzima, sus mutaciones pueden dar lugar a EA familiar.

Tras el corte proteolítico de las β y γ -secretasas se obtendrá el fragmento C-terminal intracelular AICD, que posee actividad transcripcional, algunos de los genes que pueden verse regulados por este fragmento son APP, neprelisina, CD68 y EGFR. También parece estar implicado en la señalización mediada por Ca^{2+} e incluso parece relacionado con memoria espacial (Wolfe and Guenette, 2007).

El otro fragmento que se obtiene del corte mediante β y γ -secretasas es el A β (péptido amiloide). Los péptidos amiloides pueden tener una longitud de 40-42 aminoácidos y el ratio normal de síntesis es de 1:10 (40:42). El A β adopta una estructura en lámina- β , birrefringente cuando se tiñe con rojo congo, estas láminas β pueden agregarse para formar oligómeros y protofibrillas, que son los componentes principales de las placas neuríticas. Se resumen las rutas de procesamiento del APP en la Figura 3.

A β_{42} es el primero en agregar, formando oligómeros y protofibrillas, que actuarán como núcleos sobre los que el A β_{40} podrá formar oligómeros más fácilmente. Ambos (A β_{42} y A β_{40}) forman parte de las placas seniles. Aunque se sabe que su capacidad para agregar está relacionada con su neurotoxicidad, el mecanismo exacto de ésta, no está del todo claro. (Pimplikar, 2009).

Un posible mecanismo neurotóxico podría ser el siguiente. El A β_{42} puede inducir peroxidación lipídica y oxidación proteica *in vivo* e *in vitro*, hecho relacionado con la producción de radicales libres y H_2O_2 (que aumentan el potencial redox). La Tyr en posición 10 del A β forma un complejo con 3 histidinas en posiciones 6,13 y 14, el radical tiroxil quedaría libre para interactuar con Cu(II) y liberar H_2O_2 . Esto se ha podido averiguar gracias al estudio

INTRODUCCIÓN

de diversas mutaciones familiares. También se sabe que el péptido truncado $A\beta_{25-35}$, contiene la región mínima para ser neurotóxico (Irie et al., 2005).

Aunque las mutaciones en el gen del APP fueron las primeras en descubrirse, hoy sabemos que son las mutaciones menos frecuentes de entre las que pueden dar lugar a la EA. Actualmente se conocen más de 220 mutaciones familiares de la EA, de las cuales 180 están relacionadas con PEN1, 20 con PEN2 y más de 30 con APP (Pimplikar, 2009). Las mutaciones en la proteína APP se encuentran en regiones próximas a las zonas de corte de las β y γ secretasas, promoviendo un corte mayoritario por esta vía en lugar de por la de la α -secretasa; o bien una mayor producción de $A\beta_{42}$ frente a $A\beta_{40}$; o una agregación o potencial neurotóxico mayores. Sin embargo, las mutaciones en las presenilinas, promueven un corte mayoritario a través de la β -secretasa fundamentalmente.

Pero cuál es el papel del $A\beta$ y cuáles son las funciones del APP, son dos puntos sobre los que vale la pena centrar la atención para comprender la patología de la EA.

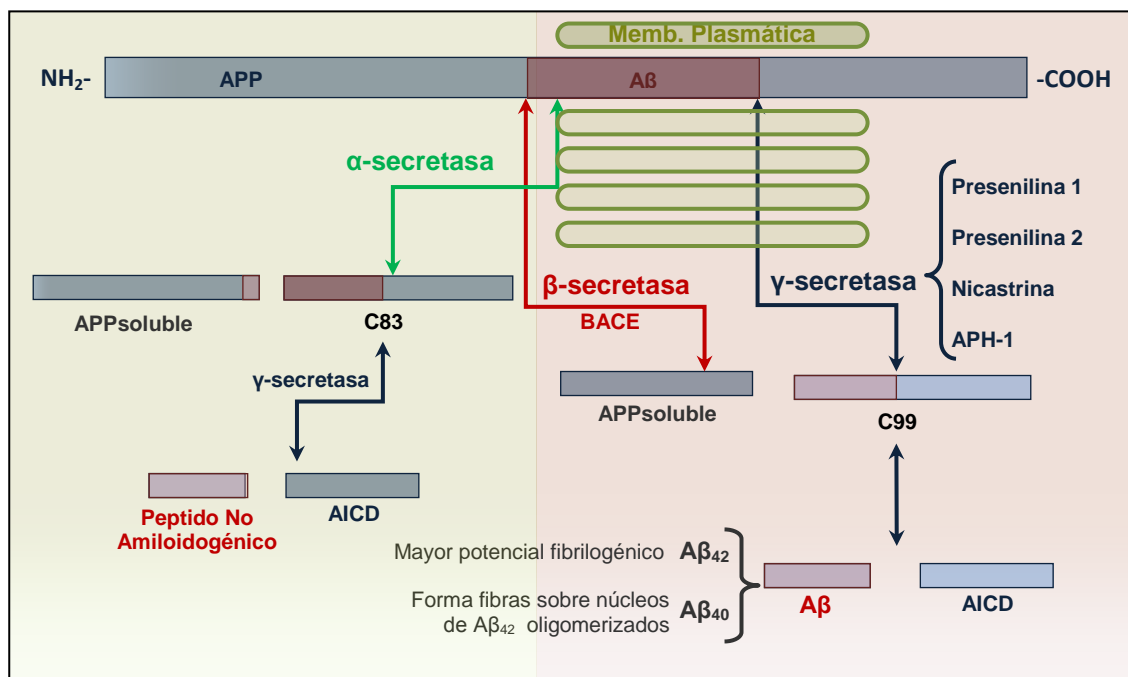


Figura 3. Rutas de procesamiento del APP. APP (proteína con un dominio transmembrana). El procesamiento a través de α -secretasa corta al APP entre los residuos 16/17 de la secuencia $A\beta$ (previniendo la formación de péptidos amiloides). La ruta de la β -secretasa deja libre el extremo N' de la secuencia $A\beta$, la γ -secretasa cortará el péptido resultante liberando $A\beta$ y AICD. Modificado de La Ferla y colaboradores, 2005.

Debemos destacar que ni las funciones del APP están claras, ni los mecanismos neurotóxicos del $A\beta$ han sido aún desentrañados, sin embargo gran número de estudios se han

dedicado al estudio de ambos aspectos, intentaremos hacer un breve resumen de los hallazgos más relevantes.

Funciones del APP y de sus fragmentos no amiloidogénicos:

Una de las primeras fue su papel como receptor. La idea surgió gracias al descubrimiento de que la vía de señalización del receptor Notch actuaba a través de un mecanismo muy similar a la ruta de procesamiento de APP (Selkoe and Kopan, 2003). Sin embargo la búsqueda de ligandos no está siendo muy fructífera, algunos de los propuestos han sido, F-espondina (proteína secretada por neuronas) y reelina (proteína de matriz extracelular fundamental en desarrollo); parecen estar implicadas en interacciones proteína-proteína; receptor Nogo-66 (relacionada con crecimiento axonal en adulto) (Wolfe and Guenette, 2007).

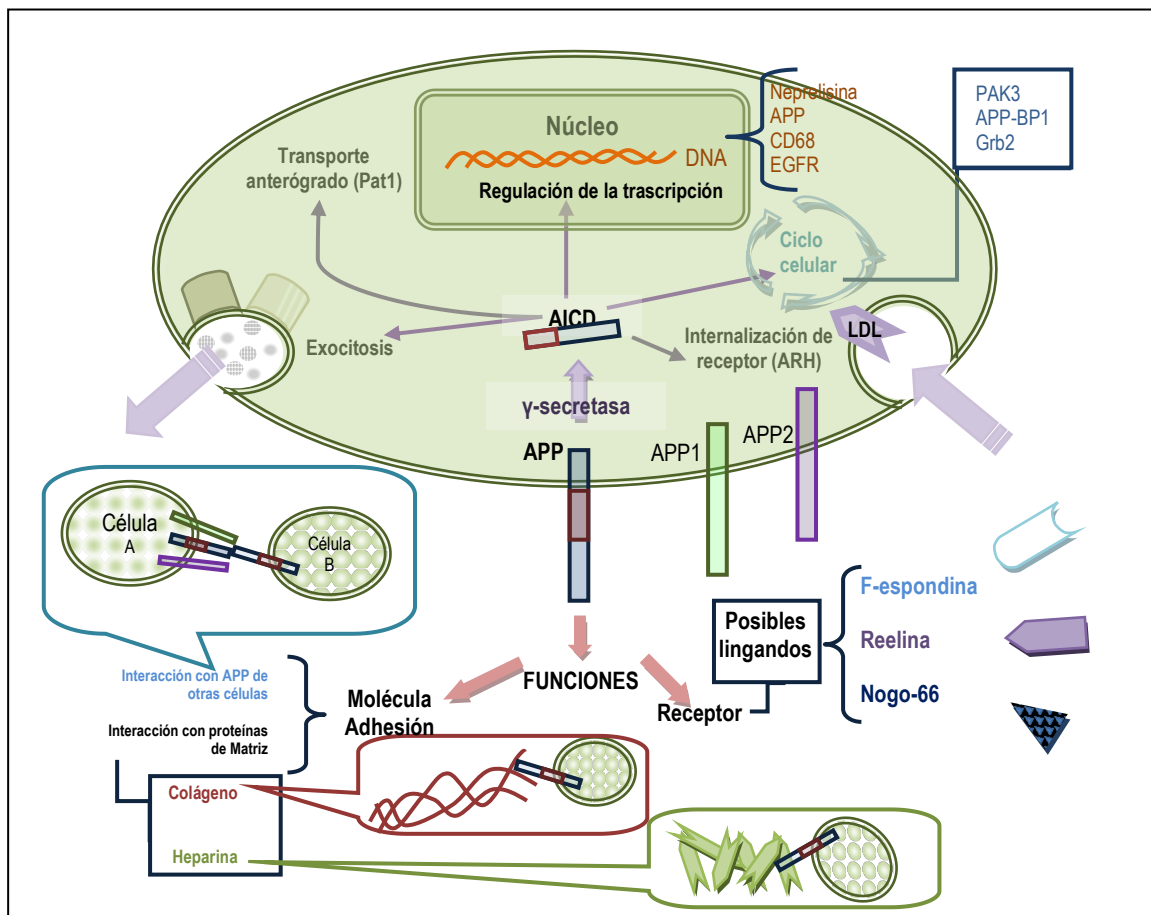


Figura 4. Funciones del APP y de sus fragmentos no amiloidogénicos. El APP como proteína transmembrana puede actuar bien como molécula de adhesión a través de su unión a otras moléculas de APP o a componentes de matriz; o bien como receptor siendo sus posibles ligandos, F-espondina, reelina y Nogo-66. El fragmento AICD intracelular puede intervenir en procesos de excitotoxicidad, transporte anterógrado o endocitosis del receptor de LDL, así mismo puede regular el ciclo celular (a través de las proteínas PAK3, APP-BP1, Grb2). Pero su función más destacada es la de regulador de la transcripción de genes como APP, Neprelisina, CD68 o EGFR.

También parece actuar como molécula de adhesión. Se une a proteínas de matriz extracelular como heparina y colágeno. Puede formar homo- y hetero- dímeros con las diversas proteínas de la familia APP que se encuentren en distintas células por un mecanismo similar al de las cadherinas y nectinas (Multhaup et al., 1994; Behr et al., 1996).

El fragmento APP soluble puede actuar como molécula de señalización, ya que parece jugar algún papel en el crecimiento de fibroblastos en cultivo. También es neuroprotector para neuronas en cultivo, previniendo elevaciones de Ca^{2+} intracelular (Park et al., 2006).

El fragmento AICD también parece tener diversas funciones. Numerosas proteínas interactúan con éste incluyendo proteínas con un papel en el transporte vesicular y el tráfico de proteínas como Mint1 y 2 (exocitosis de vesículas) o Pat1a (interacciona con microtúbulos para el transporte anterógrado de APP) y proteína ARH (para la internalización del receptor de LDL) (Muresan and Muresan, 2005; Kuan et al., 2006). Otras de las proteínas que interactúan con AICD están implicadas en la regulación del ciclo celular (G_0 , PAK3, APP-BP1, Grb) (Chen et al., 2003). Este fragmento, así mismo, es sustrato de enzimas: la γ -secretasa, kinasas (Ser7The kinasas, GSK-3 β) (Hsu et al., 2007; Hernandez et al., 2009). Sin embargo el papel que más interés ha generado es el de activador de la transcripción, a través del trímero con Fe65 y la histona acetiltransferasa tip60 (Cao and Sudhof, 2001; Wolfe and Guenette, 2007).

En la Figura 4 se puede observar un resumen de las funciones de la proteína APP y del fragmento intracelular AICD.

Mecanismos de acción del A β :

El A β interacciona con diversos receptores: RAGE (Receptor for *Advanced Glycated End products*), receptores del péptido formilado etc... A través de estos receptores promueven la liberación de quimioquinas, factores de crecimiento,...

En sistema inmune A β activa las vías del complemento promoviendo la opsonización de sí mismo y por tanto su fagocitosis la cual es insuficiente para resolver la patología (Bradt et al., 1998).

A β puede interactuar con las vías de señalización de insulina y Wnt, promoviendo un aumento de la actividad de GSK3 (Glucógeno sintasa kinasa 3). Del mismo modo, en los casos esporádicos de la EA isoformas de APOE interaccionan con un correceptor de Wnt. La función de la GSK3 en la EA es múltiple. GSK3 regula la actividad de la proteasa MMP2, capaz de degradar los péptidos amiloides (aunque también pueden ser degradados por otras enzimas, como IDE y neprelisina). Además puede modificar a la propia APP, promoviendo la liberación de péptidos amiloides (Phiel et al., 2003). Por último, un incremento en la actividad de GSK3 da lugar a la fosforilación indiscriminada de sustratos que pueden resultar tóxicos para las

neuronas corticales, tales como la proteína estabilizadora de microtúbulos Tau (Hernandez et al., 2009).

A β puede interactuar con el receptor de productos de glicosilación avanzada (RAGE), que promueve su entrada desde la circulación periférica a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Además, la interacción A β -RAGE, puede activar la vía de señalización de NF- κ B (*nuclear factor*) y por consiguiente promover apoptosis y una respuesta inflamatoria (Deane et al., 2004; Citron, 2010).

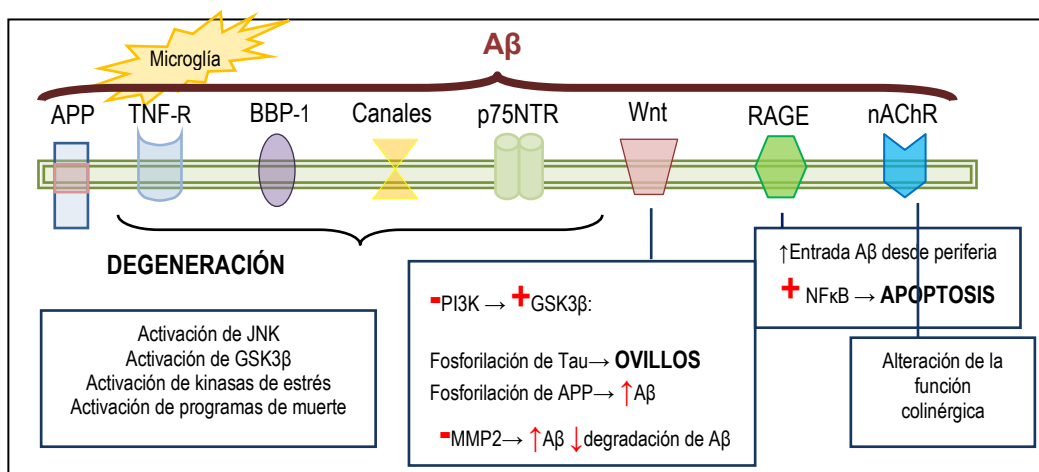


Figura 5. Dianas de A β relacionadas con los mecanismos de neurodegeneración. El A β extracelular puede interactuar con diversos receptores de superficie, promoviendo la activación de rutas de señalización relacionadas con los procesos degenerativos, como la apoptosis o la generación de ovillos neurofibrilares. Algunas de estas dianas también pueden ser intracelulares y promover rutas similares. Estos receptores están localizados en neuronas y algunos, como el receptor de TNF también en microglía. Modificado de Longo y colaboradores (2004).

En neuronas puede interactuar con infinidad de receptores, que median su toxicidad: p75NTR (receptor de neurotrofinas p75), RAGE, BBP-1, APP. También tiene dianas intracelulares en retículo endoplásmico: ERAB (dehidrogenasa acoplada a A β). Así mismo puede llevar a cabo acciones independientes de receptor, formando canales de Ca²⁺ o modulando canales de K⁺ (Longo and Massa, 2004). En la Figura 5 se puede ver un resumen de los receptores de A β asociados con los procesos degenerativos

2.2 El componente inflamatorio de la EA y la microglía

La respuesta inmune en cerebro es limitada y poco común. Debido a la presencia de la BHE, el paso de moléculas y células a su interior es restringido por lo que se le considera un órgano inmuno-privilegiado. La célula encargada de desarrollar la respuesta inmune en

cerebro es la microglía, célula derivada de la estirpe mieloide de médula ósea que penetra en cerebro durante el desarrollo (Lucin and Wyss-Coray, 2009).

El primer indicativo del componente inflamatorio de la enfermedad fueron una serie de estudios epidemiológicos en los que se ponía de manifiesto un menor riesgo de padecer EA en personas que habían recibido tratamiento con antiinflamatorios no esteroídicos, NSAID (*Non steroidic Anti-Inflammatory Drugs*) (Breitner et al., 1994; McGeer and McGeer, 2007). La respuesta inmune que tiene lugar durante la EA es inespecífica y se denomina gliosis reactiva (Zipp and Aktas, 2006). Esta gliosis implica tanto a los astrocitos como a la microglía, de hecho alrededor de las placas seniles se acumula microglía activada.

La microglía en reposo (Figura 6, B) tiene una morfología muy ramificada, cada rama sensa un área cerebral de 30-50 μ m que solapa con las ramas de la microglía cercana. Aunque estos movimientos son aleatorios, en pocas horas son capaces de sondear todo el espacio extracelular cerebral. Este movimiento se ve potenciado ante aumentos de la actividad sináptica o liberación de neurotransmisores purinérgicos (ATP, ADP, UTP) (Raivich, 2005).

La inflamación, en general se entiende como una mezcla de efectos constructivos y destructivos. En la EA, podríamos considerar que el A β promueve la activación de la microglía hacia 3 fenotipos distintos (Schwartz et al., 2006). La microglía destructiva, que induce una respuesta inmune primaria, ante la presencia de A β hace que el cerebro actúe como si estuviese siendo invadido por un microorganismo. Este tipo de respuesta va acompañada por la secreción de mediadores de inflamación (citoquinas proinflamatorias: TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-1 β , IL-8,...), potencialmente tóxicos para las neuronas cercanas y sus procesos. La expresión de RNAm de estas citoquinas se ha detectado no solo en modelos *in vivo* o *in vitro*, también en cerebro de pacientes de EA (Rogers et al., 2002).

En segundo lugar, aparece la microglía beneficiosa (Figura 6, C), aquella que lleva a cabo una respuesta quimiotáctica y fagocítica hacia los depósitos de A β , reduciéndolos. Esta respuesta se ha estudiado tanto *in vitro*, como *in vivo* (Rogers et al., 2002).

En tercer lugar se encuentra la microglía distrófica (Figura 6, A) o senescente. En un estudio reciente, Streit y colaboradores (2009), observaron que estructuras degenerativas neuronales positivas para proteína Tau, colocalizaban invariablemente con microglía distrófica-no activada y que este tipo de patología precede a la dispersión de la patología Tau. Esta microglía presenta una morfología fragmentada en sus procesos y se considera que están sufriendo un proceso de degeneración llamado citorrexis (fragmentación citoplásmica). Estas células han podido observarse tanto en pacientes de EA, como individuos control, por lo que se piensa que preceden a la neurodegeneración y que representa una pérdida de protección microglial (Streit et al., 2009). Un aumento de microglía distrófica correlacionaría con una

disminución de la neuroprotección mediada por la microglía y un aumento de la neurodegeneración.

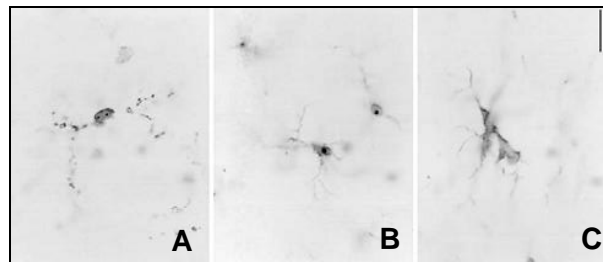


Figura 6. Imágenes representativas de los distintos tipos de microglía. (A) microglía distrófica (se observa citorrexis en las prolongaciones); **(B)** microglía en reposo y **(C)** microglía activada (hipertrófica), barra de escala 20 μ m, (Streit et al., 2009) .

Otros investigadores definen dentro de la microglía dos fenotipos inflamatorios que aparecen cuando se produce un daño neuronal. Una vez se produce se liberan al neuropilo ATP, neurotransmisores, factores de crecimiento y citoquinas, que activan a la microglía circundante. Si el daño es pequeño se liberarán citoquinas y factores de crecimiento; si el daño es grande se liberaran factores neurotóxicos. En situaciones de daño mantenido, como la EA se obtienen fenotipos neurotóxicos: M1 o M2. M1, activación clásica, produce elevadas cantidades de citoquinas pro-inflamatorias y óxido nítrico. Y M2, activación alternativa, con una reducida producción de óxido nítrico y aumento de la producción de citoquinas anti-inflamatorias. El balance entre ambos tipos microgliales podría ser fundamental para la progresión de la enfermedad (Lucin and Wyss-Coray, 2009).

Algunos estudios han mostrado, así mismo, la asociación entre las infecciones sistémicas y el progreso de las enfermedades degenerativas crónicas, como la EA. En un cerebro envejecido o dañado las señales de inflamación sistémica provocan una respuesta exagerada que contribuye a la progresión del daño. Existen tres vías de comunicación entre el resto del organismo y el parénquima cerebral. En primer lugar las aferencias sensoriales del nervio vago; segundo, citoquinas y otros mediadores de inflamación entran al torrente sanguíneo donde interaccionan con macrófagos situados en órganos circunventriculares donde no existe BHE; y por último las citoquinas, otros mediadores o los propios microorganismos pueden atravesar la BHE si estuviera comprometida e interactuar directamente con el parénquima cerebral (Perry et al., 2007). Análisis retrospectivos de bases de datos médicas han sacado a la luz que la presencia de dos o más episodios infecciosos en un periodo de cuatro años, en personas envejecidas, incrementa el riesgo de padecer EA 2 veces. Además la presencia de proteínas inflamatorias plasmáticas (proteína C-reactiva, IL-6) se vio

INTRODUCCIÓN

notablemente incrementada 5 años antes de establecerse la demencia. Así mismo las inflamaciones sistémicas y los elevados niveles plasmáticos de IL-1 β se han visto asociados a un mayor deterioro cognitivo (Holmes et al., 2009). Del mismo modo los niveles plasmáticos de TNF- α aumentados, como consecuencia de un proceso infeccioso reciente, incrementaron el progreso del deterioro cognitivo de los pacientes de EA, mientras que los que no los sufrieron no presentaban ningún progreso (Holmes et al., 2009b). Es decir los procesos inflamatorios periféricos contribuyen activamente tanto al establecimiento, como a la progresión de la EA

La microglía activada puede producir óxido nítrico (NO). El NO es sintetizado por tres enzimas, NO sintasas (NOS), la inducible (en microglía y astrocitos, iNOS), la endotelial (en vasos sanguíneos, eNOS) y la neuronal (nNOS). Tiene papeles fisiológicos en SNC ya que actúa como señalizador intracelular; es un compuesto vasoactivo y durante el desarrollo actúa sobre el crecimiento axonal y la sinaptogénesis (Downen et al., 1999; Law et al., 2001). En una situación de demencia, como la EA, tiene un papel fundamentalmente neurotóxico, aunque también se le ha descrito como neuroprotector.

En pacientes de EA se han descrito cambios en los niveles de nNOS en corteza, hipocampo y cerebelo (Dorheim et al., 1994; Norris et al., 1996). En diversos estudios histológicos se han observado incrementos en la expresión de las distintas isoformas en distintos subgrupos de células en la EA (Vodovotz et al., 1996; Luth et al., 2002; Fernandez-Vizarra et al., 2004). El NO puede reaccionar con el radical superóxido generando el radical peroxinitrito, que puede dar lugar a nitración de proteínas, y consecuentemente a su inactivación. De hecho, los niveles y expresión de proteínas nitradas en tirosina también se encuentran significativamente aumentados en corteza cerebral y otras regiones (Fernandez-Vizarra et al., 2004; Ramirez et al., 2005). El A β puede generar estrés oxidativo por sí mismo (como vimos en la sección anterior), pero también puede hacerlo a través de la generación de NO (en microglía y astrocitos), o de una manera más indirecta, activando a células T CD4+, que liberarán citoquinas (IFN- γ), que a su vez activarán a la microglía (Dickson et al., 1993). La microglía activada aumentará sus niveles de iNOS, la cual producirá NO. El NO aumenta los radicales libres, con el daño oxidativo que conlleva y la muerte celular.

La microglía, como célula inmune residente en sistema nervioso central, constituye un importante punto central para el desarrollo y evolución de la EA y debe ser tomada en cuenta a la hora de llevar a cabo cualquier investigación que pretenda estudiar una posible terapia para esta enfermedad.

3. *Diagnóstico*

Actualmente el diagnóstico definitivo de la EA se realiza postmortem, tras el análisis neuropatológico del tejido cerebral y la detección de placas seniles y ovillos neurofibrilares en el mismo.

El diagnóstico de los pacientes, por tanto, no es de certeza sino de probable Alzheimer (llegando a un 90% de acierto (Michaelis, 2003)), basándose en una serie de test clínicos y neuropsicológicos, no siendo ni sencillo ni efectivo. Un diagnóstico temprano de la enfermedad (imposible a día de hoy) sería útil tanto para el seguimiento y estudio de la enfermedad desde sus fases más tempranas, como para el establecimiento de terapias preventivas eficaces.

El primer paso es el diagnóstico genérico de demencia, el siguiente sería averiguar el tipo de demencia que se padece. Para simplificar me restringiré a tres tipos: EA, demencia vascular y deterioro cognitivo leve (DCL). Las dos primeras son las más comunes, el patrón de deterioro cognitivo en ambas es muy similar y en ocasiones ocurren de manera simultánea. Mientras que en la EA “pura” solo se observan placas y ovillos, la demencia vascular se origina por infartos cerebrales. Sin embargo se considera que en la EA también existe un componente vascular. De hecho el 80% de los pacientes presentan angiopatía amiloidea, en la que los péptidos amiloides se depositan en los vasos sanguíneos además de en las placas seniles (Kalaria, 2002). Por otro lado está el DCL, toda demencia y por ende la EA comienza como un DCL, pero no todas las personas que padecen DCL evolucionan a EA. Sería interesante averiguar si en las personas con DCL existen marcadores que puedan ayudarnos a saber qué riesgo tienen de sufrir Alzheimer, y en el caso de ser así poder plantearse estrategias preventivas para impedirlo.

Por tanto para desarrollar un diagnóstico efectivo, será importante tanto la capacidad de detección de la EA, como de posibles indicadores de conversión de DCL a EA. Las estrategias diagnósticas incluirían tres grandes tipos de pruebas: neuroimagen, análisis de biomarcadores sanguíneos y análisis de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR) (Figura 7), a parte de las pruebas neuropsicológicas.

En lo que respecta a la neuroimagen, el capítulo III de esta introducción se encuentra dedicado a ella. Solo destacaré que las medidas volumétricas del cerebro mediante Imagen de Resonancia Magnética (MRI) muestran reducciones en EA respecto a controles sanos; y descensos en el metabolismo de glucosa cerebral observado mediante tomografía por emisión de positrones (PET). También para PET se han desarrollado ligandos para la visualización de

INTRODUCCIÓN

depósitos de A β *in vivo* (compuesto de Pittsburgh). Sin embargo, estas técnicas resultan demasiado costosas para su utilización rutinaria.

Marcadores sanguíneos:

Se divide en marcadores plasmáticos y séricos, y existe un número de estudios muy elevado al respecto de este tema con resultados tanto coincidentes como contradictorios entre sí. Esto se debe a la variedad de pacientes utilizados, a las diversas técnicas, en el caso de utilizar ELISAS a los distintos anticuerpos en juego, etc.

Hye y col. (2006) identificaron recientemente 11 proteínas plasmáticas que diferían significativamente entre los pacientes de Alzheimer y controles sanos, posteriores análisis confirmaron elevaciones en los niveles de Factor del complemento H y α 2-macroglobulina en el plasma de EA (Hye et al., 2006). Ambas proteínas se han detectado en placas seniles (Thambisetty et al., 2008).

Zhang y col. (2004) encontraron una serie de biomarcadores séricos: haptoglobina, hemoglobina vitronectina, apolipoproteína B100, fragmento del factor H, glicoproteínas ricas en histidina, se encontraron elevadas en pacientes de EA, mientras que la glicoproteína ácida α 1 se vio reducida (Zhang et al., 2004).

Dado que las concentraciones plasmáticas de Tau son inferiores a los niveles de detección de la mayor parte de las técnicas analíticas, éstas se han centrado en los péptidos amiloides. La mayor parte del A β en plasma está conjugado con la albúmina y solo una pequeña parte está libre. Existen además una serie de factores que influyen en sus niveles plasmáticos como son el metabolismo, estado de la patología, edad, enfermedad cerebrovascular, catabolismo hepático y excreción renal. Sus niveles son 10 veces menores que en LCR. Algunos estudios han mostrado una correlación entre reducción de niveles de A β ₁₋₄₂ pero no A β ₁₋₄₀ plasmáticos y el agravamiento de la EA (Mayeux et al., 2003).

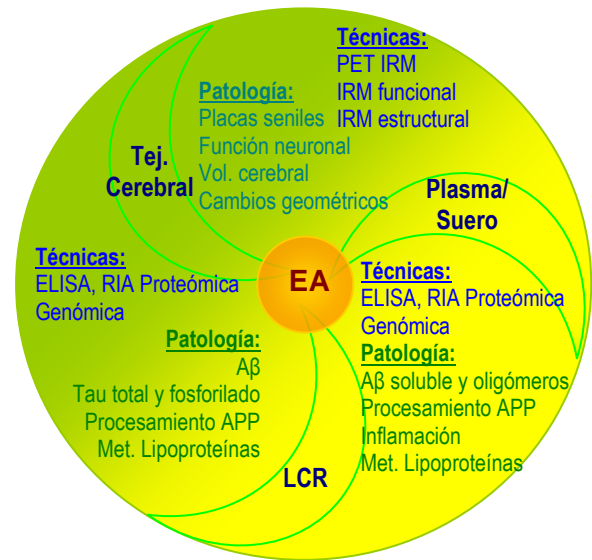


Figura 7. Diagrama esquemático de marcadores para DCL y EA, en diferentes tejidos. Patologías y técnicas modificado de (Song et al., 2009)

La presencia de microglía activada incrementa el nivel de citoquinas proinflamatorias: IL-1, IL-6, TNF- α , así como la presencia de proteínas de fase aguda: proteína-C reactiva, α 1-antiquimiotripsina. Sin embargo los resultados en circulación periférica son controvertidos (Song et al., 2009).

La isoforma ϵ 4 de la apolipoproteína E es un factor de riesgo para padecer EA esporádico (Farrer et al., 1997) y también está relacionado con el agravamiento de la función cognitiva en los pacientes de DCL (Albert et al., 2007).

Marcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR):

Algunos cambios bioquímicos que ocurren en el cerebro se reflejan en el LCR. Incrementos en la proteína Tau-hiperfosforilada en LCR de hasta 3.2 veces superiores en los enfermos que en los controles son consistentes en la bibliografía (Blennow, 2004).

Los niveles totales de péptidos amiloides se encuentran ligeramente disminuidos en enfermos. Los niveles de $A\beta_{1-42}$ se han hallado reducidos en un 40-50% en la mayor parte de los estudios realizados (Blennow et al., 2001), mientras que los niveles de $A\beta_{1-40}$ no se han visto alterados. El descenso de los niveles de $A\beta$ en LCR y sangre se relacionan, en principio, con la formación de placas seniles y el agravamiento de la enfermedad.

4. Tratamientos

Actualmente no existe ningún tratamiento de eficacia probada contra el Alzheimer. Los tratamientos que se están desarrollando y estudiando se basan en uno de estos tres puntos: patología, genética o epidemiología. En lo que respecta a la patología, las posibles terapias se centran en los ovillos, las placas y los cambios bioquímicos que tienen lugar en un cerebro de EA. Las terapias basadas en aspectos genéticos parten de la asunción de que los principios que rigen la EA familiar son los mismos que los de la EA esporádica. Por último, las terapias basadas en factores epidemiológicos se centran en factores de riesgo como la depresión, daño cerebral agudo, factores cardio y cerebro vasculares, nivel social, cultural, etc que parecen correlacionar con un aumento del riesgo.

Tratamientos basados en la pérdida de inervación colinérgica:

La pérdida de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert fue una de las primeras observaciones bioquímicas en la EA. De hecho el único tratamiento aprobado por la FDA para el Alzheimer son inhibidores de la acetilcolinesterasa (donezepil, tacrina, rivastigmina

y galantamina). Estos fármacos estabilizan el deterioro cognitivo durante un corto periodo de tiempo (Michaelis, 2003).

Tratamientos basados en A β :

Modulación de la producción de A β_{42} : ya sea por inhibición de la β o γ -secretasas o activación de la α -secretasa. La β -secretasa se expresa en todo el organismo, aunque sus niveles cerebrales son superiores, por lo que los efectos colaterales serían impredecibles, de hecho sólo una compañía ha conseguido datos clínicos con uno de sus inhibidores. En cuanto a la γ -secretasa, el estudio de sus inhibidores comenzó en los años 90, siendo éstos bastante problemáticos. Por un lado, es una enzima muy compleja con al menos 4 componentes por lo que el desarrollo de inhibidores resulta muy complicado. Por otro, está implicada en otras vías de señalización como la del receptor Notch, con los efectos secundarios que esto conlleva. Actualmente Eli Lilly & Company tiene un inhibidor de γ -secretasa en ensayo clínico en fase II. Por último, se baraja la posibilidad de potenciar la vía de la α -secretasa, que es mayoritaria, incluso en situación patológica; las consecuencias de esta potenciación son desconocidas. Sí se han conseguido desarrollar agonistas M1 muscarínicos que activan esta vía de procesamiento, pero no se ha conseguido que sean lo suficientemente específicos (Citron, 2010).

Inhibición de la agregación de A β : El tramiprosato es una pequeña molécula que se une a los monómeros de A β y los mantiene en forma soluble, su ensayo clínico está en fase II, aunque no ha mostrado ser efectiva para reducir la patología sí ha reducido los niveles de A β_{42} en LCR. Los isómeros ciclohexanohexol estabilizan A β en su conformación no tóxica *in vitro*, aunque no han entrado en fase clínica. Y compuestos atenuadores de las interacciones metal-proteína (que se ha visto que contribuyen a la patología), como el clioquinol, y que ha resultado efectivo en reducir la patología de modelos animales, se encuentra actualmente en fase II.

Aumentar el aclaramiento de A β : potenciando bien la degradación, bien el transporte fuera del SNC. Existen 3 enzimas relacionadas con la degradación del A β (neprelisina, *Insulin-degrading enzyme* IDE y plasmina). Puesto que el desarrollo de activadores es mucho más complicado que el de inhibidores, se ha abordado el problema desarrollando bloqueantes de los inhibidores de estas enzimas, como la PAI-1 (*plasmin activator inhibitor-1*). Para promover la movilización del A β hacia la periferia se pueden modular 2 receptores; inhibición RAGE, que potencia el paso de A β desde circulación periférica a SNC (Pfizer tiene patentado el fármaco

PF-044947000, en fase II de ensayo clínico); y activación LRP-1 (*protein receptor-related protein 1*) que media el paso de A β desde cerebro a circulación periférica.

Inmunoterapia: Desde los años 90 más de 10 agentes de inmunoterapia han llegado a la fase clínica. Este campo de investigación comenzó con la publicación de un trabajo (Schenk et al., 1999), en el que tras la vacunación con A β_{42} agregado de un modelo murino transgénico, se observó una marcada reducción de la patología amiloide. Comenzaron entonces una serie de estudios clínicos prometedores, un número reducido de casos de encefalitis y hemorragias cerebrales, hicieron que se detuviesen. Algunos de los que siguieron adelante, tras un seguimiento de 6 años no mostraron mejoras significativas en ese tiempo. Actualmente siguen estudiándose los mecanismos de acción de una terapia inmune frente a A β y existen 3 ensayos clínicos en fase III: bapinezumap (Elan pharmaceuticals), solanezumap (Lilly) e inmunoglobulina G intravenosa (Baxter).

Tratamientos antiinflamatorios:

Como ya se ha dicho anteriormente, la microglía activada presente en los cerebros de EA libera mediadores inflamatorios, además personas que han recibido un tratamiento a largo plazo con NSAIDs ven reducido el riesgo de padecer EA un 50%. Algunas estrategias terapéuticas se basan en potenciar los efectos positivos de los NSAID, como es la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (inducible) (celecoxib, rofecoxib) o la inhibición COX-1/2 (naproxeno), cuyos ensayos clínicos no han mostrado beneficios, probablemente porque sus efectos son sólo preventivos. Por otro lado se encontraría la activación del receptor PPAR- γ , ya que los agonistas son antiinflamatorios y antiamiloidogénicos en modelos, aunque la rosiglitazona en ensayo clínico en fase III, no parece tener efecto beneficioso.

Tratamientos anti-tau:

La inhibición de la hiperfosforilación de tau se encuentra con un problema y una ventaja. El problema es que aún no se ha identificado inequívocamente la quinasa responsable de su fosforilación (los candidatos son CDK5R1, MARK1 y GSK3). La ventaja es que los fármacos inhibidores de kinasas ya se utilizan en la clínica para el tratamiento del cáncer, por lo que ya han pasado una serie de controles, aunque se desconocen las consecuencias de un tratamiento a largo plazo.

Una de las terapias basadas en Tau más avanzadas es el azul de metileno, capaz de disolver agregados de Tau aislados de cerebros de EA y de prevenir su formación *in vitro*, se encuentra en Fase II (Citron, 2010).

INTRODUCCIÓN

En la Figura 8 se pueden observar esquemáticamente las vías terapéuticas para el tratamiento de la EA, sin incluir las que incluyen el tratamiento de la ruta colinérgica.

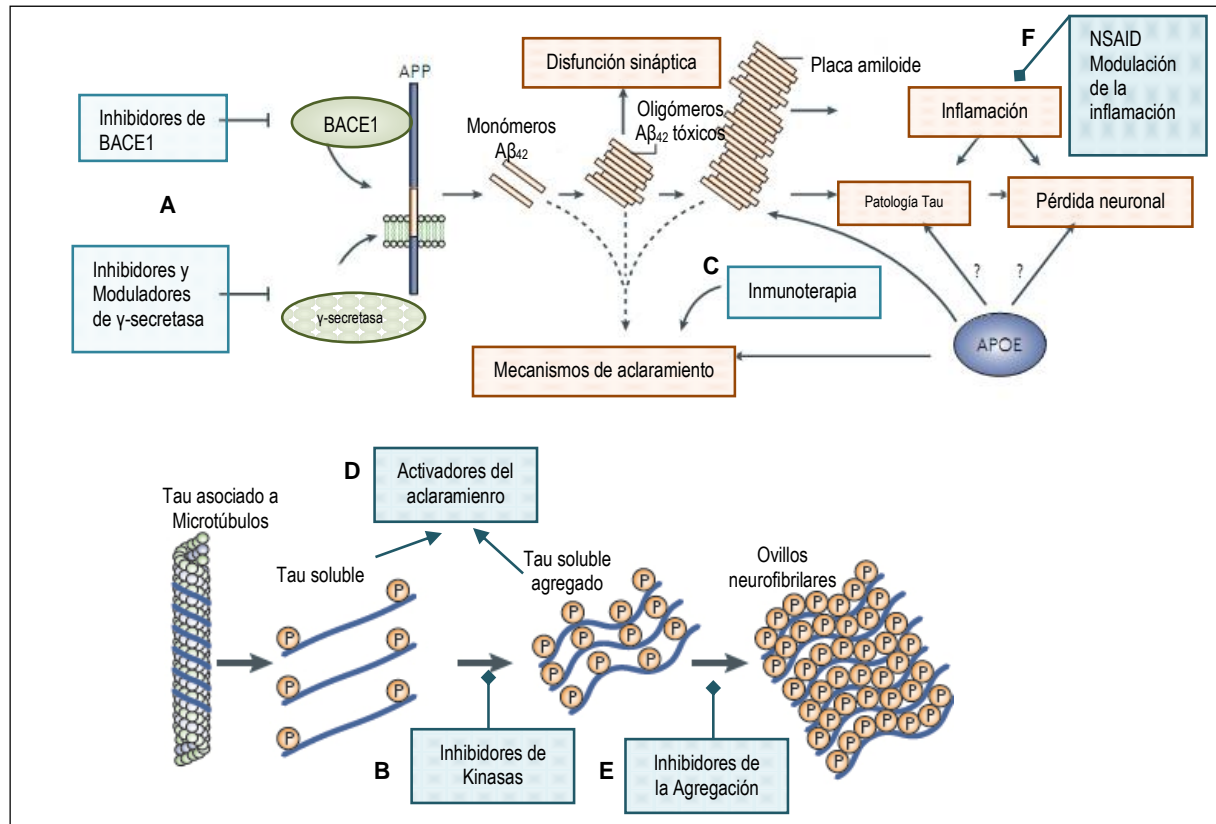


Figura 8. Representación esquemática de los sitios de acción de terapias para contrarrestar la EA. Las posibles vías terapéuticas para el tratamiento de la EA incluyen tanto inhibidores de las enzimas responsables de la síntesis de Aβ (A), como del tau hiperfosforilado (B); también contempla la creación de fármacos que destruyan tanto las placas seniles (C), como los ovillos neurofibrilares (D) o que impidan la agregación de estos últimos (E); otra vía sería la modulación del proceso inflamatorio concomitante a la enfermedad (F). Modificado de (Citron, 2010).

5. Modelos de la enfermedad

Para el estudio tanto del desarrollo de la patología, como de posibles terapias es fundamental contar con buenos modelos animales y celulares que nos permitan analizar los mecanismos moleculares de la enfermedad y la efectividad de posibles terapias.

5.1 Modelos farmacológicos

La marcada afectación de los sistemas colinérgicos de la corteza cerebral y del hipocampo fue caracterizada histológica y neuroquímicamente hace décadas. Esto explica que en los primeros modelos clásicos de la EA frecuentemente se haya manipulado el sistema colinérgico.

En primer lugar se utilizó la administración sistémica de anticolinérgicos como la escopolamina (Heise et al., 1976; Lo Conte et al., 1982), la cual altera la memoria inmediata, provoca desorientación y confusión. También se han utilizado excitotoxinas para destruir las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert (Dunnett, 1985; Wishaw et al., 1985). Las consecuencias de las lesiones de las neuronas colinérgicas son similares a las que se obtienen con neurotoxinas (Lo Conte et al., 1982). Otra estrategia es la devascularización cerebral en la que se destruyen los microvasos sanguíneos de la zona fronto-parietal provocando la degeneración retrógrada de las neuronas del núcleo basal de Meynert que envían sus proyecciones a esa zona (Maysinger et al., 1988). La utilización de inmunotoxinas es, en cambio, mucho más reciente. El factor trófico de crecimiento nervioso (NGF) está implicado en el mantenimiento de las células colinérgicas basalocorticales y actúa a través del receptor de baja afinidad p75NGFR. Se ha utilizado un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente dicho receptor conjugado con la toxina saponina, que inactiva los ribosomas. Así, esta molécula se une selectiva e irreversiblemente al receptor p75 bloqueando la síntesis de proteínas en neuronas colinérgicas, dañándolas o destruyéndolas (Wiley et al., 1991; Wiley, 1992).

Desde los trabajos del grupo de Yankner con el β A tanto *in vitro* como *in vivo*, se han venido tratando ratas con el péptido amiloide, bien por administración focal o intraventricular, con el ánimo de desarrollar un modelo de EA. En muchos trabajos se ha encontrado pérdida neuronal y expresión de patología tipo Alzheimer tras la administración *in vivo* del β A, evidenciando tanto activación microglial como astrogliosis (Frautschy et al., 1991; Kowall et al., 1991; Giordano et al., 1994). En cuanto a los sistemas colinérgicos se ha descrito que el β A disminuye la inmunotinción para la colinoacetiltransferasa en núcleo basal de Meynert (Giovannelli et al., 1995) o la actividad de esa enzima en corteza (Emre et al., 1992). La liberación de acetilcolina inducida por potasio o por nicotina también se ha encontrado reducida en ratas tratadas con el péptido (Giovannelli et al., 1995; Itoh et al., 1996) utilizando microdiálisis *in vivo*. En nuestros estudios hemos descrito una disminución en receptores muscarínicos en corteza cerebral, aunque no en hipocampo, que parecía estar relacionada con los cambios en la innervación colinérgica, tanto en su lugar de origen como en su área de proyección (Pavia et al., 2000). Los efectos obtenidos *in vivo* con el β A dependían del grado de agregación de los péptidos amiloides utilizados (Giordano et al., 1994), de modo similar a las acciones promovidas tras su adición a cultivos celulares (Pike et al., 1993; Pike et al., 1995). También se ha comprobado que los animales así tratados mostraban distintas alteraciones comportamentales, en particular déficits en aprendizaje y memoria, valorados en distintas pruebas (ver revisión (Tran et al., 2002)). Resumiendo este modelo mimetiza muchas de las

alteraciones de la enfermedad neurológica, y aunque no se ha conseguido que desarrollen los marcadores neuropatológicos de la enfermedad (placas seniles y ONF), y constituye un modelo válido desde el punto de vista farmacológico.

5.2 Modelos transgénicos

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 puede llevar o no, mutaciones en los genes de las presenilinas y/o la proteína Tau.

En general estos modelos se generan partiendo del gen de la proteína humana que contiene la mutación que da lugar a la EA (el gen completo, fragmentos significativos del mismo o el cDNA) se utilizan para generar constructos que se insertarán en el genoma del ratón y que se expresarán bajo promotores adecuados, como por ejemplo, el promotor de la proteína priónica del hámster.

Las mutaciones en posición 717 fueron las primeras en describirse (London V717I; Iowa V717F), se utilizaron para crear uno de los primeros modelos transgénicos el PDAPP. Estos ratones presentan una elevada producción de $A\beta_{42}$ y desarrollan placas neuríticas a partir de los 9-10 meses de edad, además de neuritas distróficas positivas para Tau, pérdida sináptica y gliosis (Philipson et al., 2010).

Mutación sueca (KM670/671NL), localizada justo fuera del extremo N-terminal del dominio APP, incrementa los niveles de $A\beta_{42}$ entre 6 y 8 veces. Se ha utilizado para crear uno de los modelos transgénicos de la enfermedad más utilizados, el Tg2576. Esta mutación redirige el procesamiento del APP hacia vesículas en ruta hacia la superficie celular, en lugar de hacia endosomas como ocurre en el APPwild type (Wt). En este modelo se puede encontrar angiopatía cerebral amiloidea. Una gran proporción de los animales transgénicos mueren muy jóvenes y la severidad depende, en gran parte, del fondo genético (cepa C57). Los depósitos extracelulares de $A\beta$ son evidentes a partir de los 14-16 meses de edad y contienen hasta un 75% de $A\beta_{40}$ (Hsiao et al., 1996).

Partiendo de la mutación sueca se ha generado el transgénico APP23, que lleva inserta la proteína APP751 con la mutación sueca dentro del casete Thy-1, que promueve su expresión en neuronas postmitóticas a partir de los 7 meses de edad (Kuo et al., 2001).

Otro tipo de modelos transgénicos son los que llevan varias mutaciones simultáneamente. Tras la identificación de las mutaciones humanas en las PSEN 1 y 2 comenzaron a generarse los primeros modelos murinos transgénicos para PS1 y PS2, pero

estos ratones carecen de fenotipo tipo EA. Los niveles de A β 42 y su velocidad de deposición se vieron incrementados en los modelos dobles transgénicos APP/PS1, como el PSAPP (Tg2576 + PS1) o el PS2APP (APPswe + PS2). Aunque no se conoce ninguna mutación en el gen de la proteína Tau que origine EA, sí se conocen mutaciones suyas causantes de otro tipo de enfermedades, como la demencia fronto-temporal. Estas mutaciones se han utilizado, con combinación con la mutación en APP o APP y PS1 para generar modelos múltiples transgénicos de la EA: el Tg2576 x Tau (P301L) o el triple transgénico APPswe x PS1 x Tau (P301L) desarrollado por La Ferla y colaboradores (Oddo et al., 2003).

Los Cannabinoides

1. Historia de los cannabinoides

Los cannabinoides son los compuestos activos de las plantas del género *Cannabis*, del cual existen tres especies (*C. sativa*; *C. indica* y *C. ruderalis*) comúnmente conocida como marihuana. Actualmente se distribuye por la mayor parte del planeta, pero es nativa de Asia central. No está claro dónde se cultivó por primera vez, probablemente fue en China, donde tuvo numerosos usos técnicos (uso de sus fibras para fabricar telas y cuerdas), aunque también era utilizada por sus efectos psicoactivos. Ha sido utilizada en la India durante toda su historia y también existen evidencias de su uso en Europa como sustancia psicoactiva tres mil años antes de Cristo (como el hallazgo de una pipa en Rumanía, datada en la edad de bronce). También se utilizó en el antiguo Egipto para elaborar cuerdas (Butrica, 2002).

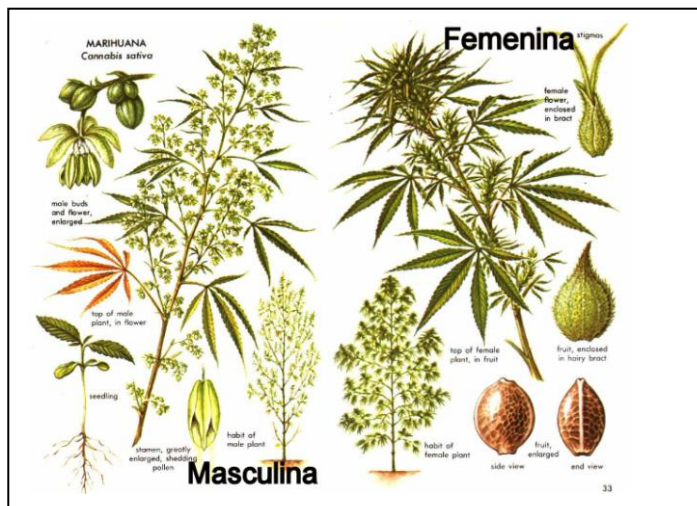


Figura 9. Cannabis sativa. Plantas masculina y femenina

Pero lo más interesante fue el uso médico que se le dio desde muy temprano, sobre todo en Grecia y Roma, donde Plinio el viejo registró en su "*Historia Naturalis*" los usos de la planta para tratar la impotencia, las obstrucciones auditivas, la gota, quemaduras, tumores y erupciones (Butrica, 2002).

Sus aplicaciones terapéuticas continuaron hasta comienzos del siglo XX, para el tratamiento de diversas dolencias: reumatismo, epilepsia, tétanos... pero su uso fue decayendo con la aparición de tratamientos más eficaces. En 1940 se prohibió como sustancia de uso farmacéutico en los Estados Unidos.

Son plantas dióicas (masculinas y femeninas) (Figura 9), y tanto una como otra tienen componentes psicoactivos, en las inflorescencias se acumulan la mayor parte de los mismos.

Dentro de los 400 compuestos sintetizados por la planta, 60 de ellos se consideran dentro del grupo de los cannabinoides. El cannabinoide arquetípico, el Δ^9 -THC, además de ser el principal responsable de sus propiedades psicoactivas, fue aislado por Gaoni y Mechoulam en 1964 (Gaoni and Mechoulam, 1964; Dewey, 1986).

Dado el carácter lipofílico de estos compuestos en principio se consideró que ejercían su acción mediante interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Más adelante estudios sobre la relación estructura-actividad sugirieron mecanismos mediados por receptor. A día de hoy solo se han clonado dos receptores para cannabinoides: CB₁ (Matsuda et al., 1990) y CB₂ (Munro et al., 1993), de los cuales hablaremos más adelante. El descubrimiento de estos receptores de membrana llevó a la comunidad científica a la búsqueda de ligandos endógenos para los mismos y, por tanto, al descubrimiento del sistema endocannabinoide.

2. El sistema endocannabinoide

El primer cannabinoide endógeno se identificó a partir del extracto lipídico obtenido de cerebro de cerdo, la anandamida (araquidonoil etanol amina; AEA) (Devane et al., 1992), el cual resultó ser la amida de un ácido graso poli-insaturado, el ácido araquidónico. Más tarde, a partir de intestino de perro se aisló el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Figura 10) (Mechoulam et al., 1995), el noladin éter a partir de cerebro de cerdo (Hanus et al., 2001). Otros ligandos endógenos del sistema cannabinoide son la virodamina, con actividad antagonista de receptores CB₁ (Porter et al., 2002) y la N-araquidonil-dopamina, ligando de los receptores vaniloides VR1 (Huang et al., 2002). Estos hallazgos fueron las primeras evidencias de la existencia de un sistema cannabinoide endógeno, el cual está siendo investigado desde entonces.

Este sistema parece estar implicado en funciones como: coordinación motora, aprendizaje y memoria, así como antinocicepción, control de las emociones, desarrollo neuronal, modulación inmune y procesos a nivel cardiovascular (Pertwee, 1997).

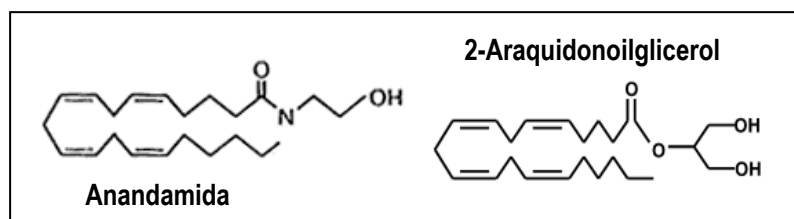


Figura 10. Estructura química de los endocannabinoides AEA y 2-AG.

Los receptores CB₁ y CB₂, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembrana y varias rutas para la transducción de la señal (Shire et al., 1995).

2.1 Biosíntesis y liberación de los endocannabinoides

Las observaciones electrofisiológicas y farmacológicas han mostrado que tanto el aumento de niveles intracelulares de Ca²⁺, como la activación de receptores metabotrópicos, pueden inducir la síntesis de endocannabinoides.

Al contrario que otros neurotransmisores no son almacenados en vesículas presinápticas.

, sino que se producen “a demanda” por hidrólisis de sus precursores, presentes en membrana celular. La anandamida se sintetiza a partir de la fosfatidil-etanolamina (PEA), que gracias a la acción de la N-acetiltransferasa (NAT) da lugar a la N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE). El NAPE por acción de la fosfolipasa D (PLD) (Di Marzo et al., 1994) liberará AEA (Sugiura et al., 2002; Freund et al., 2003).

El 2-AG, por el contrario, se sintetiza a partir de fosfatidil inositol (PI) por acción de la fosfolipasa C (PLC) que da lugar al diacil glicerol (DAG), el DAG es procesado por la diacilglicerol

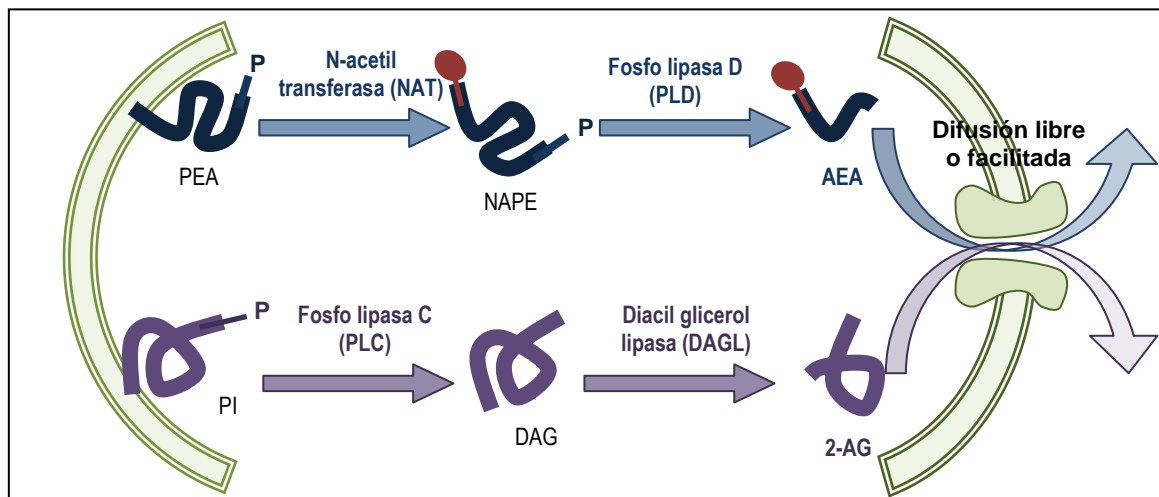


Figura 11. Vía de síntesis y liberación de los endocannabinoides AEA y 2-AG. A partir de fosfolípidos de membrana.

lipasa (DAGL) para sintetizar el 2-AG (Figura 11). Ambos endocannabinoides poseen vías de síntesis alternativas (De Petrocellis et al., 2004). La AEA puede ser sintetizada a partir de ácido araquidónico y etanolamina, por la amido hidrolasa de ácidos grasos (*fatty acid amido hidrolase*; FAAH) actuando de forma reversa, cuando ambos sustratos se encuentran en elevadas concentraciones (no fisiológicas, en principio). Y el 2-AG a partir de PI por acción de la

fosofolipasa A (PLA) dará lugar a liso-fosfolípidos, que por acción de la Lyso-PLC darán lugar al 2-AG (Sugiura et al., 2002; Freund et al., 2003).

Una vez han sido sintetizados, los endocannabinoides necesitan ser liberados al espacio extracelular para actuar sobre sus receptores. Esta liberación parece tener lugar por un mecanismo de difusión facilitada (Freund et al., 2003), al transportador responsable se le ha denominado AMT (*anandamide membrane transporter*).

Los endocannabinoides son sintetizados tanto por las neuronas como por las células gliales, astrocitos y microglía (Walter et al., 2002; Carrier et al., 2004).

2.2 Finalización de la señalización endocannabinoide

Las moléculas con funciones neuromoduladoras presentan mecanismos de inactivación para terminar las respuestas inducidas por ellas. Para los endocannabinoides el sistema de terminación consta de dos etapas: primero la recaptación de la molécula mediada por un transportador de membrana (AMT) y segundo, la hidrólisis de la molécula.

Para la recaptación celular, se consideró que debido a su carácter lipofílico, el transporte a través de la membrana se realizaba por difusión pasiva, siempre que la concentración intracelular fuese inferior a la extracelular. Sin embargo, la cinética observada indicaba una tasa de transporte superior a la esperada presentando propiedades de saturabilidad y competitividad, que revelaban un transporte facilitado. Las primeras evidencias experimentales se obtuvieron en 1997 (Hillard et al., 1997) en astrocitos y neuronas. Las características del AMT de AEA son: rapidez (vida media en el espacio extracelular < 5min.), que es saturable, específico, dependiente de temperatura e independiente de iones sodio y de ATP (Freund et al., 2003). Pero la molécula responsable no ha sido aún clonada. Lo más probable es que la translocación de los cannabinoides a través de la membrana plasmática se realice gracias a varios mecanismos coexistentes, difusión pasiva, difusión facilitada por proteínas de membrana o por los *lipid rafts* (regiones de membrana plasmática ricas en lípidos, receptores y transportadores de membrana) (Bari et al., 2006; Eehalt et al., 2006). La recaptación de endocannabinoides puede ser inhibida por compuestos acilados, como el AM404 o el VDM11 (Piomelli et al., 1999).

Se sabe que es sensible a óxido nítrico, que aumenta la actividad de la AMT. Teniendo en cuenta que la activación de receptores de cannabinoides puede estimular la NOS, es altamente significativo que el producto de reacción de esta enzima, el NO, sea capaz de activar la recaptación de la anandamida (Maccarrone et al., 1998).

INTRODUCCIÓN

Una vez dentro de la célula la hidrólisis de los endocannabinoides es catalizada por la enzima FAAH. Enzima asociada a membrana descubierta una década antes que la propia AEA. En animales *Knock out* para FAAH los niveles de AEA aumentan hasta 15 veces, pero los de 2-AG no varían, esta fue la primera evidencia de la existencia de hidrolasas adicionales para 2-AG (Lichtman et al., 2002b). La monoacil glicerol lipasa (MAGL) está encargada de la hidrólisis del 2-AG, se encuentra en membrana y citosol (Dinh et al., 2002). La AEA se hidroliza a ácido araquidónico y etanolamina; el 2-AG a ácido araquidónico y glicerol (De Petrocellis et al., 2004). Podemos ver un esquema de estos procesos en la Figura 12. La identificación de la FAAH se vió acompañada por el descubrimiento de un inhibidor de la misma, el PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro), que carece de efecto *per se*, pero que potencia los efectos de la AEA (Deutsch and Chin, 1993). Otro de los inhibidores de la FAAH es el URB597 (Fegley et al., 2005), que puede interaccionar con otras lipasas. En el caso de la MAGL, se han identificado inhibidores bastante selectivos, pero se han propuesto el URB602 (Vandevoorde et al., 2007) y el URB754 (Saario et al., 2006).

La expresión de la FAAH parece estar regulada por progesterona y leptina (aumento); estrógenos y glucocorticoides (disminución) (Waleh et al., 2002). También se ha sugerido que la propia FAAH puede facilitar la internalización de endocannabinoides (Glaser et al., 2003), como se había apuntado anteriormente.

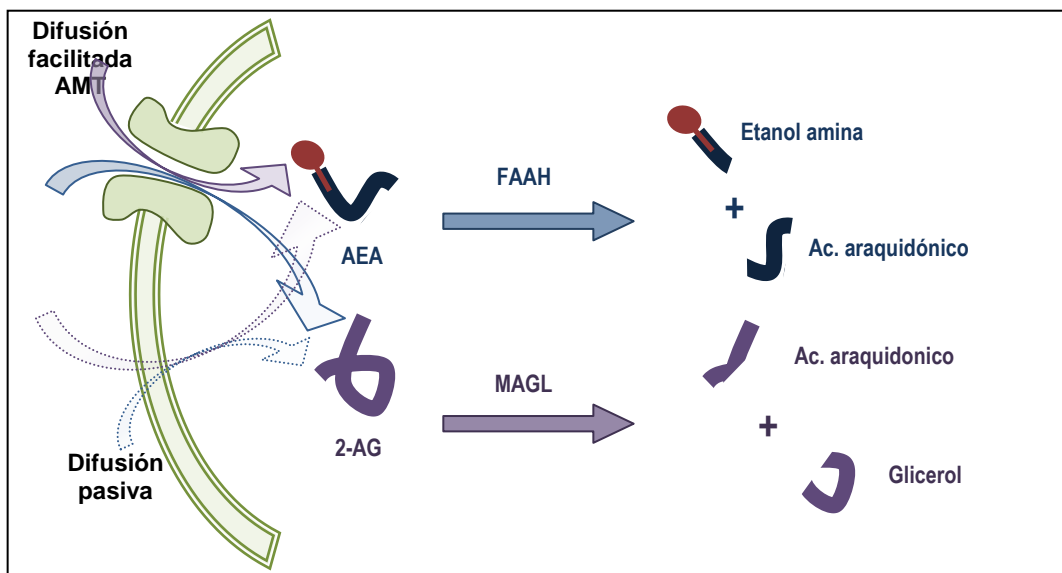


Figura 12. Recaptación y degradación de los endocannabinoides. Desde el espacio extracelular entran en las células por mecanismos de difusión pasiva o facilitada y una vez dentro son degradados por lipasas específicas, FAAH y MAGL

2.3 Receptores y señalización celular

El primer receptor caracterizado fue el receptor cannabinoide central o CB₁ (Devane et al., 1988), su estructura molecular se identificó en rata (Matsuda et al., 1990) y en el ser humano (Gerard et al., 1991). Está compuesto por 472-473 aminoácidos y posee la estructura típica de los receptores acoplados a proteína G (7 secciones transmembrana). Se localiza fundamentalmente en el sistema nervioso central. Se ha estudiado su distribución en cerebro de rata (Tsou et al., 1998) mediante estudios inmunocitoquímicos o autoradiográficos (por ej. Hekenman et al.,). La mayor densidad se encuentra en los ganglios basales, cerebelo y ciertas partes del hipocampo. Y también hay estudios sobre la distribución de estos receptores en cerebro humano (Katona et al., 2001), corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales y cerebelo (ver Figura 13).

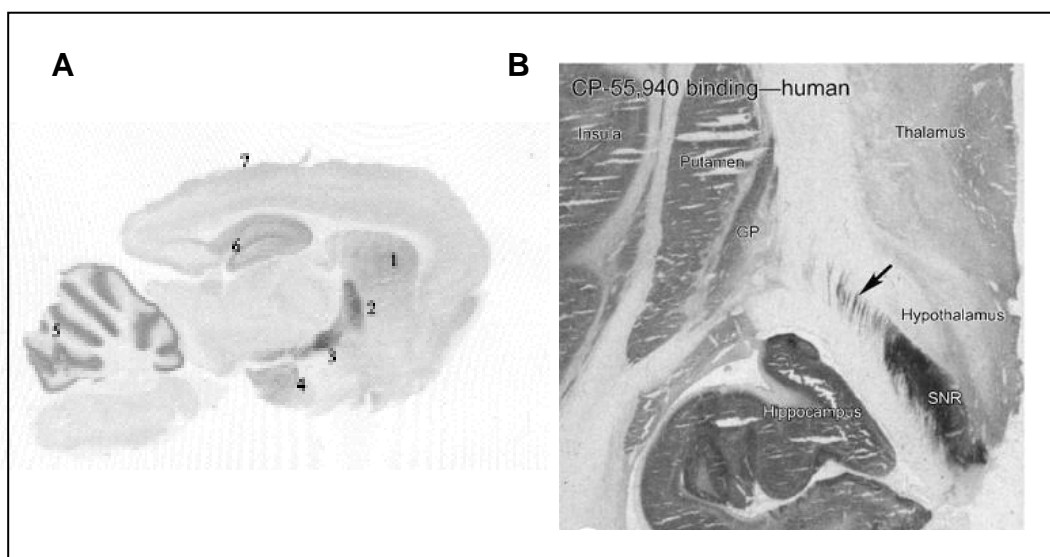


Figura 13. Localización del receptor CB1 en un cerebro de rata y en un cerebro humano. A; hibridación *in situ* en rata 1, caudado-putamen; 2, globo pálido; 3, núcleo ecto peduncular; 4, sustancia nigra; 5, cerebelo; 6, hipocampo; 7, corteza cerebral. **B;** inmunoreactividad en humano, caudado-putamen, hipotálamo, hipocampo (De Petrocellis et al., 2004).

Los receptores CB₁ también se encuentran presentes a nivel periférico en bazo, amígdalas, próstata, útero, ovario, corazón y en los terminales periféricos simpáticos (Galiegue et al., 1995; Ishac et al., 1996).

El segundo receptor de cannabinoideos, CB₂, fue clonado en 1993 por Munro y col. (Munro et al., 1993). Posee una homología con CB₁ del 44%, un 68% en las regiones transmembrana. La distribución de los receptores CB₂ es muy distinta a la de los CB₁, son muy abundantes en la membrana de células del sistema inmune (linfocitos B, monocitos y linfocitos

T) (Galiegue et al., 1995; Schatz et al., 1997). Esta distribución indica que intervienen en funciones inmunomoduladoras (Klein et al., 1998). En sistema nervioso central se expresa en células gliales: microglía (Carlisle et al., 2002), oligodendrocitos (Molina-Holgado et al., 2002) y astrocitos, al menos tras lesión (Benito et al., 2007; Garcia-Ovejero et al., 2009). En neuronas su expresión es controvertida, se ha hallado mRNA de CB₂ expresado en distintas zonas cerebrales mediante hibridación in situ, pero la inmunoreactividad CB₂ en neuronas resulta muy débil (Van Sickle et al., 2005).

Ambos tipos de receptores están acoplados a proteínas G, que, una vez se ha producido la unión del cannabinoide con sus receptores, pueden mediar diversos efectos intracelulares: inhibición de la adenilato ciclasa, regulación de canales iónicos o activación de la vía MAP kinasa, entre otros (Howlett, 1998). Cuando el cannabinoide se une a su receptor, la proteína G (formada por tres subunidades) se disocia en dos elementos: α y $\beta\gamma$ (α está unida a GTP, al separarse del receptor se hidroliza a GDP, aumentando así la afinidad de α por $\beta\gamma$, entonces se recompone la proteína G permitiendo el inicio de un nuevo ciclo de activación). Las subunidades α y $\beta\gamma$ activan distintos efectores (vías de transducción). La subunidad α está acoplada a la adenilato ciclasa (AC), en su mayoría a través de proteínas G_{i/o}, disminuyendo los niveles de cAMP intracelulares (Bonhaus et al., 1998) inhibiendo de este modo a la PKA y la PKC, implicadas en la síntesis de endocannabinoides. Otra acción de los cannabinoides es la modulación directa de canales iónicos por proteínas G. Las subunidades $\beta\gamma$, inhibirán canales de calcio, disminuyendo sus niveles intracelulares (Schwartz et al., 2006) y activarán canales potasio, elevando su entrada (Mackie et al., 1995). Consecuentemente los cannabinoides modulan el potencial de membrana y la liberación de sustancias por exocitosis, por ejemplo, de neurotransmisores.

Los cannabinoides también interaccionan con otros tipos de receptores y moléculas, como el receptor vaniloide TRPV₁. Es un receptor ionotrópico, permeable a cationes, que al ser activado permite la entrada de Ca²⁺ y Na⁺ y la salida de K⁺, despolarizando la membrana y aumentando la probabilidad de generación de potenciales de acción. Sus ligandos endógenos parecen ser la AEA y la NADA (Huang et al., 2002). Sin embargo posee mecanismos de activación adicionales, por protones, calor y cambios post-transduccionales (Zygmunt et al., 1999). Se expresa en neuronas del tálamo, hipotálamo, hipocampo, etc (Cristino et al., 2006) y se localiza en la membrana plasmáticas y otras membranas intracelulares (retículo endoplásmico y vesículas citosólicas) (Eun et al., 2001).

Se considera la existencia de un receptor acoplado a proteína G_{i/o} sensible a concentraciones micromolares de cannabidiol-anormal (abn-CBD) (Breivogel et al., 2001). Al

ser activado, este receptor da lugar a migración microglial (Franklin and Stella, 2003) y activa corrientes de calcio (Begg et al., 2003).

Otro de los posibles receptores para cannabinoides es el receptor huérfano metabotrópico GPR55, (Baker et al., 2006; Ryberg et al., 2007). Su secuencia contiene regiones para la glicosilación y fosforilación de PKC y PKA (Baker et al., 2006). El estudio de su expresión por hibridación *in situ* la ha detectado en hipocampo y núcleos talámicos (Sawzdargo et al., 1999).

Además de los efectos mediados por la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), se han descrito otros sistemas de transducción de señales para los cannabinoides. Por ejemplo, son capaces de modular el metabolismo de esfingolípidos, induciendo la liberación y acumulación de ceramida (Sanchez et al., 2001) (Galve-Roperh et al., 2000). Una vez liberada, la ceramida, activará la vía de señalización de ERK-MAPK, que en líneas tumorales y modelos tumorales *in vivo*, dará lugar a detención de ciclo celular y apoptosis (Guzman et al., 2002; Guzman, 2003).

2.4 Ligandos cannabinoides

Entre los agonistas cannabinoides, se encuentran los cannabinoides clásicos y los no clásicos. Entre los primeros encontramos los cannabinoides sintetizados por *C. sativa* (Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, cannabinal y cannabidiol (CBD)) y los diseñados por el grupo de Mechoulam (1998), en la Universidad Hebrea de Jerusalén, el más representativo de éstos es el HU-210. Los cannabinoides no clásicos son los análogos bi- y tri-cíclicos del THC, sin el anillo pirano B, sintetizados por Pfizer, representados por el CP55940 (menos lipofílico y más potente que el THC). También se incluye el levonantradol, a partir del cual los grupos de investigación de Merck han sintetizado compuestos más afines por el receptor CB₂. Los amiloalquilindoles, representados por el WIN55212-2, son además inhibidores de la ciclooxigenasa. Otros agonistas se han desarrollado para actuar selectivamente sobre uno de los dos receptores conocidos, como el JWH-133 (Huffman et al., 2010), agonista selectivo de los receptores CB₂ o el HU-308 (Hanus et al., 1999).

Los primeros antagonistas eficaces fueron sintetizados por el grupo de Sanofi Recherche. En 1991 se sintetizó el SR141716, antagonista selectivo de CB₁, bloqueante de los efectos de los cannabinoides tanto *in vitro* como *in vivo*; también se ha observado que produce efectos por sí mismo por lo que podría incluirse en el grupo de los agonistas inversos (MacLennan et al., 1998). En 1995 el mismo grupo de investigación sintetizó el primer antagonista selectivo de CB₂ SR144528.

2.5 Modulación de funciones microgliales por cannabinoides

La microglía en cerebro adulto (como macrófago residente del cerebro) puede migrar, proliferar y diferenciarse (Gordon et al., 1993). Cuando se produce una lesión o inflamación en SNC la microglía se activa, adquiriendo una morfología ameboide (Leong and Ling, 1992), proliferando y migrando hacia dicho lugar. También podría producir citoquinas (IL-6, TNF- α , por ejemplo) y NO, expresar complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para la presentación de antígenos y elaborar una respuesta fagocítica.

La microglía expresa los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, de acuerdo con resultados inmunocitoquímicos, de expresión de proteína o de su mensajero (Carlisle et al., 2002; Franklin et al., 2003; Walter et al., 2003; Ehrhart et al., 2005; Ramirez et al., 2005). Ciertas investigaciones han mostrado que los niveles de CB₂ varían en la microglía en función del estímulo activador de la misma (Carlisle et al., 2002). Carlisle y colaboradores (2002) analizaron sus niveles en varios modelos *in vitro* (incluyendo microglía primaria de rata), y observaron que el Lipopolisacárido bacteriano (LPS) disminuyeron la expresión del RNAm y de la proteína del receptor CB₂, mientras que el interferón- γ (IFN- γ), solo o en combinación con LPS, los aumentaron (Carlisle et al., 2002). Los niveles de receptor CB₂ también se ven afectados en enfermedades neurodegenerativas, se han observado aumentos del receptor en modelos de esclerosis múltiple (Loria et al., 2008) y de enfermedad de Huntington (Palazuelos et al., 2009). En la EA, en concreto, se ha descrito la presencia del receptor CB₂ en las placas junto con la expresión de parámetros de activación glial (Ramirez et al., 2005; Micale et al., 2007), de acuerdo con la localización en microglía CD68 positiva en las placas de pacientes (Benito et al., 2003). Por otro lado, en ratas que recibieron una sola inyección de A β intracortical se encontró un incremento tanto de la proteína del CB₂ como de su RNAm en hipocampo a los 7 días (Esposito et al., 2007a). Este incremento podría ser transitorio ya que en otro trabajo la administración repetida durante 7 días de A β intracerebroventricular no modificó la expresión del CB₂ en corteza cerebral a los 2 meses de iniciada la administración (Ramirez et al., 2005). De modo que, la respuesta de la microglía a la estimulación con distintos agentes *in vitro* o *in vivo* puede ser muy variada, aunque parece que se van reuniendo evidencias de la asociación de una activación microglial con incrementos en CB₂.

Distintos agonistas cannabinoides son eficaces en disminuir la generación de NO y la expresión de la iNOS. Se ha estudiado como influyen estos compuestos en la producción de NO por astrocitos, neuronas y microglía. En la línea de neuroblastoma N18TG2 se observó que el

CP55940 aumentaba la producción de NO y la expresión de nNOS, efecto mediado parcialmente por CB₁. En astrocitos la liberación de NO promovida por LPS, pudo ser disminuida con agonistas como el HU210 o inhibidores de la recaptación de AEA (UCM707), efecto probablemente mediado por la disminución de la expresión de iNOS, y que fue bloqueado por antagonistas CB₁ o CB₂ (Ortega-Gutierrez et al., 2005). En la línea C6 de glioma de rata la estimulación con LPS e IFN- γ durante 24 horas promovió la liberación de NO y el aumento de la expresión de la enzima iNOS, que fue contrarrestado por el tratamiento con WIN 55,212-2 o CBD (Esposito et al., 2001). En microglía primaria de rata Tham y colaboradores (2007) describieron que la estimulación con LPS aumenta la expresión tanto de COX-2, como de iNOS y que la inhibición de la FAAH (URB597) revierte ambos efectos (Tham et al., 2007). Del mismo modo agonistas cannabinoides pueden inhibir la producción de NO y la expresión de iNOS inducida por LPS en microglía, efecto mediado por receptor CB₁ (Compton et al., 1993; Waksman et al., 1999) o por receptor CB₂ en microglía estimulada con IFN γ o A β en presencia de CD40L (Ehrhart et al., 2005).

Una de las respuestas más destacadas de la microglía, en la inflamación, es la quimiotaxis (movimiento hacia un gradiente quimioatrayente). El estudio de la respuesta migratoria en macrófagos peritoneales ha proporcionado todo tipo de resultados. La respuesta podía estar mediada exclusivamente por CB₁ (Stefano et al., 1998), por CB₂ (Sacerdote et al., 2005) o por ambos tipos de receptores (Sacerdote et al., 2000), además los cannabinoides tanto podían promover migración como inhibirla (Miller and Stella, 2008). En microglía primaria se ha comprobado que endocannabinoides, como la AEA o el 2-AG, y fitocannabinoides, como el THC y el CBD, promueven la migración a través de receptor CB₂ (Walter et al., 2003) en la línea murina BV2. Es más, el lípido palmitoiletanolamida, que no se une a receptores CB₁ o CB₂, fue capaz de incrementar la migración inducida por AEA o 2-AG (Franklin et al., 2003).

En cuanto a la regulación de la generación de citoquinas se sabe que distintos cannabinoides la disminuyen. En el trabajo realizado por Puffenbarger et al. (2000) el THC, la AEA y su análogo estable meta-anandamida, y los cannabinoides sintéticos CP55,940 y levonantradol, disminuyeron la expresión de los genes para IL1 α , IL1 β , IL6 y TNF α en cultivos de microglía de rata (Puffenbarger et al., 2000). A destacar que el efecto fue resistente a los dos antagonistas SR1 y SR2. También fue resistente a esos antagonistas la disminución en la liberación de TNF α inducida por LPS en cultivos de microglía de rata tratada con AEA, 2AG, CP55,940, WIN 55,212-2 y HU210 (Facchinetti et al., 2003). Del mismo modo la dramática liberación de TNF α inducida por A β fue contrarrestada por el HU210, el WIN 55,212-2 y el agonista CB₂ selectivo JWH133 (Ramirez et al., 2005). El agonista CB₂ JWH015 selectivo

también inhibió la enorme liberación de TNF α inducida por el LPS en microglía en cultivo y atenuó la inducida por INF γ y A β combinadas con CD40L (Ehrhart et al., 2005).

En resumen podríamos decir, que el sistema cannabinoide modula la respuesta inflamatoria de la microglía, lo cual presenta un importante potencial para el tratamiento de enfermedades que, como la EA, presentan un componente neuroinflamatorio.

3. Neuroprotección mediada por cannabinoides

El sistema cannabinoide endógeno juega importantes papeles en diversas enfermedades neurodegenerativas, como la EA o la enfermedad de Huntington. En relación con el sistema cannabinoide y la EA, existen tres hallazgos que se han encontrado tanto en modelos de la enfermedad, como en cerebros de pacientes. Disminución de los niveles de receptor CB₁ fuera de las placas (Ramirez et al., 2005), aumento de los niveles de receptores CB₁ y CB₂ en microglía y sobre expresión de FAAH en astrocitos alrededor de las placas (Benito et al., 2003; Micale et al., 2007).

El sistema cannabinoide se ha visto implicado en gran número de estudios que apoyan su papel neuroprotector, tanto *in vitro* como *in vivo*. En estudios *in vitro* se ha observado que el THC y el CBD disminuyen la toxicidad inducida por NMDA y AMPA en cultivos de neuronas corticales de rata, el efecto no fue modificado por SR1 y en cambio las propiedades antioxidantes de los compuestos fueron las responsables (Hampson et al., 1998). Otros estudios han mostrado que WIN 55,212-2 y el CP55940 protegen a las neuronas hipocampales de la neurotoxicidad inducida por incremento en la transmisión glutamatérgica, aunque no tras aplicación directa de glutamato, efecto mediado por receptores CB₁ (Shen and Thayer, 1998). Nagayama y colaboradores (1999) fueron los primeros en describir la acción neuroprotectora del WIN en cultivos deprivados de oxígeno y glucosa como modelo de isquemia cerebral.

En modelos *in vivo* de daño isquémico, se ha observado que el WIN disminuye la pérdida de neuronas hipocampales a través de CB₁ (Nagayama et al., 1999), y que el THC protege de pérdida neuronal en el neocortex y el estriado, aunque no el hipocampo (Louw et al., 2000). Así mismo, diversos estudios han mostrado que 2-AG, endógeno o administrado exógenamente, reduce el volumen de infarto, edema cerebral y daño hipocampal producido por daño contusivo cerebral vía CB₁ (Panikashvili et al., 2001; Panikashvili et al., 2005; Panikashvili et al., 2006). Sin embargo también estarían implicadas en el efecto beneficioso del 2-AG en este modelo la disminución de citoquinas proinflamatorias y sus efectos antioxidantes (Panikashvili et al., 2006). Por otro lado se ha descrito que el WIN protege a astrocitos en

cultivo del efecto citotóxico del lípido pro-apoptótico ceramida, y más importante también protege a astrocitos hipocámpales de la administración focal de ceramida *in vivo* (Gomez Del Pulgar et al., 2002).

Diversos estudios han mostrado que los cannabinoides son capaces de modificar los niveles de factores tróficos, que puede contribuir a la neuroprotección. Por ejemplo, Δ^9 -THC administrado de forma crónica puede aumentar los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en diversas zonas cerebrales (Butovsky et al., 2005). También sabemos que en el ratón KO para CB₁ no puede aumentar la producción de BDNF ante excitotoxicidad por ácido kaínico *in vivo* (Marsicano et al., 2003) e *in vitro*, resultando en una mayor pérdida neuronal (Khaspekov et al., 2004). En la línea PC-3 el THC y la meta-anandamida inducen la liberación de NGF involucrando la activación de la vía PI3K/PKB (Sanchez et al., 2003).

Los agonistas cannabinoides también han demostrado ser eficaces en contrarrestar distintos efectos frente a la administración *in vivo* del A β . Así la pérdida de marcadores neuronales y el déficit en aprendizaje de ratas inyectadas de forma repetida con el péptido, que iba precedida de activación glial, fueron prevenidos por la co-administración de WIN (Ramirez et al., 2005). El grupo de Iuvone ha hecho interesantes contribuciones con el fitocannabinoide CBD, inicialmente en experimentos en cultivo y posteriormente en modelos *in vivo*. El CBD, que tiene potentes propiedades antioxidantes, redujo la producción de iNOS, NO, p38Kinasa y de NF κ B en células PC12 tratadas con A β (Esposito et al., 2006). Anteriormente, en otro estudio se había demostrado que el CBD disminuía la muerte neuronal secuestrando especies reactivas de oxígeno y reduciendo la peroxidación lipídica, efectos no mediados a través de receptor CB₁ (Iuvone et al., 2004). El CBD fue capaz de contrarrestar la neuroinflamación provocada por la inyección de A β en el hipocampo disminuyendo la expresión y niveles de proteína ácida gliofibrilar (GFAP), y reduciendo también el incremento en la expresión de IL1 β e iNOS, junto con la generación de nitritos y de IL1 β (Esposito et al., 2007b). Por otro lado el tratamiento subcrónico con el inhibidor de la recaptación de AEA, VDM-11, de ratas que recibieron una única inyección de A β en corteza disminuyó los incrementos en iNOS, COX-2 y otros parámetros gliales, mientras que los animales mejoraron su desempeño en una prueba de evitación pasiva (van der Stelt et al., 2006). En este mismo estudio, van der Selt y colaboradores (2006) puntualizan que la efectividad de un posible tratamiento con cannabinoides depende del momento en que se realice la intervención farmacológica.

Continuando con la neuroprotección promovida por la modulación de reactividad glial por cannabinoides hay que citar el trabajo de Esposito y colaboradores (2007). Estos autores encontraron un control opuesto de la reactividad glial inducida en ratas por inyección de A β

INTRODUCCIÓN

dependiendo del receptor cannabinoide activado (Esposito et al., 2007b). El efecto anti-inflamatorio del WIN parece el responsable de la mejoría en memoria de ratas viejas, ya que reducía el número de microglía activada en hipocampo (Marchalant et al., 2007), además de disminuir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y aumentar la neurogénesis en hipocampo (Marchalant et al., 2009). Del mismo modo este compuesto, administrado subcrónicamente, redujo la activación microglial en hipocampo de ratas infundidas con LPS durante 3 semanas, aunque no mejoró su desempeño en tareas de navegación espacial (Marchalant et al., 2007).

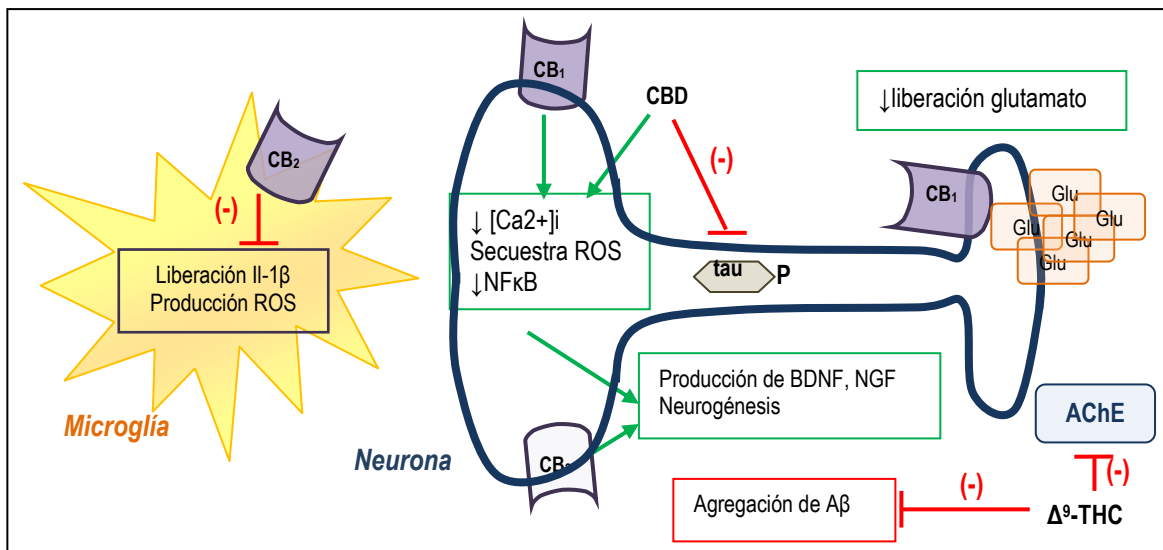


Figura 14. Lugares de acción de los cannabinoides para el tratamiento de la EA. La activación de Rc. CB₂ disminuye la formación de ROS y la liberación de citoquinas en microglía. En neuronas, la activación del Rc. CB₁ disminuye el Ca intracelular, reduce también el estrés oxidativo y disminuye el factor nuclear NFκB, así como la liberación de glutamato. El Rc. CB₂ aumenta la producción de neurotrofinas (BDNF, NGF) y promueve neurogénesis. El CBD es neuroprotector, sin mediar al Rc. CB₁, Y el THC puede inhibir directamente a la AChE y la agregación de Aβ (Campbell and Gowran, 2007).

Otro de los mecanismos por el cual los cannabinoides pueden resultar beneficiosos en una situación de neurodegeneración, es su capacidad para inducir neurogénesis en cerebro adulto. De hecho hoy en día existe amplia evidencia de que los procesos de aprendizaje y memoria dependen de la neurogénesis. En análisis post-mortem de cerebro de pacientes de EA se ha visto un aumento de la neurogénesis en estas zonas cerebrales (Jin et al., 2004), insuficiente para parar el avance de la enfermedad. Estudios recientes han descrito que los cannabinoides, tanto endógenos como exógenos, son capaces de aumentar la neurogénesis, mientras que si se compromete

En la EA se han descrito distintas alteraciones en el sistema endocannabinoide. Ya se ha mencionado la localización del receptor CB₂ en las placas (Benito et al., 2003; Ramirez et al., 2005). En estudios autorradiográficos se describió una disminución en la fijación en algunas

regiones de la formación del hipocampo (Westlake et al., 1994), aunque no en corteza cerebral, corroborado por otros autores (Ramirez et al., 2005). Sin embargo, la expresión de la proteína del receptor CB₁ se encontraba francamente reducida en la EA (Ramirez et al., 2005) similar a lo observado en ratas inyectadas con Aβ. Además en la EA se encontró una mayor tinción para FAAH en astrocitos reactivos rodeando a las placas en cerebros de pacientes (Benito et al., 2003).

En la Figura 14, se puede ver un resumen de los lugares de acción del sistema cannabinoide para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El potencial terapéutico de los cannabinoides para la EA solo se ha explorado en un par de estudios. Así, el dronabinol, preparación oleosa de Δ⁹-THC, mejoró el apetito y el comportamiento de pacientes de EA (Volicer et al., 1997; Walther et al., 2006). En cuanto a otro posible mecanismo de acción habría que tener en cuenta el reciente hallazgo de que el THC es un inhibidor competitivo de la AChE y además previene la agregación de Aβ promovida por la propia enzima (Eubanks et al., 2006).

Resumiendo, los cannabinoides pueden ejercer sus acciones neuroprotectoras interfiriendo con multitud de mecanismos neurodegenerativos: limitando la excitotoxicidad, disminuyendo los niveles intracelulares de calcio; secuestrando ROS; inhibiendo del procesamiento de la caspasa-3 y reduciendo apoptosis; incrementando los niveles de factores tróficos o controlando la neuroinflamación.

Neuroimagen

1. Aspectos generales

El uso de la resonancia magnética (RM) en humanos se introdujo a principios de los años 80 y desde entonces ha demostrado ser una técnica extremadamente versátil (gracias a la cantidad de compuestos de contraste disponibles) para la evaluación de diversos parámetros anatómicos y metabólicos (Figura 15). El número de fenómenos susceptibles a su análisis mediante RM aumenta cada año.

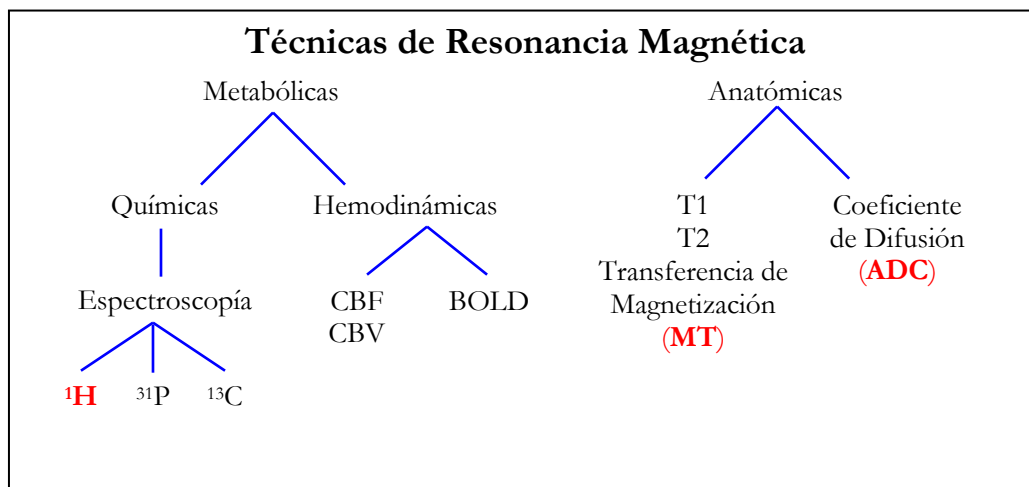


Figura 15. Esquema de las técnicas de Resonancia Magnética. CBF (*Cerebral Blood Flow*), CBV (*Cerebral Blood Volume*), BOLD (*Blood Oxygenation Level Dependent*) Modificado de Choi et al. (2007).

La RM se basa en el fenómeno físico por el cual las partículas con un número impar de electrones o neutrones pueden absorber energía electromagnética de radiofrecuencia. La RM de ^1H , principal componente del agua, muy abundante y de elevada señal magnética, es la que más se utiliza en clínica y también en este estudio.

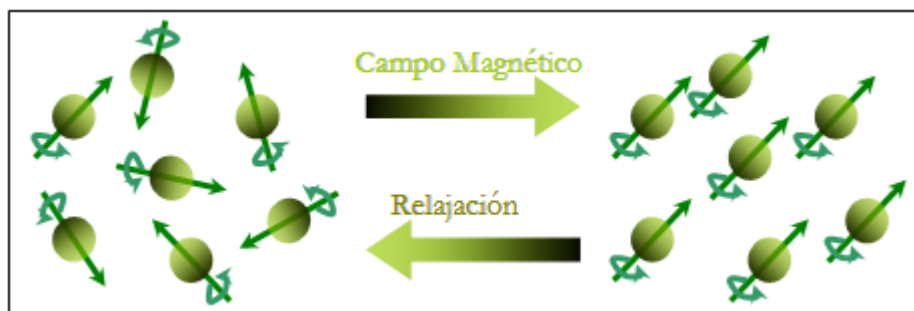


Figura 16. Esquema de la obtención de una señal de resonancia magnética.

Al colocar a un individuo bajo un campo magnético, todos sus núcleos de hidrógeno entrarán en resonancia con los pulsos de radiofrecuencia a los que estén siendo sometidos y se alinearán con el campo magnético. Una vez eliminado el campo, las moléculas volverán a su posición inicial, en un proceso denominado *relajación energética*, durante el cual se emite una señal eléctrica que analizada convenientemente servirá para obtener las distintas imágenes de resonancia o los espectros (Figura 16).

El tipo y calidad de las imágenes obtenidas dependen de varios parámetros, entre ellos, los tiempos de relajación de los átomos: T1 (Tº de relajación longitudinal) y T2 (Tº de relajación transversal). También son importantes la densidad de núcleos en resonancia o la potencia magnética del aparato (medida en Teslas).

Agentes de contraste:

El objetivo de los agentes de contraste es aumentar la sensibilidad y la especificidad de la detección, para diferenciar zonas concretas. Las señales de contraste deben modificar la señal de resonancia y pueden hacerlo tanto por exceso como por defecto. La materia se comporta frente a un campo magnético, de acuerdo a su configuración interna y dicho comportamiento se cuantifica mediante la susceptibilidad magnética (χ). Un cuerpo se denomina diamagnético si $\chi < 0$, sus núcleos no se moverán en presencia del campo magnético, minimizando la señal. Se denominan paramagnéticos, si $\chi > 0$. Este tipo de agentes alinean sus núcleos paralelamente al campo, y son el tipo de materiales que se utilizan para generar agentes de contraste, como el Gadolinio.

2. Resonancia magnética nuclear (RMN) en EA

Como ya se ha dicho anteriormente, uno de los principales problemas de la EA es su diagnóstico precoz. La neuroimagen ha sido ampliamente utilizada para la evaluación de la EA. Tanto la imagen funcional como estructural están siendo explotadas para su detección temprana.

Uno de los parámetros más utilizados y aceptados son las medidas volumétricas de las regiones más afectadas por la enfermedad, hipocampo y córtex entorrino, mediante resonancia. Así mismo, la tomografía y el PET, están siendo explotadas para la discriminación de la EA respecto a otras demencias. Sin embargo con el SPECT (*Single-Photon-Emission Computed-Tomography*) se están evaluando las alteraciones regionales y globales del metabolismo y el flujo sanguíneo (Lee et al., 2003).

2.1 Imágenes estructurales

Existe una nutrida bibliografía que muestra una reducción del volumen del hipocampo en pacientes de EA en comparación con sujetos control, concomitante con un aumento del tamaño de los ventrículos. Esta atrofia se ha valorado mediante tomografía y resonancia desde comienzos de los años 90 (Pfefferbaum et al., 1990; Jack et al., 1992). Al igual que con la deposición de A β , la atrofia comienza en la formación hipocampal y el córtex entorrino, antes de progresar hacia otras zonas cerebrales (Price and Morris, 1999).

Uno de los problemas para valorar este tipo de estudios es la falta de consenso a la hora de establecer los límites precisos del hipocampo. Por otro lado está la variabilidad de los pacientes utilizados en cada uno de ellos, desde la demencia multiinfarto, hasta la EA, pasando por el deterioro cognitivo leve (DCL) (Lee et al., 2003), así como una gran variabilidad en la edad de los pacientes utilizados en los estudios. También se puede encontrar este tipo de atrofia en individuos sin ninguna patología (formando parte del proceso normal del envejecimiento) o en otro tipo de alteraciones como la enfermedad de los cuerpos de Lewy.

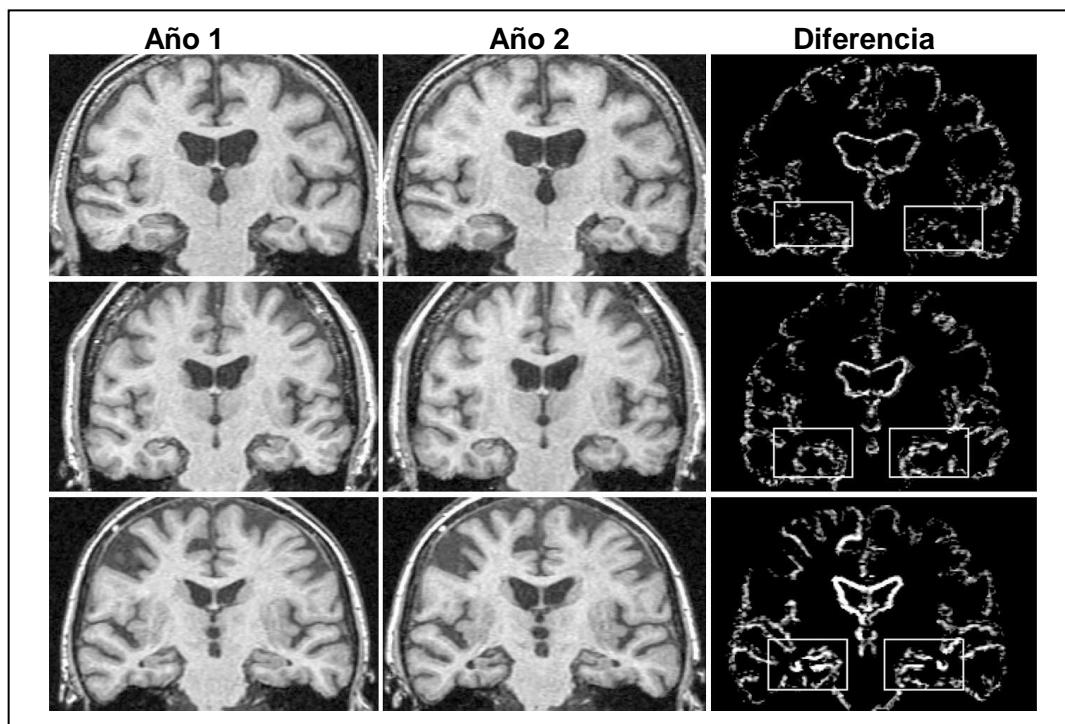


Figura 17. Secciones coronales en T1 del seguimiento de 3 individuos a lo largo de 2 años. De izquierda a derecha se pueden observar imágenes a tiempo cero (izq.), imágenes tomadas 2 años después (dcha.) y la diferencia entre ambas imágenes marcando en blanco tan solo las diferencias (dcha.). De arriba abajo se muestran imágenes de 3 individuos representativos. Arriba: hombre de 72 años sano (tasa de atrofia de 0.2%). Centro: Mujer de 70 años que fue diagnosticada de DCL 6 años después de la línea base (tasa de atrofia de 0.8%). Abajo: Hombre de 77 años diagnosticado de EA en el momento de la segunda imagen (tasa de atrofia del 1.3%). Los rectángulos señalan el lóbulo medio temporal (Rusinek et al., 2003).

La mayor parte de las publicaciones, han estudiado de forma puntual individuos control y enfermos de AD en distintos estadios. En la mayor parte de los estudios se han observado reducciones significativas del volumen de hipocampo, lóbulos temporal y medial, así como Cx entorrino (Ramani et al., 2006). Por otro lado están los estudios longitudinales, que valora en cada individuo la evolución de los cambios en el tiempo. En este tipo de estudios para visualizar las posibles diferencias basta con ajustar las diversas imágenes seriadas obtenidas a distintos tiempos y sustraer unas de otras (Rusinek et al., 2003). La reducción de volumen se expresaría como un porcentaje de pérdida de volumen respecto al tiempo inicial de cada individuo. Dado que la pérdida de volumen es relativamente lenta, estos estudios han mostrado ser especialmente sensibles a pequeñas diferencias (Figura 17).

La principal ventaja de este tipo de análisis, sería la posibilidad de detectar la EA en estadios presintomáticos para poder llevar a cabo estrategias preventivas.

2.2 Coeficiente de la difusión aparente del agua (ADC)

Gracias a la RM es posible cuantificar alteraciones en la difusión del agua en los tejidos (por ejemplo, en cerebro), ya que ésta da lugar a cambios microscópicos estructurales que tienen consecuencias sobre los valores de T1 y T2 (Lee et al., 2003).

El agua en cerebro se encuentra repartida en tres grandes compartimentos, los valores de ADC para cada compartimento son fijos, lo que puede cambiar es la contribución de cada uno de ellos al volumen total. Estos compartimentos son: volumen intracelular (V_i), volumen extracelular (V_e) y volumen vascular (V_v), la modificación de cualquiera de estos volúmenes redundaría en la alteración de los otros dos.

Existen diversas alteraciones que pueden modificar los volúmenes mencionados. Por ejemplo, los valores de ADC aumentan durante el desarrollo en cerebro (Sakuma et al., 1991), debido a la mielinización progresiva del tejido. Mientras que en enfermedades desmielinizantes (esclerosis múltiple, adenoleucodistrofia) lo que se observa es una disminución de los valores de ADC (Nomura et al., 1994).

En el caso de la EA los diversos estudios realizados han mostrado, en general, un aumento en la difusión del agua, aunque no todos han resultado significativos. Hanyu y col (1998) no encontraron diferencias significativas en hipocampo, pero sí en Cx. temporal; mientras que Kantarci y col. (2001) y Sandson y col. (1999) observaron aumentos significativos de ADC en hipocampo y Cx. Temporal.

Por todo esto, a la hora de llevar a cabo el presente estudio, decidimos estudiar las posibles alteraciones en ADC en el modelo Tg2576 de la EA.

2.3 Transferencia de Magnetización (MT)

Las imágenes de transferencia de magnetización están basadas en el intercambio de magnetización entre los protones (siendo el agua el principal representante) libres y los protones inmóviles, es decir, ligados a biomoléculas. Las biomoléculas que mas agua acopla son los fosfolípidos.

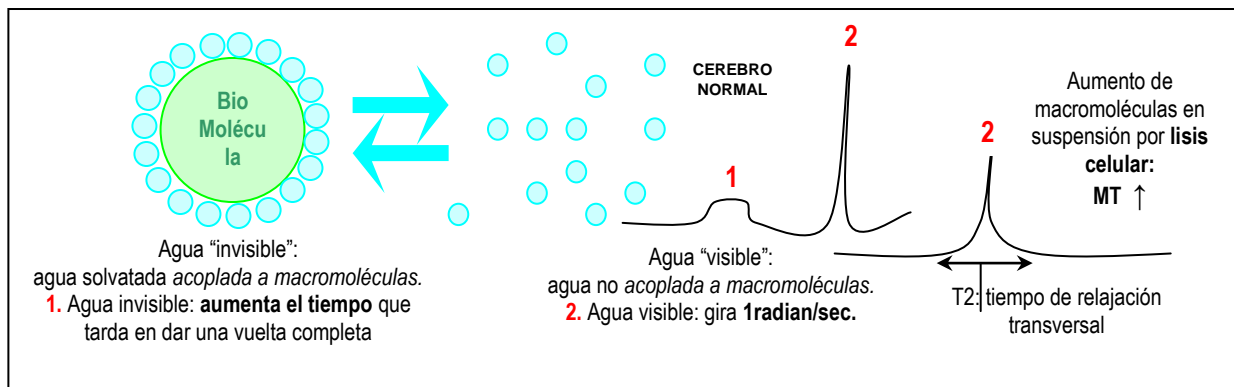


Figura 18. Representación esquemática de la transferencia de magnetización que puede observarse en los tejidos. Las moléculas de agua ligadas a una macromolécula tienen unos valores de T2 muy bajos porque transfieren su energía rápidamente a las moléculas próximas.

El agua acoplada a biomoléculas no transfiere magnetización a otras moléculas y se la considera "invisible", mientras que el agua libre sí, siendo ésta la principal responsable de la transferencia de magnetización observable (visible) (Figura 18).

Los valores de MT dependen de la concentración, de la superficie química y de la biofísica dinámica de las macromoléculas. Este parámetro se ha utilizado desde hace tiempo en el seguimiento de pacientes de esclerosis múltiple, considerándose que una disminución en los valores de MT es indicativo de un proceso desmielinizante (van Waesberghe et al., 1998).

En la EA la transferencia de magnetización se ha utilizado en un reducido número de estudios. De forma similar a lo ya comentado para ADC, los resultados obtenidos han sido variables. Un estudio de 2002 mostró aumentos significativos al analizar el cerebro completo, pero al centrarse en lóbulo temporal las diferencias desaparecían (van der Flier et al., 2002). En otro estudio, por el contrario, se observó una disminución significativa de los valores de MT en lóbulo temporal, en comparación con controles sanos (Bozzali et al., 2001). En general se ha obtenido una reducción de los valores de MT en el hipocampo de los pacientes de EA (Hanyu et al., 2000), e incluso en pacientes con deterioro cognitivo leve, en comparación con

individuos control (Hanyu et al., 2001). Aunque el mecanismo por el cual se puede observar esta reducción no está del todo claro. Los hallazgos histopatológicos mostraron una pérdida de neuronas piramidales acompañada de un aumento en el número de astrocitos, microglía y oligodendrocitos, así como de placas seniles y ovillos neurofibrilares. Es decir un aumento de la celularidad y de las partículas capaces de acoplar agua podría ser la responsable de un aumento en los valores de MT en la EA

3. Espectroscopía in vivo por Resonancia Magnética

Los espectros de resonancia se representan como gráficos en los que el área bajo cada pico constituye la concentración relativa de una especie química dada (Figura 19).

Técnicamente fue mejorando y simplificándose, sobre todo, a partir de 1995 cuando la FDA (*Food And Drug Administration*) aprobó la utilización de la secuencia PROBE (*PROton Brain Examination*), para la espectroscopía de voxel único para protón. Ésta permite la obtención de un espectro de protón para un volumen de interés en 6 minutos, aproximadamente (Soares and Law, 2009).

La espectroscopía de RM de protón es la más comúnmente utilizada por su gran sensibilidad magnética en comparación con otros núcleos, como fósforo, carbón, sodio, etc que requieren de amplificadores específicos para su detección. Además el *hardware* es el mismo que para una obtención de imágenes de resonancia convencional. La única limitación es que no pueden obtenerse espectros con campos magnéticos inferiores a 1Tesla.

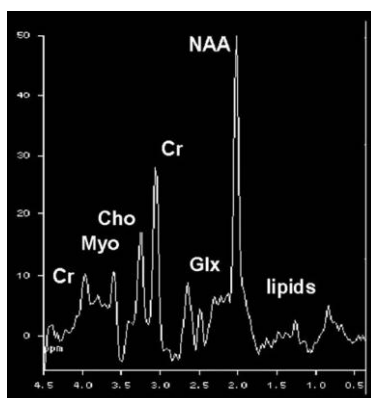


Figura 19. Espectro normal.

En el eje de las x se representa el cambio químico en partes por millón, en el eje de las y la amplitud relativa de la señal o la concentración para cada metabolito.

Los metabolitos que pueden ser identificados mediante una resonancia de protones dependen, en parte, del *Echo Time* (TE). A 1.5 Teslas y con un TE entre 144 y 288ms, se pueden visualizar los siguientes metabolitos: N-Acetil Aspartato (NAA), Colina (Cho), Creatina (Crea) y posiblemente Alanina (Ala) y lactato. TE inferiores a 40ms permiten la visualización, además de

los ya indicados, de Myoinositol (Myo), Glutamato, Glutamina, Glucosa y algunas proteínas y lípidos (Kwock, 1998). Con el aumento de la potencia magnética, también aumenta el número de metabolitos que pueden ser detectados.

3.1. Significado biológico de los metabolitos

N-Acetil aspartato: Está presente en todas las áreas cerebrales con pequeñas diferencias regionales que no exceden un incremento del doble. Es más abundante en sustancia gris que en sustancia blanca (Miyake et al., 1981). Va aumentando durante el desarrollo, y en cerebro adulto está confinada en neuronas, por ello la modificación de sus niveles se consideran directamente relacionados con efectos neuronales (Choi et al., 2007). En los últimos años está ganando interés clínico ya que disminución de sus niveles se considera indicativo de pérdida neuronal o de función (Demougeot et al., 2004). Este hecho se sustenta en que sus niveles se ven reducidos en enfermedades neuronales como esclerosis múltiple, encefalopatía hipóxica o también tumores cerebrales. Su función, a día de hoy, sigue siendo desconocida, cierta literatura sugiere que actúa como un osmolito cerebral (reduciendo el estrés neuronal) y reservorio de aspartato (Baslow, 2000).

En la EA distintos estudios han mostrado una consistente disminución en los niveles de NAA/Cre que refleja la muerte neuronal que ocurre. En el trabajo de Kantarci y colaboradores (2000) la relación NAA/Cre disminuyó en lóbulo superior temporal y giro posterior del cíngulo en pacientes de EA en comparación con individuos con DCL y controles, siendo los valores del lóbulo occipital medio similares en todos los grupos. En otro estudio, en cambio, la NAA se encontró disminuída tanto en pacientes de EA como de DCL *versus* individuos control, existiendo una correlación entre ese parámetro y el deterioro cognitivo, y el volumen ventricular (Kantarci et al., 2007). También se ha encontrado disminuido en individuos presintomáticos con EA familiar (Godbolt et al., 2006).

Colina: es un marcador metabólico de la integridad y densidad de las membranas (síntesis y degradación de fosfolípidos). Indica la concentración de precursores de membrana (colina y fosfo-colina) libres. Sus niveles pueden variar en sustancia gris y sustancia blanca. Los tumores malignos muestran un aumento en los niveles de colina debido al incremento en la celularidad (Demougeot et al., 2004). La glía presenta niveles de colina de 2 a 3 veces superiores a las neuronas, por lo que podría servir como marcador de gliosis (Urenjak et al., 1993; Choi et al., 2007).

En la EA se han descrito un aumento en niveles Cho/Crea en comparación con sujetos con DCL o controles en corteza cingulada posterior (Kantarci et al., 2000) o valores muy similares en todos los grupos en hipocampo y área cingulada posterior (Wang et al., 2009).

Otros metabolitos como el *myo*-Inositol (mI), se encuentran presentes en concentraciones muy superiores en células gliales respecto a neuronas, por lo que también resulta un buen marcador de gliosis (Choi et al., 2007). Pettegrew y col. (1997) mostraron un aumento en los niveles de *myo*-inositol en pacientes de Alzheimer, concomitante con una disminución en NAA. Del mismo modo otros autores han observado incrementos en corteza cingulada tanto en la EA como en el DCL (Kantarci et al., 2000; Griffith et al., 2007).

4. Tomografía por Emisión de Positrones de FDG

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una tecnología de imagen analítica, que utiliza compuestos marcados con radioisótopos emisores de positrones (isótopos de oxígeno, ^{14}O ^{15}O ; nitrógeno, ^{13}N ; carbón, ^{11}C) para obtener imágenes y valorar procesos bioquímicos *in vivo*, ya que tienen una vida media muy corta (Phelps, 2000).

El trazador de PET mas utilizado es la 2- ^{18}F fluoro-2deoxy-D-glucosa (FDG), este trazador es inyectado de manera intravenosa en los sujetos y transportado al interior de las células por el transportador de glucosa, donde es fosforilado por la hexoquinasa a FDG-6-fosfato, el cual no puede ser metabolizado, quedando así atrapado en la célula, donde su acumulación puede ser medida mediante un scanner de PET (Herschman, 2003).

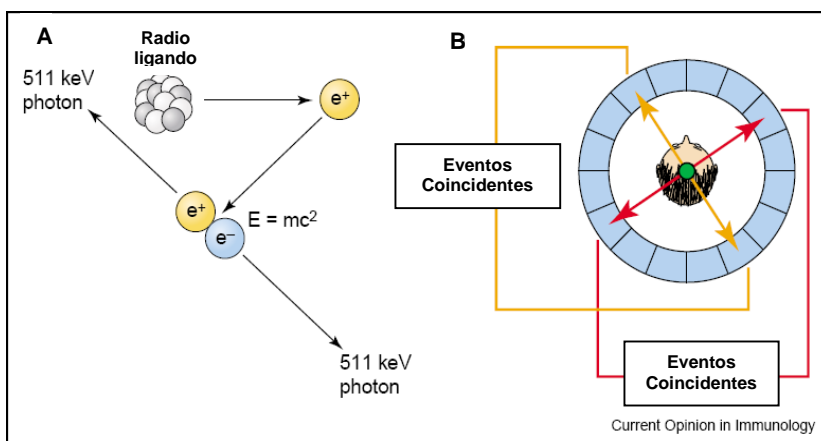


Figura 20. Esquema del proceso de detección de la señal de un tomógrafo.

A, los positrones emitidos por los radioligandos colisionan con electrones liberando 2 fotones en direcciones opuestas. **B**, los fotones que golpean simultáneamente detectores opuestos son registrados como un evento. *Modificada de (Herschman, 2003).*

El mecanismo físico, mediante el cual pueden detectarse estos ligandos, como el FDG, es el siguiente. Los radioisótopos (en este caso ^{18}F) poseen núcleos inestables que al desintegrarse liberan energía en forma de positrones que al colisionar con un electrón sufren un proceso de

aniquilación que liberará 2 fotones con la misma energía en direcciones opuestas 180°, solo se detectarán eventos, cuando colisionen simultáneamente en detectores opuestos (Figura 20).

Las imágenes de PET tienen una resolución anatómica muy pobre, por lo que, para poder identificar con exactitud el origen de la señal se suelen superponer a éstas, imágenes de RM, en las que se seleccionan las regiones de interés con precisión.

4.1 EL PET en la EA

El metabolismo de glucosa proporciona el 95% de la energía de ATP requerida para una correcta función del cerebro. El FGD se ha considerado tradicionalmente como un indicador del consumo de glucosa, y por tanto de la actividad cerebral, y dado que en la EA hay una marcada reducción del número de neuronas, principales consumidoras de glucosa. Desde el comienzo de este tipo de estudios siempre se esperó una reducción en los niveles de FDG en cerebro de pacientes de EA (Figura 21).

Se han identificado reducciones en el metabolismo de glucosa en corteza de asociación parietotemporal e hipocampo, mientras que se ha visto preservado en otras zonas como los ganglios basales. Las diferencias son significativas entre EA severa y controles, pero no entre EA moderada y EA media (Kumar et al., 1991; Minoshima et al., 1998). También se han descrito diferencias entre el establecimiento del deterioro metabólico de la EA temprana y la EA tardía, la primera comienza por Cx. cingulado parietal y posterior, y la segunda por sistema límbico y lóbulo frontal-medial (Mielke et al., 1992; Yasuno et al., 1998; Sakamoto et al., 2002). Por otro lado se ha encontrado que los sujetos predementes que presentan ApoE4 y una reducción del consumo de glucosa similar a la observada en pacientes, acabarán desarrollando demencia (Reiman et al., 1996; Small et al., 2000). Otra de las utilidades del PET es la monitorización de los tratamientos, sólo se ha utilizado para el tratamiento con donezepil, con un ligando para los receptores de Ach (N-[¹¹C]-metilpiperidin-4-il-acetato) (Shinotoh et al., 2001; Bencherif et al., 2002).

Insistimos en la necesidad de un diagnóstico precoz que permita distinguir a la EA de otras demencias. A este respecto el PET proporciona una herramienta muy útil a la hora de detectar la enfermedad hasta 3 años antes que con los sistemas de diagnóstico convencionales con una fiabilidad de hasta el 93% (Phelps, 2000).

Algunos estudios se han llevado a cabo en sujetos asintomáticos de familias con EA familiar y han descubierto déficits metabólicos (detectables mediante PET) correlacionados con la presencia del factor de riesgo APOE4, 5 años antes de la aparición de los primeros síntomas (Small et al, 2002).

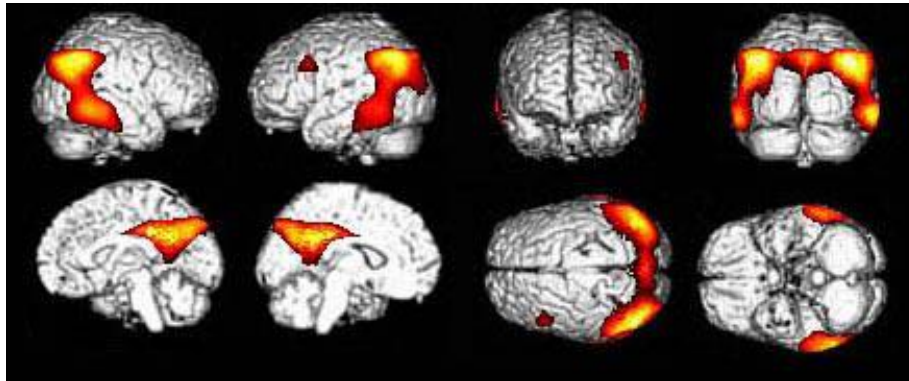


Figura 21. Descenso de la actividad metabólica cerebral típica de la EA. Las zonas que presentan un metabolismo de glucosa reducido son el córtex cingulado posterior, córtex parietotemporal y áreas precuneales. Se indican estas áreas sobre imágenes de Resonancia Magnética (Ishii, 2002).

4.2 PET en animales transgénicos

Fue a partir de 1999 cuando comenzaron a desarrollarse scanners para animales pequeños con una resolución de 2^3 mm^3 , hasta llegar a los 1^3 mm^3 de resolución espacial actual (Herschman, 2003). Estos nuevos aparatos han permitido obtener imágenes moleculares *in vivo* en roedores similares a las de humanos. Este tipo de aparatos ya han sido utilizados en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, para la visualización de placas seniles en modelos transgénicos de la enfermedad gracias a radioligandos específicos (Valla et al., 2002; Maeda et al., 2007).

En cuanto al metabolismo de glucosa en los modelos transgénicos, los primeros estudios se realizaron mediante autoradiografía. Valla y colaboradores (2002), utilizando el transgénico PDAPP y el radioligando FDG observaron una reducción en el marcaje del Cx. cingulado posterior, significativa respecto a los controles Wt. Otros estudios autorradiográficos recientes utilizando el radioligando 2-DG ($[^{14}\text{C}]$ -2-deoxiglucosa) en los modelos APP-PS1 y PS1 de 15 meses de edad, han mostrado una reducción de la captación de glucosa en algunas regiones cerebrales (Cx. cingulado, Cx. retrosplenial, tálamo y subáreas de hipocampo), aunque en otras hubo un incremento (Dubois et al., 2010). Por último, Kuntner y colaboradores (2009), utilizando FDG y el modelo Tg2576 no observaron diferencias significativas en la captación de glucosa en ninguna zona cerebral (Kuntner et al., 2009) a los 13-15 meses.

4.3 Otros radioligandos para la EA

Compuesto de Pittsburgh: la primera evidencia para la visualización y cuantificación de las placas seniles *in vivo*, en un modelo de la EA fue presentada por Maeda y col. en 2007. Tras la administración intravenosa del N-[¹¹C]metil-2-(4'-metilaminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (o [¹¹C]PIB por "*Pittsburgh Compound-B*"), ratones transgénicos Tg APP23 mostraron una elevada radioactividad en regiones ricas en péptidos amiloide (hipocampo), presumiblemente, placas (Figura 22).

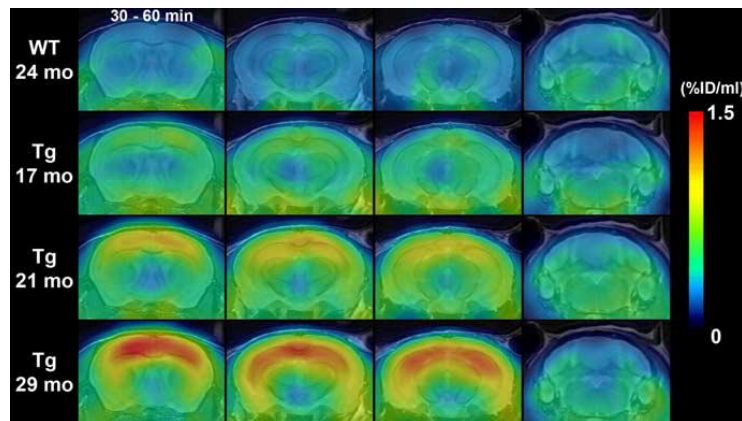


Figura 22. Detección de placas *in vivo* en un modelo Tg APP a distintas edades. Imágenes de PET generadas como la media de imágenes tomadas durante 30-60min tras la administración del compuesto PIB, superpuestas a una imagen de RM. De arriba abajo se muestran: (arriba) un animal control; animales Tg APP23 de 17, 24 y 29 meses de edad respectivamente. De izda. a dcha. se muestran imágenes coronales a 0, 2, 3 y 7 mm posteriores a bregma. En la escala se observa que el rojo es el máximo y el azul el mínimo de señal. (Maeda et al., 2007).

Pocos estudios se han llevado a cabo en humanos utilizando este compuesto. En 2010 (Shin et al., 2010) realizaron tomografías de pacientes de EA y sujetos control utilizando además del PIB, FDG y un tercer ligando, y observaron que ciertas regiones cerebrales (córtex parietal, temporal y frontal) de EA presentaban un marcaje más intenso del compuesto PIB que los controles.

Objetivos

El papel neuroprotector de los cannabinoides *in vivo* e *in vitro* es conocido, pero el mecanismo a través del cual llevan a cabo su acción neuroprotectora, en el contexto de la EA, no había sido abordado en su conjunto. Los objetivos del presente trabajo son:

1. Estudiar el efecto de distintos agonistas cannabinoides, en particular aquellos carentes de efectos psicoactivos, sobre funciones microgliales tales como la generación de nitritos o la migración, que puedan ser relevantes para la terapia de la EA.
2. Comprobar si el tratamiento prolongado con cannabinoides previene la hipoactividad y los déficits cognitivos que muestran ratones Tg APP y si estos cambios están asociados a una menor activación glial, a una disminución en parámetros inflamatorios ó a niveles de A β .
3. Investigar las modificaciones en la expresión y localización de receptores cannabinoides y niveles de sus ligandos endógenos, en el modelo transgénico de la EA y comprobar el efecto del tratamiento prolongado con cannabinoides.
4. Estudiar el metabolismo cerebral *in vivo* por técnicas de tomografía por emisión de positrones (captación de glucosa) o por espectroscopía de resonancia magnética de protón (niveles relativos de N-acetilaspártato y colina) en ratones Tg APP y el efecto del tratamiento prolongado con cannabinoides.
5. Valorar *in vivo* mediante técnicas de resonancia magnética de protón (coeficiente de difusión aparente y transferencia de magnetización) si existen cambios cuantificables debidos a la patología tipo EA en el Tg APP y al efecto del tratamiento con cannabinoides.

MATERIALES Y MÉTODOS



Ensayos in Vitro

1. Cultivos

1.1 Cultivos primarios de microglía

Se prepararon a partir de cortezas de animales neonatales (P0-P1) (de ratones de la cepa C57BL/6 o ratas Wistar). Las cortezas se disgregaron mecánicamente y se sembraron en frascos de 75 cm² en DMEM con alto contenido en glucosa (Lonza), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS) y 40 µg/ml de gentamicina. Las células se cultivaron en una atmósfera de 5% CO₂ / 95% de aire a 37°C. Se realizaron cambios de medio a las 24 horas y a los 7 y 14 días de iniciar el cultivo.

Tras 2 semanas en cultivo, aproximadamente, las células alcanzaron la confluencia y a los 2-3 días se agitaron durante 3 horas a 250 rpm, se recogió el medio con las células en flotación y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min para su recuento.

En todos los casos las células se sembraron en placas recubiertas con poli-L-Lisina (10 µg/ml) a la densidad especificada en cada caso. Los cultivos de microglia eran 99% puros, de acuerdo criterios inmunocitoquímicos: tinción positiva para Lectina de tomate (1:200; Sigma) y OX42 (1:50; ICC) y negativa para el marcador de astrocitos GFAP (1:900, DAKO) (Figura 23).

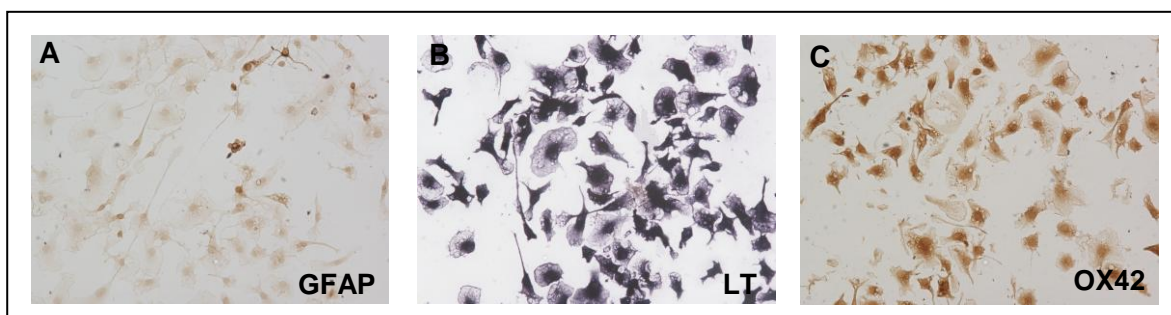


Figura 23. Cultivos de microglia primaria de rata positivos para lectina de tomate y OX42. A, ausencia de marcaje con proteína ácida fibrilar glial, específica de astrocitos (GFAP; 1:900). B, marcaje con lectina de tomate, específica de microglia (LT; 1:200). C, marcaje con OX42, específico de la estirpe microglial (OX42 1:50). Microfotografías tomadas a 200 aumentos.

1.2 Cultivo de líneas microgliales

Línea microglial N13:

La línea microglial N13 fue generada por el grupo de Righi y colaboradores (1989). Inmortalizaron cultivos primarios de microglía de cerebro de ratón embrionario con retrovirus

oncogénicos murinos. Generaron varios clones que expresaban marcadores de superficie microgliales (F4/80, Mac-1) y producían IL-1, IL-6 y TNF α utilizando ensayos de actividad biológica y análisis por *Northern Blot* (Righi et al., 1989).

Las células N13 se expandieron y cultivaron en RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 10% FCS y 40 μ g/ml de gentamicina. Una vez confluentes, las células fueron tratadas enzimáticamente con tripsina-EDTA durante 10 minutos, que fue inactivada por adición de medio con suero. Se sembraron en placas recubiertas con poli-L-Lisina (10 μ g/ml) a la densidad indicada en cada caso. El número de pases máximo tras la descongelación de cada alícuota fue de 5.

Línea microglial BV-2:

La línea microglial BV2 fue generada por Blasi y colaboradores (1990) en la Universidad de Perugia, Italia. La línea fue establecida a partir de cultivos de microglía primaria infectados con retrovirus portadores del oncogen v-raf/v-myc (Blasi et al., 1990).

Las células BV-2 se expandieron y cultivaron en RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% FCS, L-glutamina 0.2 mM y gentamicina 40 μ g/ml. Las células se obtuvieron por agitación manual de los frascos, ya que crecen en semiadherencia. Se sembraron en placas recubiertas con poli-L-Lisina (10 μ g/ml) a la densidad indicada en cada caso. El número de pases máximo tras la descongelación de cada alícuota fue de 12.

1.3 Ensayos de migración

Migración:

Se realizaron ensayos similares a los realizados en cámara de Boyden. Se utilizaron placas de 24 pocillos (Transwell COSTAR 3422, Corning Incorporated) con insertos de 6.5 mm de diámetro con una membrana de policarbonato porosa (tamaño de poro 8 μ m). Las células, N13, se sembraron sobre el inserto a una densidad de 90.000 células/pocillo en un volumen final de 100 μ l en RPMI con 0.1% FCS. Inmediatamente después de sembrarlas se activaron tratándolas durante 24 h con LPS a una concentración de 3 μ g/ml, tanto en la cámara superior como en la inferior. En ensayos preliminares se comprobó la necesidad de la activación con LPS para obtener una respuesta migratoria. A las 24 h se retiró el medio de ambas cámaras y se sustituyó por medio fresco con 0.1% FCS, y en la cámara inferior se añadieron los distintos tratamientos cuyos potenciales migratorios iban a ser evaluados. Posteriormente las células se

incubaron durante 3 horas a 37°C, tiempo suficiente para que las células atravesaran la membrana porosa hacia la cámara inferior sin desprenderse de la misma (Figura 24).

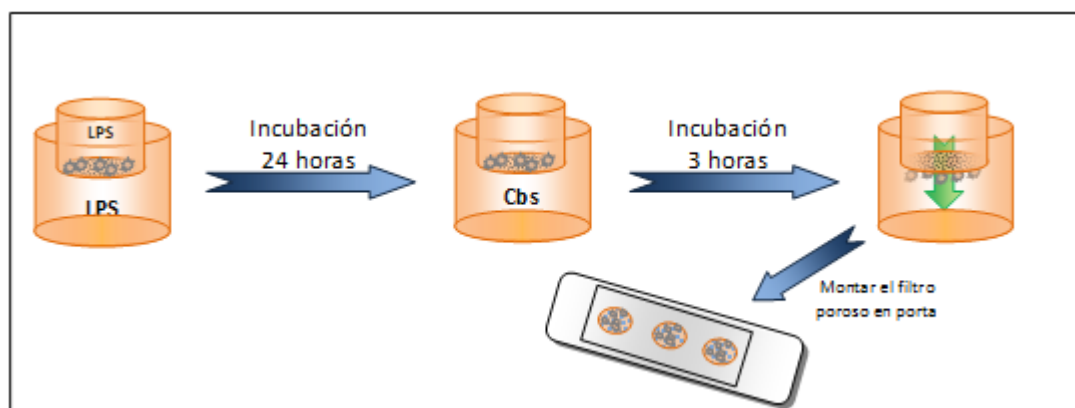


Figura 24. Esquema del ensayo de migración.

Para contabilizar el número de células que habían atravesado la membrana las células se fijaron (PF 4%, durante 20 min), y tras tres lavados con PBS, se tiñeron con azul Coomassie al 0.2%. Para la visualización de las células se extrajeron las membranas de los insertos y se montaron en portas con la cara inferior de la membrana hacia el lado del cubre, en Tris/glicerol (9/1). Se tomaron 4 fotografías por membrana a 400 aumentos, con el objetivo de inmersión, y se contaron el número de células por campo. Los resultados se expresaron en porcentaje de migración respecto al control (vehículo).

Migración sobre secciones humanas:

Desarrollamos un ensayo para valorar la posible migración de células microgliales inducida por los depósitos de A β presentes en cerebro de Alzheimer, con mayor relevancia fisiológica que el ensayo a través de membranas.

Así, secciones (40 μ m) fijadas de corteza frontal de pacientes de EA o sujetos control se montaron sobre cubres gelatinizados de 24 mm de lado, y se conservaron a -20°C hasta su uso. Dichas secciones se colocaron en placas de 6 pocillos y sobre ellas se sembró una suspensión de 300.000 células/pocillo de la línea celular N13, marcadas con Fast Blue (ver más abajo), en RPMI con 0.1% FCS. Se añadieron los compuestos en estudio y se incubaron durante 24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se fijaron las secciones con PF 4% durante 30 min, se lavaron con PBS y se montaron sobre portas gelatinizados en Tris/glicerol (1/1) (Figura 25).

Materiales y Métodos

Se tomaron 3 fotografías por sección en un microscopio de fluorescencia (Leika DMI6000B; Cámara de fluorescencia DFC350FX; Software Leika Application suite 2.3.4.) a 200 aumentos, con filtro exc: 330-385 nm y emi: 400 nm, para la visualización de las células N13 y el filtro Ex/Em = 488/507 para visualizar la anatomía de la sección (autofluorescencia). Para la valoración final se fundieron ambas imágenes.

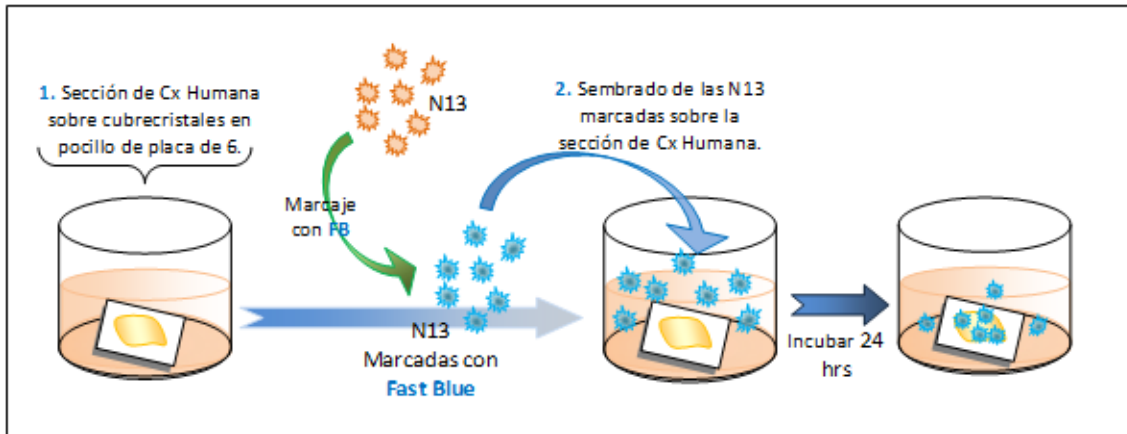


Figura 25. Esquema del ensayo de migración sobre secciones de Cx Humana.

Marcaje de las células con producto fluorescente Fast Blue:

Una vez tripsinizadas, las células (3.3×10^6 células/ml) se incubaron en RPMI 10% FCS con una décima parte el volumen de la suspensión consistente en Fast Blue disuelto en agua a una concentración final de $6 \mu\text{g/ml}$, durante 30 min a 37°C , con agitación manual periódica, para evitar su adhesión al tubo y en oscuridad. El exceso de Fast Blue se eliminó mediante dos lavados con el doble del volumen de incubación y las correspondientes centrifugaciones (5 min, 1000 rpm). Por último, las células se resuspendieron en RPMI 0.1% FCS y se sembraron sobre las secciones.

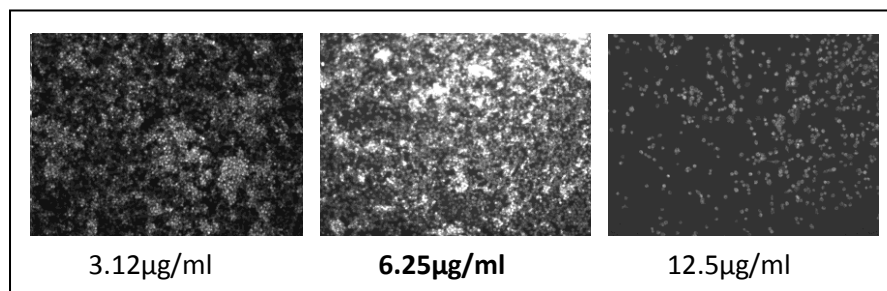


Figura 26. Marcaje de células N13 con Fast Blue. Efecto dependiente de concentración. Imágenes de fluorescencia a un aumento inicial de 200X. En negrita se indica la concentración utilizada finalmente en el ensayo.

En estudios preliminares se comprobó la concentración de FB necesaria para el correcto marcaje fluorescente de las células microgliales, sin alterar su viabilidad (ensayo de MTT) a las 24 h de incubación (Figura 26).

1.4 Valoración de Nitritos:

Se llevó a cabo por el método de Griess (Sigma).

En placas de 96 pocillos recubiertas con Poli-L-Lys se sembraron células microgliales BV-2 (50.000 células/pocillo) o microglia primaria de rata (40.000 células/pocillo) en medio suplementado con 10% FCS, tras 24 h de incubación se sustituyó por medio fresco 0.1% FCS. Se añadieron los compuestos en estudio y se valoró la generación de nitritos tras 24 h de incubación adicionales. Se determinaron los efectos de los cannabinoides sobre la liberación de nitritos promovida por LPS [100ng/ml].

Se recogieron 80 μ l del medio de cultivo y se le adicionaron 80 μ l de reactivo de Griess, tras incubar 15 minutos a temperatura ambiente se valoró la absorbancia a 540 nm. La curva de calibración se realizó con cantidades crecientes de nitrito sódico.

1.5 Transporte a través de barrera hematoencefálica

Los ensayos de transporte a través de barrera hematoencefálica fueron realizados por la Dra. E. Carro en el Servicio de Neurología del Hospital 12 de Octubre.

Para mimetizar la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo en estudios *in vitro* se realizaron cultivos de doble cámara de células epiteliales de plexos coroides (Carro et al., 2002). Las células se cultivaron durante 24 h sobre un inserto, tras las cuales se añadió $A\beta_{1-40}$ [1 μ M] a la cámara superior en presencia o ausencia de los compuestos. Se tomaron muestras de medio del compartimento inferior a distintos tiempos y se cuantificó la cantidad de $A\beta_{1-40}$ que había atravesado la barrera mediante ELISA. El curso temporal (1h-48 h) del transporte se valoró en ensayos de *Western blotting*.

Ensayos in Vivo

1. Animales

Se utilizaron ratones macho de la línea transgénica Tg2576, línea *knock-in* heterocigota, que lleva inserta la proteína APP humana con la doble mutación sueca de la

enfermedad de Alzheimer (K670N, M671L) y como controles, machos *wild type* de la misma colonia (Hsiao et al., 1996). Los animales tenían 7 meses de edad al inicio de los experimentos, fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (55-60%), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso libre a comida. El consumo de agua, aunque no se vio restringido, sí fue controlado puesto que el tratamiento se administró en el agua de bebida.

Se cumplió la normativa dictada en el Real Decreto 223/1988 del 14 de Marzo sobre la protección de los animales para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 67 de Marzo de 1998, pp 8509-8512).

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las regulaciones éticas para el uso y cuidado de animales de laboratorio dictado por la Unión Europea y el Ministerio de Agricultura Español, y los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética del CSIC.

2. Genotipado de los transgénicos

El genotipado de los animales se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en extractos de DNA procedente de la cola de los animales, teniendo en cuenta que el Tg APP es una línea heterocigota, se utilizó el gen de inserción (PrP, de la proteína priónica) como control positivo de la reacción.

La extracción de la fracción de ácidos nucleicos totales se llevó a cabo con tampón de digestión (NID-Buffer: KCl 50mM; Tris-HCl pH 8.3, 50mM; MgCl₂ 50mM; gelatina 0.05%; IGPAL CA 630 Sigma 0.45%; Tween 20 0.4%, proteinasa-K 0.1µg/µl) en Thermomixer (3 horas a 56°C a 1400 rpm, y 20 min. a 96°C a 500 rpm). Se eliminaron los restos de la digestión centrifugando 1,5 min a 8.000 rpm a 4°C, conservando sólo el sobrenadante.

Mediante PCR se amplificaron para cada animal y en el mismo tubo, la secuencia control PrP (presente en todos los animales) en que va inserto el gen APP humano y la secuencia del gen APP (presente tan solo en los animales heterocigotos para el transgen).

Las secuencias de los *primers* utilizados en el genotipado se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los *Primers* utilizados en el Genotipado de los animales.

	Secuencia
PrP-forward*	CCTCTTTGTGACTATGTGGACTG
PrP-reverse	GTGGATACCCCTCCCCAGCCT
APP-forward	CCGAGATCTCTGAAGTGAAGATG

(PrP-forward* sirve como reverse del gen APP)

3. Tratamiento subcrónico con agonistas cannabinoides ratones C57 inyectados con A β

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57 de 12 semanas de edad. A los cuales se inyectó intracerebro-ventricularmente (icv) 3 μ g de A β ₁₋₄₀ fibrilado disuelto en salino estéril, a los animales control se les inyectó el péptido A β ₂₅₋₃₅ (fragmento activo) de secuencia alterada (*scrambled*, SCR). Al día siguiente de realizar la inyección icv se comenzó el tratamiento con los fármacos cannabinoides (Cannabidiol 20mg/kg/día; WIN 55.212-2, JWH-133, y HU-308 0.5mg/kg/día) mediante inyección intraperitoneal (ip). El tratamiento se administró diariamente durante las primera semana y durante las dos semanas siguientes cada 2 días por las tardes, para evitar el efecto agudo de los fármacos sobre los ensayos de comportamiento. Se detallan los grupos experimentales y el número de animales de cada uno de ellos en la Tabla 2.

Tabla 2. Grupos experimentales del tratamiento subcrónico con agonistas cannabinoides.

	Vehículo	WIN 55.121-2	JWH-133	CBD	HU-308
SCR	6	-	-	-	-
A β	6	8	7	8	7

A los 8 días de realizar la inyección icv se comenzó un ensayo de laberinto de agua de Morris, a los 15 días se comenzó un ensayo de reconocimiento de objeto nuevo y se sacrificaron al finalizar el mismo, a los 19 días desde el inicio del ensayo, mediante dislocación cervical y se extrajeron los cerebros para su posterior análisis. En la Figura 27 se detalla el desarrollo del experimento.

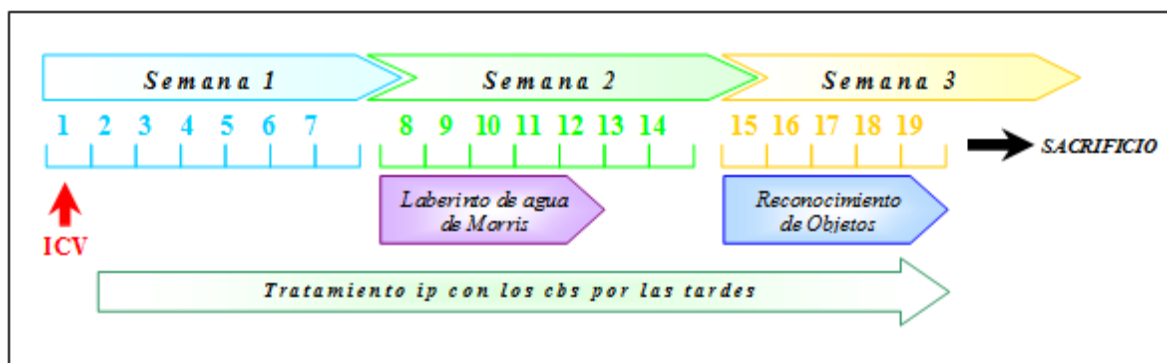


Figura 27. Cronograma del tratamiento subcrónico con agonistas cannabinoides a ratones inyectados icv con A β .

4. Tratamiento oral prolongado de los animales *Transgénicos APP*

Este ensayo constó de los grupos experimentales que se detallan en la Tabla 3, al comienzo del ensayo cada grupo contaba de 10 animales debido a la elevada edad de los animales y los procedimientos a los que fueron sometidos algunos animales fallecieron durante el desarrollo del mismo por lo que nuestro el numero de animales al final del ensayo.

Tabla 3. Grupos experimentales del tratamiento oral prolongado de animales Tg APP.

	Vehículo	WIN 55.212-2	JWH-133
Animales Wild Type	10	8	8
Animales Tg APP	10	7	9

Los animales tenían 9 meses de edad en el momento de comenzar el tratamiento con los fármacos cannabinoides, una edad en la que aún no presentan síntomas cognitivos, y recibieron tratamiento durante 4 meses ininterrumpidos con fármacos cannabinoides (WIN o JWH) o el vehículo en que fueron diluidos (Etanol) a razón de 0.2mg/kg/día en el agua de bebida. El consumo se controló cada 2 días, para evitar el deterioro de los fármacos y controlar la dosis de los mismos.

Para realizar un seguimiento de los animales, a los dos meses de comenzar el tratamiento, se les realizaron una serie de ensayos para evaluar su estado motor y cognitivo (Actividad motora y Laberinto de agua de Morris); así como imágenes de resonancia magnética (MRI). A los cuatro meses de comenzar el tratamiento se repitieron los ensayos cognitivos, a los que se sumó el ensayo de reconocimiento de objeto nuevo y, además de MRI se les realizó tomografía por emisión de positrones (PET).

Al finalizar este periodo se sacrificó a los animales por dislocación cervical y se extrajeron sus cerebros, mas adelante se especifica que muestras se extrajeron y como fueron procesadas con detenimiento.

En la Figura 28 se detalla el cronograma del experimento.

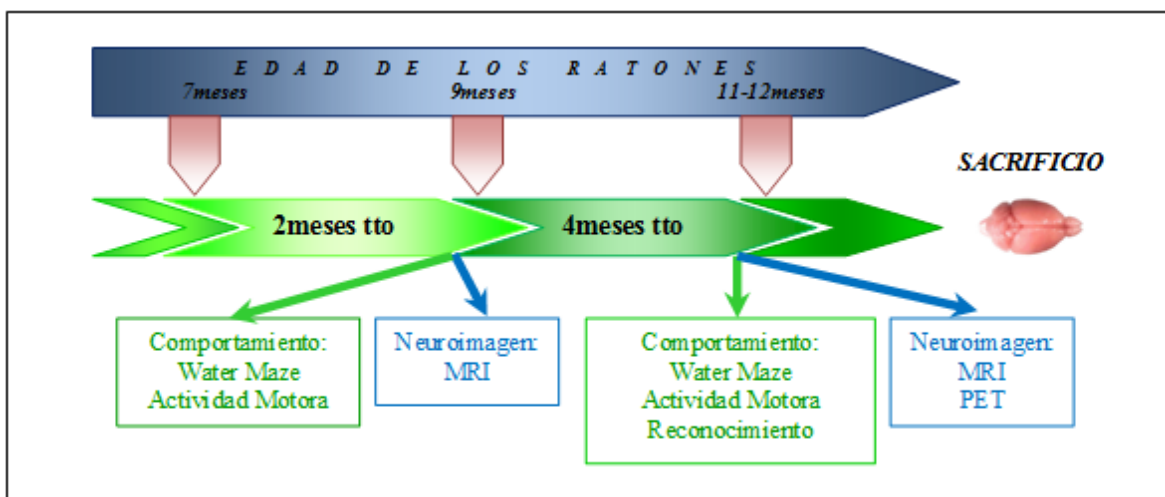


Figura 28. Cronograma del tratamiento oral prolongado y de los ensayos de comportamiento y neuroimagen realizados, hasta el sacrificio de los animales.

5. Tests de Comportamiento

Todos los tests de comportamiento se realizaron a la misma hora del día (8:30- 15:00 hrs) durante la fase diurna del ciclo circadiano de los animales.

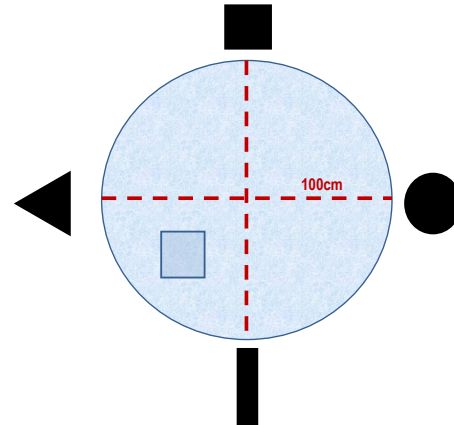
5.1 Actividad Motora

Se registró en cajas de actividad con células fotoeléctricas (Digiscan Instruments Inc., USA) durante 30 min en una habitación aislada e insonorizada, escogiéndose como parámetros a valorar los siguientes: actividad horizontal, actividad vertical (*rears*) y movimientos estereotipados.

5.2 Laberinto de agua de Morris (water maze)

Se utilizó para determinar la capacidad de aprendizaje y memoria de los animales. Consiste en una prueba de navegación espacial en la cual se entrena a los ratones para que encuentren una plataforma escondida en una piscina circular de agua de 100 cm de diámetro, con cuatro claves intra-laberinto, que consisten en figuras geométricas sencillas equidistantes. La temperatura del agua se mantuvo constante durante el ensayo a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$. El tiempo de latencia máximo para encontrar la plataforma se estableció en 60 segundos y si el animal no conseguía encontrarla se le situaba sobre la misma durante 15 segundos. Se realizaron 4 entradas cada día, separadas entre sí 30 min, comenzando desde cada una de las claves. El entrenamiento se repitió durante 5 días consecutivos.

Figura 29. Esquema del laberinto de agua de Morris.



5.3 Reconocimiento de objetos

Otro test utilizado para evaluar el estado cognitivo de los animales fue el test del reconocimiento de objeto nuevo. Esta prueba se realiza en una caja cuadrada de 40x40x40 cm con el suelo cubierto de serrín (usado por los mismo animales para evitar las pistas olorosas por saturación ambiental), durante tres días consecutivos. El primer día se habitúa al animal a la caja vacía durante 15min, el segundo día se realizan 2 entradas de 10 min separadas por un intervalo de 10 min exponiéndolo a 2 objetos iguales (entrenamiento), el tercer día se cambia uno de los objetos por otro nuevo y se realiza una única entrada de 10 min (prueba).

En cada una de las entradas se registra el tiempo que dedica el ratón a explorar cada uno de los objetos, considerándose como actividad exploratoria la aproximación de la nariz del animal al objeto a una distancia de 2 cm o menor. Los datos se expresaron como porcentaje de exploración respecto al tiempo total de exploración en el día de prueba. También se valoró el tiempo dedicado a explorar los objetos en el día de entrenamiento y se consideró como indicativo de la atención del animal.

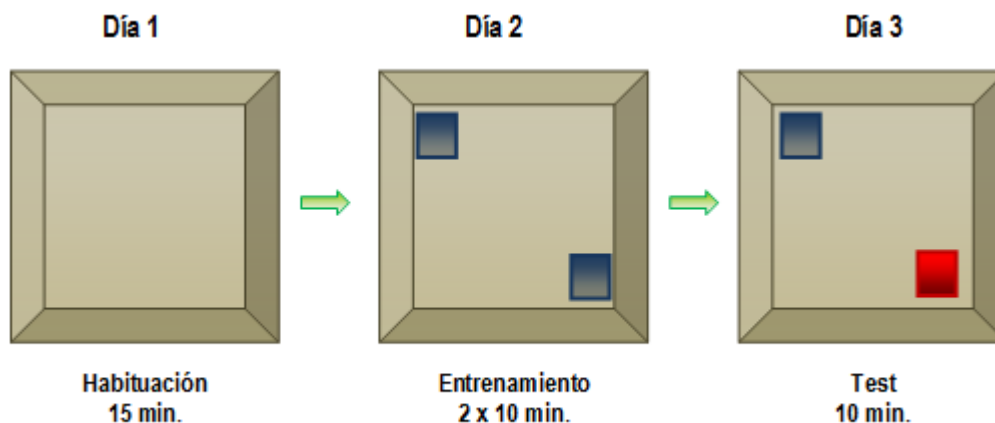


Figura 30. Esquema del ensayo de reconocimiento de objeto

6. Sacrificio de los animales y recogida de muestras

Al finalizar los cuatro meses de tratamiento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajo el cerebro entero, del cual se eliminaron mediante un corte limpio el cerebelo y los bulbos olfatorios, posteriormente se dividió en dos mitades sagitalmente, tomándose las siguientes muestras para su posterior análisis:

Un hemiserebro se postfijó durante 24 horas en PF al 4%, se crioprotegió con cantidades crecientes de sacarosa y finalmente se congeló a -80°C en hexano. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior procesamiento histológico.

Se diseccionaron la corteza e hipocampo de la otra mitad del cerebro, las muestras, se congelaron inmediatamente en hielo seco y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

7. Análisis bioquímicos

7.1 Análisis de las proteínas por *Western Blotting*

Los tejidos se lisaron en tampón de lisis [HEPES (pH 7.9, 20mM, NaCl 100mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, Tritón X-100 1%; como inhibidores de fosfatasa DTT 5mM, ortovanadato sódico 1mM y NaF 2mM, y Complete Mini (Roche) como inhibidores de proteasas)], seguido de sonicado y centrifugación (15.000g a 4°C). Las proteínas de los lisados (40 µg/muestra) se separaron por electroforesis SDS-PAGE (10%) y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para bloquear uniones inespecíficas se utilizó Tris 2.5mM, NaCl 13.7mM, pH 7.4 con 5% de leche en polvo desnatada, 0.1% Tween-20, durante 1 hora a RT. El anticuerpo primario se incubó O/N a 4°C (se detallan las concentraciones y referencias de los anticuerpos en la Tabla 4) en el tampón anterior con BSA al 1% en vez de leche. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP (1:10.000, Jackson Immuno Research Laboratories) y se reveló por quimioluminiscencia (Amershan Biosciences)

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en los ensayos de *Western Blotting*.

Anticuerpo	Compañía (referencia)	Concentración
Anti-CB ₁	Generado en el I. Cajal (α -CC2A)	1:4.000
Anti-CB ₂	Affinity (PA1-746) <i>Mackie</i>	1:10.000
Anti-COX2	abCam (ab24591)	1:100
Anti-GFAP	DAKO (G3893)	1:10.000
Anti- GSK3 β	BD Tran. Labs (610201)	1:5.000
Anti- P-GSK3 β	Cell Signaling (9336)	1:1.500
Anti- β -Tubulina	Promega (G7121-G712A)	1:10.000

7.2 Valoración de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ mediante ELISA

Para la valoración de los fragmentos amiloidogénicos del APP se utilizaron los mismos lisados de corteza que para la valoración de proteínas diluidos 5 veces.

Se utilizaron los siguientes kits de ELISA en fase sólida (BioSource. Inc.; Covance, respectivamente). Los pocillos estaban recubiertos por un anticuerpo específico anti A β ₁₋₄₂ o A β ₁₋₄₀. A continuación se añadieron las muestras o los estándares, y posteriormente el anticuerpo secundario biotinilado, siguiendo los protocolos de incubación del fabricante. Se reveló con estreptavidina-peroxidasa y se valoró la absorbancia en un fluorímetro FluoStar™.

7.3 Valoración de los niveles de Endocannabinoides

Los niveles de cannabinoides endógenos (AEA y 2-AG) fueron valorados en muestras de hipocampo en el *Mass Spectrometry Service* del *Institute of Medical Sciences* de la Universidad de Aberdeen (Reino Unido).

Las muestras se homogenizaron en 600 μ l de acetonitrilo/metanol (50/50), sobre hielo, con un homogenizador de tejido Ultra Turrax. Como estándar interno se añadieron 6 pmol de d4-anandamida. Las muestras se llevaron a 70% agua añadiendo 1.4 ml de agua y se conservaron a -80°C antes de la extracción en fase sólida. Los estándares se prepararon de la misma manera.

La extracción en fase sólida se realizó en un procesador de presión positiva CEREX System 48, con columnas poliméricas en fase reversa Strata-X, equilibradas con 1 ml de metanol seguido de 1 ml de agua. Las muestras descongeladas se centrifugaron a 2.500 rpm durante 20 min a 4°C y los sobrenadantes se aplicaron a las columnas, mientras que en los pellets se valoró la cantidad de proteína, para la normalización de los resultados.

El análisis fue realizado en cromatógrafo de líquidos Thermo Surveyor acoplado a ESI-TSQ espectrómetro de masas Quantum, controlado mediante el *software* Xcalibur v2.06, que también sirvió para la adquisición de datos. El análisis cromatográfico, en condiciones isocráticas, fue realizado en columnas ACE 5 μ m C8 (150x2.1mm, Hichrom), utilizando como fase móvil agua/metanol/ac. Fórmico (15/85/0.5 v/v/v) a un flujo de 200 μ l/min. La columna se mantuvo a 30°C y la bandeja de muestras a 4°C durante el análisis.

La AEA eluyó en un solo pico, mientras que el 2-AG lo hizo en forma de doblete dada la presencia de isómero 1(3)-AG. Las áreas correspondientes a ambos picos del 2-AG fueron consideradas en las valoraciones.

7.4 Análisis de la expresión génica

Para analizar los cambios en la expresión de diversos genes de interés se extrajo el RNA total de corteza, a partir del cual se sintetizó el DNA copia (cDNA) y se analizaron sus niveles de expresión por PCR cuantitativa.

El RNA de las cortezas se extrajo mediante el reactivo TRIzol de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen). Se retrotranscribió un total de 1 µg de RNA (cuantificado por espectrofotometría) de cada muestra, se empleó para la reacción de síntesis de cDNA 5U de retrotranscriptasa del virus de la *Myeloblastosis aviar* en presencia de 20U de RNAsin (Promega). Dicha reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20µl durante 75min a 42°C.

Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados en las PCR cuantitativas (5' a 3').

	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
β-actina	TGTTTGAGACCTTCAACACC	CGCTCATTGCCGATAGTGAT
TNF-α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA

Después se amplificó el cDNA con oligonucleotidos específicos. Como control interno de amplificación y para asegurar que empleábamos la misma cantidad de cDNA por reacción, se amplificó el gen β-actina, cuya expresión es constitutiva. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl, se utilizó Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystem) y 5 pmol de los primers. Tras una desnaturalización inicial de 10min a 95°C, las condiciones de PCR fueron 15 seg a 95°C (desnaturalización); 30 seg a 60°C (anillamiento); 30 seg a 60°C (elongación), el número de ciclos fue de 40 en todos los casos. El análisis se basó en el método de ΔCt. La cuantificación se realizó con el software StepOne (Applied Biosystem). Las secuencias de los primers utilizados se detallan en la Tabla 5.

8. Estudios de neuroimagen

8.1 Imágenes por Resonancia Magnética (IRM)

Los experimentos de IRM fueron realizados en un espectrómetro horizontal Bruker Pharmascan® (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Alemania) utilizando un imán superconductor de 7,0 T, equipado con una resonador de volumen selectivo para ¹H de 38 mm de diámetro y un inserto de gradientes Bruker de 90 mm de diámetro (intensidad máxima 360 mT/m). Todos

los estudios fueron adquiridos en una consola Hewlett-Packard mediante el programa Paravision (Bruker Medical GmbH) operando sobre una plataforma Linux.

Los animales fueron anestesiados mediante inhalación de oxígeno (1L/min.) con un contenido de 3% de isoflurano y se mantuvieron anestesiados durante el ensayo con un 2% de anestésico. La temperatura del animal se mantuvo constante a 37°C aproximadamente, utilizando para ello una manta térmica de agua. El estado fisiológico de los animales fue monitorizado en todo momento gracias al monitor fisiológico Biotrig (Bruker) que controlaba la tasa respiratoria y la temperatura corporal. Se tomaron todas las medidas necesarias para minimizar el sufrimiento de los animales.

Para cada animal se adquirieron diversos tipos de imágenes y datos, unas con un fin anatómico y otras funcional, dentro de la primera categoría se encuentran las imágenes potenciadas en T2. Este tipo de imágenes presentan un elevado contraste entre tejidos por lo que muestran una gran definición anatómica.

Imágenes potenciadas en T2 (T2W):

Fueron adquiridas mediante secuencias de eco de espín con los siguientes parámetros de adquisición: TR = 2500 ms, TE = 60 ms, promedios = 6, matriz de adquisición = 256 x 256 que corresponde a una resolución en plano de de $90 \mu^2$.

Mapas de Coeficiente de Difusión Aparente del Agua (ADC):

Los mapas de ADC se obtuvieron a partir de imágenes potenciadas en difusión del agua (DWI). Las imágenes DW reflejan el movimiento relativo translacional de las moléculas de agua en los diferentes tejidos. A partir de las mismas se puede obtener el valor del ADC de las moléculas en cada región. Usualmente cambios en los valores de ADC reflejan la presencia de edema citotóxico o vasogénico (Schaefer et al., 2000) (Rovira et al., 2002), así como un aumento/disminución de la celularidad.

Las imágenes de difusión se obtuvieron utilizando la secuencia de eco de espín de Stejskal-Tanner y empleando los siguientes parámetros: TR = 4000 ms, TE = 25 ms, prodedios = 1, duración del gradiente de difusión (δ) = 4 ms, separación de los gradientes de difusión (Δ) = 16 ms, matriz de adquisición = 128 x 128 que corresponde a un resolución en plano de $195 \times 195 \mu^2$, valores del factor b = 100, 400 y 1000 s/mm². Los mapas de ADC se obtuvieron por medio de un ajuste lineal del logaritmo de la intensidad de la señal (S_b) frente al valor del factor b según la expresión: $\log S_b = \log S_0 + b \times \text{ADC}$, donde S_b es el valor de la intensidad de señal de un pixel determinado en presencia de un valor b dado.

Adquisición de los mapas de Transferencia de Magnetización (MT):

La MT es una técnica de IRM que genera un contraste cuyo mecanismo se fundamenta en el intercambio de magnetización entre los patrones de agua y los que forman parte de macromoléculas grandes y con poca movilidad, como la mielina. Con las imágenes de puede obtener un mapa indirecto de la concentración de mielina en el parénquima encefálico. Esta técnica identifica la presencia de alteraciones en la sustancia blanca de apariencia normal, que se atribuye a la existencia de lesiones desmielinizantes microscópicas (Hanyu et al., 2000).

Los mapas de MT se obtuvieron a partir de dos secuencias idénticas de eco de espín, una de ella con un tren de pulsos de MT conectado y la otra con el tren de pulsos desconectado. Se utilizaron los siguientes parámetros: TR = 2500 ms, TE = 10 ms, promedios = 1, matriz de adquisición = 128 x 128 que se corresponde con una resolución en plano de 195 x 195 μ^2 , número de pulsos de tren de MT = 50, intensidad de cada pulso de MT = 5,5 μ T. Los mapas se expresaron en porcentaje y se obtuvieron pixel a pixel aplicando la siguiente ecuación matemática: % MT = $[(S_0 - S_{MT}) / S_0] \times 100$ donde S_{MT} es la intensidad de un pixel determinado en la secuencia en que se aplica el pulso de MT y S_0 en la intensidad de ese mismo pixel en la secuencia en que no se aplica.

Valoración de ADC y MT en las distintas zonas cerebrales:

A partir de imágenes potenciadas en T2 con la misma geometría que los mapas paramétricos de ADC y MT se seleccionaron las siguientes regiones de interés (ROIs) en cada sección: corteza motora e hipocampo. Empleando el programa libre Image J (Image processing and analysis in Java, NIH, EE.UU) se seleccionaron a mano alzada regiones de entre 35 y 45 pixels (que se corresponden con una región anatómica en cada caso de 9-12 mm^2) (Figura 31),

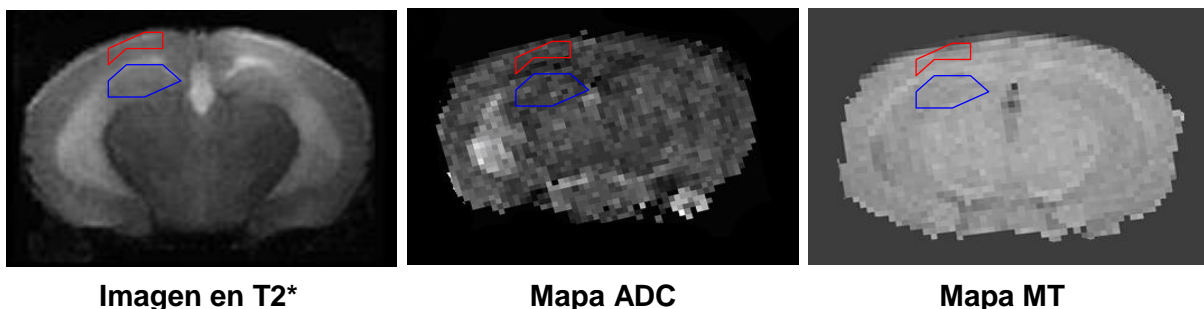


Figura 31. Ejemplo de la selección de las zonas de cerebrales para su análisis en mapas de ADC y MT. En rojo se indica la zona de corteza y en azul hipocampo.

de cada uno de los ROI y de, al menos, 2 secciones por cada animal. Se obtuvo la media de cada región por animal y la de cada grupo experimental.

Materiales y Métodos

8.2 Espectroscopia in vivo por Resonancia Magnética

Todos los análisis de ERM localizada fueron llevados a cabo en el equipo Bruker Pharmascan de 7,0 T en animales anestesiados (2% Isoflourano). Se adquirieron en todos los

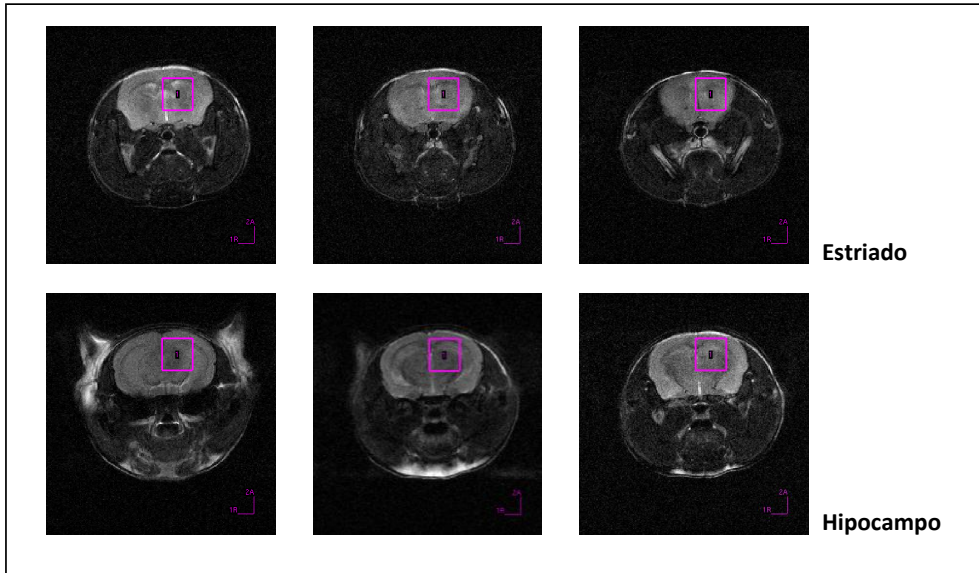


Figura 32. Imágenes representativas de la localización de los voxels de espectroscopia.

casos los espectros empleando una secuencia PRESS (Point REsolved SpectroScopy) con una secuencia VAPOR para suprimir la señal del agua y los siguientes parámetros de adquisición: TR

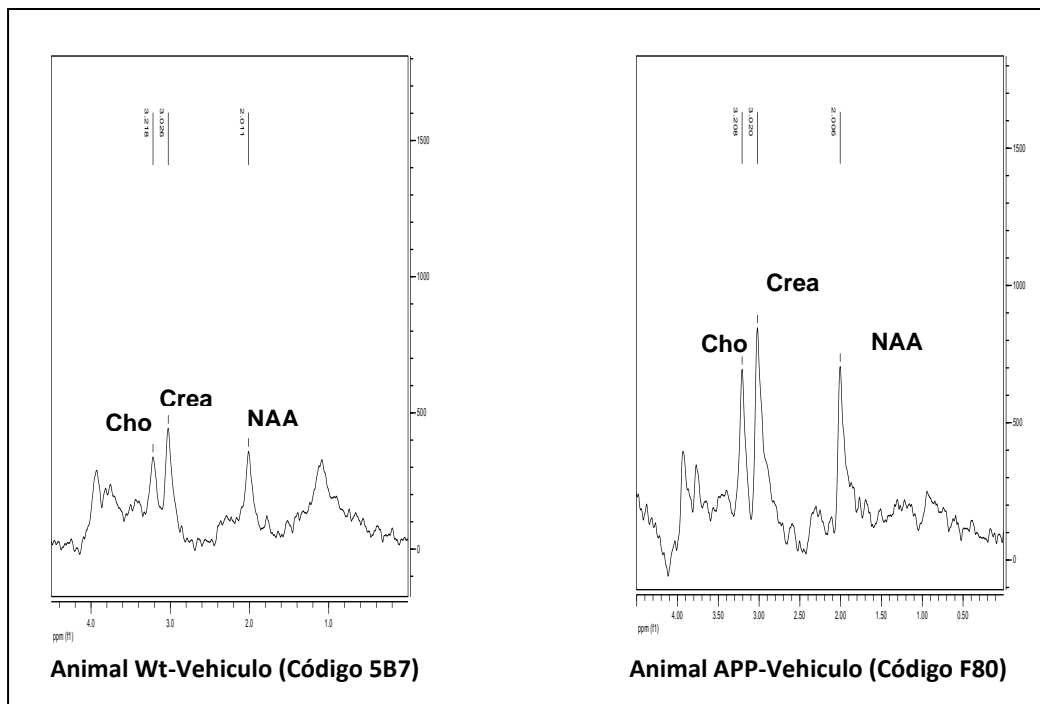


Figura 33. Espectroscopias representativas de un animal Wt-Veh y un animal APP-Veh. Se indican los picos correspondientes a la colina (Cho), la creatina (Crea) y el ácido N-acetil aspártico (NAA).

= 3000 ms, TE = 35 ms, número de adquisiciones = 128, tamaño del voxel = $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ (27 μL).

Las regiones estudiadas fueron hipocampo medial y estriado. Se situaron 2 vóxeles de $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}$ (Figura 32), uno en cerebro anterior (estriado) y otro en cerebro posterior (hipocampo). El vóxel localizado en cerebro anterior identifica mayoritariamente el estriado, aunque también contribuyen algunas regiones de la corteza cerebral, por ej corteza cingulada, prelímbica, motora. El vóxel localizado en cerebro posterior, en cambio, valora el hipocampo, aunque también incluye parte del tálamo o del mesencéfalo.

Los metabolitos valorados fueron en todos los casos: ácido *N*-acetilaspártico (NAA), compuestos derivados de creatina (Cr) y compuestos derivados de colina (Cho). Los datos fueron procesados mediante el programa de análisis de espectros MestRec © Los valores se normalizaron respecto a la Cre y/o Cho como metabolitos que pueden ser utilizados como estándares internos, podemos ver dos espectros representativos en la Figura 33.

8.3 Captación de 18F-Fluorodeoxiglucosa (18-FDG) por Tomografía por Emisión de Positrones

Los animales fueron anestesiados mediante inhalación de oxígeno 1L/min con 2% de isofluorano e inyectados intraperitonealmente con ^{18}F FDG (300 μCi /200 μl salino; Instituto Tecnológico PET, Madrid). Tras un período de incorporación de 45 min, se realizó la adquisición de imágenes tomográficas durante otros 30 min. Para ello se utilizó el equipo de microPET Albira, de 8 detectores (Oncovision, España).

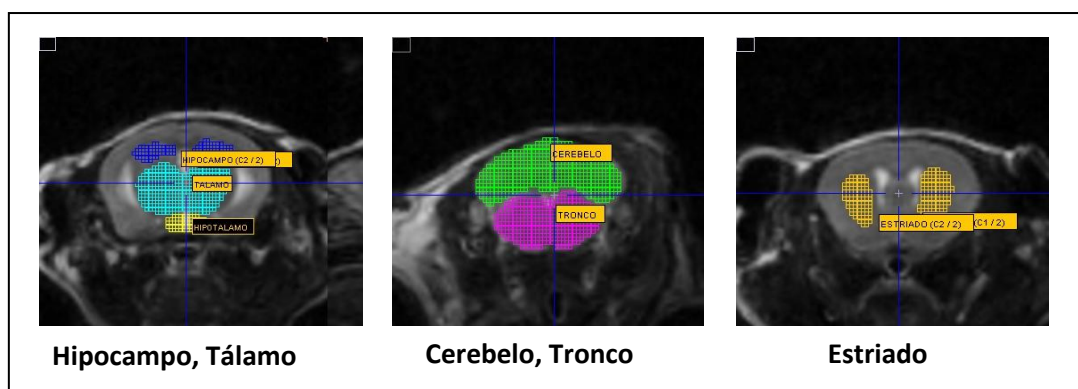


Figura 34. Imágenes representativas de la selección de los Volúmenes de Interés (VOIs) de PET. Seleccionados sobre imágenes de Resonancia, para analizar los datos obtenidos por PET.

Con el fin de delimitar las estructuras cerebrales en estudio, las imágenes PET se corregistraron con una imagen de resonancia potenciada en T2 (Bruker Biospin, Alemania).

Materiales y Métodos

Posteriormente, sobre dicha imagen de resonancia, se trazaron los volúmenes de interés (VOIs) correspondientes a las estructuras cerebrales a analizar (Figura 34).

Todo este proceso de visualización, delimitación de VOIs y cuantificación se realizó con el programa PMOD 2.9 (PMOD Technologies, Suiza). Las regiones de interés analizadas fueron: corteza frontal, corteza parieto-temporal, estriado e hipocampo.

9. Inmunohistoquímica

Estos experimentos se llevaron a cabo mediante técnicas estándar en secciones de criostato de 40 μm (conservadas en PBS/ Azida 0.01% a 4°C) y en flotación libre.

Como paso previo se lavaron las secciones en PBS 5 minutos (3 veces). Se bloqueó la peroxidada endógena con metanol y H_2O_2 1% y las uniones inespecíficas en tampón fosfato 50mM o PBS con las concentraciones de suero normal de cabra (NGS) y Tx-100 que se indican en la Tabla 6. Los anticuerpos primarios se prepararon en el mismo tampón que se indica en dicha tabla y se incubaron el tiempo indicado en cada caso a 4°C. Tras atemperar las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a biotina (Jackson SA) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se reveló por sistema indirecto usando el complejo avidina-biotina peroxidasa (método ABC, Pierce) preparado en PBS 30 minutos antes

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en ensayos de Inmunohistoquímica: se indican la compañía, dilución, buffers de incubación y anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Compañía (referencia)	Concentración (Incubación)	Buffer incubación	Anticuerpo 2 ^{ario} (DAB)
Iba-1	WAKO (019-19741) α -Rabbit	1:1000 (ON)	PB/NGS 1%/ Tx-100 0.2%	1:200
CB1	Generado en el l. Cajal (α -CC2A)	1:800 (2días)	PB/ NGS1%/ Tx-100 0.1%	1:100
GFAP	Sigma (G3893) α -Mouse	1:1500 (ON)	PB/NGS 1%/ Tx-100 0.2%	1:200

de su utilización y se visualizó mediante la oxidación de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), como cromógeno, sin intensificar o intensificando con sulfato de níquel amonio (se indica en cada caso, Tabla 6).

Finalmente las secciones se montaron secuencialmente en portas gelatinizados y tras dejarlas secar durante 24 horas, se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes y en xileno, y se colocaron los cubreobjetos con DEPEX (BDH).

Análisis de imagen:

Tras el montaje de las secciones se tomaron fotografías representativas de las regiones de interés (Corteza e Hipocampo) en microscopio Axiolab (Zeiss), equipado con una cámara digital Nikon DS-Fi1.

El análisis de imagen se realizó mediante el software MCID Image Analysis System TM (InterFocus Imaging Ltd, UK) o mediante el programa libre ImageJ (Image processing and analysis in Java, NIH, EE.UU).

En los resultados de la inmunocitoquímica para GFAP se analizaron 4 imágenes por animales a 4 aumentos de hipocampo, para valorar la DOR (Densidad óptica relativa, en MCID) en 5 regiones que abarcan *stratum radiatum* y *stratum lacunosum moleculare* y se hace la media de los 5 valores obtenidos.

Para los resultados de la inmunocitoquímica de Iba-1 se analizaron el número de células multipolares positivas para Iba-1 por sección (ImageJ), en 2 fotografías por sección a 20 aumentos, en la región de corteza.

10. Estadística

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5.0. Las comparaciones se realizaron por análisis de la varianza de una o dos vías, según corresponda, seguido del test Newman-Keuls de múltiples comparaciones, o del test de Student desapareado. Se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS



**Efectos de los cannabinoides sobre funciones de la
microglía (ensayos in vitro)**

1. Localización de receptores cannabinoides en microglía

A lo largo de esta sección examinaremos la influencia de los fármacos cannabinoides sobre diversas funciones microgliales.

Era importante averiguar, si tanto los cultivos primarios, como las líneas celulares utilizadas en los posteriores experimentos, expresan los receptores cannabinoides y si, por lo tanto, serían capaces de responder a los fármacos utilizados.

Para investigar la localización de los receptores cannabinoides en la microglía primaria de rata y la línea celular N13 se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas con anticuerpos específicos frente a ambos tipos de receptores (CB₁ y CB₂). La inmunoreactividad tanto frente a CB₁ (1:900; Anticuerpo generado en el I. Cajal-CC2A) como a CB₂ (1:900; anticuerpo de Affinity) se localizaba en todo el cuerpo celular, citoplasma y núcleo, así como en los lamelipodios (Figura 35).

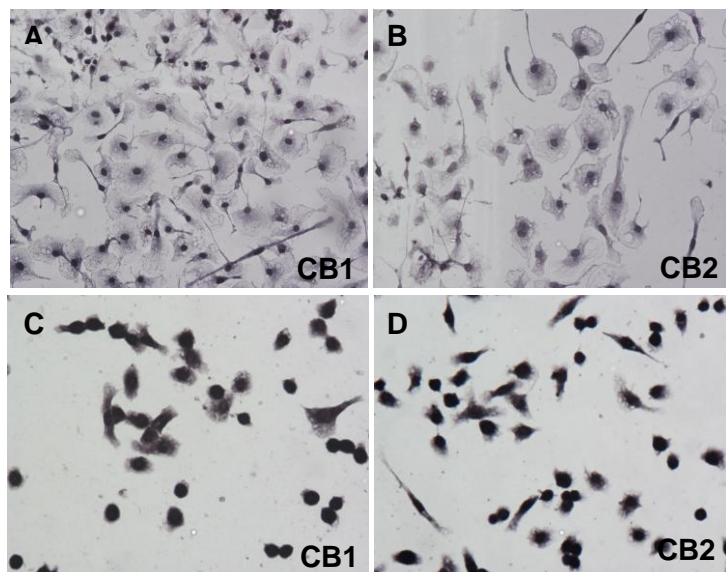


Figura 35. Localización de los receptores cannabinoides en microglía primaria de rata. A y B microglía primaria de rata; **C y D** Línea microglia N13. **A y C**, tinción inmunohistoquímica para el receptor CB₁. **B y D**, tinción inmunocitoquímica para el receptor CB₂, localizada en todo el cuerpo celular. Fotos realizadas a 40x.

2. Ensayos de Migración microglial en la línea N13

En esta serie de ensayos se abordó el estudio de la función migratoria microglial promovida por fármacos cannabinoides y el péptido A β .

La primera serie de ensayos se llevó a cabo utilizando la línea microglial N13, valorando la migración de estas células a las 3 horas de haber añadido los distintos compuestos a la cámara inferior de los cultivos. Los estudios con LPS y fMLP se realizaron tras 4 horas de incubación.

En primer lugar determinamos la migración de las células N13 inducida por concentraciones crecientes de dos compuestos (Lipopolisacárido, LPS y péptido Formilado, fMLP) de conocida capacidad migratoria (Cui et al., 2002). En dichos ensayos preliminares observamos que ambos compuestos eran capaces de inducir de manera concentración dependiente la migración de las células a través de la membrana porosa que separaba ambas cámaras (Figura 36). Así el LPS incrementó significativamente el número de células que habían migrado, observándose su efecto máximo (150% respecto al control no estimulado) a la concentración de 6 µg/ml. El efecto del péptido fMLP fue algo más potente, pues la mayor concentración ensayada (200 ng/ml) indujo un 130% de migración respecto al control.

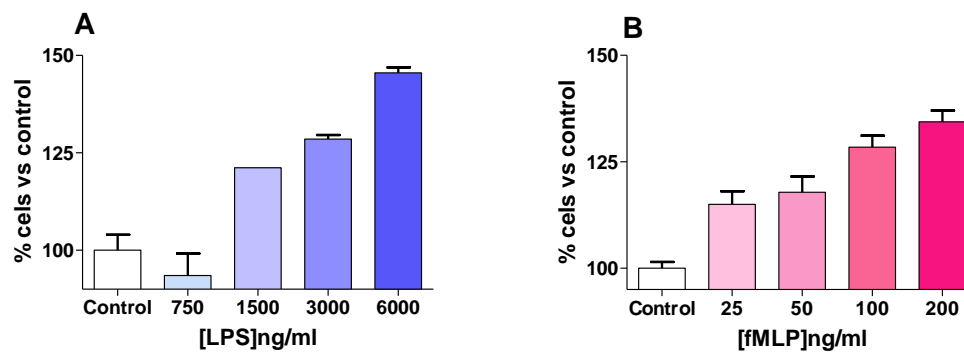


Figura 36. Inducción de la migración microglial por LPS y fMLP. A, inducción de la migración de la línea microglial N13 a través de una membrana porosa por LPS de manera concentración dependiente. B, inducción de la migración de la línea microglial N13 por fMLP de manera concentración dependiente. Los resultados se expresan como porcentaje de células que atraviesan la membrana respecto al control (n=3). Media ± ESM.

Una vez demostrado que la línea celular era capaz de responder a estímulos migratorios, a continuación se estudió el efecto de los agonistas cannabinoides, WIN 55.212-2 y JWH-133. Ambos cannabinoides fueron capaces de promover la migración de las células N13. El efecto fue muy pronunciado desde concentraciones bajas (50nM) y no parecía ser concentración dependiente. Probablemente esto se debía a la capacidad migratoria de esta línea microglial. En los siguientes experimentos decidimos utilizar una concentración intermedia de 200nM.

El resultado de la adición tanto de WIN como de JWH fue un aumento de la migración de la línea N13, a través de la membrana, de aproximadamente un 20% respecto a los controles (Figura 37, B).

RESULTADOS

El efecto del WIN sobre la migración no fue alterado ni por el antagonista CB₁ selectivo SR141716 (200nM; SR1) ni por el antagonista CB₂ selectivo SR144528 (200nM; SR2). Para inhibir el efecto de WIN fue necesario combinar ambos antagonistas (Figura 37, B).

En el caso del JWH, el efecto sobre la migración fue totalmente antagonizado por el antagonista CB₂, y no fue modificado por el antagonista CB₁. Los antagonistas carecieron de efecto sobre la migración.

El péptido amiloide fibrilado (Aβ) (2 μM) también promovió la migración de la línea N13 (Figura 37, A) en una proporción muy similar (20% de incremento) a la de los agonistas cannabinoides. Sin embargo, la adición conjunta a los cultivos del Aβ con los cannabinoides, no modificó los efectos observados (resultados no mostrados).

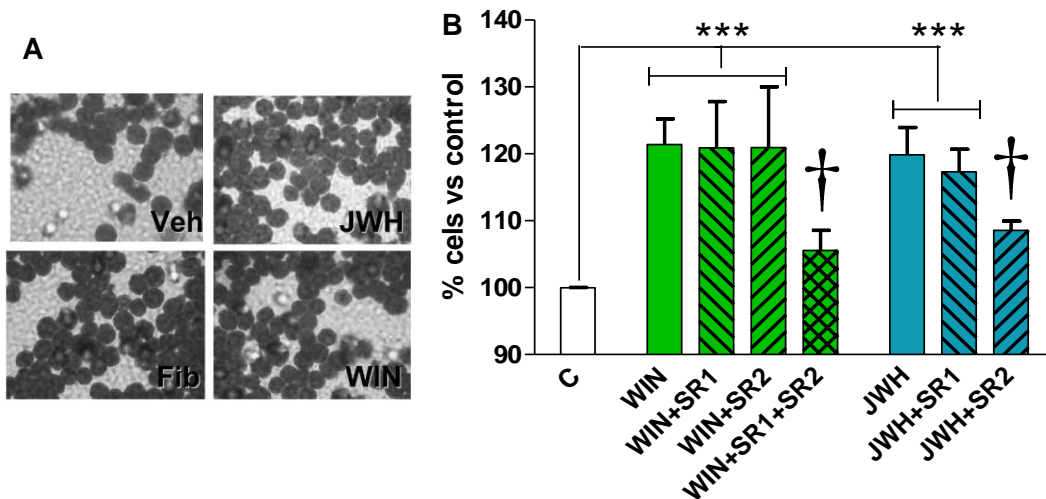


Figura 37. Los fármacos cannabinoides WIN y JWH promueven la migración de la línea N13 activando receptores cannabinoides CB₁ y CB₂. **A**, Imagen representativa del incremento de la migración inducida por Fib, WIN y JWH respecto al Vehículo. **B**, WIN y JWH promueven la migración, el efecto del WIN fue bloqueado por la combinación de los antagonistas SR1 y SR2; mientras que el efecto del JWH se antagonizó con SR2. Los resultados se expresan como la media ± ESM de n=5 experimentos independientes. *** p<0.005 vs control (C); † p<0.05 vs el cannabinoide.

3. Ensayos de migración microglial en microglia primaria de rata

Una vez valorados los efectos de los cannabinoides sobre la migración de una línea de microglia immortalizada procedimos al análisis de estos en cultivos de microglia primaria de rata.

El Aβ fibrilado, en un amplio intervalo de concentraciones (25 - 250 nM) promovió la migración de manera concentración dependiente (Figura 38, A). El WIN (0.1nM -10μM)

promovió la migración de la microglia de rata de manera concentración dependiente entre las concentraciones de 0.1 y 50nM (Figura 38, B). El JWH (0.5nM – 1µM) posee un efecto bifásico (Figura 38, C), promueve migración de manera concentración dependiente entre las

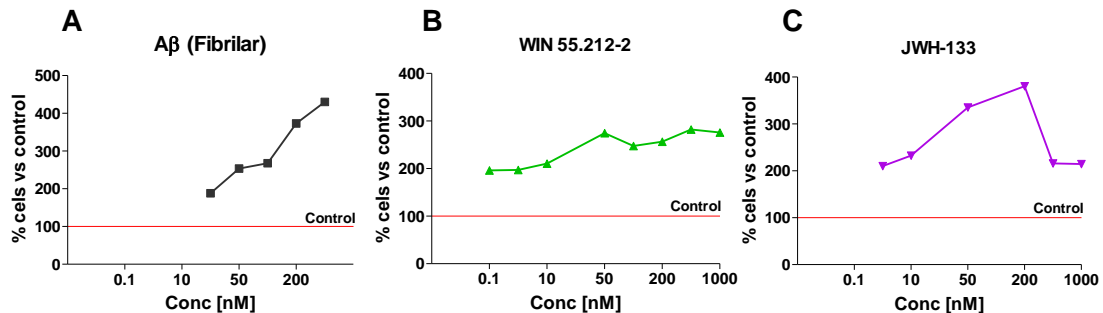


Figura 38. Tanto el péptido amiloide fibrilado, como los cannabinoides WIN y JWH promueven migración de la microglia primaria de manera concentración dependiente. A, efecto concentración dependiente del Aβ Fib sobre la migración de la microglia primaria. **B,** efecto concentración dependiente del WIN entre 0.1 y 50nM. **C,** efecto bifásico del JWH. Los resultados son la media (n=5 experimentos independientes) y están expresados como porcentaje respecto al control.

concentraciones de 0.5nM y 200nM.

Además de los dos agonistas estudiados en los ensayos anteriores, analizamos el efecto de otros dos compuestos cannabinoides. Por un lado, el cannabidiol (CBD) un fitocannabinoide que posee una baja afinidad por los receptores CB₁ y CB₂ y por otro lado HU-308, agonista sintético CB₂ selectivo (Figura 39).

En la Figura 39 se recogen todos estos resultados. Por razones comparativas también se ha incluido el efecto sobre la migración del LPS (3ng/ml) y del Aβ₁₋₄₀ Fibrilar (200nM) que indujeron una respuesta migratoria de aproximadamente el 250% respecto a los controles

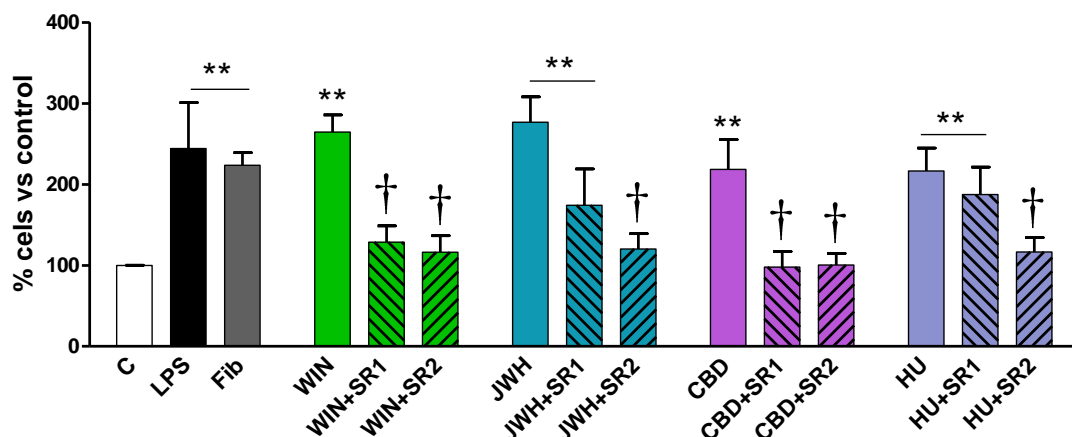


Figura 39. Los fármacos cannabinoides promueven la migración de la microglia primaria, efecto mediado por receptores. LPS 3ng/ml, Fib 215nM, WIN 150nM, JWH 200nM, CBD 400nM, HU-308 400nM. Resultados expresados como porcentaje de células que atraviesan la membrana respecto a control (n = 5) Media ± ESM. ** p<0.01; † p<0.05.

(Figura 39). De acuerdo con estos resultados la microglía primaria posee una capacidad migratoria superior a la que mostraban las células N13 (alrededor del 120% respecto al control).

Todos los compuestos ensayados promovieron de una forma eficaz la migración de microglía de rata en cultivo, incrementando en un 100-150% la migración respecto a los controles. La potencia relativa de los compuestos fue WIN 55,212.2>JWH-133>cannabidiol=HU308. El efecto del WIN y del CBD fue bloqueado tanto por el SR1 como por el SR2. En cambio, la migración promovida por los dos agonistas CB₂ selectivos (JWH y HU) sólo fue antagonizada por el SR2.

4. Migración de la línea microglial N13 sobre secciones de enfermos de Alzheimer e individuos control

Con el fin de comprobar la posible migración promovida, en este caso, por el A β presente en las placas seniles de corteza cerebral de pacientes afectados por la EA, se utilizaron como sustrato secciones de estas zonas cerebrales, y sirvieron como controles secciones de individuos sanos. Así, se marcaron células N13 con Fast Blue y se cultivaron durante 24 h en presencia o ausencia de los compuestos en estudio.

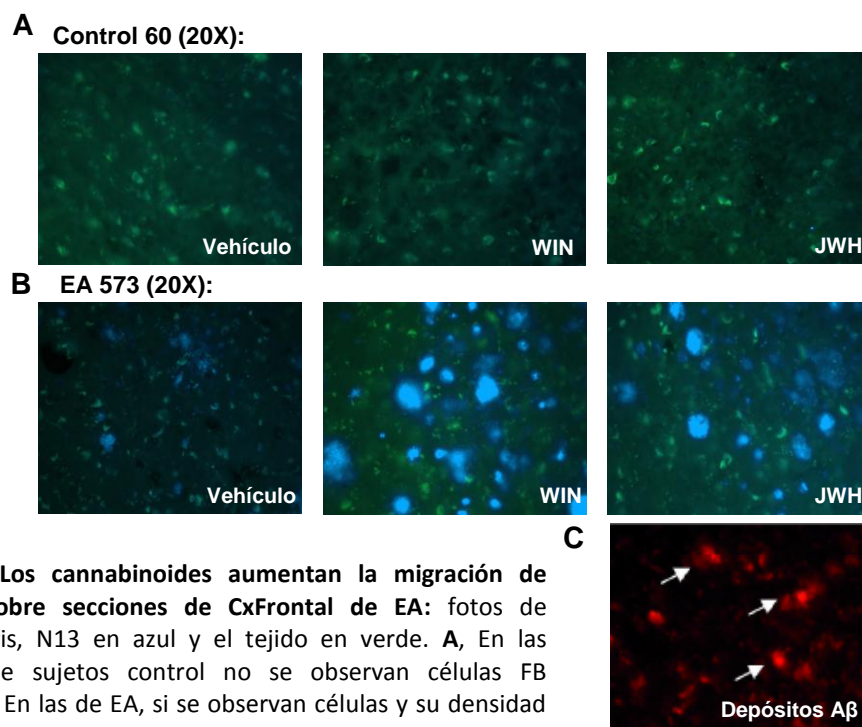


Figura 40. Los cannabinoides aumentan la migración de microglía sobre secciones de CxFrontal de EA: fotos de sustancia gris, N13 en azul y el tejido en verde. **A,** En las secciones de sujetos control no se observan células FB positivas. **B,** En las de EA, si se observan células y su densidad aumenta en presencia de los cannabinoides. **C,** Se observaron depósitos de A β por inmunohistoquímica en secciones adyacentes.

En la Figura 40 (A) podemos observar la ausencia de marcaje con Fast Blue en secciones de un sujeto control tratadas con vehículo, como en las tratadas con uno u otro cannabinoide. Es decir no se encontraron células adheridas a las secciones de individuos control después de 24 h.

Sin embargo si se observaron células fluorescentes sobre secciones de corteza de pacientes de EA (Figura 40, B), con una distribución similar a los depósitos de A β (Figura 40, C). Por otro lado, los tratamientos con WIN y JWH (200nM) en el medio de cultivo aumentaron el número de células marcadas con Fast Blue en la sección, en comparación con las secciones tratadas con vehículo.

5. Reducción de la producción de nitritos en microglia promovida por LPS mediante fármacos cannabinoides

Distintos agentes dan lugar a la activación microglial generando NO e incrementando los niveles de nitritos en el medio de cultivo y los cannabinoides son capaces de disminuir su concentración. En este caso utilizamos la línea microglial BV2 para evaluar la producción de nitritos y el efecto de los fármacos cannabinoides en estudio.

La liberación de nitritos al medio de cultivo fue promovida por LPS a una concentración de 10 μ M, a razón de unos 15 pg/ml de nitritos totales en 24 horas.

En células microgliales todos los cannabinoides redujeron la producción de nitritos promovida por LPS de manera concentración dependiente (Figura 41). La potencia relativa de los agonistas cannabinoides en reducir la generación de nitritos fue CBD=HU>JWH>WIN. De hecho, como puede observarse en la Figura 41 (B), CBD 300nM, HU 400nM, JWH 500nM y WIN 1 μ M, redujeron la producción de nitritos en un 50% aproximadamente.

En microglía primaria de rata, la adición de los cannabinoides a una concentración de 500 nM dio lugar a una reducción similar (alrededor del 50%) en los niveles de nitritos (Figura 41, C).

Para analizar si estos efectos estaban mediados por receptores cannabinoides combinamos los fármacos a las concentraciones IC50 con los antagonistas SR1 y SR2 a 1 μ M (Figura 42). Pudimos observar que los antagonistas por si mismos no tienen efecto sobre la producción de nitritos y que ninguno de los antagonistas revertió el efecto de los agonistas.

RESULTADOS

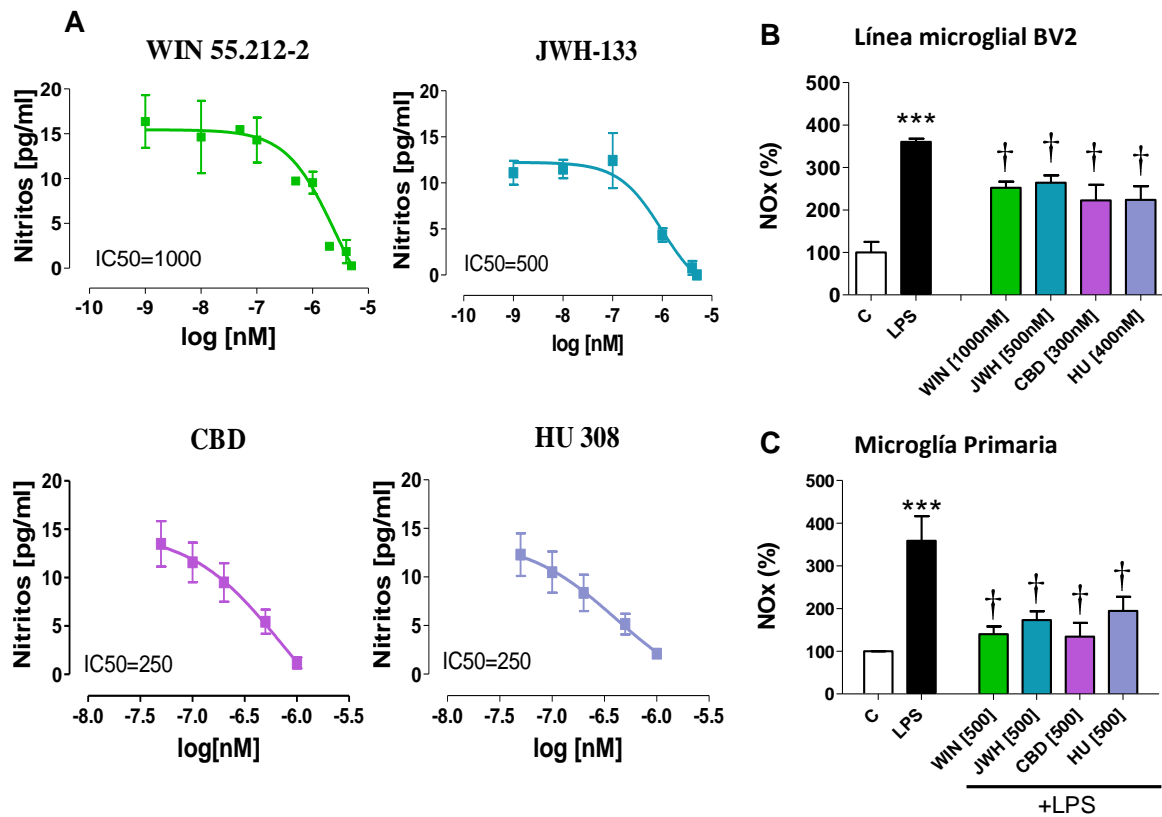


Figura 41. Los cannabinoides inhiben la producción de nitritos promovida por LPS tanto en la línea BV2 como en microglía primaria. **A**, Inhibición concentración dependiente inducida por los cannabinoides en las células BV-2. Se indica la IC50 en cada caso. **B**, inhibición de la producción de nitritos por cannabinoides en la línea microglial BV-2. **C**, inhibición de la producción de nitritos en microglía primaria de rata inducida por los cannabinoides. Resultados expresados como porcentajes respecto al control (n = 5) Media ± ESM, *** p<0.005; † p<0.05

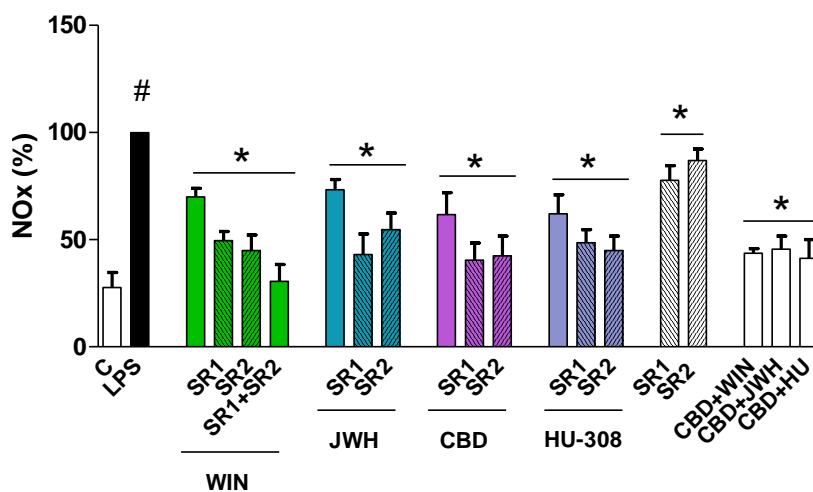


Figura 42. La inhibición de la producción de nitritos mediada por cannabinoides es independiente de receptores cannabinoides. Todos los compuestos, excepto el control se combinaron con LPS 3µM. Los antagonistas solos no tuvieron efecto sobre la producción de nitritos, ni modificaron el efecto de los cannabinoides de manera significativa. Por otro lado la combinación de CBD con los otros cannabinoides tampoco tuvo efectos significativos. (n = 3) Media ± ESM. * p<0.05 vs LPS; # p<0.05 vs control.

**Efectos in Vivo del tratamiento subcrónico con
agonistas cannabinoideos en ratones C57 inyectados
con A β**

RESULTADOS

En estudios previos se había demostrado que la administración icv de A β da lugar al desarrollo de déficits cognitivos y a una respuesta inflamatoria similar a la que ocurre en la enfermedad de Alzheimer. Decidimos utilizar este modelo farmacológico de EA para evaluar la posible eficacia terapéutica de los cannabinoides. Así, tras una única inyección de A β icv se trató a los animales con los compuestos durante dos semanas y se realizaron una serie de test cognitivos. Tras el sacrificio de los animales se analizaron, mediante PCR cuantitativa, los niveles de dos citoquinas proinflamatorias: TNF- α e IL-6

1. Efectos del tratamiento subcrónico con cannabinoides sobre distintos parámetros de comportamiento

Para determinar las alteraciones cognitivas que ocurrían en este modelo se realizaron dos ensayos de comportamiento: Aprendizaje de una tarea de navegación espacial y Prueba de la novedad.

a. Prueba de navegación espacial (Water Maze):

A los siete días de la inyección icv se sometió a los animales a una prueba de aprendizaje

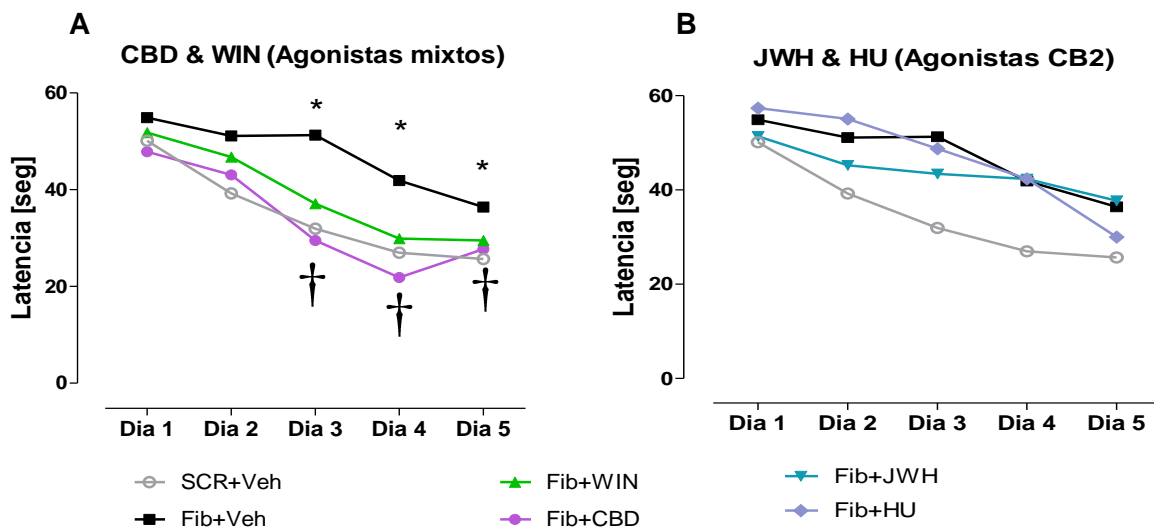


Figura 43. Efectos de los cannabinoides sobre el aprendizaje de una tarea espacial. A los 7 días de la inyección de A β icv y tras la administración diaria de los fármacos (CBD 20mg/kg/día; WIN, JWH y HU 0.5mg/kg/día). Se valoró el tiempo de latencia (seg) en encontrar la plataforma escondida en la piscina. **A**, animales inyectados con SCR o Fib \pm WIN/CBD. **B**, animales inyectados con SCR o Fib \pm JWH/HU. Los datos son la media de 7-8 animales por grupo y se expresan en segundos. No se representa el ESM para mayor claridad de la representación gráfica. ANOVA de medidas repetidas * $p < 0.05$ vs Scr; † $p < 0.05$ vs Fib.

de navegación espacial (*water maze*) (Figura 43). Los animales control (SCR-Veh) aprendieron a encontrar la plataforma escondida a lo largo de 5 días de entrenamiento.

Los animales que fueron inyectados con A β icv mostraron déficits en aprender la tarea de navegación espacial (Figura 43, A) ya que los tiempos de latencia para encontrar la plataforma fueron significativamente mayores (aprox. 35 seg) respecto a los animales inyectados con el péptido control (aprox. 20seg.), durante los tres últimos días del ensayo.

En la Figura 43, A, se recogen los resultados obtenidos tras la administración de CBD y WIN. Los agonistas cannabinoides CBD y WIN, fueron capaces de prevenir el deterioro cognitivo inducido por la inyección de A β de manera significativa entre los días 3 y 5, los tiempos de latencia en encontrar la plataforma fueron similares a los de los animales control (SCR).

En cambio los agonistas CB $_2$ selectivos, JWH y HU (Figura 43, B), no fueron capaces de mejorar el efecto del A β administrado icv.

b. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo:

La prueba de la novedad se llevó a cabo a los 15 días de la inyección de A β icv. Se desarrolla en 3 días consecutivos, durante el día del aprendizaje todos los animales exploraron durante un 50% del tiempo cada uno de los objetos iguales que les eran presentados, es decir, no existía ningún sesgo en cuanto a la posición del objeto que pudiera falsear los resultados de la prueba (datos no mostrados).

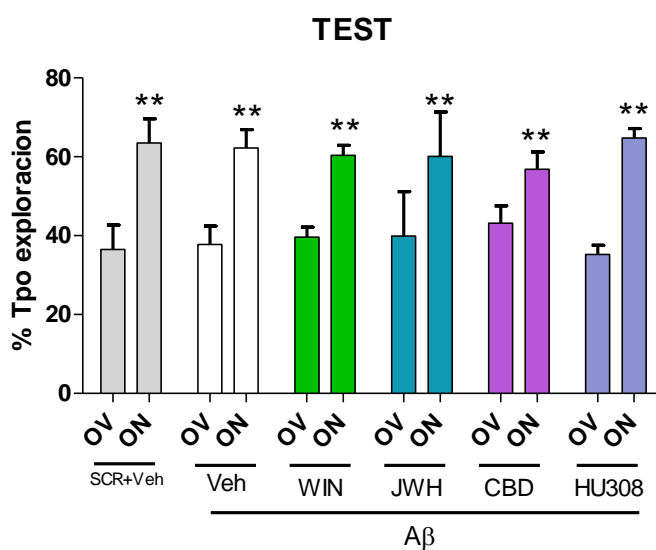


Figura 44. Memoria de trabajo tras la administración icv de A β Fibrilar. Se valoró mediante la prueba de la novedad a los 15 días de la administración icv de A β y tras la administración subcrónica de CBD 20mg/kg/día, WIN/JWH/HU 0.5mg/kg/día. Tras una habituación a la caja, se presentó a cada animal dos objetos iguales y al día siguiente se cambió uno de los objetos por un objeto nuevo (**Test**). Todos los grupos experimentales fueron capaces de distinguir el objeto nuevo respecto al viejo. Datos expresados como porcentaje de tiempo empleado en el reconocimiento del objeto (OV-Objeto Viejo; ON-Objeto Nuevo). Media \pm ESM, ** p<0.01

RESULTADOS

El tercer día se cambió uno de los objetos por otro totalmente distinto, este día todos los animales, independientemente del tratamiento, exploraron más el objeto nuevo que el viejo (Figura 44).

No se observaron diferencias significativas ni entre los animales inyectados con el péptido control y los inyectados con A β icv, ni entre los animales sometidos a tratamiento ip con los distintos cannabinoides.

2. Efectos del tratamiento con cannabinoides sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias en ratones inyectados con A β

Basándonos en los resultados obtenidos en las pruebas de comportamiento, analizamos la expresión de dos citoquinas proinflamatorias: IL6 y TNF α , en la corteza cerebral de los grupos experimentales cuyo tratamiento (WIN y CBD) fue capaz de prevenir el deterioro cognitivo inducido por el A β (Fib-Veh);, además del grupo control (SCR-Veh).

TNF α es una molécula mediadora, entre otros efectos, de apoptosis y elevación de los niveles de óxido nítrico. En la Figura 45 (A), se observa un incremento en la expresión de TNF α en el grupo inyectado icv con A β y tratado con vehículo, respecto a los animales control. WIN

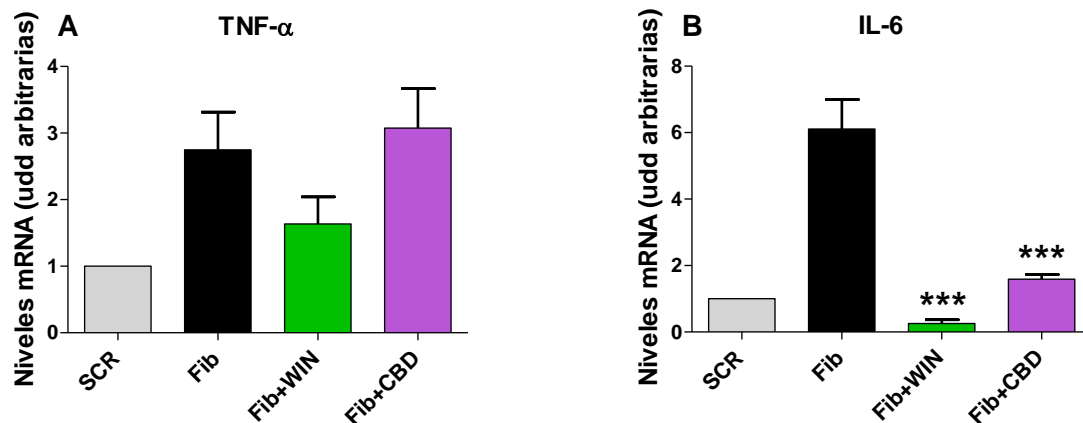


Figura 45. Efectos de la administración icv de A β Fibrilar y del tratamiento con cannabinoides sobre los niveles de expresión citoquinas en corteza cerebral. Análisis mediante PCR en tiempo real de los niveles de mRNA. **A**, Los niveles TNF α aumentaron en los animales inyectados icv con A β Fibrilar y ninguno de los cannabinoides pudieron revertir este efecto. **B**, IL-6 aumento 6 veces sus niveles con la inyección icv de Fibrilar, tanto WIN como JWH (0.5mg/kg/día) redujeron de manera altamente significativa este efecto (hasta niveles control). Media \pm ESM, *** p<0.005.

no redujo de forma estadísticamente significativa la expresión de esta citoquina y CBD tampoco alteró este incremento.

IL-6 constituye un importante mediador de la respuesta inflamatoria en fase aguda y regula la expresión de otras citoquinas y quimioquinas. Podemos observar (Figura 45, B) que los niveles de mensajero de IL-6 se encontraban marcadamente elevados (6X) en el grupo inyectado con el péptido A β Fibrilar 20 días antes. En este caso, el tratamiento tanto con WIN como con CBD redujo de manera altamente significativa la expresión de IL-6.

**Efectos in Vivo del tratamiento oral prolongado con
agonistas cannabinoideos en el modelo Tg APP**

El segundo modelo experimental utilizado para ensayar el mecanismo neuroprotector de los cbs en la EA fue uno de los múltiples modelos transgénicos de la enfermedad, en concreto el transgénico 2576 (Tg APP). En este modelo los primeros síntomas cognitivos aparecen a los 9 meses de edad. Por ello, como una estrategia preventiva comenzamos el tratamiento con los fármacos a los 7 meses. La administración se realizó en el agua de bebida.

Los fármacos utilizados en este ensayo fueron el WIN 55-212.2 y el JWH-133 cuyo papel neuroprotector había sido demostrado en estudios anteriores (Ramirez et al., 2005). El tratamiento se llevó a cabo durante 4 meses ininterrumpidos a una dosis de 0.2mg/kg/día. Así mismo se monitorizó el consumo de agua y las variaciones en el peso de los animales durante todo el estudio.

Se realizó un seguimiento exhaustivo de los animales durante este periodo, a los 2 y 4 meses de tratamiento se sometió a los animales a una serie de ensayos cognitivos y pruebas de neuroimagen, las cuales nos permitieron estudiar el estado cerebral de los animales *in vivo*.

1. Efecto del genotipo y de los cannabinoides sobre la actividad motora y parámetros cognitivos

Para determinar las posibles alteraciones cognitivas que ocurrían a los 2 y 4 meses de tratamiento se realizaron dos pruebas comportamentales: aprendizaje de una tarea de navegación espacial y la prueba de reconocimiento de un objeto nuevo. También se estudió la actividad motora de estos animales.

1.1 Efecto agudo del WIN sobre la actividad motora:

Se analizó la actividad motora de los animales tras la administración aguda del agonista cannabinoide WIN a la misma dosis que se utilizaría en el tratamiento crónico (0,2mg/kg) o del vehículo (ver Figura 46). Para comparar el efecto agudo con el subcrónico. La actividad horizontal se vio reducida en los animales Wt tras el tratamiento agudo con WIN, los TgAPP presentaban una reducción significativa de la distancia recorrida y el tratamiento con WIN no modificó este efecto del genotipo (Figura 46, A). El número de elevaciones se vio reducido en los Wt por efecto del tratamiento, los TgAPP, mostraron una reducción significativa de este parámetro y el tratamiento con WIN no modificó este efecto (Figura 46, B). Observamos que las esterotipias no se vieron afectadas ni por el genotipo, ni por el tratamiento (Figura 46, C).

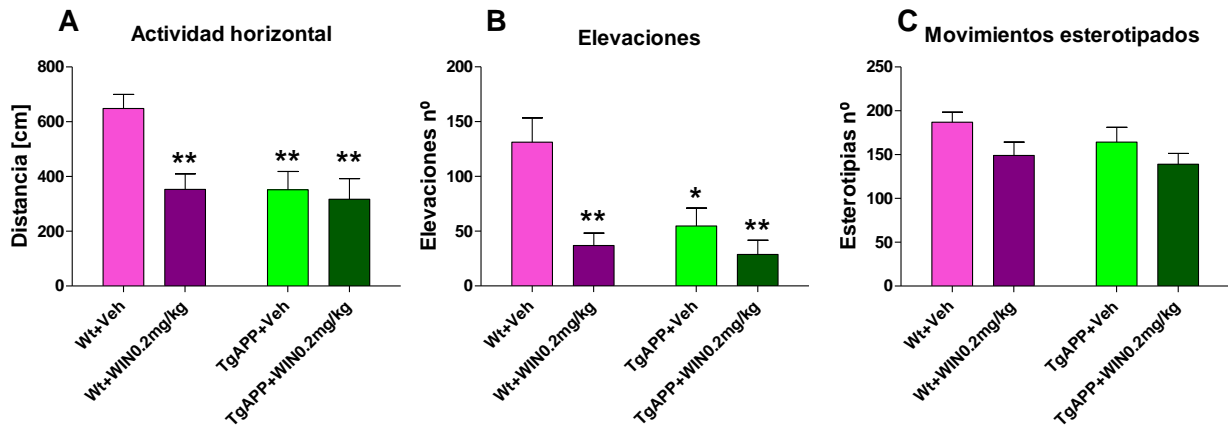


Figura 46. Efecto agudo del tratamiento con WIN 0.2mg/kg sobre la actividad motora en animales de 12 meses Wt y TgAPP. **A**, la actividad motora expresada como distancia recorrida en cm, se encontró significativamente disminuida en los transgénicos, el tratamiento con WIN redujo este parámetro en los animales Wt, pero no en los TgAPP. **B**, los TgAPP vieron disminuido el número de elevaciones respecto a los Wt, el WIN redujo el número de elevaciones en los Wt pero no afectó a los TgAPP. **C**, el número de esterotipias no se vio afectado ni por el genotipo ni por el tratamiento. Los datos muestran la actividad registrada durante 30 minutos, los valores son la media \pm ESM, (n = 7-8) animales por grupo. ** p<0.01 vs Wt-Veh; * p<0.05 vs v. ANOVA de 1-vía, post-hoc N-K.

1.2 Actividad motora

Dado que los ensayos de aprendizaje implican una respuesta motora, se estudiaron previamente los posibles efectos del tratamiento con los cannabinoides WIN y JWH sobre la conducta motora. Se valoró la actividad horizontal, el número de elevaciones o posturas erguidas (*rears*) y el de esterotipias (Figura 47).

2 meses tratamiento (9 meses de edad):

La actividad horizontal (Figura 47, A), expresada como distancia recorrida en cm, no se vio afectada por los tratamientos en los animales silvestres, mientras que los animales transgénicos vieron disminuido este parámetro en comparación con los Wt en un 30% aproximadamente. Los animales transgénicos, tratados con WIN aumentaron la distancia recorrida a niveles de control, mientras, el tratamiento con JWH no tuvo efecto significativo.

La actividad vertical o n° de elevaciones, está recogida en la Figura 47, B. En los animales silvestres, tanto el WIN como el JWH aumentaron el número de elevaciones significativamente hasta un 140% respecto a los tratados con vehículo. Los Tg APP mostraron una reducción significativa de este parámetro respecto a los animales Wt de un 40%. El tratamiento con WIN no tuvo efecto significativo sobre el número de elevaciones de los Tg

RESULTADOS

APP, mientras que JWH aumentó significativamente a el doble este parámetro respecto a los tratados con vehículo.

Por otro lado el número de esterotipias no se vio afectado ni por el genotipo ni por el tratamiento (Figura 47, C).

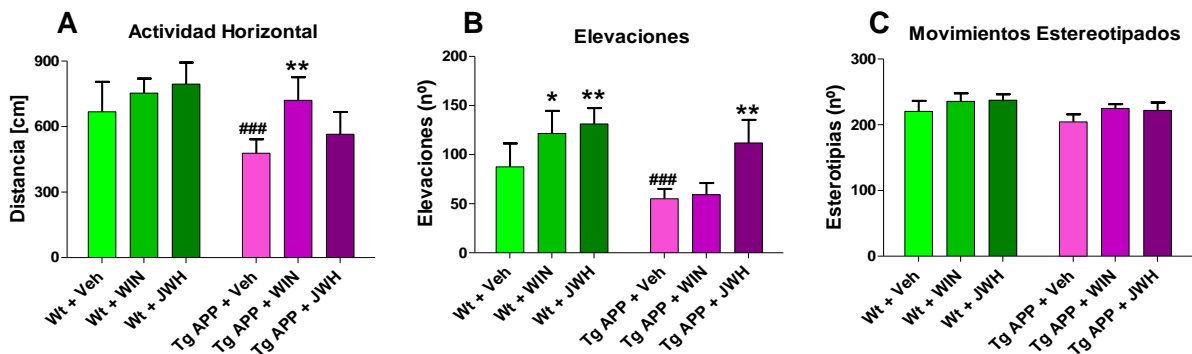


Figura 47. Actividad motora tras 2 meses de tratamiento oral con WIN y JWH (0.2mg/kg/día). A, la actividad motora expresada como distancia recorrida en cm, se encontró muy significativamente disminuida en los transgénicos, efecto que se revertió con el WIN. B, ambos tratamientos incrementaron el número de elevaciones en los WT, se vieron reducidas en los transgénicos, en este caso fue el JWH el que contrarrestó su alteración. C, el número de esterotipias no se vio afectado ni por el genotipo ni por el tratamiento. Los datos muestran la actividad registrada durante 30 minutos, los valores son la media \pm ESM, $n = 7-8$ animales por grupo. ### $p < 0.01$ vs Wt-Veh; * $p < 0.05$ vs control; ** $p < 0.01$ vs control.

4 meses de tratamiento (11 meses de edad):

Tras otros dos meses más de tratamiento, volvimos a analizar la actividad motora de los animales (Figura 48).

La actividad motora horizontal (Figura 48, A) en los animales silvestres (314 ± 30) se vio aumentada significativamente por el tratamiento con WIN (507 ± 70). Se observó una disminución significativa en los transgénicos (230 ± 38) respecto a los Wt. En los Tg APP el tratamiento con WIN aumento (340 ± 20) la distancia recorrida respecto a los animales tratados con vehículo. El JWH no tuvo efecto en los transgénicos.

El número de elevaciones (Figura 48, B), fue incrementado tanto por WIN como por JWH (47%) en los animales silvestres (34 ± 4). Este parámetro se redujo en los Tg APP (alrededor del 50%) respecto a los Wt y los cannabinoides no modificaron esta alteración en los transgénicos. El número de esterotipias (Figura 48, C) no se vio afectado ni por el genotipo ni por el tratamiento, al igual que ocurría a los 2 meses de tratamiento.

Cabe destacar que tanto en actividad horizontal, como en el número de elevaciones, se puede observar una reducción de estos parámetros en todos los grupos experimentales desde

los 2 a los 4 meses de tratamiento. En la actividad horizontal pasan de unos 600cm de media a los 2 meses a 400cm a los 4 meses de tratamiento. Mientras que en las elevaciones pasan de 100 elevaciones de media a 40. Esto nos indica que los animales son capaces de recordar el entorno, ya que en tan solo dos meses no se ha podido producir un deterioro tan grave de sus capacidades físicas.

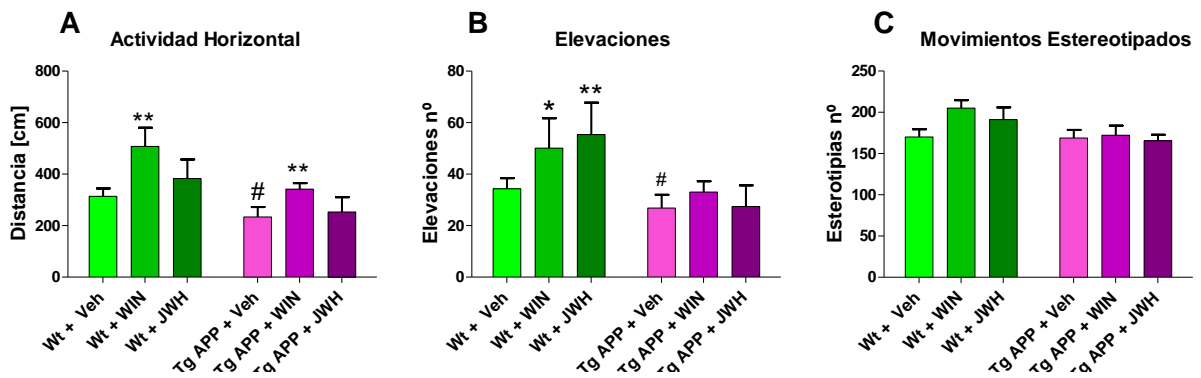


Figura 48. Actividad motora tras 4 meses de tratamiento oral con WIN y JWH (0.2mg/kg/día). A, distancia recorrida en cm, se encontró significativamente disminuida en los transgénicos, efecto que se reversionó con el WIN, que incrementó la actividad locomotora de los Wt. B, el número de elevaciones aumento significativamente en los Wt debido a los tratamientos y se vio reducido en los transgénicos. C, el numero de esterotipias no se vio afectado ni por genotipo ni por tratamiento. Los datos muestran la actividad registrada durante 30 minutos, los valores son la media \pm ESM, n = 7-8 animales por grupo. # p<0.05 vs Wt-Veh; * p<0.05 vs control; ** p<0.01 vs control.

1.3 Prueba de navegación espacial (Water Maze):

Una de las estructuras cerebrales que primero se ven afectadas en la EA y en este modelo de la enfermedad es el hipocampo. Una de las funciones del hipocampo es la codificación de las memorias espaciales, por ello, el aprendizaje de una tarea espacial (como es el caso el *Water Maze*) constituye una herramienta fundamental en la evaluación de la efectividad de los tratamientos.

2 meses de tratamiento (9 meses de edad):

Se sometió a los animales al aprendizaje de una tarea de navegación espacial a los 2 meses de iniciar los tratamientos con WIN y JWH (0.2mg/kg/día).

Todos los animales aprendieron a encontrar la plataforma sumergida a lo largo de los 5 días de entrenamiento, pasando de los 60seg. de latencia del primer día a 15-20 seg. en el

RESULTADOS

último día (Figura 49, A). No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales durante los primeros 4 días de entrenamiento.

Durante el quinto y último día del ensayo (Figura 49, B) pudo observarse como los animales Tg APP presentaban un aumento significativo en el tiempo de latencia en encontrar la plataforma respecto al grupo de animales control (Wt-Veh). Ni WIN ni JWH modificaron el efecto del genotipo en los transgénicos, ni la respuesta de los animales Wt.

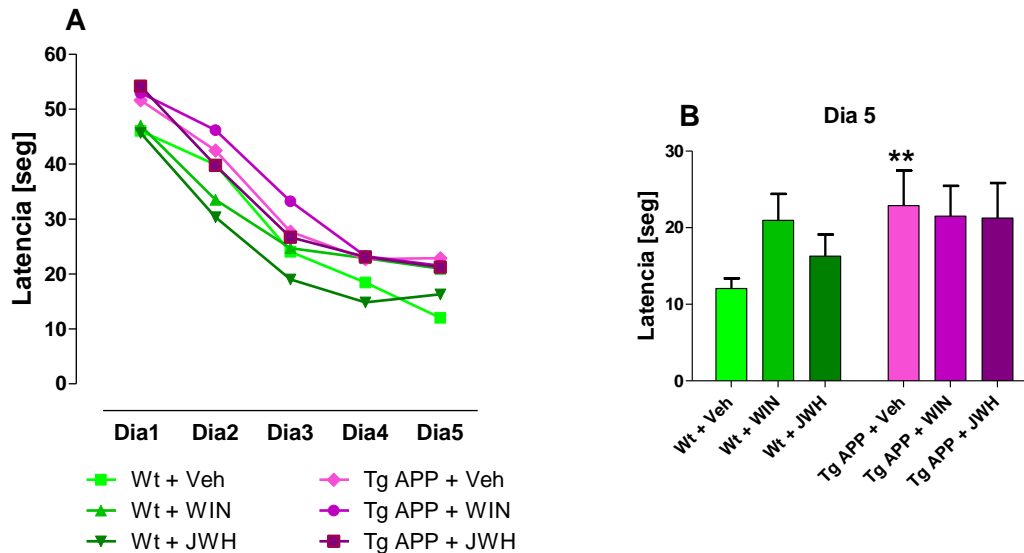


Figura 49. Aprendizaje de una tarea de navegación espacial (*water maze*) a los 9 meses de edad, tras 2 meses de administración oral de WIN y JWH (0.2mg/kg/día). A, no se observaron diferencias significativas ni por genotipo ni por tratamiento en los 4 primeros días de entrenamiento. B, en quinto día del ensayo el grupo Tg APP-Veh mostró un tiempo de latencia significativamente superior al de los Wt-Veh, los cannabinoides no modificaron este efecto. En la grafica A no se presentan los ESM para mayor claridad de la representación. Los datos muestran el tiempo de latencia en encontrar la plataforma sumergida en seg (n = 7-8). ** p<0.05.

4 meses de tratamiento (11 meses de edad):

Tras dos meses más de tratamiento volvimos a analizar el estado cognitivo de los animales, de nuevo mediante un ensayo de *water maze*, manteniendo la plataforma sumergida en la misma posición en que se encontraba durante el ensayo realizado 2 meses antes.

Lo primero que nos encontramos, es que los tiempos de latencia iniciales se situaban alrededor de los 25 seg, por lo que existía una fuerte retención de la memoria de navegación espacial (Figura 50). Además todos los animales parecen ser capaces de mejorar su rendimiento en el entrenamiento.

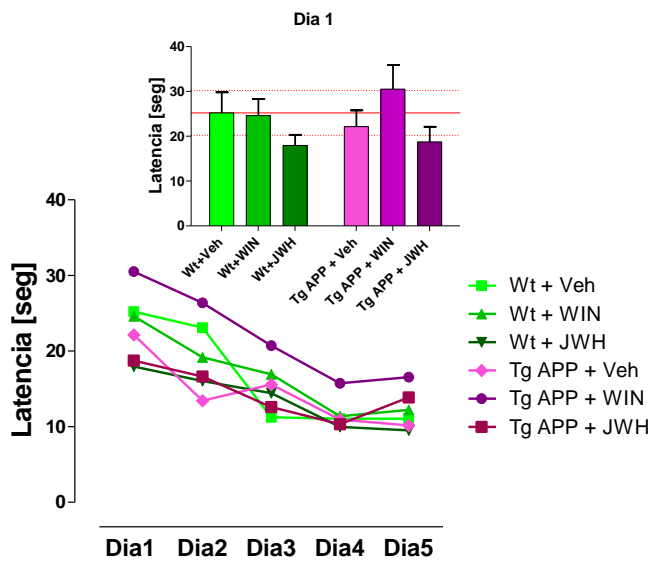


Figura 50. Aprendizaje de una tarea de navegación espacial (*water maze*) a los 11 meses de edad, tras 4 meses de administración oral de WIN y JWH (0.2mg/kg/día). El tiempo de la latencia inicial fue de unos 25seg. todos los animales mejoraron el rendimiento con el entrenamiento. No se observaron diferencias significativas ni por genotipo ni por tratamiento. Los datos muestran el tiempo de latencia en encontrar la plataforma sumergida en seg (n = 7-8).

No pudimos observar diferencias significativas ni por genotipo ni por tratamiento, aunque si se apreciaba una tendencia a un mayor tiempo de latencia durante todo el ensayo en el grupo Tg APP tratado con WIN.

Resumiendo, el aprendizaje espacial no estaba comprometido.

1.4 Reconocimiento de Objeto Nuevo:

Una vez habíamos comprobado que a los 4 meses de tratamiento, el ensayo de *Water Maze* no detectaba alteraciones en el estado cognitivo de los animales, inmediatamente llevamos a cabo otro ensayo para evaluar si la memoria de trabajo de los animales se veía afectada en el modelo y como modificaban los tratamientos un posible efecto del genotipo.

4 meses de tratamiento (11 meses de edad):

En la prueba de la novedad, que se realiza en tres días consecutivos, se entrena a los animales a reconocer dos objetos iguales y el último día se cambia uno de estos objetos por otro nuevo. Durante el día de entrenamiento, todos los animales exploraron cada uno de los objetos iguales durante un 50% del tiempo, demostrando que no existía ningún sesgo en cuanto a la posición de los mismos (datos no mostrados).

RESULTADOS

Durante el tercer día del ensayo (Test) (Figura 51) se evaluó la memoria de reconocimiento de objetos. Observamos que todos los animales silvestres, independientemente del tratamiento recibido durante los 4 meses previos, permanecían un 20% más de tiempo explorando el objeto nuevo respecto al viejo. Los animales Tg APP (tratados con vehículo) permanecieron durante un 50% del tiempo explorando cada uno de los objetos, y por lo tanto no fueron capaces de distinguir uno de otro. El tratamiento con WIN no modificó este comportamiento en los Tg APP, mientras que el JWH revertió el efecto del genotipo hasta los niveles de Wt-Veh (explorando un 20% más el objeto nuevo).

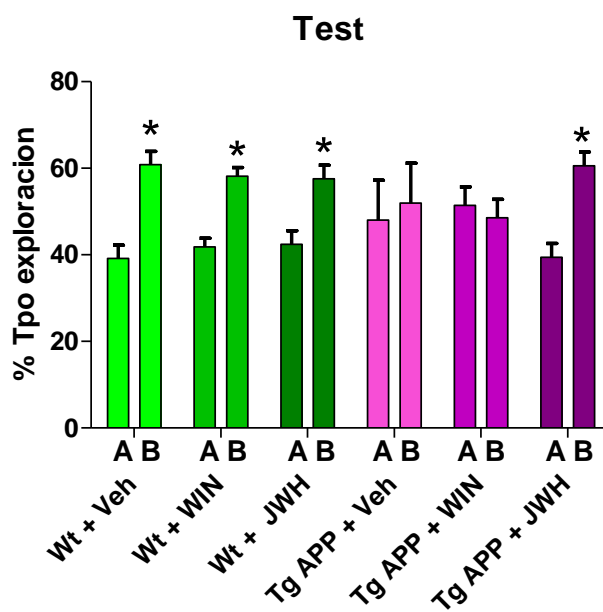


Figura 51. Reconocimiento de objeto nuevo tras la administración oral de WIN y JWH durante 4 meses. Administración diaria de 0.2mg/kg. Los animales Tg APP no son capaces de reconocer el objeto nuevo, JWH mejora esta conducta en los Tg. Los datos muestran el porcentaje de tiempo empleado en la exploración de los objetos el tercer día del ensayo (A=Objeto Viejo; B=Objeto Nuevo). Media \pm ESM, * $p < 0.05$

En resumen, la memoria de trabajo se vio afectada en los animales Tg APP a los 11 meses de edad, y el tratamiento con el Cannabinoide CB₂ selectivo durante 4 meses mejoró este efecto del genotipo.

2. Estudios longitudinales de neuroimagen

Los estudios de neuroimagen están siendo ampliamente explotados en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas en la actualidad. En concreto, en la EA se ha visto que en estadios avanzados de la enfermedad, las imágenes de alta resolución anatómica, T2* muestran una reducción en el volumen cerebral de corteza muy marcado, así como un aumento del tamaño de los ventrículos (Lee et al., 2003).

Uno de los objetivos principales de los estudios aquí presentados era el de evaluar el potencial **diagnóstico** y de **seguimiento** de las técnicas de neuroimagen en el contexto de la EA, ya que uno de los principales inconvenientes de la enfermedad es que no existen métodos de seguimiento del estatus cerebral durante un posible tratamiento preventivo, que tendría lugar en etapas presintomáticas.

Los estudios de neuroimagen llevados a cabo podrían dividirse en tres categorías: imágenes por resonancia magnética (IRM), espectroscopía *in vivo* por resonancia magnética y captación de ^{18}F FDG por Tomografía por Emisión de Positrones (PET).

Los dos primeros se llevaron a cabo a los 2 y 4 meses de tratamiento, mientras que el tercero solo se realizó a los 4 meses de tratamiento.

Dentro de las imágenes por resonancia magnética (IRM) se obtuvieron tres tipos de imágenes para cada animal: las imágenes en T2*, los mapas de Coeficiente de Difusión Aparente del Agua (ADC) y los mapas de transferencia de magnetización.

Las imágenes en T2* se utilizaron para la localización de zonas anatómicas concretas y su posterior análisis. No se pudo obtener de ellas ningún tipo de información anatómica diferencial entre los grupos experimentales.

En la Figura 9 de la sección Material y Métodos, se muestra un ejemplo de cómo se seleccionaron estas zonas, basándonos en las imágenes en T2

2.1 Mapas de Coeficiente de Difusión Aparente del Agua (ADC):

2 meses de tratamiento (9 meses de edad):

A los dos meses de tratamiento (Figura 52) podemos observar que en corteza (Figura 52, A) la administración de los cannabinoides (WIN y JWH) no afectó a los niveles de ADC en los animales silvestres (0.5 ± 0.02). Los animales Tg APP tratados con vehículo (0.75 ± 0.14) mostraron valores de ADC significativamente superiores a los de los animales Wt-Veh y el tratamiento con ambos cannabinoides normalizó esta elevación a niveles de control.

Por otro lado, en hipocampo (Figura 52, B) no se observan efectos significativos en los niveles de ADC, en los animales transgénicos respecto a los silvestres. Y los tratamientos con los cannabinoides carecieron de efectos significativos tanto en los animales Wt como en los animales Tg APP.

RESULTADOS

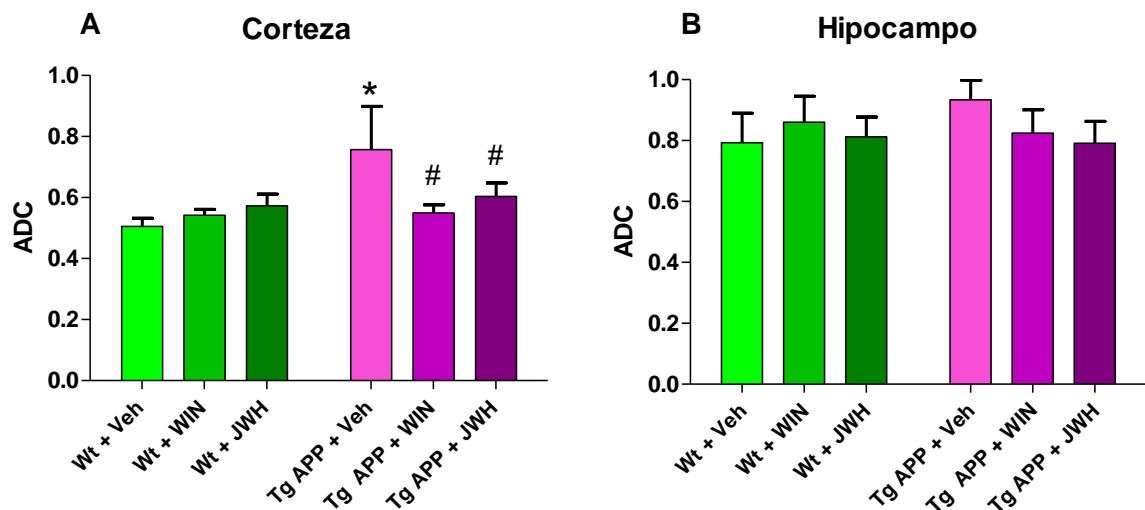


Figura 52. Valores de coeficiente de difusión aparente del agua en corteza e hipocampo tras 2 meses de tratamiento oral con cbs. WIN y JWH se administraron a una dosis de 0.2mg/kg/día durante 2 meses. **A**, valores de ADC en corteza, se observó un aumento significativo en los Tg APP revertido por ambos cbs, no hubo un efecto significativo de los tratamientos en los animales Wt. **B**, No se encontraron efectos significativos ni por genotipo ni por tratamiento en Hipocampo. Datos expresados como media±ESM (n = 5-6).

4 meses de tratamiento (11 meses de edad):

Tras otros dos meses más de tratamiento volvimos a analizar a los animales mediante Resonancia Magnética, para realizar un análisis longitudinal.

En la Figura 53 podemos ver los resultados de ADC a los 4 meses de tratamiento. En corteza (Figura 53, A) los cannabinoides siguen sin afectar a los niveles de ADC de los animales silvestres. No encontramos el efecto significativo del genotipo que habíamos visto a los 9 meses de edad (Figura 52, A), y los cannabinoides no modificaron los niveles de ADC observados en los Tg APP. Los niveles de ADC en corteza se mantuvieron muy similares a 2 y 4 meses de tratamiento.

En hipocampo (Figura 53, B) los fármacos continuaron sin afectar a los niveles de ADC en animales Wt, aunque en el caso del JWH se observó una tendencia a aumentar sus valores, que no llegó a ser significativa. Los Tg APP no presentaron valores significativamente diferentes respecto a los Wt y los cannabinoides no modificaron los valores de ADC de los animales transgénicos tras 4 meses de tratamiento continuado. En contraste con lo observado en corteza, los valores de ADC en hipocampo, en general, son menores a los 11 meses de edad respecto a los 9 meses de edad (pasando de 0.8 a alrededor de 0.6).

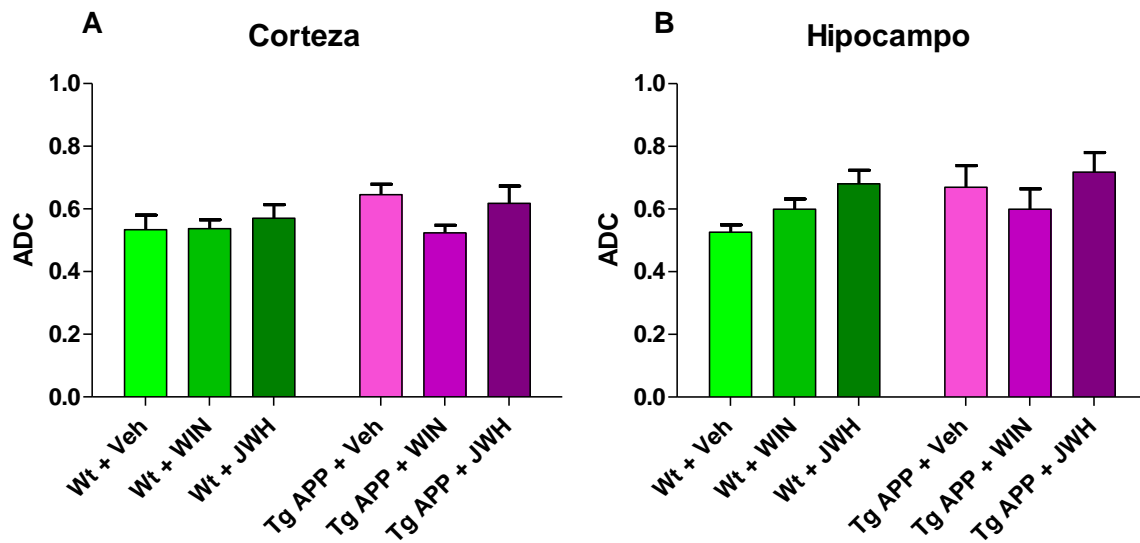


Figura 53. Valores de coeficiente de difusión aparente del agua en corteza e hipocampo tras 4 meses de tratamiento oral con cbs. WIN y JWH se administraron a una dosis de 0.2mg/kg/día durante 4 meses. **A**, valores de ADC en corteza. **B**, valores en hipocampo. No se observan efectos significativos ni por genotipo ni por tratamiento. Datos expresados como media±ESM (n = 6-8).

2 meses vs 4 meses de tratamiento (11 meses de edad):

En corteza (Figura 54, A) no se observaron diferencias significativas entre los valores de 2 y 4 meses de tratamiento. Sin embargo en hipocampo (Figura 54, B) los valores de ADC a 2 meses de tratamiento resultaron significativamente superiores a los de los 4 meses de tratamiento.

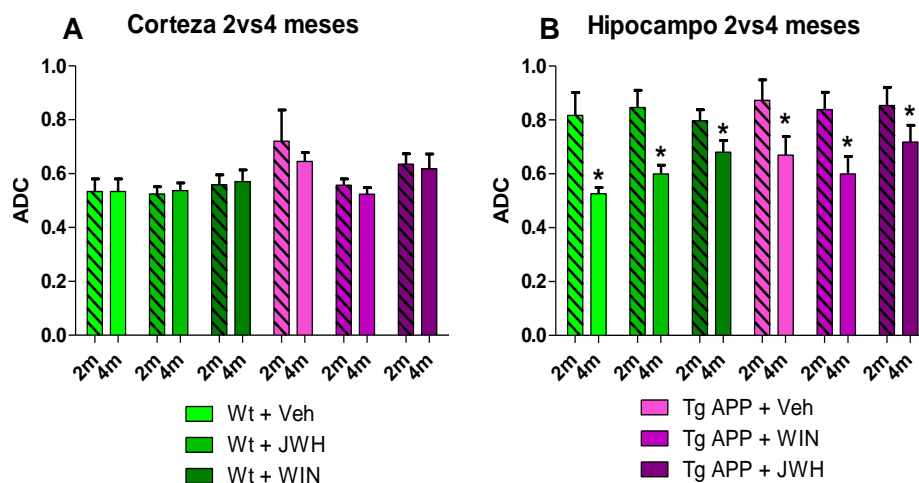


Figura 54. Valores de ADC en corteza e hipocampo, comparación de 2 y 4 meses de tratamiento oral con cannabinoides. WIN y JWH 0.2mg/kg/día. **A**, valores de ADC en corteza, no se observan diferencias significativas entre 2 y 4 meses. **B**, valores en hipocampo, los valores a los 2 meses son en general, superiores a los de los 4 meses de tto. Datos expresados como media±ESM (n = 6-8) * p<0.05 vs 2meses de tratamiento.

2.2 Mapas de Transferencia de Magnetización (MT):

Los valores de MT están relacionados con la cantidad de moléculas de agua libres en el tejido, es decir, no ligadas a ninguna biomolécula. Una de las biomoléculas que más agua acoplan son los fosfolípidos. Las moléculas de agua ligadas a macromoléculas tienen unos valores de T2 muy bajos porque transfieren su energía rápidamente a las moléculas próximas, se las considera moléculas “invisibles”, mientras que las moléculas no ligadas a macromoléculas (o libres), se las considera “visibles”, puesto que son aquéllas cuyo movimiento es apreciable por Resonancia magnética.

Un aumento del número de moléculas en suspensión (por ejemplo, debido a lisis celular) daría lugar a un aumento en los valores de MT, mientras que un aumento del agua (por edema, por ejemplo) provocaría lo contrario.

Se ha visto, en estudios recientes, que la EA se asocia con modificaciones de los valores de MT cerebrales, en concreto reducciones en los niveles en hipocampo (Hanyu et al., 2000). Por ello se seleccionó este parámetro para el estudio longitudinal del tratamiento crónico con cannabinoides en el modelo Tg 2576.

2 meses de tratamiento (9 meses de edad):

Tras dos meses de tratamiento oral con los fármacos (WIN y JWH), no pudimos observar ningún efecto ni por genotipo, ni por tratamiento, en ninguna de las 2 zonas estudiadas (corteza e hipocampo) (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de la Transferencia de magnetización en corteza e hipocampo a los 2 meses de tratamiento oral con los cannabinoides. WIN y JWH administrados a 0.2mg/kg/día.

	Corteza		Hipocampo	
	Mean ± SEM	N	Mean ± SEM	N
Wt Veh	42.41± 0.71	10	42.39 ± 1.80	10
Wt WIN	44.34 ± 1.20	6	44.89 ± 1.21	6
Wt JWH	45.15 ± 1.84	7	44.76 ± 1.77	6
APP Veh	41.12 ± 0.75	10	40.01± 1.03	11
APP WIN	44.68 ± 1.46	6	41.14 ± 2.48	6
APP JWH	43.04 ± 0.79	8	44.49 ± 0.90	8

4 meses de tratamiento (11 meses de edad):

A los 4 meses de tratamiento oral con los cannabinoides tampoco pudimos ver efectos significativos ni por genotipo, ni por tratamiento, en ninguna de las dos zonas estudiadas como podemos observar en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la Transferencia de magnetización en corteza e hipocampo a los 4 meses de tratamiento oral con los cannabinoides. WIN y JWH administrados a 0.2mg/kg/día.

	Corteza		Hipocampo	
	Mean	N	Mean	N
Wt Veh	48.10 ± 3.12	6	47.44 ± 2.78	6
Wt WIN	50.28 ± 1.92	8	48.83 ± 1.86	8
Wt JWH	50.07 ± 1.90	7	50.85 ± 1.31	7
APP Veh	44.79 ± 2.05	6	43.93 ± 1.69	6
APP WIN	46.99 ± 3.07	6	47.06 ± 2.26	6
APP JWH	50.19 ± 1.05	8	49.56 ± 1.82	7

2 meses vs 4 meses de tratamiento (11 meses de edad):

Lo que sí que pudimos observar claramente es que si comparáramos los valores

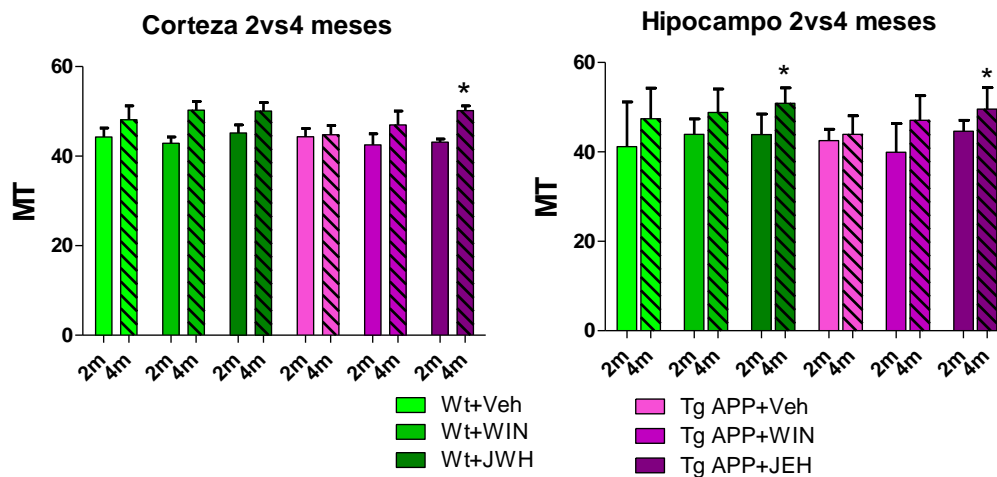


Figura 55. Valores de MT tras 2 y 4 meses de tratamiento oral con WIN y JWH en corteza e Hipocampo. Dosis diaria de 0.2mg/kg. Datos expresados como media±ESM. * p<0.05

obtenidos a los 2 meses con los obtenidos a los 4 meses, la tendencia general era un aumento en los niveles de MT en ambas áreas y todos los grupos a los 4 meses, excepto en el grupo Tg APP+Veh, en los que se mantuvieron muy similares durante todo en estudio (Figura 55).

RESULTADOS

Resultaron significativas las diferencias en los Tg APP + JWH en Cx y en los Wt + JWH y Tg APP + JWH en hipocampo.

2.3 Espectroscopía in vivo por Resonancia Magnética:

En los análisis de espectroscopía se obtiene información sobre las cantidades de metabolitos de una zona cerebral concreta contenida en un voxel de 27mm³. Los metabolitos más destacados son N-acetil-aspartato (NAA), Creatina (Crea) y Colina (Cho). La cuantificación de los mismos no es absoluta, sino que debe ser normalizada frente a un standard interno, en este caso Crea.

2 meses de tratamiento (9 meses de edad):

Tras dos meses de tratamiento oral con WIN y JWH, el análisis de los niveles de metabolitos cerebrales (Figura 56) mostraró los siguientes resultados.

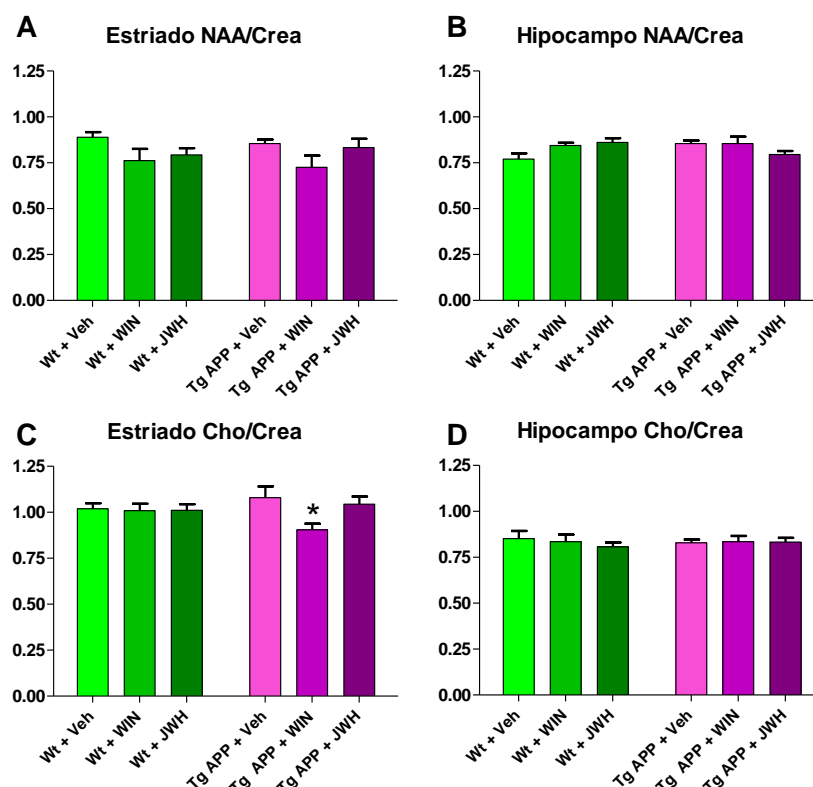


Figura 56. Niveles de los metabolitos cerebrales valorados por espectroscopia a los 2 meses de tratamiento. WIN y JWH (0.2mg/kg/día). **A** y **B**, los niveles de NAA/Crea no mostraron modificaciones significativas ni por efecto del genotipo, ni por efecto de los tratamientos. **C**, los animales Wt no presentaron un efecto significativo del tratamiento con ninguno de los cannabinoides, el WIN disminuyó los niveles de Cho significativamente, mientras que JWH no tuvo efecto sobre los mismos en Tg APP. **D**, Los niveles Cho en hipocampo no se vieron afectados ni por el genotipo ni por el tratamiento. Los resultados se expresan como cocientes respecto a Crea. Datos media±ESM (n=6-8). * p<0.05 vs TgAPP+Veh.

Los niveles de NAA/Crea en estriado (Figura 56, A y B) no mostraron modificaciones significativas ni por genotipo ni por tratamiento, aunque el tratamiento con WIN tendió a disminuir los niveles de NAA/Crea en estriado tanto en los animales Wt como en los Tg APP. En hipocampo todos los grupos experimentales presentaron niveles de NAA/Crea muy similares.

En los valores de Cho/Crea en estriado de animales silvestres (Figura 56, C) a los dos meses de tratamiento, no se observaron efectos significativos de los. Tampoco hubo un efecto significativo del genotipo. Sin embargo en los Tg APP el WIN disminuyó significativamente los niveles de Cho/Crea y JWH no tuvo ningún efecto.

Por último, en los niveles de Cho/Crea en hipocampo (Figura 56, D), no se observaron diferencias significativas ni por genotipo ni por tratamiento.

4 meses de tratamiento (11 meses de edad):

A los cuatro meses de iniciar el tratamiento oral volvimos a analizar la composición metabólica del cerebro por espectroscopía (Figura 57).

Al igual que lo observado a los dos meses de tratamiento, los niveles de NAA se mantuvieron sin cambios debidos ni al genotipo ni al tratamiento en estriado e hipocampo

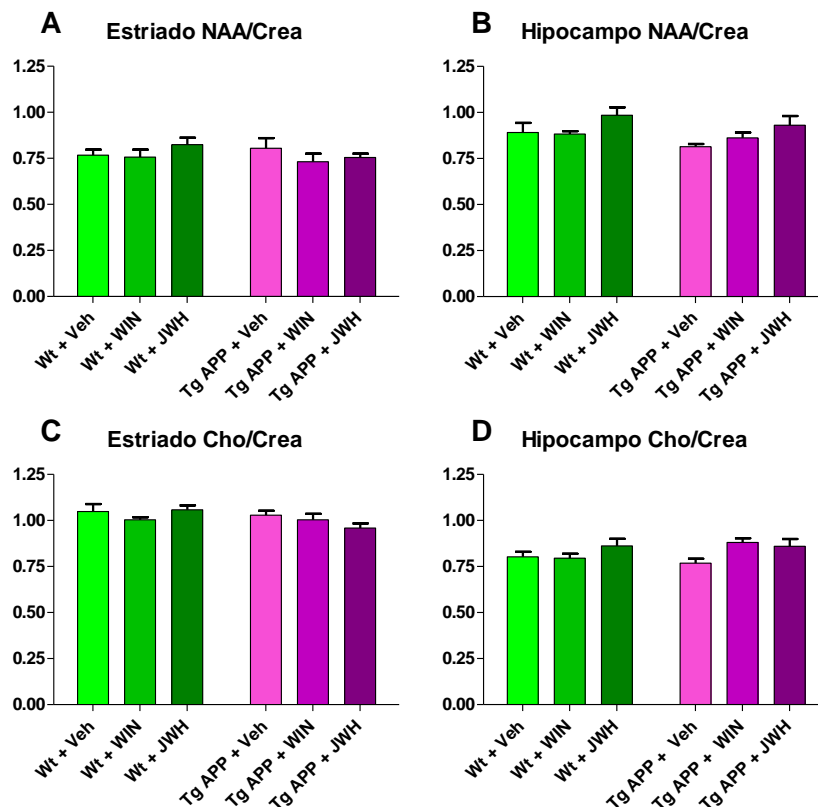


Figura 57. Niveles de los metabolitos cerebrales valorados por espectroscopía a los 4 meses de tratamiento. WIN y JWH (0.2mg/kg/día). A y B, los niveles de NAA no muestran modificaciones significativas ni debidas al genotipo, ni por efecto de los tratamientos ni en estriado ni en hipocampo, respectivamente. C y D, los niveles Cho en estriado e hipocampo tampoco se ven afectados por genotipo ni por tratamiento. Los resultados se expresan como cocientes respecto a Crea. Datos media±ESM (n=6-8).

RESULTADOS

(Figura 57, A y B).

Por otro lado en los niveles de Cho/Crea en estriado (Figura 57, C) no se observa ningún efecto significativo ni del WIN, ni del JWH, ni en los animales silvestres, ni en los Tg APP. Los niveles de Cho/Crea en hipocampo siguieron sin mostrar efectos significativos ni del genotipo, ni de los tratamientos (Figura 57, D).

2 meses vs 4 meses de tratamiento (11 meses de edad):

Los niveles de NAA/Crea en estriado mostraron una reducción de los valores a los 11 meses de edad respecto a los 9 meses de edad en el grupo Wt-Veh (Figura 58, A), mientras que tanto en los animales silvestres como Tg APP tratados con WIN y JWH, no se observó esa reducción.

En hipocampo, por el contrario, se observó un aumento de los niveles de NAA/Crea (Figura 58, B) al aumentar la edad de los animales. El tratamiento con WIN y JWH anuló este

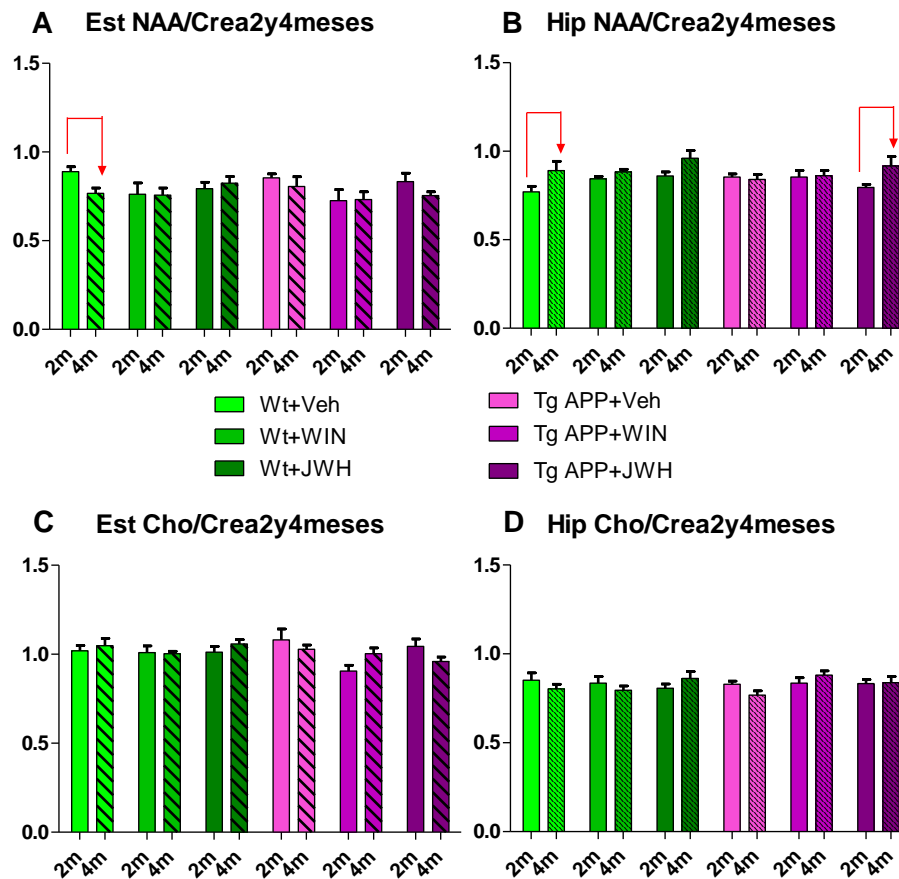


Figura 58. Comparación de los niveles de metabolitos cerebrales a 2 y 4 meses de tratamiento con WIN y JWH. (0.2mg/kg/día). A, los niveles de NAA en estriado se vieron reducidos a los 4 meses de tratamiento, el resto de los grupos no mostraron ninguna modificación. B, los valores de NAA en hipocampo aumentaron a los 4 meses en los Wt-Veh, los Tg APP-Veh, no se vieron modificados, el tratamiento con JWH de los Tg mostró una modificación similar a la de los controles. C y D, los niveles de Cho no se vieron alterados a los 4 respecto a los 2 meses de tratamiento ni por genotipo ni por tratamiento, ni en estriado ni en hipocampo. Los resultados se expresan como cocientes respecto a Crea, como normalizador. Datos media±ESM (n=6-8).

efecto en los animales silvestres. Los Tg APP mostraron los mismos niveles de NAA/Crea a 2 y 4 meses, el tratamiento con WIN no modificó este efecto, mientras que JWH resolvió la situación a niveles de control.

Los niveles de Cho/Crea tanto en estriado como en hipocampo no mostraron modificaciones significativas a los 4 meses respecto a los 2 meses de tratamiento, como se puede observar en la Figura 58, C y D.

2.4 Tomografía por Emisión de Positrones (PET) FDG a los 4 meses de tratamiento:

En esta serie de estudios se evaluó la captación de glucosa marcada radiactivamente por los cerebros de los animales que habían sido tratados durante 4 meses con los fármacos cannabinoides WIN y JWH. En una primera aproximación, se estudiaron las posibles diferencias en captación de glucosa entre los animales silvestres y los Tg APP. Se observó una marcada reducción de la captación de glucosa en los animales transgénicos, respecto a los silvestres, como puede observarse en la Figura 59, A y B.

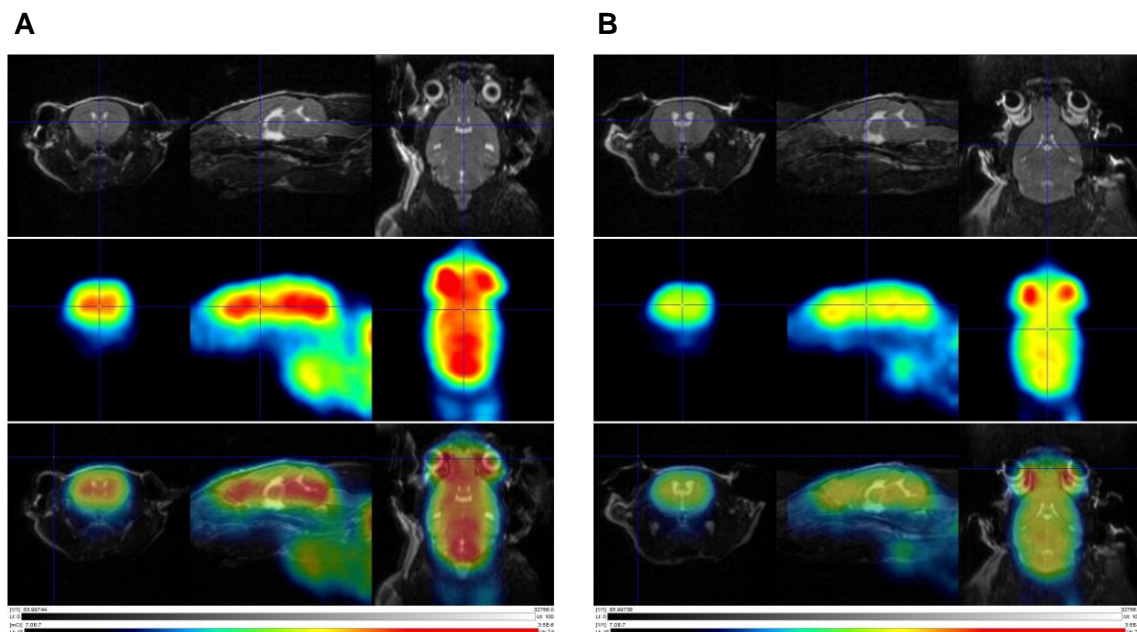


Figura 59. Imágenes de PET de un animal silvestre y un transgénico APP. En cada panel se observan, de arriba abajo: imágenes de MRI; imágenes de PET y superposición de ambos tipos de imágenes (en planos coronal, sagital y transversal). A, ejemplo de animal Wt en el que se observaron altos niveles de captación de glucosa en todas las zonas cerebrales. B, ejemplo de un animal Tg APP donde se observó una reducción general de la captación de glucosa. Cuanto mayor sea la captación de glucosa, mayor será la señal, siendo el rojo el máximo y el azul el mínimo.

RESULTADOS

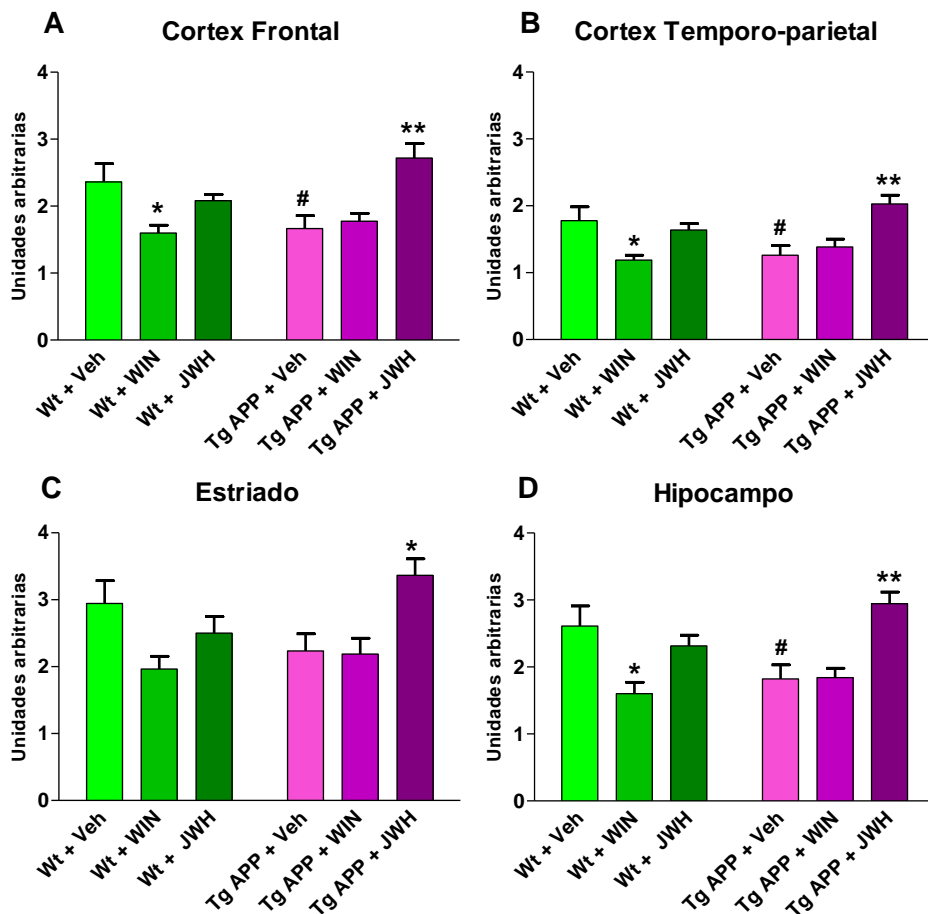


Figura 60. Efectos sobre la captación de glucosa, valorada mediante PET, del tratamiento oral durante 4 meses con WIN y JWH. Los cannabinoides se administraron a 0.2mg/kg/día. **A**, niveles en Cx frontal; **B**, niveles en Cx temporo-parietal; **C**, niveles en Estriado y **D**, niveles en Hipocampo. En A, B y D los Tg APP mostraron una captación significativamente inferior a la de los Wt, el WIN disminuyó la captación en los Wt y no tuvo efecto en los Tg APP. JWH aumentó la captación de glucosa en los Tg APP. En C tan solo pudo observarse que JWH aumentaba la captación de glucosa en los transgénicos. Los datos muestran la captación de glucosa normalizada respecto a los niveles en cerebelo y a la actividad inyectada. Resultados son media±ESM (n=3-4).

Se analizaron específicamente cuatro zonas cerebrales: Cx frontal, Cx temporal-parietal, estriado e hipocampo.

En Cx frontal, temporo-parietal e hipocampo se observaron resultados similares (Figura 60, A, B y D). En los animales Wt, el tratamiento con WIN redujo de forma significativa los niveles de captación, mientras que el JWH no tuvo ningún efecto sobre los mismos. Los animales Tg APP, mostrarán asimismo una disminución significativa respecto a los WT, el tratamiento con WIN no resultó efectivo en mejorar este efecto, mientras que el JWH aumentó la captación de manera muy significativa.

El estriado (Figura 60, C) fue la única zona cerebral que no mostró diferencias significativas debidas al genotipo en la captación de FDG. Ninguno de los tratamientos tuvo efecto sobre la captación de glucosa en los Wt. Sin embargo, pudo observarse un incremento significativo en los Tg APP cuando fueron tratados con JWH durante 4 meses.

Los resultados de neuroimagen aquí presentados, muestran que la resonancia de protón, no parece herramienta útil en el seguimiento de este modelo de la enfermedad, mientras que los estudios de PET, revelan tener un gran potencial en el seguimiento del modelo para futuros estudios.

3. Análisis multivariante de los resultados *in vivo*

Una vez terminados los estudios *in vivo*, llevamos a cabo un análisis estadístico multivariante, para averiguar si la interacción de varios parámetros nos permitía distinguir, los animales silvestres de los transgénicos.

Tabla 9. Análisis de la correlación entre los diversos parámetros de comportamiento y neuroimagen a los 2 meses de tratamiento (9 meses de edad).

Wt y Tg APP tratados con Vehiculo			Wt y Tg APP tratados con WIN			Wt y Tg APP tratados con JWH		
	r	P		r	P		r	P
<u>ADC (Hip.)</u>			<u>ADC (Hip.)</u>			<u>MT (Hip.)</u>		
MT (Hip.)	0.813	0.014*	Cho/Crea (Est.)	0.765	0.006**	NAA/Crea (Est.)	0.545	0.036*
<u>ADC (Cort.)</u>			<u>ADC (Cort.)</u>			<u>NAA/Crea(Hip.)</u>		
Water Maze (5º Día)	0.954	0.001**	NAA/Crea(Hip.)	0.784	0.004**	Dist. Horizontal	0.597	0.024**
<u>MT (Hip.)</u>			<u>Cho/Crea(Hip.)</u>			<u>Dist. Horizontal</u>		
MT (Cort.)	0.576	0.040*	Dist. Horizontal	0.515	0.049**	Esterotipias	0.849	0.0001**
						Elevaciones	0.763	0.002**
<u>Dist. Horizontal</u>			<u>Water Maze(5º Día)</u>					
Esterotipias	0.802	0.001**	Elevaciones	0.598	0.018*			
Elevaciones	0.922	0.0001***						

Abreviaturas: Hip: Hipocampo; Est: Estriado; Cort: Corteza. r: coeficiente de correlación de Pearson. P: nivel de significación.

RESULTADOS

De modo que investigamos la posible correlación entre los distintos parámetros de comportamiento, con los parámetros obtenidos en neuroimagen. En la Tabla 9 se muestran las correlaciones que resultaron ser significativas a los 2 meses de tratamiento.

Los parámetros de neuroimagen parecen estar muy relacionados entre sí, como cabía suponer. De hecho en los animales tratados con vehículo se observó una significativa correlación entre el ADC y la MT en hipocampo y la MT en las dos regiones analizadas. Esto no fue evidente tras los distintos tratamientos. Así mismo, existe una importante correlación

Tabla 10. Análisis de la correlación entre los diversos parámetros de comportamiento y neuroimagen a los 4 meses de tratamiento (11 meses de edad).

Wt y Tg APP tratados con Vehículo			Wt y Tg APP tratados con WIN			Wt y Tg APP tratados con JWH		
	r	P		r	P		r	P
<u>MT (Hip.)</u>			<u>ADC (Hip.)</u>			<u>MT(Hip.)</u>		
MT(Cort.)	0.944	0.001**	MT (Hip.)	-0.69	0.014*	MT(Cort.)	0.826	0.001**
			MT (Cort.)	-0.64	0.024*			
<u>Dist. Horizontal</u>			<u>MT(Hip.)</u>			<u>MT(Cort.)</u>		
Elevaciones	0.895	0.0001**	MT (Cort.)	0.866	0.0001**	NAA/Crea(Est.)	0.719	0.008**
			Dist. Horizontal	0.555	0.04*	Dist. Horizontal	0.673	0.012*
			<u>MT (Cort.)</u>			<u>NAA/Crea(Est.)</u>		
			NAA/Crea(Est.)	-0.55	0.043*	NAA/Crea(Hip.)	0.627	0.029*
			NAA/Crea(Hip.)	0.721	0.005**	Water Maze (5ºDía)	0.564	0.044*
			Cho/Crea(Hip.)	-0.57	0.043*			
			<u>Cho/Crea(Est.)</u>			<u>Cho/Crea(Est.)</u>		
			Water Maze (5ºDía)	-0.77	0.001**	Dist. Horizontal	0.556	0.049*
						Elevaciones	0.708	0.007**
			<u>Cho/Crea(Hip.)</u>			<u>Dist. Horizontal</u>		
			Dist. Horizontal	-0.56	0.037*	Estereotipias	0.545	0.036*
						Elevaciones	0.879	0.0001**

Abreviaturas: Hip: Hipocampo; Est: Estriado; Cort: Corteza. r: coeficiente de correlación de Pearson. P: nivel de significación.

con los parámetros de comportamiento. En los animales tratados con vehículo o JWH durante 2 meses, la distancia horizontal (distancia recorrida) estuvo correlacionada con los valores de

esterotipias o las elevaciones (actividad vertical). Por otro lado el rendimiento de los animales en el laberinto de agua, se correlacionó con la actividad vertical solamente en los animales tratados con WIN. Los resultados más interesantes son los que se refieren a las correlaciones entre ambos tipos de resultados. Sólo se apreciaron correlaciones significativas entre neuroimagen y comportamiento, cuando los animales recibieron tratamientos cannabinoides, mientras que en los grupos control no se apreciaron.

También analizamos las posibles correlaciones entre neuroimagen y comportamiento a los 4 meses de tratamiento, los resultados significativos pueden observarse en la Tabla 10.

En este caso, cabe destacar que la cantidad de correlaciones significativas, en general, es muy superior en los grupos tratados con los cannabinoides, que en el grupo control. Al igual que a los 2 meses de tratamiento, existen correlaciones entre los parámetros de neuroimagen o los de comportamiento, sobre todo en los grupos tratados con cannabinoides. En la discusión se analizarán en detalle estos resultados.

4. Estudios bioquímicos e histológicos tras el tratamiento oral prolongado con agonistas cannabinoides en el modelo Tg 2576 de la enfermedad de Alzheimer:

En esta sección se recogen los resultados correspondientes al análisis bioquímico de expresión génica y de estudios histológicos de los animales que habían recibido un tratamiento continuado con los cannabinoides WIN y JWH durante 4 meses.

4.1 Niveles de β -Amiloide y valores de P-GSK3 β en corteza cerebral

a) Niveles de A β en corteza cerebral

Se analizaron los niveles de los fragmentos amiloidogénicos del APP, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂, en los extractos proteicos solubles de las cortezas de los animales que habían recibido un tratamiento oral con los cannabinoides, WIN 55.212-2 y JWH-133, durante 4 meses.

La inserción del gen humano de la APP, con mutaciones correspondientes a casos de EA familiar, en los ratones TgAPP da lugar a una elevación en los niveles de A β . Para su cuantificación se utilizaron ELISAs que detectan específicamente A β ₁₋₄₀ o A β ₁₋₄₂ humano. Los animales silvestres, utilizados como controles, sólo expresan el péptido murino en la misma

RESULTADOS

medida que los TgAPP. De cualquier modo se analizaron muestras de 2 animales Wt-Veh, cuyos valores no fueron detectados (resultados no mostrados).

Los niveles de $A\beta_{1-42}$ (Figura 61, A) en los animales Tg APP tratados con vehículo, se encontraron alrededor de los 5.4 ± 0.7 pg/mg de proteína, mientras que, tanto en los animales tratados con WIN como con JWH estos niveles descendieron alrededor de un 30% (3.8 ± 0.7 y 3.5 ± 0.8 , respectivamente).

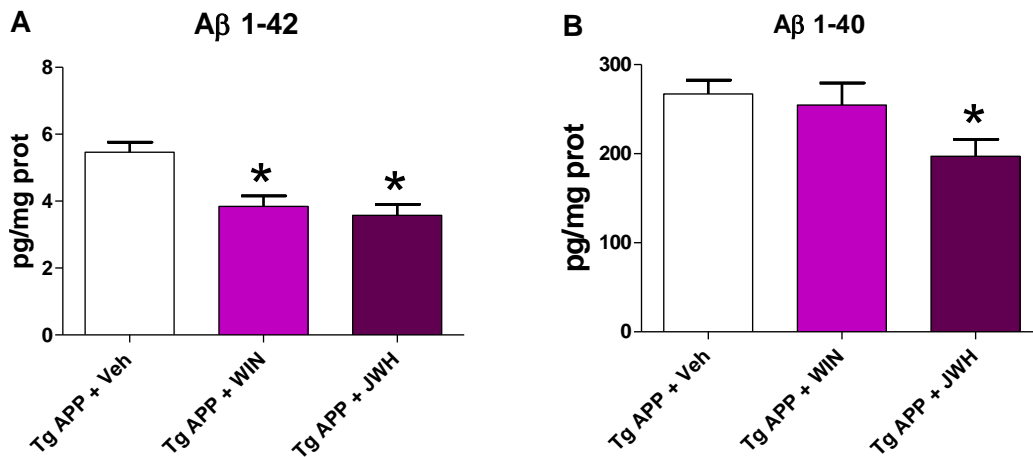


Figura 61. Niveles de $A\beta$ en corteza cerebral de los animales Tg APP tratados durante 4 meses con WIN y JWH. A, los niveles de $A\beta_{1-42}$ se vieron reducidos por el tratamiento tanto con WIN como con JWH (Dosis 0.2mg/kg/día). B, los niveles de $A\beta_{1-40}$ sólo se vieron reducidos por el tratamiento con JWH. Los resultados se expresan como la media \pm ESM ($n = 6$). * $p < 0.05$ vs tratados con veh test de la *t de Student's*.

Por otro lado, los valores de $A\beta_{1-40}$ (Figura 61, B) detectados en la corteza de los animales Tg APP-Veh fueron de 267.1 ± 19 , el tratamiento con WIN no modificó significativamente estos niveles (254.6 ± 30), mientras que el tratamiento con JWH los redujo significativamente (197.6 ± 23).

También analizamos los niveles de $A\beta$ insolubles en el hipocampo de estos animales, pero los valores obtenidos fueron mínimos (datos no mostrados), esto se debe a que a la edad analizada los animales no presentan prácticamente placas, por lo que no era de esperar encontrar grandes cantidades de $A\beta$ insoluble.

Estos resultados indican que el tratamiento con cannabinoides es eficaz en disminuir el incremento en los niveles de $A\beta$ en Tg APP.

b) Transporte a través de barrera hematoencefálica de $A\beta_{1-40}$

Un aumento en el transporte del $A\beta$ desde el cerebro hacia la periferia podría ser responsable de la disminución de sus niveles en cerebro. Se valoró el transporte de $A\beta_{1-40}$ en un modelo *in vitro* de barrera líquido cefalorraquídeo-sangre y la capacidad de los

cannabinoides en estudio de potenciar este transporte. Mediante *Western blotting* se comprobó que, en los controles, el péptido iba apareciendo gradualmente en la cámara inferior a partir de las 12 h de incubación y hasta las 48 h (Figura 35, A). Sin embargo, en presencia de WIN o de JWH (1 mM) el péptido era transportado muy rápidamente durante las primeras horas (1-3-6 h). Es decir los cannabinoides aceleran el transporte del A β .

Estos resultados se cuantificaron mediante ELISA. En la Figura 62, B, se observa el marcado incremento en el transporte del péptido A β_{1-40} en presencia de ambos cannabinoides (WIN y JWH a 200 nM) en comparación con el vehículo, a 1 y 3 horas de incubación.

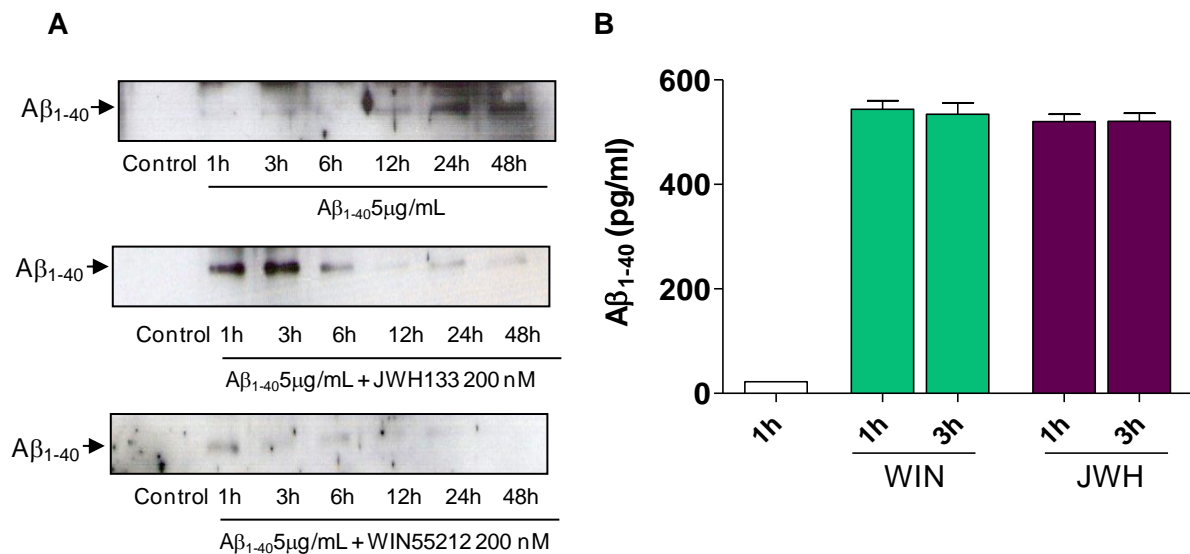


Figura 62. El transporte a través de BHE de A β_{1-40} se ve acelerado por los cannabinoides WIN y JWH. A una dosis de 200nM. A, De arriba abajo podemos observar Blots para A β_{1-40} en una situación control (transporte máximo a las 24-48 horas), cuando se trata a las células con JWH (transporte máximo a las 1-3 horas) y por último, tratadas con WIN (transporte máximo a las 1-3 horas). **B**, cuantificación mediante ELISA de el transporte a través de barrera LCS, indica un marcado aumento del transporte de A β_{1-40} tanto en presencia de WIN, como de JWH.

c) Niveles de expresión de P-GSK 3 β

Una de las consecuencias de la acumulación de A β en cerebro es la activación de rutas de señalización intracelulares con diversas consecuencias. Entre estas rutas se encuentra la activación de glucógeno sintasa kinasa-3 β (GSK3 β), la cual se encuentra implicada en la fosforilación de la proteína tau estabilizadora de microtúbulos, siendo la forma fosforilada de la enzima, la inactiva.

Se observó que los niveles de la forma inactiva de la GSK3 β (Figura 63, A) no se vieron afectados por los tratamientos con los cannabinoides (WIN y JWH). Sin embargo en los animales transgénicos tratados con vehiculo se detectaron niveles significativamente reducidos de P-GSK3 β respecto a los Wt-Veh, el tratamiento con WIN fue capaz de contrarrestar esta reducción, mientras que JWH no contrarrestó el efecto del genotipo.

RESULTADOS

Por otro lado los niveles de GSK3 β totales no se vieron afectados, ni por el genotipo de los animales, ni por el tratamiento recibido, de forma significativa (Figura 63, B).

Puesto que la cantidad de GSK3 β inactiva se encuentra reducida, es de esperar que aumente la forma activa y con ello la fosforilación de proteínas, proceso importante para la EA, como ya vimos en la introducción.

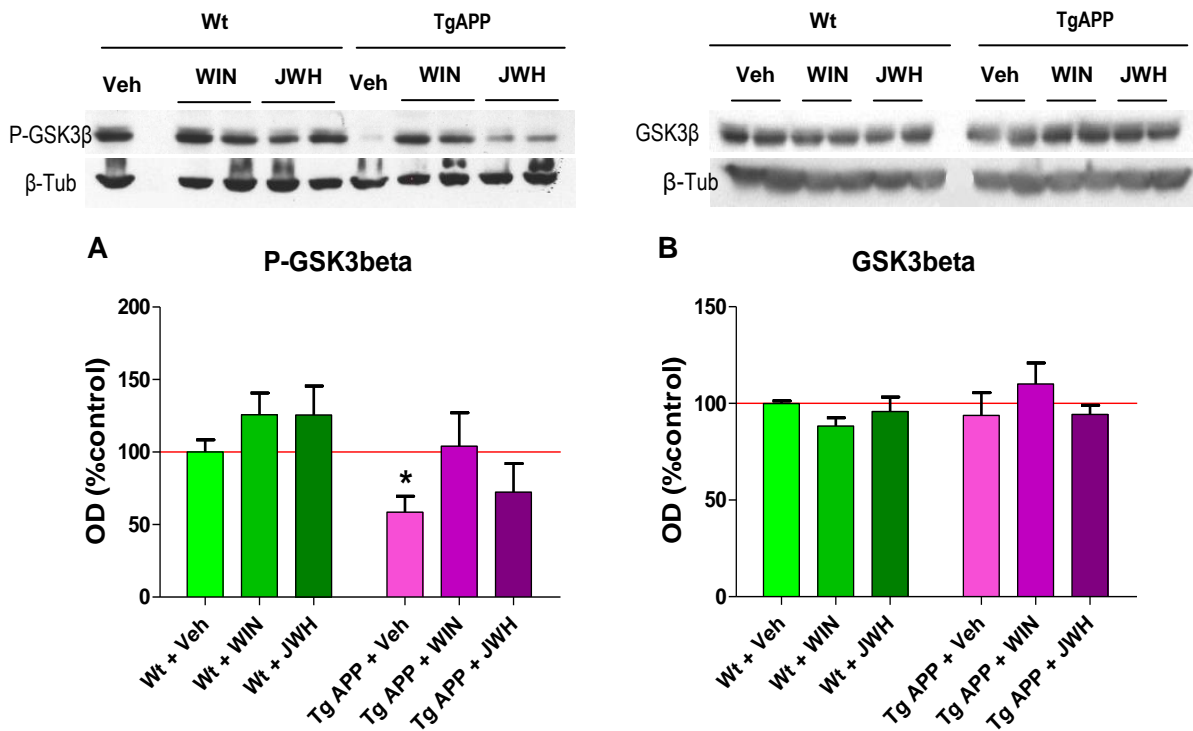


Figura 63. Reducción de la expresión de P-GSK3 β en animales Tg2576 durante 4 meses de tratamiento. Efecto de la administración oral de WIN y JWH. Dosis 0.2mg/kg/día durante 4 meses. **A**, la expresión de P-GSK3 β se vió reducida en los Tg APP, el tratamiento con WIN contrarrestó este efecto. **B**, la expresión de GSK3 β no se vio afectada ni por genotipo ni por tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (n = 6-8). * p<0.05.

4.2 Modulación de parámetros inflamatorios en corteza cerebral

a) Expresión de proteínas implicadas en inflamación

A continuación analizamos algunos marcadores implicados en el proceso inflamatorio, ya que los cannabinoides actúan como moduladores del sistema inmune, tienen propiedades anti-inflamatorias y en la EA la inflamación es una diana terapéutica.

Por un lado se estudió la expresión de la cicloxigenasa inducible (COX-2) (Figura 64, A), enzima implicada en la producción de ácido araquidónico y prostaglandinas, mediadores lipídicos de inflamación. En los animales silvestres, el tratamiento con WIN no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de la enzima, mientras que el tratamiento con JWH los redujo significativamente. En los animales Tg APP se pudo observar un aumento muy significativo

(50%) de la expresión de COX-2 en corteza, que se vió contrareestado por el tratamiento tanto con WIN como con JWH durante 4 meses consecutivos.

La expresión de GFAP se estudió porque sus niveles dan una idea de la activación astrocitaria en la región cerebral en estudio (Figura 64, B). Aunque la variabilidad de este parámetro resultó muy marcada, no se observaron efectos significativos debidos ni al genotipo, ni al tratamiento.

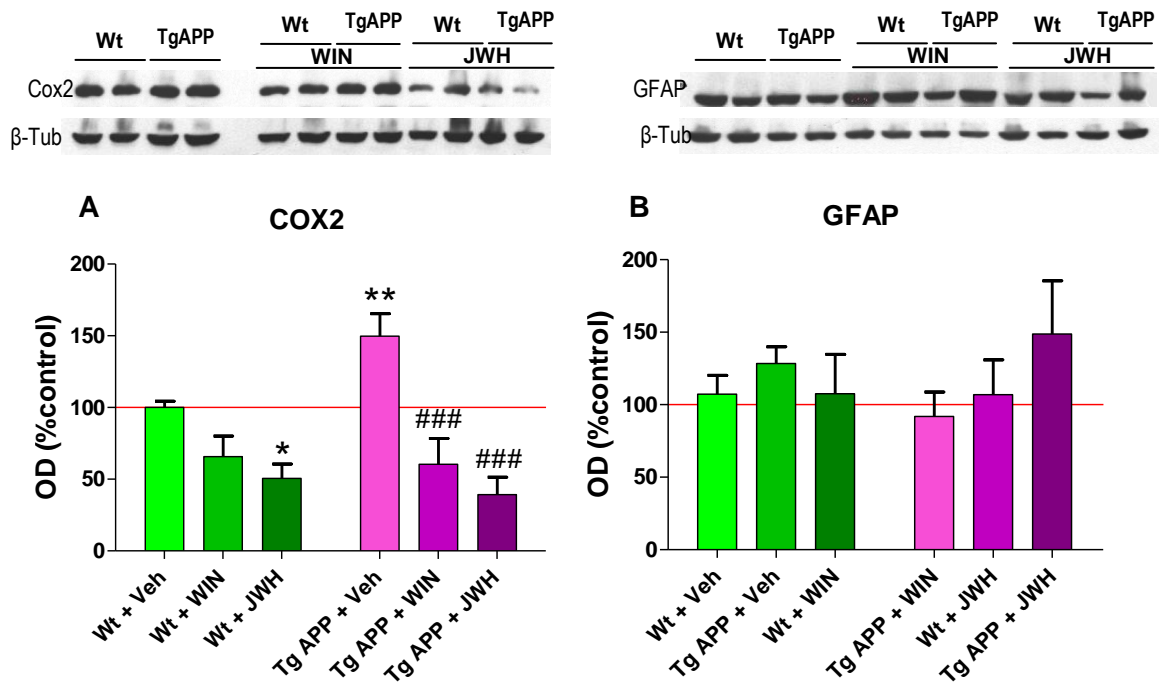


Figura 64. Modulación de la expresión de marcadores de inflamación en la corteza e animales Tg tratados con WIN y JWH durante 4 meses. Dosis 0.2mg/kg/día. Valorados por *Western Blotting* en lisados de corteza **A**, la expresión de COX-2 se vió aumentada en los Tg APP, el tratamiento tanto con WIN como con JWH mejoró este efecto. **B**, la expresión de GFAP no se vió afectada ni por genotipo ni por tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (n = 6-8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Wt+Veh. ### $p < 0.005$ vs Tg APP+Veh.

b) Expresión de citoquinas proinflamatorias

Los expresión génica de la citoquina pro-inflamatoria interleuquina-6 (IL-6) no se vió afectada en los animales transgénicos APP y los cannabinoides no modificaron su expresión ni en los animales silvestres, ni en los Tg APP (Figura 65, A), manteniéndose en todos los casos alrededor de 1.

La expresión de TNF- α , en corteza (Figura 65, B) de animales control (Wt-Veh), no resultó afectada por el tratamiento con los cannabinoides durante 4 meses. Sin embargo en los animales transgénicos pudimos observar un aumento de 6 veces los niveles respecto a los Wt-Veh. El tratamiento con WIN redujo los valores de TNF- α hasta 1.5, y JWH a 3.2 respecto a la expresión de los Wt-Veh.

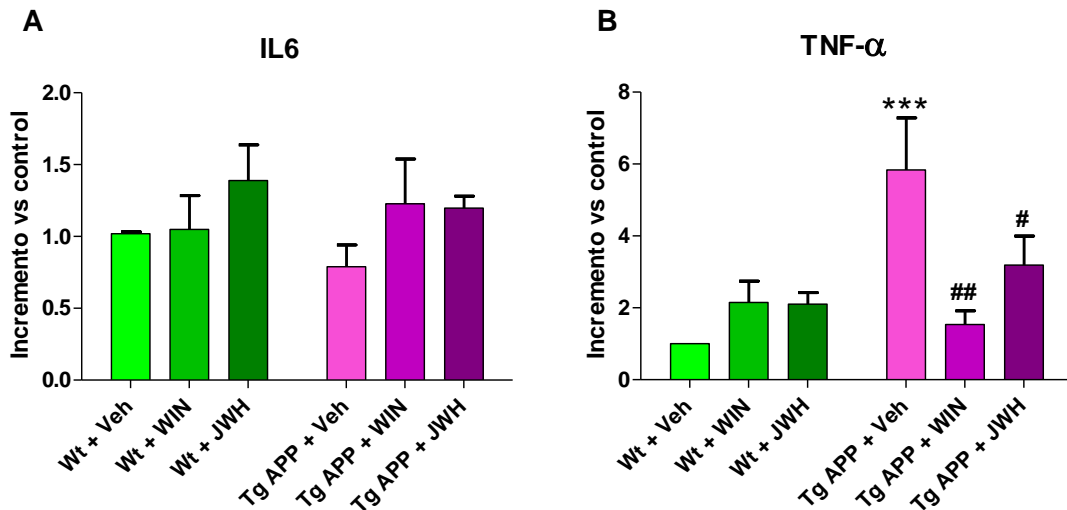


Figura 65. Efectos del tratamiento oral prolongado con WIN y JWH a animales Tg 2576 sobre los niveles de expresión de citoquinas en corteza cerebral. Análisis mediante PCR en tiempo real de los niveles de mRNA. **A**, Los niveles IL-6 no se vieron afectados ni por el genotipo ni por el tratamiento. **B**, la expresión de TNF- α aumento 6 veces sus niveles en los animales Tg APP, tanto WIN como JWH redujeron de manera significativa este efecto. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (n = 6-8). *** p<0.005 vs Wt+Veh. # p<0.05, ## p<0.01 vs Tg APP+Veh.

4.3 Modulación del sistema endocannabinoides en los Tg APP a los 12 meses de edad, tras 4 meses de tratamiento oral con WIN y JWH

a) Niveles de expresión de los receptores cannabinoides

En la EA se han descrito alteraciones en la expresión y/o funcionalidad de distintos elementos del sistema endocannabinoide, además habíamos estado administrando fármacos cannabinoides durante 4 meses, por tanto era interesante estudiar si la expresión de ciertos componentes del sistema endocannabinoide había resultado afectada.

En primer lugar estudiamos la expresión de los dos receptores de cannabinoides conocidos, CB₁ y CB₂, en lisados de corteza cerebral.

Los niveles de receptor CB₁ (Figura 66, A), valorados mediante *Western Blotting*, no se vieron afectados en los animales silvestres ni por el WIN ni por el JWH administrados durante 4 meses. En los animales Tg APP se pudo observar un aumento significativo de la proteína del receptor CB1 (150% vs Wt-Veh), el tratamiento con WIN no modificó este efecto, mientras que el JWH redujo sus niveles significativamente hasta un 50% respecto a los Wt-Veh.

Los niveles de expresión del receptor CB₂ (Figura 66, B) en animales Wt solo se vieron reducidos por el tratamiento con JWH en un 50 % mientras que WIN no tuvo ningún efecto. Los niveles de CB₂ no se vieron modificados en los animales Tg APP, el tratamiento tanto con WIN como con JWH de los transgénicos redujo sus niveles hasta aproximadamente un 25% respecto a los Tg APP-Veh.

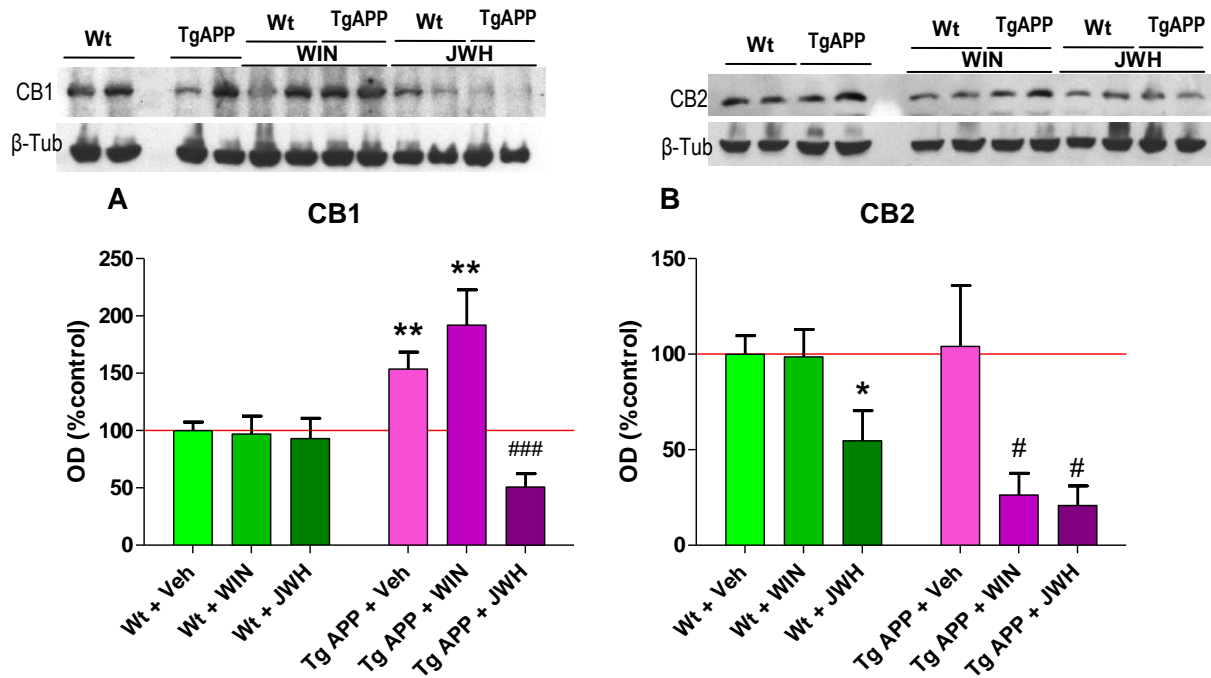


Figura 66. Modulación de la expresión de receptores cannabinoides en la corteza de animales Tg tratados con WIN y JWH durante 4 meses. Valorados por *Western Blotting* en lisados de corteza **A**, la expresión de CB₁ se vio aumentada en los Tg APP, el tratamiento (Dosis 0.2mg/kg/día) con WIN no mejoró este efecto y JWH redujo la expresión. **B**, la expresión de CB₂ no se vio afectada por el genotipo, el tratamiento con WIN y JWH redujo su expresión en los Tg APP. Los resultados se expresan como la media ± ESM (n =5-8). *p<0.05, **p<0.01 vs Wt+Veh. #p<0.05; ### p<0.005 vs Tg APP+Veh.

b) Valoración de los niveles de endocannabinoides

Posteriormente analizamos los niveles de dos cannabinoides endógenos mediante espectrometría de masas, concretamente 2-Araquidonoilglicerol (2-AG) y Araquidonoiletanolamina (AEA), en extractos de hipocampo de los animales tratados durante 4 meses con los cannabinoides sintéticos WIN y JWH.

Los niveles de 2-AG (Figura 67, A) mostraron valores entre 1000 y 1500 pmol/mg de proteína en los 6 grupos experimentales, sin presentar diferencias significativas debidas, ni al genotipo, ni al tratamiento.

Los niveles de AEA (Figura 67, B) en animales silvestres tratados con vehiculo fueron de 244±25 nmol/mg, el tratamiento tanto con WIN como con JWH en animales Wt redujo los niveles de AEA a 134±8 y 138±8 respectivamente. Los animales Tg APP tratados con vehículo

RESULTADOS

presentaron niveles significativamente reducidos de AEA (175 ± 23 nmol/mg). El tratamiento con WIN no modificó este efecto, mientras que JWH potenció esta reducción llegando a alcanzar los 98 ± 5 nmol/mg de AEA en este grupo experimental.

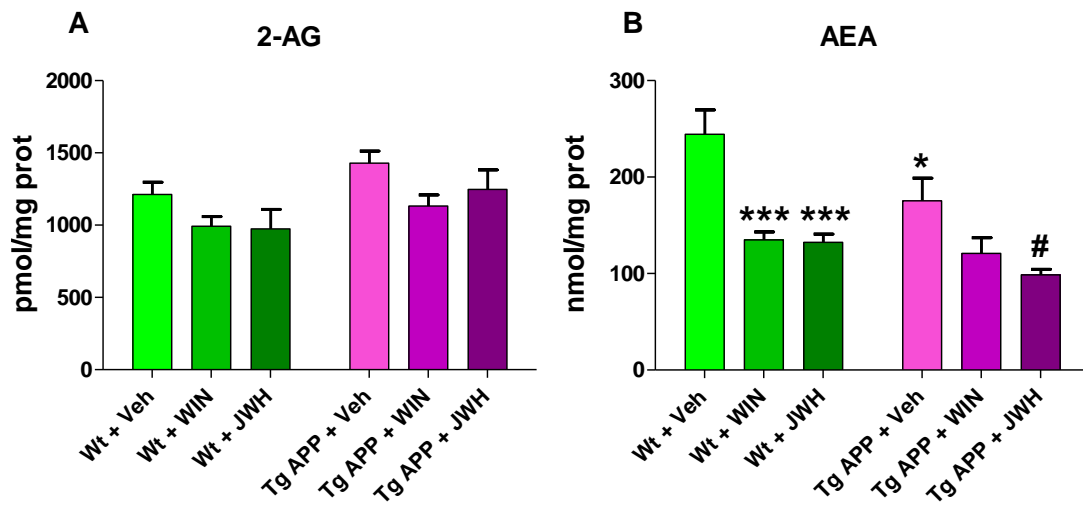


Figura 67. Niveles de endocannabinoides en Hipocampo de animales Tg APP tratados durante 4 meses con WIN y JWH. Dosis 0.2mg/kg/día. **A**, los niveles de 2-AG no se vieron alterados significativamente ni por el genotipo ni por el tratamiento. **B**, los valores de AEA se vieron reducidos significativamente en animales Wt tanto por WIN como por JWH, los Tg APP mostraron, también, una reducción significativa de los niveles de AEA, WIN no modificó este efecto y JWH acentuó esta reducción. Los resultados se expresan como la media \pm ESM ($n = 5-8$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ vs Wt+Veh. # $p < 0.05$ vs Tg APP+Veh.

4.4 Resultados de los análisis Inmuno histoquímicos:

a) Marcaje inmunohistoquímico con GFAP

Mediante técnicas de inmunohistoquímica analizamos la expresión de marcadores de astrocitos y microglía en el hipocampo de los animales que habían sido tratados durante 4-5 meses con los fármacos cannabinoides. En el caso del la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no observamos una modificación en el marcaje en hipocampo, perceptible macroscópicamente, ver Figura 68.

Al valorar cuantitativamente este marcaje pudimos apreciar que, si bien las diferencias no resultaron significativas, el JWH mostró una tendencia a reducir el marcaje GFAP tanto en los Wt, como en TgAPP (Figura 69).

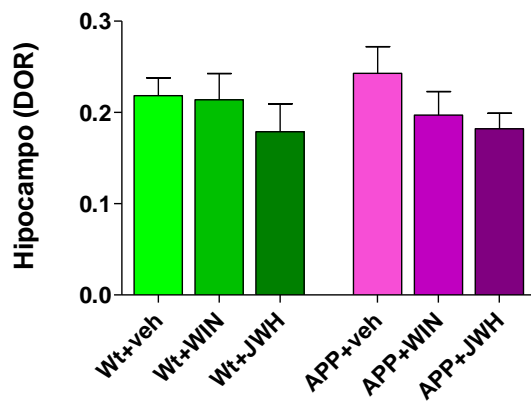


Figura 69. DOR del marcaje con GFAP en hipocampo en secciones de animales TgAPP y Wt tratados durante 4-5 meses con cannabinoides.

No se observaron diferencias significativas ni por el genotipo, ni por el tratamiento. A Si pudo observarse una tendencia en los animales tratados con JWH a reducir la expresión de GFAP.

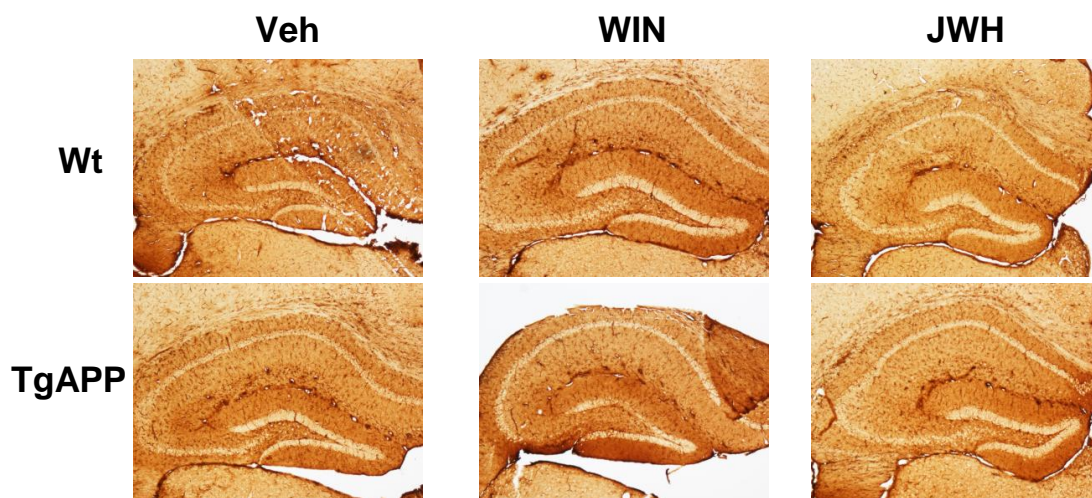


Figura 68. Expresión de GFAP en secciones de hipocampo de animales TgAPP y Wt que habían recibido un tratamiento de 4-5 meses con cannabinoides. WIN y JWH dosis 0.2mg/kg/día. No se observan diferencias macroscópicas en los marcajes Fotografías a 4 aumentos.

b) Marcaje inmunohistoquímico con Iba-1

Existe un amplio consenso en la existencia de microglía activada alrededor de las placas tanto en cerebros de pacientes de EA como en sus modelos transgénicos. El Tg APP utilizado en el presente trabajo a los 12 meses de edad todavía no presenta placas y era interesante conocer si existían cambios en esta población celular involucrada en inflamación. Para su marcaje se utilizó un anticuerpo frente a Iba-1, que permite visualizar la morfología, con múltiples procesos, de estas células gliales. En animales Wt se observó un gran número de microglía en corteza y en hipocampo, los procesos surgían del cuerpo en forma radial y tenían algunas ramificaciones. En los ratones Tg APP la densidad parece incrementarse en corteza (Figura 70). La morfología en algunos casos no parecía alterada, pero en otros aparecían algunas células activadas con procesos cortos y engrosados, y en otros se encontraron un

RESULTADOS

menor número de procesos y fragmentados, probablemente como consecuencia de la edad de los animales.

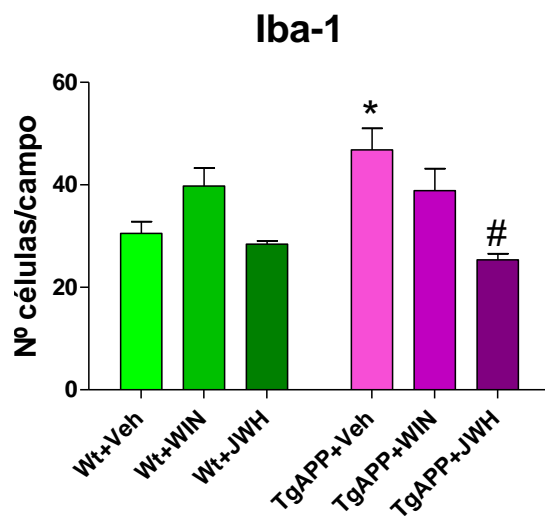


Figura 70. Recuentos de las células Iba-1 positivas en secciones de animales TgAPP y Wt tratados durante 4-5 meses con cannabinoides en corteza. WIN y JWH (dosis 0.2mg/kg/día). Los TgAPP muestran un mayor número de células positivas para Iba-1 que los controles, el tratamiento con WIN redujo el número de células positivas en los TgAPP, los animales Wt no vieron modificados el número de células Iba-1 positivas con ninguno de los dos tratamientos recibidos. Número de células positivas por campo. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (n =5-8). *p<0.05 vs Wt+Veh; #p<0.05 vs TgAPP+Veh.

El WIN no alteró ni la densidad ni la morfología de la microglía en Wt o Tg APP. En cambio, los animales tratados con JWH mostraron, en general, una densidad menor, células con procesos muy cortos y/o fragmentados independientemente del genotipo (Figura 71).

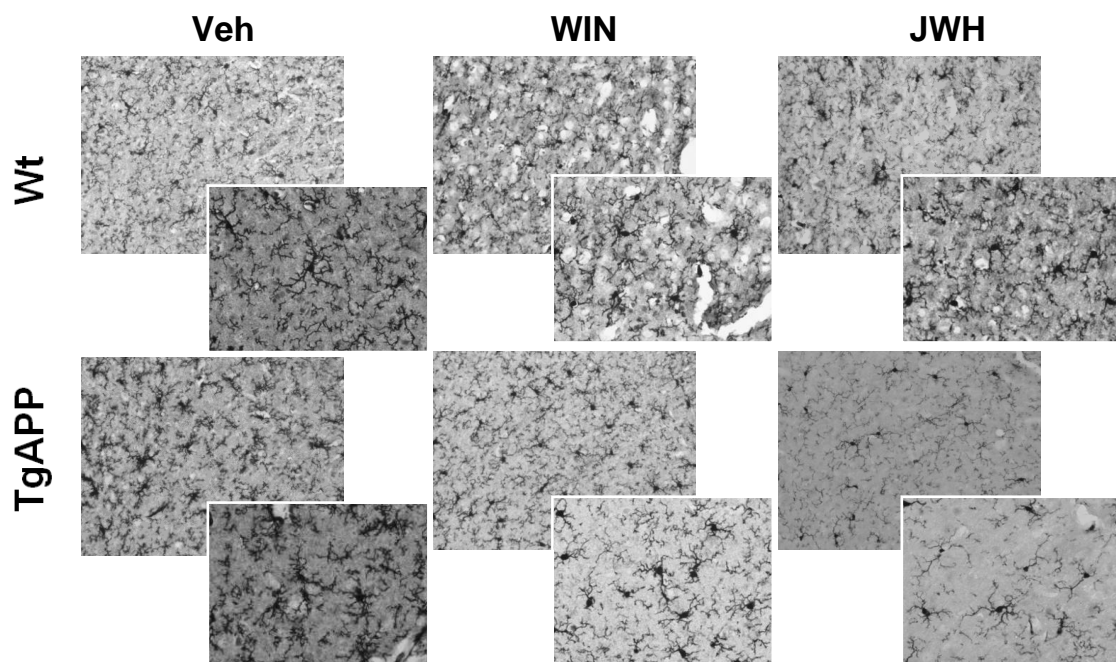


Figura 71. Inmunoreactividad para Iba-1 en secciones de corteza de animales TgAPP y Wt tratados o no con cannabinoides de manera subcrónica. WIN y JWH (dosis 0.2mg/kg/día). Podemos observar ejemplos de las fotografías utilizadas para los contajes a 20 aumentos (fotografías grandes) y fotografías en detalle para observar alguna de las características de la microglía (insertos a 40 aumentos) Los TgAPP muestran un mayor número de células positivas para Iba-1 que los controles, el tratamiento con JWH redujo el número de células positivas en los TgAPP, los animales Wt no vieron modificados el número de células Iba-1 positivas con ninguno de los dos tratamientos recibidos.

c) Localización y expresión del receptor CB₁

La localización y la expresión del receptor CB₁ se estudió por inmunocitoquímica, con un anticuerpo generado en nuestro laboratorio, dirigido frente al extremo N-terminal extracelular, purificado por afinidad utilizando el péptido antigénico. Este anticuerpo da lugar a una tinción específica de acuerdo con los estudios en el ratón KO para CB₁, y marca tanto los cuerpos neuronales, como terminales.

En la Figura 72 se encuentran imágenes representativas de los cambios observados en corteza tras el tratamiento prolongado con WIN y JWH durante 4 meses, en ratones WT y Tg APP. En la corteza de animales Wt se observó IR (inmunoreactividad) CB₁ en terminales homogéneamente distribuidos, además de en los cuerpos neuronales con un marcaje intenso, que corresponden a interneuronas GABAérgicas y algunas neuronas piramidales, localizadas en capas III-V, cuyo marcaje resultó menos intenso. En hipocampo, se observaron multitud de interneuronas intensamente teñidas, aparte de IR en todas las regiones del asta de Ammón (CA1 a CA3) y en el giro dentado, que fue algo más débil. En ratones Wt tratados con WIN las neuronas piramidales CB₁ positivas eran más evidentes y no hubo cambios notables en las interneuronas intensamente marcadas.

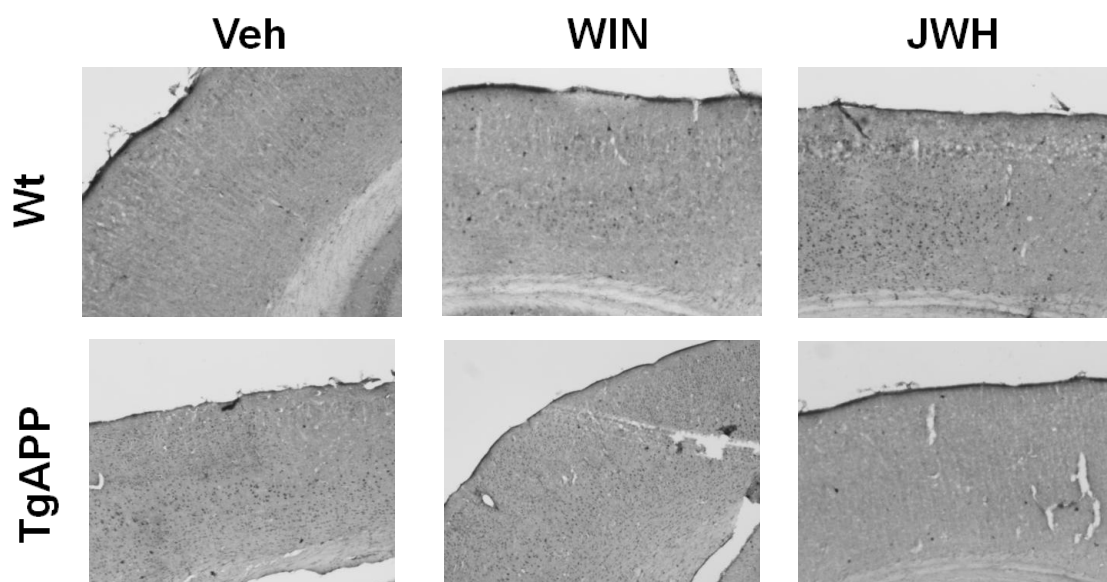


Figura 72. Secciones de corteza de animales TgAPP y Wt marcadas con Ab-CB₁. Animales tratados con WIN o JWH (dosis 0,2mg/kg/día).

RESULTADOS

En cambio en hipocampo el WIN redujo la IR existente en la capa piramidal y parecían existir menos neuronas positivas en distintas regiones. El JWH en ratones Wt no produjo cambios notables en la corteza cerebral, y en el hipocampo el número de neuronas positivas fue menor en distintas regiones, además de disminuir la IR en giro dentado y aumentarla en CA3.

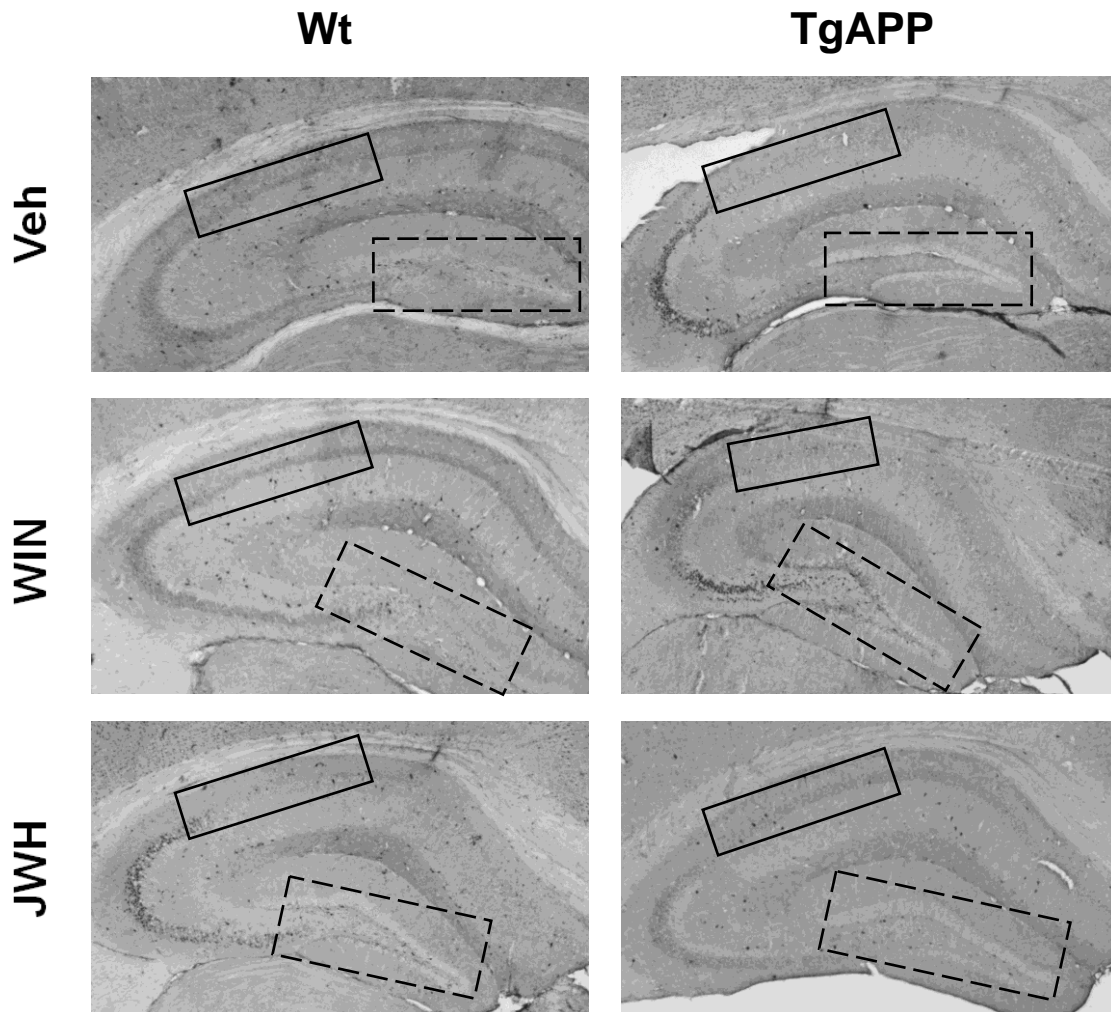


Figura 73. Secciones de hipocampo de animales TgAPP y Wt marcadas con Ab- CB₁. Animales tratados con WIN o JWH (dosis 0,2mg/kg/día). Se señala con un recuadro de línea continua los cambios en la región CA1, y con un recuadro de línea discontinua los cambios en la región del giro dentado. En CA1, se observa una reducción del marcaje en los TgAPP, que es recuperada con JWH. En el giro dentado se pierdo el marcaje en la zona granular en los TgAPP, al menos parcialmente, con WIN y JWH.

En los animales Tg APP fue muy evidente el incremento en la tinción de las neuronas piramidales, en casi todas sus capas, no existiendo cambios evidentes en las interneuronas positivas (Figura 73). La IR disminuyó marcadamente en CA1 y aún más en giro dentado, aunque aumentó en CA3. El número de interneuronas CB₁ también disminuyó de forma

notable por todo la extensión del hipocampo. El WIN en Tg APP aumentó mucho más la tinción de las neuronas piramidales en corteza. En CA1 la tinción continuó siendo reducida como en los Tg APP tratados con vehículo, pero fue mucho menor en el caso del giro dentado, y el número de interneuronas siguió siendo menor que en los Wt que recibieron veh. Comparando la IR de neuronas y neuropilo en corteza de Tg APP que recibieron JWH con la de los Wt + veh no se observaron cambios, y sí mejoría en comparación con los Tg APP. La tinción de los distintos elementos (terminales y neuronas) en hipocampo por JWH en Tg APP no mostró grandes variaciones, exceptuando la tinción incrementada de CA3 y la reducción en IR en CA1 que parecieron normalizarse.

Estos resultados en conjunto muestran una regulación de la expresión de CB₁ por los tratamientos que recibieron los animales, por un lado, y en un modelo de EA por otro. En el caso del WIN no parece contrarrestar los cambios que existen en el Tg APP en cuanto a expresión del receptor CB₁, en cambio el JWH parece haber prevenido algunas de las alteraciones tras su administración prolongada.

DISCUSIÓN



En la EA existe activación glial, en particular alrededor de las placas, que es responsable de la neuroinflamación presente en la enfermedad y fármacos anti-inflamatorios son eficaces en prevenir el riesgo de padecer la enfermedad neurológica. Previamente se demostró que la co-administración de WIN con A β intraventricular prevenía la activación microglial, los daños cognitivos y la pérdida de marcadores neuronales inducidos por el péptido. Además en estudios *in vitro* se comprobó que tanto el WIN como el JWH contrarrestaron la neurodegeneración inducida por la activación microglial con el A β . Estos resultados fueron el primer paso, para considerar la modulación microglial mediante fármacos cannabinoides una útil herramienta para intentar prevenir la patología de la EA (Ramirez et al., 2005). Por ello quisimos profundizar en los mecanismos de estas acciones terapéuticas de los cannabinoides relevantes para la EA, con particular énfasis en los posibles efectos anti-inflamatorios de esos agentes.

1. Acción de los cannabinoides sobre funciones microgliales “*in vitro*”

Estudiamos algunas de las funciones de microgliales *in vitro*, como son la migración y la producción de nitritos, fundamentales en la propagación del efecto inflamatorio de la EA. En la Tabla 11 se puede ver un resumen de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*.

Tabla 11. Tabla resumen de los resultados obtenidos en los ensayos realizados *in vitro* en microglía primaria y en las líneas N13 y BV2.

	WIN	JWH	CBD	HU	A β
Migración N13 Insertos	$\uparrow^{***}(CB_1/CB_2)$	$\uparrow^{***}(CB_2)$	-	-	$\uparrow^{***}(\text{Fib})$
Migración microglía 1^{aria} Insertos	\uparrow^{***}	\uparrow^{***}	\uparrow^{***}	\uparrow^{***}	$\uparrow^{***}(\text{Fib})$
Migración en secciones EA N13	\uparrow	\uparrow	-	-	-
Nitritos BV2	\downarrow^*	\downarrow^*	\downarrow^*	\downarrow^*	-
Nitritos microglía 1^{aria}	\downarrow^*	\downarrow^*	\downarrow^*	\downarrow^*	-

Distintos estudios han comprobado la existencia de receptores CB₁ y CB₂, tanto por técnicas inmunocitoquímicas como por PCR, en microglía primaria de ratón o en las distintas líneas microgliales (Walter et al., 2003; Ramirez et al., 2005). De acuerdo con ellos, como se esperaba, se detectó la expresión, por técnicas inmunocitoquímicas, de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, tanto en la línea microglía N13, como en microglía primaria de rata, destacando la expresión de CB₂ en el borde de los lamelipodios.

Los cannabinoides se han mostrado como prometedores agentes para el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas. Sobre todo, los cannabinoides sin efectos psicoactivos, agonistas selectivos de los receptores CB₂ o agonistas con baja afinidad por receptores cannabinoides (como el CBD), son interesantes para el traslado a la clínica.

La activación de la microglía por A β se asocia con respuestas quimiotácticas hacia los lugares en los que se acumula el mismo. Esto se corresponde con zonas de elevada densidad de microglía activada alrededor de las placas seniles en cerebros de pacientes de EA. Por ello se ha estudiado el efecto del A β ₁₋₄₀ y de los cannabinoides sobre la migración.

Se sabe que el A β induce migración, a través de membranas porosas, al interactuar con receptores quimiotácticos, FRP2 y FRP-*like*1 (Cui et al., 2002) en microglía y otras células de la estirpe inmune (Le et al., 2001; Tiffany et al., 2001). Estos receptores están acoplados a proteínas G_{i/o} y pueden modular los niveles de AMP cíclico y Ca²⁺ intracelulares (Cui et al., 2002; Franklin et al., 2003), mecanismos por los cuales pueden modular la respuesta quimiotáctica. En los experimentos aquí presentados, ha sido necesario activar a la microglía previamente con LPS, tanto en el caso de la línea N13, como de la microglía primaria, para obtener una respuesta quimiotáctica. Esto podría deberse a que el LPS promueve un aumento de la expresión de los receptores quimiotácticos FRP, necesarios para que las células lleven a cabo una respuesta quimiotáctica (Cui et al., 2002).

En el presente estudio hemos observado que los péptidos amiloides inducen respuestas quimiotácticas en células microgliales (tanto en la línea N13, como en la microglía primaria) en cultivo. Estudios previos habían mostrado que los fito y endocannabinoides inducen migración en la línea microglial BV2 (Franklin and Stella, 2003; Walter et al., 2003). No se había estudiado el efecto de los cannabinoides de síntesis. En nuestro trabajo hemos observado el agonista CB₁/CB₂ WIN y el CB₂ selectivo JWH promueven la migración en la línea N13 y que a concentraciones similares (100-200nM), el efecto observado en microglía primaria fue superior. En los ensayos de Walter y colaboradores (2003), el efecto de los cannabinoides estaba mediado por receptores cannabinoides CB₂ y el receptor para Abn-CBD. En nuestros estudios, los efectos sobre la migración de la línea N13, también fueron promovidos por el receptor CB₂, ya que dos agonistas CB₂ selectivos, JWH y HU, promovieron migración que fue

bloqueada por el antagonista CB₂, SR2, pero no por el antagonista CB₁ (Tabla 11). Sin embargo, al contrario de lo descrito previamente, la activación de receptores CB₁ también fue efectiva, de hecho la migración inducida por WIN (agonista mixto CB₁/CB₂) y por CBD, fue prevenida por el antagonista CB₁ selectivo. El CBD no alteró la migración inducida por los cannabinoides sintéticos en estudio, por tanto no se comportó como un antagonista al contrario de lo descrito por Walter y colaboradores (2003). Los cannabinoides no alteraron la respuesta quimiotáctica inducida por el A β en células N13.

La activación glial, induce la expresión de la iNOS, que puede dar lugar a generación excesiva de NO que promueve neurodegeneración. La activación de microglía con A β puede dar lugar a generación de nitritos, en particular cuando se combina con otro agente activador como IFN- γ o CD40L (Goodwin et al., 1995; Ehrhart et al., 2005). Sin embargo otros autores no obtuvieron respuesta alguna (Casal et al., 2002) o necesitaron concentraciones micromolares del péptido para obtener generación de nitritos (Novarino et al., 2004). Por ello estimulamos las células microgliales con LPS para obtener una respuesta robusta en cuanto a generación de nitritos, y que podría modelar una activación microglial.

Hemos observado un descenso concentración-dependiente en los nitritos presentes en el medio de cultivo de microglía (línea BV2 o microglía primaria) estimulada con LPS. De acuerdo con un trabajo previo en que se utilizó un cannabinoide sintético CB₁/CB₂ CP55940 en microglía estimulada con LPS/IFN- γ (Waksman et al., 1999). En la línea BV2, CBD y HU (300-400nM) fueron más potentes a la hora de reducir la concentración de nitritos que el WIN o el JWH, mientras que en la microglía primaria todos los cannabinoides fueron equipotentes (500nM) y la inhibición fue mayor (Tabla 11). En cambio otros autores necesitaron una concentración de 5 μ M del JWH015 para inhibir los nitritos generados por LPS/CD40L o A β /CD40L en microglía primaria de ratón (Ehrhart et al., 2005). El efecto de los cannabinoides fue independiente de receptor, puesto que los antagonistas ensayados no alteraron sus efectos, lo cual contrasta con el antagonismo del efecto del CP55940 con el SR1 (Waksman et al., 1999). Es cierto que estos autores añadían los compuestos 8 horas antes de estimular la microglía con LPS, lo que podría explicar la discrepancia entre los resultados obtenidos y los descritos previamente.

La ausencia de efecto de los antagonistas CB₁ y CB₂ ensayados podría explicarse por la interacción de los agonistas con otros receptores, sabemos que la farmacología de los fito- y endocannabinoides va incrementando su complejidad. Podría ocurrir que el efecto se deba a la interacción de los cannabinoides con otros receptores conocidos, pero menos estudiados como el TRPV, GPR55 o el receptor de Abn-CBD.

De acuerdo con estudios de afinidad en células transfectadas con receptores CB₁ y CB₂ humanos, el CBD mostró muy baja afinidad (2-4μM) por estos receptores (Showalter et al., 1996). Uno de los aspectos más interesantes de nuestro estudio es que el CBD ha mostrado efectos sobre funciones microgliales a concentraciones nanomolares (similares a las de otros cannabinoides), y que muchos de estos efectos parecen mediados a través de receptor CB₂. Esto podría haber pasado desapercibido dado que la expresión de CB₂ en un cerebro normal es muy pequeña, siendo observable tan solo por PCR cuantitativa, por ello puede que la acción de CBD a través de CB₂ haya resultado difícil de detectar en estudios anteriores.

2. Efectos del tratamiento ip subcrónico con cannabinoides sobre un modelo farmacológico de EA “in vivo”

Una vez comprobado que el CBD y otros agonistas cannabinoides eran eficaces en modificar funciones de la microglía en cultivo se estudió si serían capaces de contrarrestar el déficit cognitivo inducido por Aβ en ratón y reducir marcadores de inflamación, como la expresión de citoquinas pro-inflamatorias.

La utilización de este modelo se ve justificada por estudios previos, en los que la administración repetida de Aβ₂₅₋₃₅ icv a ratas durante 7 días, originaba disminución de receptores muscarínicos (Pavia et al., 2000) y alteraciones cognitivas en tareas de navegación espacial (Ramirez et al., 2005). Es más Mazzola y colaboradores (2003), observaron déficits en el ensayo de evitación pasiva en ratones a los 7 días de la administración de una única dosis de Aβ₂₅₋₃₅ o Aβ₄₂ (Mazzola et al., 2003). Otros autores (van der Stelt et al., 2006) mostraron que una sola inyección intracortical de Aβ interfería con el aprendizaje en ese mismo ensayo a los 12 días. Por último, Medeiros y colaboradores (2007), al inyectar intracerebroventricularmente Aβ₄₀ fibrilado consiguieron un déficit cognitivo en *water maze* a los 7 días de la administración del Aβ que pudieron revertir con anticuerpos frente a TNF-α (Medeiros et al., 2007).

En nuestros estudios los animales que habían recibido una única inyección de Aβ mostraron un peor desempeño en la tarea de aprendizaje espacial que los animales control, que aprendieron tras 5 días de entrenamiento. Los ratones sometidos a un tratamiento subcrónico con WIN y CBD manifestaron un mejor aprendizaje de la tarea, en comparación con los animales tratados con vehículo, a los 7-14 días de haber recibido la inyección de Aβ (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Sin embargo, en este modelo los agonistas CB₂ (JWH y HU) no fueron efectivos. Estos resultados están de acuerdo con la eficacia del WIN en prevenir los déficits cognitivos inducidos por Aβ, co-administrados intraventricularmente (Ramirez et al., 2005) y con la del tratamiento subcrónico con un agente que aumenta la

disponibilidad de endocannabinoides, como el inhibidor de la recaptación VDM11, en ensayos de evitación pasiva (van der Stelt et al., 2006).

También se estudió la posible implicación de la modulación glial a través de la medida de la expresión de citoquinas. En animales inyectados con A β , se observó un marcado incremento de la expresión de IL-6 y TNF- α . El tratamiento con WIN y CBD disminuyó la expresión de IL-6, mientras que tan solo WIN pudo reducir parcialmente, la expresión de TNF- α (Tabla 12). De manera que en este modelo farmacológico *in vivo* de la EA los cannabinoides mostraron beneficiosos efectos sobre parámetros cognitivos (*water maze*), lo cual podría estar mediado por la modificación de la activación glial.

Existen distintas evidencias de la inhibición de la liberación y/o expresión de TNF- α por WIN en cultivos de microglía (Facchinetti et al., 2003; Ramirez et al., 2005) que explicarían su efecto *in vivo* tras su administración subcrónica. Además en otros estudios con este cannabinoide CB₁/CB₂ se ha observado una disminución en la activación microglial inducida por LPS (Marchalant et al., 2007). Por otro lado, se ha descrito que la administración aguda de CBD disminuye los niveles circulantes de TNF α en un modelo de inflamación con carragenina (Lodzki et al., 2003; Costa et al., 2004) y la disminución tanto de la astrogliosis como de distintos parámetros de activación glial, como GFAP, iNOS e IL-1 β (Esposito et al., 2007a) en ratones que habían recibido una inyección intrahipocampal de A β .

Tabla 12. Resumen de los resultados obtenidos en el tratamiento *in vivo* de ratones C57 con A β y el efecto de cuatro cannabinoides de distinto perfil farmacológico.

	SCR+Veh	A β +Veh	A β +WIN	A β +JWH	A β +CBD	A β +HU
Water maze	Ref.	↑*	Normaliza	↑*	Normaliza	↑*
TNF-α	Ref.	↑***	↑**	-	↑**	-
IL-6	Ref.	↑***	Normaliza	-	Normaliza	-

Las diferencias se expresan respecto al grupo experimental SCR+Veh, indicándose con el término "Ref" (grupo de referencia). En el caso de *water maze* la flecha indica, aumento o disminución en el T^º de latencia para encontrar la plataforma.

No queda claro porqué los agonistas selectivos CB₂ HU y JWH, que mostraron una eficacia similar en cuanto a funciones microgliales no modificaron en absoluto el deterioro cognitivo inducido por el A β *in vivo*. Por un lado el JWH, que también disminuyó la liberación del TNF α *in vitro* (Ramirez et al., 2005), tuvo un efecto terapéutico en ratones Tg APP (ver más adelante), y disminuyó la activación glial y distintos parámetros anti-inflamatorios en modelos de enfermedades neurológicas (Correa et al., 2007; Palazuelos et al., 2009). La información

relativa al HU es escasa, pero Hanus et al. (1999) habían comprobado su efecto antiinflamatorio. Es más, en un modelo de isquemia/reperfusión el HU administrado de manera preventiva, disminuyó los niveles de TNF α y de caspasa-3, entre otros parámetros (Rajesh et al., 2007).

No hay duda de que en la EA ocurre una inflamación en la que están implicados astrocitos y microglía. La respuesta inflamatoria posee efectos tanto beneficiosos, como perjudiciales para el desarrollo de la enfermedad. La microglía activada libera moléculas tóxicas, como NO o citoquinas pro-inflamatorias que pueden contribuir a la neurodegeneración. Al mismo tiempo, estas células liberan factores tróficos, migran hacia las zonas afectadas y fagocitan neuronas muertas, contribuyendo a la neuroprotección. El resultado de los procesos inflamatorios será una combinación de ambos efectos. Parece que los cannabinoides regulan estas funciones de forma positiva. De hecho estos compuestos contrarrestan el incremento de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α y la consecuente neurodegeneración tras su administración *in vivo* e *in vitro* (Ramirez et al., 2005). Además los cannabinoides promueven migración, mecanismo que, en última instancia, permitirá la fagocitosis de los depósitos de A β . Por tanto, este tipo de fármacos, con propiedades neuroprotectoras y efectos antiinflamatorios (Walter and Stella, 2004) son interesantes para la prevención de la inflamación de la EA. Concretamente los agonistas CB₂ selectivos resultan especialmente interesantes, al carecer de efectos psicoactivos (Hanus et al., 1999; Sanchez et al., 2001).

3. Efectos del tratamiento crónico con cannabinoides sobre un modelo transgénico de EA

El modelo transgénico Tg2576 de la enfermedad de Alzheimer es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la EA, en el que los animales desarrollan algunos de los síntomas cognitivos y neuropatológicos de la enfermedad. Presentan niveles detectables de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ a partir de los 6 meses de edad (Hsiao et al., 1996) y comienzan a aparecer placas a partir de los 12-14 meses (Arendash and King, 2002). Por esta razón y, además porque el desarrollo de las alteraciones comportamentales y neuropatológicas es más lento que en otros modelos, proporcionando así un marco temporal más amplio para el estudio de estrategias preventivas, elegimos este modelo experimental.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en el presente estudio, es la vía de administración utilizada para los cannabinoides, oral, en el agua de bebida. En un estudio previo se había utilizado la coadministración intraventricular de los cannabinoides con A β

(Ramirez et al., 2005). La ventaja de aquella vía de administración es doble, evita una manipulación excesiva y estresante para los animales durante un periodo prolongado y por otro lado constituye una vía de fácil traslado a la clínica en humanos. Elegimos esta administración basándonos en trabajos previos (Steffens et al., 2005; Gertsch et al., 2008), en los que administraban THC 0.1 mg/kg/día. Durante los 4 meses que duró el estudio se monitorizó tres veces por semana el consumo de agua y no se encontraron diferencias en los niveles de consumo de los distintos grupos experimentales. Esto parece indicar que los animales no rechazaban los compuestos en la bebida, y que tampoco existían efectos reforzantes a la dosis utilizada.

3.1. Pruebas de comportamiento

Es bien sabido que los cannabinoides inducen hipoactividad tras su administración aguda y que se trata de un efecto dosis-dependiente (Tulunay et al., 1982; Jarbe et al., 2006). En este trabajo el WIN incluso a una dosis baja de 0.2 mg/kg disminuyó de forma significativa la actividad motora, tanto la actividad horizontal, vertical como las esterotipias. En cambio el JWH, a la misma dosis, careció de efecto, de acuerdo con estudios anteriores (Sanchez et al., 2001). Por otro lado el WIN a esa dosis redujo en menor medida la actividad motora en los ratones Tg APP, que indicaría una menor sensibilidad de los receptores CB₁ que median dicho efecto.

Los ratones Wt tratados con WIN y con JWH durante 2 meses recorrieron la misma distancia que los tratados con vehículo, y mostraron un incremento en la actividad vertical. Tras 4 meses de tratamiento sólo el WIN incrementó la actividad horizontal, y ambos compuestos incrementaron las elevaciones de los ratones Wt. En el caso del primero se podría pensar en el desarrollo de tolerancia fuera el responsable (Hollister, 1978; Hampson et al., 2003), y que la tolerancia continúa progresando con la duración del tratamiento. En el caso del agonista CB₂ cabría en cambio pensar que continúa siendo selectivo en cuanto a actividad locomotora se refiere y por tanto carente de efecto psicoactivo.

Los ratones Tg APP (9 y 11 meses de edad) mostraron hipoactividad respecto a los Wt (Tabla 13). Esto, en principio, contradice los resultados obtenidos por otros grupos, en los que los Tg2576 presentan por lo general un aumento de la actividad locomotora (Hsiao et al., 1996; Lalonde et al., 2003; Gil-Bea et al., 2007). Sin embargo la disparidad entre nuestros resultados y los de otros grupos se explica al profundizar en los protocolos utilizados; Gil-Bea y colaboradores sometieron a los animales a dos sesiones de 30 minutos con 24 horas de

Tabla 13. Resumen de las alteraciones encontradas en el modelo TgAPP durante su seguimiento, y efectos del tratamiento crónico con agonistas cannabinoides in vivo (a los 2 y 4 meses de tratamiento) y post mortem (11-12 meses de edad).

		Wt	Wt+WIN	Wt+JWH	Tg	Tg+WIN	Tg+JWH	EA	
Actividad motora	Distancia horizontal 2meses	Ref.	=	=	↓***	Normaliza	↓**	↓ actividad diurna ↑ actividad nocturna	
	Elevaciones 2meses	Ref.	↑*	↑**	↓***	↓***	Normaliza		
	Dist. Horizontal 4meses	Ref.	↑**	=	↓*	Normaliza	↓*		
	Elevaciones 4meses	Ref.	↑*	↑**	↓*	Normaliza	Normaliza		
Aprendizaje	Water Maze 5ºDia 2meses	Ref.	=	=	↑**	↑**	↑**	Deficits cognitivos	
	Water Maze 4meses	-----Buena retención de memoria-----							
	Rec. de objetos 4meses	Ref.	=	=	↓discriminación	↓discriminación	Normaliza		
Neuroimagen	ADC Cx 2meses	Ref.	=	=	↑*	Normaliza	Normaliza	↑	
	PET CxF/CxPF/Hp 4meses	Ref.	↓*	=	↓*	↓*	Normaliza	↓	
Metabolismo del Aβ	Aβ42				Ref.	↓*	↓*	↑	
	Aβ40				Ref.	=	↓*	↑	
	P-GSK3β	Ref.	=	=	↓*	Normaliza	Normaliza	↓	
Parámetros inflamatorios	COX-2	Ref.	=	↓*	↑***	Normaliza	Normaliza	↑	
	GFAP	Ref.	=	=	=	=	=	↑	
	IL6	Ref.	=	=	=	=	=	↑	
	TNF-α	Ref.	=	=	↑***	Normaliza	Normaliza	↑	
Sistema cannabinoide	CB1	Ref.	=	=	↑**	↑**	Normaliza	↓	
	CB2	Ref.	=	↓*	=	↓*	↓*	↑	
	2-AG	Ref.	=	=	=	=	=	¿?	
	AEA	Ref.	↓***	↓***	↓*	↓**	↓**	¿?	
ICQ	GFAP	Ref.	=	=	=	=	=	↑	
	Iba-1	Ref.	=	=	↑*	=	↓#	↑	

Las diferencias que se expresan respecto a los grupos experimentales Wt o Tg, indicándose en cada caso con el término "Ref." (grupo de referencia). CxF, cortex frontal; CxPF, cortex

parietal frontal; Hp, hipocampo. Aquellas modificaciones que resultan positivas para mejorar la patología se indican en verde. En la última columna se indican algunas de las alteraciones que se observan en la EA, destacando en azul aquellas que mimetiza el modelo transgénico utilizado. En el caso de *water maze* la flecha indica, aumento o disminución en el Tº de latencia para encontrar la plataforma.

diferencia teniendo en cuenta solo la segunda, en la que los animales están habituados. Lalonde y colaboradores utilizan 3 sesiones de 5 minutos en 3 días consecutivos, y otros investigadores utilizan sesiones de tan solo 3 minutos (Deacon et al., 2008). Estos autores llevaron a cabo habituación de los animales a la arena previo a las valoraciones, mientras que los Wt se movían menos al conocer la arena, los Tg APP reaccionaban a ella como si fuera nueva y la exploraban. Por tanto es lógico que los resultados de nuestros animales, que no han sido habituados a la arena, presenten discrepancia con los de otros investigadores.

Destacamos que con el tratamiento con los cannabinoides las estereotipias no se vieron afectadas, independientemente del genotipo o del tratamiento recibido (Tabla 13). En cuanto a los transgénicos, el JWH elevó a niveles normales el número de elevaciones a los 2 meses, mientras que a los 4 meses el WIN mejoró la distancia horizontal recorrida. Es decir, los cannabinoides pueden modificar positivamente algunas de las alteraciones motoras presentes en el modelo.

Algunos cannabinoides que inducen efectos psicoactivos interfieren con el aprendizaje y procesos de memoria (Lichtman et al., 2002a), efecto que es dosis-dependiente. Así, la administración aguda de WIN a partir de 1mg/kg, aunque no a las dosis de 0.1 o 0.3 mg/kg, interfiere en el desempeño en el *water maze* (Varvel and Lichtman, 2002), mientras que en el laberinto de ocho brazos la dosis ED₅₀ fue de 2,2 mg/kg (Lichtman et al., 1995). Sin embargo ni el WIN ni el JWH administrados en el agua de bebida modificaron el curso del aprendizaje en comparación con los tratados con el vehículo. Una explicación sería la dosis baja que había sido elegida, ya que otro cannabinoide mixto CB₁/CB₂, el CP55,940, administrado durante 21 días a dosis crecientes entre 0.15 y 0.3 mg/kg no alteró el reconocimiento de objeto nuevo en ratas adultas (O'Shea et al., 2004) y en el caso del WIN se podría invocar a una posible tolerancia a su efecto agudo (Abood and Martin, 1996; Hampson et al., 2003).

En nuestro estudio no observamos alteraciones significativas en el aprendizaje de la tarea espacial (*water maze*) en ratones Tg APP de 9 meses de edad (2 meses de tratamiento), tan solo una ligera diferencia durante el último día del ensayo. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores. Así Hsiao y colaboradores (1996) fueron los primeros en describir que las alteraciones en el aprendizaje espacial (*water maze* y *Y-maze*) comienzan entre los 9 y 10 meses de edad. Estudios posteriores han descrito resultados contradictorios, Arendash y colaboradores (2002) no observaron diferencias significativas al estudiar el modelo

entre los 3 y los 19 meses de edad utilizando un protocolo muy similar al de nuestro estudio (Arendash and King, 2002; King and Arendash, 2002). Tampoco en hembras de 15 meses de edad se observaron alteraciones en el aprendizaje espacial (Bizon et al., 2007). Otros estudios, en los que utilizaron un protocolo de *water maze cued* (plataforma visible) describieron que las alteraciones comienzan entre los 6 (Westerman et al., 2002) y 9 meses de edad (King and Arendash, 2002). Es cierto que el ligero deterioro cognitivo observado en el quinto día por los Tg APP no fue contrarrestado por los cannabinoides, pero cabría destacar que los fármacos no empeoraron el aprendizaje en ninguno de los animales tratados. Dos meses después, se repitió el ensayo de aprendizaje espacial y los animales mostraron una buena retención de la memoria espacial, que no se vio afectada ni por el genotipo, ni por el tratamiento. Este es el primer trabajo (hasta donde nosotros sabemos) en el que se ha tratado y analizado a la misma cohorte de animales durante un periodo prolongado de tiempo.

El siguiente ensayo de comportamiento, reconocimiento de objeto nuevo, se llevó a cabo tan solo a los 4 meses de iniciar el tratamiento. Este ensayo había sido utilizado previamente en el Tg2576 por Tagliatela y colaboradores (2009), los cuales detectaron un deterioro de la retención de la memoria a los 5 meses de edad a las 4 y 24 horas. Es importante tener en cuenta que mientras que el laberinto de agua está asociado a funcionalidad del hipocampo, el reconocimiento de objetos está asociado a corteza perirrinal (Barker et al., 2007) y por lo tanto no reflejan exactamente el mismo tipo de alteraciones. Los resultados obtenidos muestran una alteración del reconocimiento de un objeto nuevo en los transgénicos en comparación con los controles, que fue prevenido por el tratamiento oral con JWH durante 4 meses, de nuevo, un agonista CB₂ resultó más efectivo que uno mixto CB₁/CB₂. También es importante destacar que ninguno de los cannabinoides alteró el aprendizaje de los animales control. Resumiendo el tratamiento oral prolongado con WIN y JWH no es perjudicial en cuanto a aprendizaje y memoria se refiere en ratones Wt y el déficit cognitivo del modelo de EA fue normalizado por el tratamiento con JWH.

3.2. Estudios longitudinales de neuroimagen

Uno de los aspectos más interesantes del trabajo aquí presentado es la utilización de técnicas de neuroimagen para el seguimiento de un modelo transgénico de la enfermedad y su tratamiento crónico con cannabinoides. El objetivo que perseguíamos era doble, el seguimiento de la patología tipo EA, y el potencial traslado de protocolos de seguimiento a la

clínica. Además de estudiar la utilización de técnicas multi-paramétricas como una herramienta útil en el diagnóstico de la EA.

Antes de comenzar a valorar los resultados obtenidos debe tenerse en cuenta que las técnicas de resonancia están optimizadas para humanos y que los aparatos fabricados para su utilización experimental en animales pequeños están implementados para su uso en ratas, siendo su utilización en ratones un desafío (Choi et al., 2007). Por lo que los resultados aquí presentados poseen un valor aún mayor.

La difusión del agua se ve afectada por los componentes estructurales (orgánulos y macromoléculas); las barreras físicas (membranas celulares) y las propiedades físico-químicas del tejido (viscosidad, temperatura). Diversas alteraciones patológicas de la EA pueden afectar al movimiento del agua: el edema, alteraciones de la homeostasis iónica, alteraciones del citoesqueleto, la celularidad, así como la aparición de depósitos proteicos intra y extracelulares. En conjunto, las alteraciones de la EA, dan lugar a la alteración de las barreras que de forma natural impiden el movimiento del agua; variando, de este modo, los valores de ADC. En enfermos de EA se ha descrito de forma general un aumento en los valores de ADC en pacientes de EA respecto a individuos sanos; sobre todo en sustancia blanca, ya que la muerte neuronal y la consecuente pérdida de fibras reducen las barreras para el movimiento del agua (Hanyu et al., 1998; Kantarci et al., 2001). Estos estudios no han sido capaces de diferenciar entre EA y DCL. No existen demasiados estudios realizados en modelos transgénicos sobre los coeficientes de difusión del agua. El primer estudio, hasta donde sabemos, se realizó en el modelo APP23, en el cual se encontró una disminución en los valores de ADC en caudado-putamen a los 25 meses de edad que se adscribió a un aumento en la gliosis (celularidad) y los depósitos de A β (Mueggler et al., 2004). En estudios llevados a cabo en el modelo Tg2576 no se observaron alteraciones en las imágenes de la tensión en la difusión del agua (parámetro ligeramente distinto al ADC) en animales de 8 meses de edad (Sun et al., 2005). En animales de 12-16 meses de edad del modelo TgCRND8 no se han encontrado diferencias significativas en ninguna de las zonas estudiadas (Thiessen et al.). En nuestro estudio hemos encontrado un aumento en los valores de ADC en el cortex de animales TgAPP respecto a los transgénicos a los 9 meses de edad, lo que coincide con los resultados obtenidos en la EA por Hanyu y colaboradores (1998) y Kantarci y colaboradores (2001). Lo más interesante es que el tratamiento tanto con WIN como con JWH durante dos meses revertió este efecto, sin afectar a los valores de ADC de animales Wt. No observamos alteraciones en hipocampo, lo que coincide con los resultados de Hanyu y colaboradores (1998) en humanos en pacientes de EA. Existe una relación inversa entre alta celularidad (valores de ADC bajos) y los niveles Cho/Crea (Gupta et al., 1999). Cuando existe edema citotóxico también existe una reducción en ADC

(Schaefer et al., 2000). Sin embargo, un incremento en ADC se considera indicativo de edema vasogénico (McManus et al., 1995) y se ha descrito en la intoxicación aguda con amonio en distintas regiones cerebrales (Cauli et al., 2007) y en enfermedades neurológicas crónicas (Gass et al., 2001). Cuando comparamos los resultados obtenidos a 2 y 4 meses de tratamiento, observamos que en cortex no existen diferencias significativas, mientras que en hipocampo existe una tendencia general a disminuir los niveles de ADC a los 4 meses de tratamiento, efecto que se debe seguramente a un efecto compensatorio que desarrollan con la edad.

La transferencia de magnetización aumenta cuanto mayor es el número de biomoléculas en solución capaces de solvatar agua, cuando existe muerte celular se liberan biomoléculas, pudiendo incrementarse este parámetro. En humanos se han encontrado resultados variables, desde aumentos en los valores de MT en lóbulo temporal (Hanyu et al., 2000; Bozzali et al., 2001); hasta disminuciones respecto a los controles en la zona del hipocampo (Hanyu et al., 2001). Los estudios de Hanyu y colaboradores, destacan que la correlación entre los resultados obtenidos en el test mini-mental y los valores de MT podrían ayudar a distinguir la demencia tipo Alzheimer de la no tipo Alzheimer. Sin embargo no existían estudios previos realizados en modelos transgénicos de la EA que nos pudiesen orientar. Para este caso es importante destacar que, en el modelo utilizado en nuestro estudio, no existe muerte neuronal, por lo que es lógico que la transferencia de magnetización no se vea afectada en el mismo, ya que al no haber muerte neuronal no se liberan fosfolípidos al medio que pudieran solvatar agua y con ello modificar la MT, como de hecho ha ocurrido. Tampoco observamos un efecto del tratamiento con cannabinoides, cuyo efecto sobre la transferencia de magnetización no se había estudiado anteriormente.

La espectroscopia nos da una idea de la composición química de un volumen tisular. En diversos estudios recientes llevados a cabo en pacientes de EA y DCL se han encontrado una serie de hallazgos consistentes, como son una reducción en los cocientes NAA/Crea principalmente en hipocampo y distintas regiones corticales, de alrededor de un 10% en los pacientes de EA respecto a individuos sanos (Kantarci et al., 2000; Griffith et al., 2007; Kantarci et al., 2007; Wang et al., 2009). Además en individuos presintomáticos que portan mutaciones de EA familiar también se encontró NAA/Crea disminuídos (Godbolt et al., 2006). Existe algo más de controversia respecto a si existen diferencias entre EA y DCL, Wang y colaboradores (2009) no encontraron diferencias entre EA y DCL en hipocampo; mientras que Kantarci y colaboradores (2000) describieron mayores niveles de NAA/Crea en pacientes de DCL que en los de EA, aunque en otras zonas cerebrales, lóbulo temporal y lóbulo cingulado. Otro hallazgo persistente en enfermos de EA es el aumento de los niveles de ml/Crea en EA respecto a controles, alrededor de un 19% (Kantarci et al., 2000; Wang et al., 2009). Otros metabolitos

que se han visto afectados en la enfermedad son: scyllo-Inositol/Crea que se ha visto aumentado el EA (Griffith et al., 2007) o incrementos de la Cho/Crea en pacientes de EA (Kantarci et al., 2000; Kantarci, 2007) versus controles o DCL. También existen una serie de estudios de MRS realizados en modelos transgénicos de la EA, el primer estudio se realizó en el modelo utilizado por nosotros, el Tg2576, en animales de 19±2 meses; en el análisis *in vitro* de muestras de corteza encontraron una reducción en los niveles de NAA, glutamina y glutatión, además de una elevación en los niveles de taurina; *in vivo*, por el contrario, solo se encontraron reducidos los niveles de NAA y aumentados los de taurina (Dedeoglu et al., 2004). El resto de los estudios realizados, hasta donde nosotros sabemos, se han llevado a cabo en dobles transgénicos APP-PS1 y APP-PS2. En el APP-PS1 se han observado disminuciones en los niveles de NAA y Glu y aumentos de Myo-I a partir de los 3 meses de edad (Marjanska et al., 2005); en un estudio posterior vieron que el myo-I se veía aumentado desde los 2,5 meses de edad, mientras que el NAA y el Glu disminuían desde los 6,5-9 meses (Oberge et al., 2008) y que las alteraciones eran muy destacadas al año de vida (Woo et al., 2010). En lo que respecta al APP-PS2 la disminución de NAA/Crea comienza a ser detectable a partir de los 20 meses de edad (von Kienlin et al., 2005). Dados estos antecedentes resultaba lógico investigar las posibles alteraciones presentes en nuestros sujetos de estudio, sin embargo, no hemos encontrado ninguna diferencia entre los animales Wt y TgAPP; a ninguna de las dos edades analizadas. Resulta lógico que no hayamos encontrado diferencias a los 9 y 11 meses de edad puesto que estudios anteriores en el mismo modelo encontraron disminuciones de NAA a partir de los 19 meses de edad y en dobles transgénicos (cuya evolución es más rápida) las alteraciones aparecen a los 9 meses (APP-PS1) o 20 meses de edad (APP-PS2). Tampoco observamos ninguna influencia del tratamiento crónico con los cannabinoides, sobre los niveles de NAA/Crea ni Cho/Crea en ninguna de las dos zonas cerebrales estudiadas (estriado e hipocampo). Es cierto que Hermann y colaboradores (2007), observaron una disminución significativa del ratio NAA/Crea en individuos consumidores de cannabis respecto a sujetos control en corteza prefrontal dorsolateral, además de una correlación significativa en putamen/globo pálido entre los niveles de CBD (analizados en el cabello) y el ratio NAA/Crea en los consumidores. Este cambio era similar al que ocurre en esquizofrénicos. Por tanto la ausencia de efecto puede considerarse positiva, ya que el tratamiento crónico con dosis bajas de cannabinoides (0,2mg/kg/día WIN y JWH) no ha alterado los niveles de los metabolitos cerebrales.

De acuerdo con resultados obtenidos previamente en un estudio longitudinal (Mosconi et al., 2009), o estudios puntuales (Kumar et al., 1991; Minoshima et al., 1998), ambos en pacientes de EA; y los obtenidos en modelos transgénicos de la EA (Kuntner et al., 2009),

hemos hallado una reducción en la captación de glucosa en los animales TgAPP respecto a los Wt a los 11 meses de edad. Este hallazgo se corresponde con una alteración cognitiva observada en el ensayo de reconocimiento de objetos a los 11 meses de edad. Esta reducción en la captación de glucosa se pudo observar en 3 de las 4 zonas (ROIs) analizadas; cortex frontal, cortex temporal-parietal e hipocampo; mientras que en estriado no encontramos diferencias estadísticamente significativas, esto coincide con el hecho de que es la zona menos afectada tanto en el modelo como en la EA. El WIN disminuyó significativamente el consumo de glucosa en los Wt. Parece que este hecho, de nuevo, indica tolerancia al efecto agudo del compuesto que dio lugar a un modesto aunque estadísticamente significativo aumento en la captación de glucosa (PET). Estos últimos resultados son similares a los obtenidos en secciones de hipocampo *in vitro* tras adición de WIN, y que dado que el antagonista CB₁ AM251 disminuye la captación de glucosa indican que existe un control endocannabinoide mediado por el receptor CB₁ (Kofalvi, comunicación personal). El JWH mejoró significativamente, hasta niveles control, la captación de glucosa en los transgénicos, lo que se asocia con la mejora de parámetros tanto cognitivos, como bioquímicos (Tabla 13).

En el contexto de la neuroimagen resulta especialmente interesante el análisis conjunto de todos los parámetros analizados, análisis multivariante. Llevamos a cabo este tipo de análisis para intentar profundizar en las interrelaciones existentes entre los resultados obtenidos. En general, encontramos correlaciones entre distintos parámetros de neuroimagen y entre distintos parámetros de comportamiento, como era de esperar. Uno de los resultados más interesantes es la correlación a 2 meses de tratamiento (9 meses de edad) entre ADC en corteza, con el resultado de *water maze* el 5º día de entrenamiento en los animales tratados con vehículo, lo que demuestra que las alteraciones en ADC se reflejan en alteraciones en aprendizaje. Esta correlación se pierde cuando se trata a los animales tanto con WIN como con JWH. A los 4 meses de tratamiento (11 meses de edad) no encontramos correlación entre parámetros de neuroimagen y cognitivos en animales tratados con vehículo, probablemente debido a la edad y a la ausencia de efecto de los tratamientos. A los 4 meses de tratamiento los animales tratados con WIN o JWH presentan un mayor número de correlaciones que los tratados con vehículo, en general, quizá debido a que los cannabinoides revierten, en cierto modo los efectos de la edad en estos animales, lo que sería beneficioso.

3.3. Estudios bioquímicos

a) Niveles de A β en corteza, transporte de A β a LCR y niveles de GSK3 β

Cuando iniciamos este estudio no existía ninguna evidencia que nos hiciese pensar que los cannabinoides fuesen capaces de modificar los niveles de A β en un modelo transgénico de la EA. Uno de los estudios más completos sobre los niveles cerebrales, sanguíneos y en LCR de A β_{40} y A β_{42} soluble e insoluble en el Tg2576 fue realizado por Kawarabayashi y colaboradores (2001). En este estudio vieron que los niveles de A β , en general, aumentaban exponencialmente en cerebro, entre los 6 y 10 meses de edad; mientras que, de manera simultánea, en LCR y sangre observaban una disminución paulatina de los mismos (Kawarabayashi et al., 2001). De la misma manera, hemos encontrado elevados niveles de A β_{40} y A β_{42} soluble en la corteza de animales Tg2576 de 11-12 meses de edad. Kawarabayashi y colaboradores (2001) mostraron que las placas amiloides eran evidentes a partir de los 12 meses de edad pero en pequeño número. Coincidiendo con estos resultados, en estudios inmunohistoquímicos de nuestros animales de 11-12 meses de edad, encontramos sólo alguna placa aislada, en alguna sección de los animales Tg2576. En cuanto a los animales que habían recibido un tratamiento oral con cannabinoides durante 4 meses, observamos que WIN redujo los niveles de A β_{42} , mientras que JWH disminuyó tanto los niveles de A β_{42} , como los de A β_{40} , en corteza. En otro estudio, la administración crónica del HU210 a la dosis de 50 μ g/kg en ratones Tg APP/PS1 durante no modificó en absoluto ni el área ocupada por las placas ni los niveles de A β , además de resultar tóxico para los animales (80% de mortalidad) (Chen et al., 2010). Por lo tanto es la primera vez que se describe este efecto, que podría ser muy beneficioso para la progresión de la enfermedad, especialmente en el caso de JWH, ya que reduce los niveles de ambos fragmentos amiloides y que carece de efectos psicoactivos.

El mecanismo mediante el cual los cannabinoides llevan a cabo esta reducción era desconocido, para esclarecerlo, estudiamos el transporte a LCR a través de los plexos coroides. El transporte del A β cerebral hacia circulación periférica o LCR es una estrategia terapéutica que está siendo estudiada activamente hoy en día. Así, diversos estudios han mostrado que el transporte de A β a LCR a través de los plexos, es mediado por el receptor de la megalina y el factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1), y que la modulación de este transporte tiene efectos neuroprotectores (Carro et al., 2002; Carro et al., 2005). De manera que los niveles de A β en LCR están, íntimamente relacionados con sus niveles cerebrales, por lo que era lógico analizar si los cannabinoides pueden modificar el transporte de A β a través de los plexos coroides. Por otro lado, la primera descripción de la presencia de componentes del sistema

endocannabinoide en los plexos coroides, se realizó en el año 2000 cuando se detectó la presencia de la FAAH (Egertova et al., 2000), enzima de degradación de AEA. Más tarde, en el 2004, se describió la presencia de receptor CB₁ en las células endoteliales de los plexos (Ashton et al., 2004). En los estudios de transporte a través de los plexos presentados en nuestro estudio, observamos que tanto WIN como JWH, aceleraban el transporte de Aβ₄₀ a través de los plexos, siendo el efecto de este último mucho más marcado. Esto podría explicar porqué los animales tratados oralmente con WIN y JWH presentan reducción de los niveles de Aβ en corteza, en comparación con los tratados con el vehículo, y porqué el efecto positivo de JWH abarca mayor número de parámetros.

Un rasgo invariable de la EA es el incremento en tau hiperfosforilado, la quinasa implicada es la GSK3β. Es más, el Aβ es capaz de aumentar la forma activa de la enzima (no fosforilada) (Longo and Massa, 2004) y se están investigando terapias para la EA que prevengan la activación de esta enzima. Hemos observado una disminución de la forma fosforilada de la GSK3β en animales transgénicos respecto a los Wt lo que supondría un incremento en la fosforilación de tau. La inactivación por fosforilación de GSK3β podría ocurrir por la activación de la vía PI3K/Akt (o PKB). Diferentes estudios han demostrado que los cannabinoides son capaces de activar esta vía de señalización. Así se ha descrito que el THC a través de receptor CB₁, era capaz de activar la vía PI3K/PKB que al fosforilar a la GSK3β la inactivaba (Gomez Del Pulgar et al., 2002; Ozaita et al., 2007). Otros autores habían visto que los receptores CB₂ también estaban implicados en la activación de la ruta de fosforilación de la GSK3β (Molina-Holgado et al., 2002). En nuestro estudio los cannabinoides WIN y JWH previenen la fosforilación de GSK3β, lo que disminuiría la fosforilación de tau, lo que podría ser beneficioso para la progresión de la patología.

b) Los cannabinoides modulan parámetros inflamatorios del Tg2576

La inflamación es un proceso fundamental en el desarrollo de la EA, y los cannabinoides son unos conocidos agentes moduladores de la respuesta inflamatoria, por ello era importante estudiar cómo había afectado el tratamiento prolongado con WIN y JWH a algunos parámetros inflamatorios. Estudiamos la expresión de la enzima COX-2 en hipocampo porque está implicada en la síntesis de ácido araquidónico y otros mediadores de inflamación. En la EA la COX-2 se sobre-expresa en neuronas potenciando su deterioro redox (Pasinetti, 1998). En nuestros resultados, los animales Tg2576 muestran una sobreexpresión de COX-2, que puede estar implicado en el déficit de memoria observado en estos animales en el *water maze* y el reconocimiento de objetos, ya que, como vieron Andreasson y colaboradores (2001), ratones transgénicos que sobre expresaban COX-2 presentaban importantes déficits de memoria

(Andreasson et al., 2001). Este aumento de la expresión de COX-2 se debe probablemente a la expresión de A β en estos animales, puesto que en otros estudios se ha observado que la administración icv de A β_{40} induce un aumento en la expresión de COX-2, además de un déficit cognitivo (Medeiros et al., 2010). En nuestros resultados vemos que JWH reduce la expresión de esta enzima en animales Wt y que tanto WIN como JWH reducen la expresión a niveles control en los TgAPP. En un estudio, Zhang y colaboradores (2008) consiguieron con 2-AG reducir la expresión de COX-2 *in vitro* en neuronas tratadas con LPS, efecto mediado por ambos receptores cannabinoides. Sin embargo, al contrario que en este estudio, donde utilizaban concentraciones entre 1 y 10 μ M (Zhang and Chen, 2008), nosotros conseguimos reducir la sobreexpresión de COX-2 *in vivo* con una dosis de WIN y JWH de tan solo 0.2mg/kg.

Otro parámetro de inflamación analizado fue la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que indica la presencia de astrocitos, aumentos de su expresión se relacionan con astrocitos reactivos. En nuestro estudio no hemos encontrado un aumento en la expresión de GFAP (*Western blotting*) debido al genotipo, sin embargo, dado que nuestros animales, por su edad, aun no habían desarrollado placas seniles y que en estudios de muestras de pacientes de EA se ha observado un aumento en la expresión de GFAP que localizaba con A β en ellas (Perez et al., 2000), es lógico que no encontremos este efecto en el modelo. Por otro lado, los cannabinoides no han afectado a la expresión de GFAP ni en los TgAPP ni en los Wt, por lo que el tratamiento prolongado con cannabinoides no varía la reactividad astrocitaria, de manera que los efectos moduladores sobre la función inmune que observamos en los animales podrían adscribirse de forma exclusiva a la microglía. Esto se ve confirmado por los resultados inmunohistoquímicos, en los que la expresión de GFAP no se modificó, mientras que la de Iba-1, marcador microglial, aumenta en los TgAPP.

La expresión de citoquinas proinflamatorias es un punto clave en la EA, se sabe que tanto IL-6 como TNF α (Dickson et al., 1993), se ven aumentados en cerebros de pacientes respecto a controles sanos. En el modelo Tg2576 se había descrito un aumento de estas citoquinas por inmunohistoquímica en estudios de animales a partir de 13 meses de edad (Mehlhorn et al., 2000; Apelt and Schliebs, 2001) y en estudios de expresión observaron aumentos de IL-6 a partir de los 4 meses de edad (Tehrani et al., 2001). En este trabajo los niveles de IL-6 no variaron ni por efecto del genotipo, ni por efecto del tratamiento; aunque es importante que la técnica de valoración de nuestro estudio es más precisa que la de Tehrani y colaboradores (2001). Describimos por primera vez que el aumento de la expresión de TNF- α en corteza, valorado por PCR cuantitativa en el modelo TgAPP a los 11-12 meses de edad fue reducido drásticamente por el tratamiento con WIN y JWH en los transgénicos, aunque no modificó los niveles de los controles. Así confirmamos la existencia de un proceso inflamatorio cerebral en

el Tg2576 y que los cannabinoides son capaces de contrarrestarlo. Podemos relacionar, además, la reducción de TNF- α con la de COX-2, ya que Medeiros y colaboradores (2010) vieron recientemente que el aumento de los niveles de COX-2 observado en animales que habían sido inyectados icv con A β ₄₀, era bloqueado al utilizar anticuerpos frente a TNF- α . Este aumento en los niveles de TNF- α puede estar directamente relacionado con el deterioro cognitivo observado en estos animales y la normalización de sus niveles tras el tratamiento con los cannabinoides podrían explicar la mejora cognitiva que experimentaron los animales al recibir el tratamiento con cannabinoides.

c) Sistema endocannabinoide en Tg APP y efecto del tratamiento prolongado con cannabinoides

Una vez comprobado el efecto de los tratamientos sobre parámetros inflamatorios, analizamos el sistema endocannabinoide de los animales tras 4-5 meses de tratamiento oral con WIN y JWH (0,2 mg/kg). Es la primera vez que se lleva a cabo un estudio de este tipo, en animales que han recibido un tratamiento tan prolongado con fármacos cannabinoides.

En la EA anteriormente habíamos descrito una disminución en neuronas CB₁ positivas en corteza frontal, además de en la expresión y en su funcionalidad (Ramirez et al., 2005). Sin embargo la expresión del receptor cannabinoide CB₁ (*Western blotting* e inmunocitoquímica) en corteza de los animales TgAPP se encontró elevada. No esperábamos una reducción en CB₁ ya que en este modelo de la EA no existe neurodegeneración. Por otro lado dado que dicho receptor está presente tanto en neuronas como en células gliales se podría argumentar que su expresión también se incrementara, con la activación glial, por ejemplo. De cualquier modo desconocemos si esta mayor expresión se pudiera traducir en receptores funcionales; ya que, de hecho, la respuesta hipoactiva del WIN tras su administración aguda se encontró disminuida en Tg APP. Por último, si existiera una disminución en los niveles corticales de AEA similar al encontrado en hipocampo, esta elevación en la expresión del receptor CB₁ podría ser un mecanismo compensatorio para mantener la homeostasis del sistema endocannabinoide. La administración oral prolongada de los compuestos no alteró la expresión del CB₁, probablemente por la baja dosis de los compuestos o, de nuevo, porque se hubiera desarrollado tolerancia a sus efectos agudos. Sin embargo, el WIN incrementó, aún más, la expresión del receptor CB₁, junto con la inmunorreactividad en neuronas piramidales de corteza cerebral. Cabría pensar en un fenómeno de “supertolerancia” al WIN, proceso contrario a la disminución en la sensibilidad de los receptores tras administración aguda, y que pudiera estar relacionado con modificaciones en las cascadas de señalización tras la activación

crónica de los receptores (Rhee et al., 2000). Es interesante destacar que el tratamiento con JWH normalizó la expresión de CB₁ y que, al contrario del WIN, dio lugar a la normalización de multitud de parámetros, en particular del deterioro cognitivo y disminución del metabolismo de glucosa valorado por PET.

En el caso del receptor CB₂, el tratamiento con el agonista CB₂ selectivo, JWH, redujo su expresión tanto en los WT como en los Tg, efecto que podría deberse a una regulación a la baja por estimulación crónica. Un incremento de la expresión de CB₂ en el Tg APP se correlaciona con la activación microglial mantenida en el tiempo que comprobamos en los animales (incremento en expresión en citoquinas pro-inflamatorias e incremento en el número de células Iba-1 positivas) y que se ha descrito en otros modelos de enfermedades neurológicas (Correa et al., 2007; Palazuelos et al., 2009). Es más, podría estar propiciado por el Aβ ya que su administración *in vivo* aumenta la expresión de CB₂ (van der Stelt et al., 2006; Esposito et al., 2007a). Este aumento es beneficioso, ya que permite la oportuna modulación de la respuesta inflamatoria, y ésta se ha encontrado incrementada en el KO de CB₂ tras lesión (Palazuelos et al., 2009).

Se desconocen los posibles niveles de endocannabinoides en la EA. Cuestiones técnicas impiden su valoración en tejido cerebral post-mortem (Palkovits et al., 2008). En un estudio reciente no se han encontrado diferencias entre los niveles circulantes o en líquido cefalorraquídeo de endocannabinoides en pacientes de EA comparado con controles (Koppel et al., 2009). Al contrario del aumento en 2-AG que ocurre en daño agudo cerebral (Panikashvili et al., 2006), en lesión medular (García-Ovejero et al., 2009), en el modelo de inflamación crónica de granuloma (De Filippis et al.) o tras una única inyección de Aβ (van der Stelt et al., 2006), sus niveles en hipocampo no variaron en el Tg APP. Tampoco los tratamientos alteraron sus niveles ni en Wt o Tg APP. Los niveles de anandamida disminuyeron en los transgénicos y el tratamiento tanto con WIN como con JWH redujo los niveles tanto de los Wt como de los Tg. Es lógico que tras un tratamiento crónico con un agonista exógeno los niveles del ligando endógeno disminuyan. También el péptido amiloide podría estar involucrado en la disminución de AEA ya que su adición a cultivos de células C6 dió lugar a ese cambio (Esposito et al., 2007a). Últimamente se le está concediendo a la AEA un importante papel como modulador de la inflamación, por tanto una disminución en sus niveles sería perjudicial ya que no limitaría la inflamación mantenida que existe en ratones Tg APP.

Es interesante destacar que en hipocampo de Tg APP, además de una reducción en los niveles de AEA, se encontró una marcada disminución en inmunorreactividad CB₁, al contrario de lo observado en corteza. Así, describimos que el número de interneuronas positivas disminuyó, junto con un marcado descenso de terminales positivos en CA1 y giro dentado. A

destacar el efecto del JWH en el modelo, que normalizó la expresión del receptor tras su administración crónica.

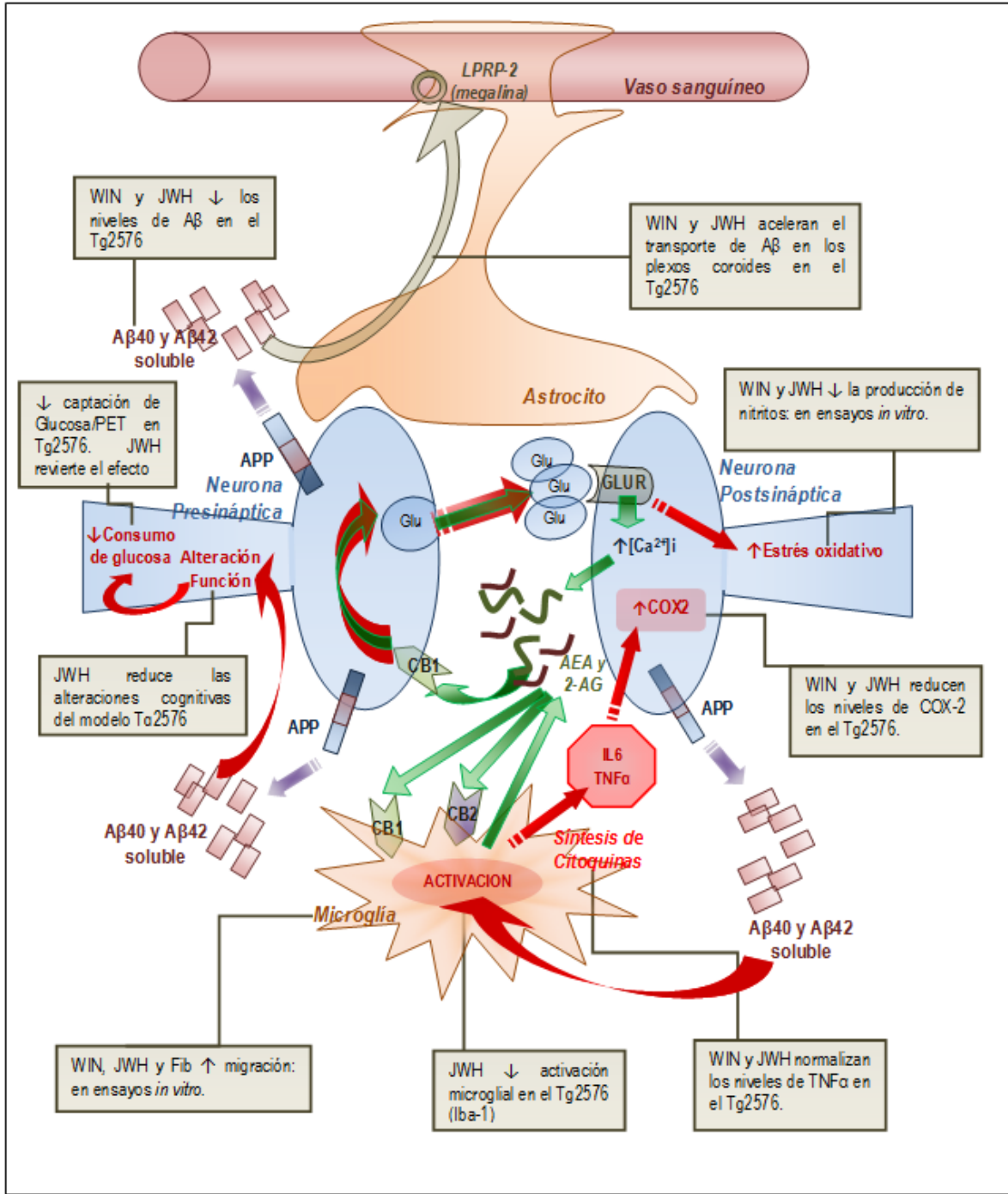


Figura 74. Esquema de las bases celulares y moleculares de los efectos de los cannabinoides en un modelo de la EA. Las flechas verdes describen rutas de señalización no patológicas; las moradas aquellas relacionadas con el procesamiento del APP y las rojas indican las alteraciones observadas en la EA analizadas en el presente estudio. En los recuadros se muestran los efectos del tratamiento con cannabinoides en el modelo estudiado.

En resumen, el sistema endocannabinoide también se encuentra alterado en el modelo transgénico de la EA, Tg APP, existiendo significativos cambios en la expresión de los

receptores CB₁ y CB₂, y en los niveles de anandamida. Algunas de esas alteraciones podrían contribuir a las alteraciones comportamentales, metabólicas y en la neuroinflamación existente en el modelo. Es más el tratamiento con cannabinoides prolongado pueden contribuir a su regulación y a los efectos beneficiosos que hemos encontrado.

Conclusiones

1. Los cannabinoides (WIN, JWH, CBD y HU) promueven la migración de microglía en cultivo por un mecanismo dependiente tanto de receptores CB₁ y CB₂, y disminuyen la generación de nitritos inducida por LPS, efecto independiente de receptores cannabinoides. El WIN y el CBD previenen además el deterioro cognitivo y el incremento en la expresión de las citoquinas proinflamatorias Il-6 y TNF α inducido por la inyección de A β a ratones. Estos efectos podrían contribuir positivamente a retrasar el avance de la EA.
2. El tratamiento oral prolongado con cannabinoides normaliza la hipoactividad de los animales TgAPP, no modifica la adquisición de una tarea de navegación espacial. El agonista CB₂ JWH previene la deficiencia en el reconocimiento de objetos en el modelo de EA. Ambos cannabinoides disminuyeron los niveles de A β , la activación microglial, y normalizaron distintos parámetros inflamatorios (COX-2, Il-6, TNF α).
3. En el TgAPP hubo un incremento en la expresión del receptor CB₁ en corteza cerebral que fue normalizado con el tratamiento con JWH durante 4 meses. El receptor CB₂ no está afectado en el modelo, pero fue regulado a la baja por JWH. Los niveles del endocannabinoide 2-AG en hipocampo fueron similares en Wt y en TgAPP, pero los de AEA fueron menores en el transgénico. El tratamiento prolongado con WIN y JWH disminuyó los niveles de AEA.
4. Los metabolitos cerebrales en corteza y hipocampo, valorados por MRS, no variaron en el TgAPP, ni fueron alterados por los tratamientos. Se observó un incremento en ADC en corteza de los TgAPP a los 9 meses de edad, compatible con un edema vasogénico, que fue normalizado por la administración de los cannabinoides durante dos meses. No se observaron cambios en los estudios de transferencia de magnetización.
5. Se observó una reducción de la captación de glucosa, analizada por PET, en corteza e hipocampo a los 11 meses de edad en el Tg2576, que fue normalizada por el tratamiento durante 4 meses con JWH. Los estudios de PET parecen reflejar las alteraciones metabólicas en el modelo de EA mejor que el resto de las técnicas de neuroimagen.

Conclusion final:

Los cannabinoides utilizados en el presente estudio han demostrado ser agentes terapéuticos beneficiosos y no han causado efectos deletéreos importantes en los animales control, siendo el agonista CB₂ selectivo, JWH-133, el más eficaz de los dos a la hora de contrarrestar los efectos de la enfermedad en el modelo. La modulación de la activación microglial parece ser la responsable de los efectos de los cannabinoides. Los cannabinoides CB₂ selectivos representan, por tanto, útiles herramientas para futuros tratamientos de la EA.

BIBLIOGRAFÍA



- Aboud ME, Martin BR (1996) Molecular neurobiology of the cannabinoid receptor. *International Review of Neurobiology*:197-221.
- Albert M, Blacker D, Moss MB, Tanzi R, McArdle JJ (2007) Longitudinal change in cognitive performance among individuals with mild cognitive impairment. *Neuropsychology* 21:158-169.
- Andreasson KI, Savonenko A, Vidensky S, Goellner JJ, Zhang Y, Shaffer A, Kaufmann WE, Worley PF, Isakson P, Markowska AL (2001) Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J Neurosci* 21:8198-8209.
- Apelt J, Schliebs R (2001) Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res* 894:21-30.
- Arendash GW, King DL (2002) Intra- and intertask relationships in a behavioral test battery given to Tg2576 transgenic mice and controls. *Physiology and Behavior* 75:643-652.
- Ashton JC, Appleton I, Darlington CL, Smith PF (2004) Cannabinoid CB1 receptor protein expression in the rat choroid plexus: A possible involvement of cannabinoids in the regulation of cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 364:40-42.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27:1-4.
- Bari M, Spagnuolo P, Fezza F, Oddi S, Pasquariello N, Finazzi-Agro A, Maccarrone M (2006) Effect of lipid rafts on Cb2 receptor signaling and 2-arachidonoyl-glycerol metabolism in human immune cells. *J Immunol* 177:4971-4980.
- Barker GR, Bird F, Alexander V, Warburton EC (2007) Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci* 27:2948-2957.
- Baslow MH (2000) Functions of N-acetyl-L-aspartate and N-acetyl-L-aspartylglutamate in the vertebrate brain: role in glial cell-specific signaling. *J Neurochem* 75:453-459.
- Begg M, Mo FM, Offerler L, Batkai S, Pacher P, Razdan RK, Lovinger DM, Kunos G (2003) G Protein-coupled Endothelial Receptor for Atypical Cannabinoid Ligands Modulates a Ca²⁺-dependent K⁺ Current. *J Biol Chem* 278:46188-46194.
- Behr D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G (1996) Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem* 271:1613-1620.
- Bencherif B, Endres CJ, Musachio JL, Villalobos A, Hilton J, Scheffel U, Dannals RF, Williams S, Frost JJ (2002) PET imaging of brain acetylcholinesterase using [11C]CP-126,998, a brain selective enzyme inhibitor. *Synapse* 45:1-9.

- Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J (2003) Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23:11136-11141.
- Benito C, Romero JP, Tolon RM, Clemente D, Docagne F, Hillard CJ, Guaza C, Romero J (2007) Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J Neurosci* 27:2396-2402.
- Bizon J, Prescott S, Nicolle MM (2007) Intact spatial learning in adult Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 28:440-446.
- Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27:229-237.
- Blennow K (2004) CSF biomarkers for mild cognitive impairment. *J Intern Med* 256:224-234.
- Blennow K, Vanmechelen E, Hampel H (2001) CSF total tau, Abeta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 24:87-97.
- Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR (1998) Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 287:884-888.
- Bozzali M, Franceschi M, Falini A, Pontesilli S, Cercignani M, Magnani G, Scotti G, Comi G, Filippi M (2001) Quantification of tissue damage in AD using diffusion tensor and magnetization transfer MRI. *Neurology* 57:1135-1137.
- Bradt BM, Kolb WP, Cooper NR (1998) Complement-dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease beta-peptide. *J Exp Med* 188:431-438.
- Breitner JC, Gau BA, Welsh KA, Plassman BL, McDonald WM, Helms MJ, Anthony JC (1994) Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* 44:227-232.
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 60:155-163.
- Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR (2005) Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect* 113:1250-1256.
- Butovsky E, Juknat A, Goncharov I, Elbaz J, Eilam R, Zangen A, Vogel Z (2005) In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Delta-tetrahydrocannabinol. *J Neurochem* 93:802-811.
- Butrica JL (2002) The medical use of cannabis among Greeks and Romans. *J Cancer Therapies* 2:51-70.
- Campbell VA, Gowran A (2007) Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids? *Br J Pharmacol* 152:655-662.

- Cao X, Sudhof TC (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120.
- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol* 2:69-82.
- Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65:999-1007.
- Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I (2005) Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* 25:10884-10893.
- Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8:1390-1397.
- Casal C, Serratos J, Tusell JM (2002) Relationship between beta-AP peptide aggregation and microglial activation. *Brain Res* 928:76-84.
- Cauli O, Lopez-Larrubia P, Rodrigues TB, Cerdan S, Felipo V (2007) Magnetic resonance analysis of the effects of acute ammonia intoxication on rat brain. Role of NMDA receptors. *J Neurochem* 103:1334-1343.
- Chen B, Bromley-Brits K, He G, Cai F, Zhang X, Song W (2010) Effect of synthetic cannabinoid HU210 on memory deficits and neuropathology in Alzheimer's disease mouse model. *Curr Alzheimer Res* 7:255-261.
- Chen Y, Liu W, McPhie DL, Hassinger L, Neve RL (2003) APP-BP1 mediates APP-induced apoptosis and DNA synthesis and is increased in Alzheimer's disease brain. *J Cell Biol* 163:27-33.
- Choi JK, Dedeoglu A, Jenkins BG (2007) Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR Biomed* 20:216-237.
- Citron M (2010) Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* 9:387-398.
- Compton DR, Rice KC, De Costa BR, Razdan RK, Melvin LS, Johnson MR, Martin BR (1993) Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *J Pharmacol Exp Ther* 265:218-226.
- Correa F, Docagne F, Mestre L, Loria F, Hernangomez M, Borrell J, Guaza C (2007) Cannabinoid system and neuroinflammation: Implications for multiple sclerosis. *NeuroImmunoModulation* 14:182-187.

- Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, Colleoni M (2004) Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol* 143:247-250.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139:1405-1415.
- Cui YH, Le Y, Gong W, Proost P, Van Damme J, Murphy WJ, Wang JM (2002) Bacterial lipopolysaccharide selectively up-regulates the function of the chemotactic peptide receptor formyl peptide receptor 2 in murine microglial cells. *J Immunol* 168:434-442.
- De Filippis D, D'Amico A, Cipriano M, Petrosino S, Orlando P, Di Marzo V, Iuvone T Levels of endocannabinoids and palmitoylethanolamide and their pharmacological manipulation in chronic granulomatous inflammation in rats. *Pharmacological Research* 61:321-328.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V (2004) The endocannabinoid system: A general view and latest additions. *Br J Pharmacol* 141:765-774.
- Deacon RMJ, Cholerton LL, Talbot K, Nair-Roberts RG, Sanderson DJ, Romberg C, Koros E, Bornemann KD, Rawlins JNP (2008) Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice. *Behavioural Brain Research* 189:126-138.
- Deane R, Wu Z, Zlokovic BV (2004) RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 35:2628-2631.
- Dedeoglu A, Choi JK, Cormier K, Kowall NW, Jenkins BG (2004) Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile. *Brain Res* 1012:60-65.
- Demougeot C, Marie C, Giroud M, Beley A (2004) N-acetylaspartate: a literature review of animal research on brain ischaemia. *J Neurochem* 90:776-783.
- Deutsch DG, Chin SA (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol* 46:791-796.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Dewey WL (1986) Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* 38:151-178.

- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686-691.
- Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C (1993) Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7:75-83.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10819-10824.
- Dorheim MA, Tracey WR, Pollock JS, Grammas P (1994) Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205:659-665.
- Downen M, Zhao ML, Lee P, Weidenheim KM, Dickson DW, Lee SC (1999) Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. *J Neuropathology and Exp Neurol* 58:12-21.
- Dubois A, Harard AS, Delatour B, Hantraye P, Bonvento G, Dhenain M, Delzescaux T (2010) Detection by voxel-wise statistical analysis of significant changes in regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 51:586-598.
- Dunnett SB (1985) Comparative effects of cholinergic drugs and lesions of nucleus basalis or fimbria-fornix on delayed matching in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 87:357-363.
- Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR (2000) Fatty acid amide hydrolase expression in rat choroid plexus: Possible role in regulation of the sleep-inducing action of oleamide. *Neurosci Lett* 282:13-16.
- Ehehalt R, Fullekrug J, Pohl J, Ring A, Herrmann T, Stremmel W (2006) Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem* 284:135-140.
- Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle RD (2005) Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation* 2:29.
- Emre M, Geula C, Ransil BJ, Mesulam MM (1992) The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain. *Neurobiol Aging* 13:553-559.

- Esposito G, Iuvone T, Savani C, Scuderi C, De Filippis D, Papa M, Di Marzo V, Steardo L (2007a) Opposing control of cannabinoid receptor stimulation on amyloid-beta-induced reactive gliosis: in vitro and in vivo evidence. *J Pharmacol Exp Ther* 322:1144-1152.
- Esposito G, Izzo AA, Di Rosa M, Iuvone T (2001) Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells. *J Neurochem* 78:835-841.
- Esposito G, Scuderi C, Savani C, Steardo L, Jr., De Filippis D, Cottone P, Iuvone T, Cuomo V, Steardo L (2007b) Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br J Pharmacol* 151:1272-1279.
- Eubanks LM, Rogers CJ, Beuscher AEt, Koob GF, Olson AJ, Dickerson TJ, Janda KD (2006) A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Mol Pharm* 3:773-777.
- Eun SY, Jung SJ, Park YK, Kwak J, Kim SJ, Kim J (2001) Effects of capsaicin on Ca(2+) release from the intracellular Ca(2+) stores in the dorsal root ganglion cells of adult rats. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1114-1120.
- Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A (2003) Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia* 41:161-168.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278:1349-1356.
- Fegley D, Gaetani S, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2005) Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3beta-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): Effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 313:352-358.
- Munoz P, Martinez-Murillo R, Rodrigo J (2004) Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 15:287-305.
- Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N (2003) Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci* 23:7767-7775.
- Franklin A, Stella N (2003) Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol* 474:195-198.

- Frautschy SA, Baird A, Cole GM (1991) Effects of injected Alzheimer beta-amyloid cores in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8362-8366.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232:54-61.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzman M (2007) The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* 13:109-114.
- Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes ML, Gomez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzman M (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* 6:313-319.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish [8]. *Journal of the American Chemical Society* 86:1646-1647.
- Garcia-Ovejero D, Arevalo-Martin A, Petrosino S, Docagne F, Hagen C, Bisogno T, Watanabe M, Guaza C, Di Marzo V, Molina-Holgado E (2009) The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis* 33:57-71.
- Gass A, Niendorf T, Hirsch JG (2001) Acute and chronic changes of the apparent diffusion coefficient in neurological disorders-biophysical mechanisms and possible underlying histopathology. *J Neurol Sci* 186:S15-S23.
- Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279 (Pt 1):129-134.
- Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, Altmann KH, Karsak M, Zimmer A (2008) Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9099-9104.
- Gil-Bea FJ, Aisa B, Schliebs R, Ramirez MJ (2007) Increase of locomotor activity underlying the behavioral disinhibition in tg2576 mice. *Behav Neurosci* 121:340-344.
- Giordano T, Pan JB, Monteggia LM, Holzman TF, Snyder SW, Krafft G, Ghanbari H, Kowall NW (1994) Similarities between beta-amyloid peptides 1-40 and 40-1: Effects on aggregation, toxicity in vitro, and injection in young and aged rats. *Experimental Neurology* 125:175-182.
- Giovannelli L, Casamenti F, Scali C, Bartolini L, Pepeu G (1995) Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience* 66:781-792.

- Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG (2003) Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4269-4274.
- Godbolt AK, Waldman AD, MacManus DG, Schott JM, Frost C, Cipolotti L, Fox NC, Rossor MN (2006) MRS shows abnormalities before symptoms in familial Alzheimer disease. *Neurology* 66:718-722.
- Gomez Del Pulgar T, De Ceballos ML, Guzman M, Velasco G (2002) Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 277:36527-36533.
- Goodwin JL, Uemura E, Cunnick JE (1995) Microglial release of nitric oxide by the synergistic action of beta-amyloid and IFN-gamma. *Brain Res* 692:207-214.
- Gordon S, Andersson PB, Lawson L, Perry H (1993) Differentiation and activation of macrophages and microglia in the nervous system. *Discussions in Neuroscience* 9:69-73.
- Gotz J, Ittner LM (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9:532-544.
- Griffith HR, den Hollander JA, Stewart CC, Evanochko WT, Buchthal SD, Harrell LE, Zamrini EY, Brockington JC, Marson DC (2007) Elevated brain scyllo-inositol concentrations in patients with Alzheimer's disease. *NMR Biomed* 20:709-716.
- Gupta RK, Sinha U, Cloughesy TF, Alger JR (1999) Inverse correlation between choline magnetic resonance spectroscopy signal intensity and the apparent diffusion coefficient in human glioma. *Magnetic Resonance in Medicine* 41:2-7.
- Guzman M (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3:745-755.
- Guzman M, Sanchez C, Galve-Roperh I (2002) Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther* 95:175-184.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8268-8273.
- Hampson RE, Simeral JD, Kelly EJ, Deadwyler SA (2003) Tolerance to the memory disruptive effects of cannabinoids involves adaptation by hippocampal neurons. *Hippocampus* 13:543-556.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3662-3665.

- Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, Pertwee RG, Ross RA, Mechoulam R, Fride E (1999) HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14228-14233.
- Hanyu H, Asano T, Iwamoto T, Takasaki M, Shindo H, Abe K (2000) Magnetization transfer measurements of the hippocampus in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia, and other types of dementia. *AJNR Am J Neuroradiol* 21:1235-1242.
- Hanyu H, Asano T, Sakurai H, Takasaki M, Shindo H, Abe K (2001) Magnetization transfer measurements of the hippocampus in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 188:79-84.
- Hanyu H, Sakurai H, Iwamoto T, Takasaki M, Shindo H, Abe K (1998) Diffusion-weighted MR imaging of the hippocampus and temporal white matter in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 156:195-200.
- Hardy J, Orr H (2006) The genetics of neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 97:1690-1699.
- Heise GA, Conner R, Martin RA (1976) Effects of scopolamine on variable intertrial interval spatial alternation and memory in the rat. *Psychopharmacology* 49:131-137.
- Hernandez F, de Barreda EG, Fuster-Matanzo A, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J (2009) The role of GSK3 in Alzheimer disease. *Brain Res Bull* 80:248-250.
- Herschman HR (2003) Micro-PET imaging and small animal models of disease. *Curr Opin Immunol* 15:378-384.
- Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A, Campbell WB (1997) Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 69:631-638.
- Hollister LE (1978) Cannabis and the development of tolerance. *Advances in the biosciences* 22-23:585-589.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, Culliford D, Perry VH (2009) Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 73:768-774.
- Howlett AC (1998) The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis* 5:405-416.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
- Hsu MJ, Hsu CY, Chen BC, Chen MC, Ou G, Lin CH (2007) Apoptosis signal-regulating kinase 1 in amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell apoptosis. *J Neurosci* 27:5719-5729.

- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8400-8405.
- Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, Hooper C, Rijdsdijk F, Tabrizi SJ, Banner S, Shaw CE, Foy C, Poppe M, Archer N, Hamilton G, Powell J, Brown RG, Sham P, Ward M, Lovestone S (2006) Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain* 129:3042-3050.
- Irie K, Murakami K, Masuda Y, Morimoto A, Ohigashi H, Ohashi R, Takegoshi K, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T (2005) Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng* 99:437-447.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 118:2023-2028.
- Ishii K (2002) Clinical application of positron emission tomography for diagnosis of dementia. *Ann Nucl Med* 16:515-525.
- Itoh A, Nitta A, Nadai M, Nishimura K, Hirose M, Hasegawa T, Nabeshima T (1996) Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in beta-amyloid protein-infused rats. *Journal of Neurochemistry* 66:1113-1117.
- Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 89:134-141.
- Jack CR, Jr., Petersen RC, O'Brien PC, Tangalos EG (1992) MR-based hippocampal volumetry in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:183-188.
- Jarbe TU, Ross T, DiPatrizio NV, Pandarinathan L, Makriyannis A (2006) Effects of the CB1R agonist WIN-55,212-2 and the CB1R antagonists SR-141716 and AM-1387: open-field examination in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 85:243-252.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:343-347.
- Kalaria R (2002) Similarities between Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci* 203-204:29-34.
- Kantarci K (2007) 1H magnetic resonance spectroscopy in dementia. *B J Radiol* 80:S146-S152.

- Kantarci K, Jack CR, Jr., Xu YC, Campeau NG, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Kokmen E, Tangalos EG, Petersen RC (2001) Mild cognitive impairment and Alzheimer disease: regional diffusivity of water. *Radiology* 219:101-107.
- Kantarci K, Jack Jr CR, Xu YC, Campeau NG, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Kokmen E, Tangalos EG, Petersen RC (2000) Regional metabolic patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A 1H MRS study. *Neurology* 55:210-217.
- Kantarci K, Weigand SD, Petersen RC, Boeve BF, Knopman DS, Gunter J, Reyes D, Shiung M, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Jack Jr CR (2007) Longitudinal 1H MRS changes in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28:1330-1339.
- Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF (2001) Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci* 21:9506-9518.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001) Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid beta protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:372-381.
- Khaspekov LG, Brenz Verca MS, Frumkina LE, Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2004) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 19:1691-1698.
- King DL, Arendash GW (2002) Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiology and Behavior* 75:627-642.
- Klein TW, Friedman H, Specter S (1998) Marijuana, immunity and infection. *J Neuroimmunol* 83:102-115.
- Koppel J, Bradshaw H, Goldberg TE, Khalili H, Marambaud P, Walker MJ, Pazos M, Gordon ML, Christen E, Davies P (2009) Endocannabinoids in Alzheimer's disease and their impact on normative cognitive performance: A case-control and cohort study. *Lipids in Health and Disease* 8.
- Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA (1991) An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7247-7251.
- Kuan YH, Gruebl T, Soba P, Eggert S, Nestic I, Back S, Kirsch J, Beyreuther K, Kins S (2006) PAT1a modulates intracellular transport and processing of amyloid precursor protein (APP), APLP1, and APLP2. *J Biol Chem* 281:40114-40123.

- Kumar A, Schapiro MB, Grady C, Haxby JV, Wagner E, Salerno JA, Friedland RP, Rapoport SI (1991) High-resolution PET studies in Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 4:35-46.
- Kuntner C, Kesner AL, Bauer M, Kremslehner R, Wanek T, Mandler M, Karch R, Stanek J, Wolf T, Muller M, Langer O (2009) Limitations of small animal PET imaging with [¹⁸F]FDDNP and FDG for quantitative studies in a transgenic mouse model of alzheimer's disease. *Molecular Imaging and Biology* 11:236-240.
- Kuo YM, Beach TG, Sue LI, Scott S, Layne KJ, Kokjohn TA, Kalback WM, Luehrs DC, Vishnivetskaya TA, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Weller RO, Roher AE (2001) The evolution of A beta peptide burden in the APP23 transgenic mice: implications for A beta deposition in Alzheimer disease. *Mol Med* 7:609-618.
- Kwock L (1998) Localized MR spectroscopy: basic principles. *Neuroimaging Clin N Am* 8:713-731.
- LaFerla FM, Oddo S (2005) Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11:170-176.
- Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, Kim H, Fukuchi K (2003) Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res* 977:38-45.
- Law A, Gauthier S, Quirion R (2001) Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res Brain Res Rev* 35:73-96.
- Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W, Dunlop NM, Gao JL, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM (2001) Amyloid (beta)₄₂ activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J Neurosci* 21:RC123.
- Lee BC, Mintun M, Buckner RL, Morris JC (2003) Imaging of Alzheimer's disease. *J Neuroimaging* 13:199-214.
- Leong SK, Ling EA (1992) Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 6:39-47.
- Lichtman AH, Dimen KR, Martin BR (1995) Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 119:282-290.
- Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF (2002b) Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 302:73-79.
- Lichtman AH, Varvel SA, Martin BR (2002a) Endocannabinoids in cognition and dependence. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:269-285.

- Lo Conte G, Bartolini L, Casamenti F (1982) Lesions of cholinergic forebrain nuclei: Changes in avoidance behavior and scopolamine actions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 17:933-937.
- Lodzki M, Godin B, Rakou L, Mechoulam R, Gallily R, Touitou E (2003) Cannabidiol - Transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *J Controlled Release* 93:377-387.
- Longo FM, Massa SM (2004) Neuroprotective strategies in Alzheimer's disease. *NeuroRx* 1:117-127.
- Loria F, Petrosino S, Mestre L, Spagnolo A, Correa F, Hernangomez M, Guaza C, Di Marzo V, Docagne F (2008) Study of the regulation of the endocannabinoid system in a virus model of multiple sclerosis reveals a therapeutic effect of palmitoylethanolamide. *Eur J Neurosci* 28:633-641.
- Louw DF, Yang FW, Sutherland GR (2000) The effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on forebrain ischemia in rat. *Brain Res* 857:183-187.
- Lucin KM, Wyss-Coray T (2009) Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* 64:110-122.
- Luth HJ, Munch G, Arendt T (2002) Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res* 953:135-143.
- Maccarrone M, van der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegthart JF, Agro AF (1998) Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem* 273:32332-32339.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15:6552-6561.
- MacLennan SJ, Reynen PH, Kwan J, Bonhaus DW (1998) Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Br J Pharmacol* 124:619-622.
- Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, Okauchi T, Staufenbiel M, Iwata N, Ono M, Saido TC, Suzuki K, Mori H, Higuchi M, Suhara T (2007) Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J Neurosci* 27:10957-10968.
- Marchalant Y, Brothers HM, Wenk GL (2009) Cannabinoid agonist WIN-55,212-2 partially restores neurogenesis in the aged rat brain. *Molecular Psychiatry* 14:1068-1071.

- Marchalant Y, Rosi S, Wenk GL (2007) Anti-inflammatory property of the cannabinoid agonist WIN-55212-2 in a rodent model of chronic brain inflammation. *Neuroscience* 144:1516-1522.
- Marjanska M, Curran GL, Wengenack TM, Henry PG, Bliss RL, Poduslo JF, Jack CR, Jr., Ugurbil K, Garwood M (2005) Monitoring disease progression in transgenic mouse models of Alzheimer's disease with proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11906-11910.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302:84-88.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.
- Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD (2003) Plasma A[β]40 and A[β]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 61:1185-1190.
- Maysinger D, Herrera-Marschitz M, Carlsson A, Garofalo L, Cuello AC, Ungerstedt U (1988) Striatal and cortical acetylcholine release in vivo in rats with unilateral decortication: Effects of treatment with monosialoganglioside GM1. *Brain Res* 461:355-360.
- Mazzola C, Micale V, Drago F (2003) Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *Eur J Pharmacol* 477:219-225.
- McGeer PL, McGeer EG (2007) NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging* 28:639-647.
- McManus ML, Churchwell KB, Strange K (1995) Regulation of cell volume in health and disease. *N Engl J Med* 333:1260-1266.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, HanuÅi L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* 50:83-90.
- Medeiros R, Figueiredo CP, Pandolfo P, Duarte FS, Prediger RDS, Passos GF, Calixto JB (2010) The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. *Behavioural Brain Research* 209:165-173.
- Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, Figueiredo CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB (2007) Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease:

- relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci* 27:5394-5404.
- Mehlhorn G, Hollborn M, Schliebs R (2000) Induction of cytokines in glial cells surrounding cortical beta-amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer pathology. *International Journal of Developmental Neuroscience* 18:423-431.
- Micale V, Mazzola C, Drago F (2007) Endocannabinoids and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res* 56:382-392.
- Michaelis ML (2003) Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new. *J Pharmacol Exp Ther* 304:897-904.
- Michaelis ML, Dobrowsky RT, Li G (2002) Tau neurofibrillary pathology and microtubule stability. *J Mol Neurosci* 19:289-293.
- Mielke R, Herholz K, Grond M, Kessler J, Heiss WD (1992) Differences of regional cerebral glucose metabolism between presenile and senile dementia of Alzheimer type. *Neurobiol Aging* 13:93-98.
- Miller AM, Stella N (2008) CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br J Pharmacol* 153:299-308.
- Minoshima S, Frey KA, Kuhl DE (1998) Cerebellar metabolic reduction in Alzheimer's disease and data normalization. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 39:374-376.
- Miyake M, Kakimoto Y, Sorimachi M (1981) A gas chromatographic method for the determination of N-acetyl-L-aspartic acid, N-acetyl-alpha-aspartylglutamic acid and beta-citryl-L-glutamic acid and their distributions in the brain and other organs of various species of animals. *J Neurochem* 36:804-810.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arellano-Martín A, Almazañán G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2002) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: Involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 22:9742-9753.
- Mosconi L, Mistur R, Switalski R, Tsui WH, Glodzik L, Li Y, Pirraglia E, De Santi S, Reisberg B, Wisniewski T, de Leon MJ (2009) FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36:811-822.
- Mueggler T, Meyer-Luehmann M, Rausch M, Staufenbiel M, Jucker M, Rudin M (2004) Restricted diffusion in the brain of transgenic mice with cerebral amyloidosis. *Eur J Neurosci* 20:811-817.

- Multhaup G, Bush AI, Pollwein P, Masters CL (1994) Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP). *FEBS Lett* 355:151-154.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65.
- Muresan Z, Muresan V (2005) Coordinated transport of phosphorylated amyloid-beta precursor protein and c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-1. *J Cell Biol* 171:615-625.
- Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA (1999) Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* 19:2987-2995.
- Nagy Z (2005) The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 9:531-541.
- Nomura Y, Sakuma H, Takeda K, Tagami T, Okuda Y, Nakagawa T (1994) Diffusional anisotropy of the human brain assessed with diffusion-weighted MR: relation with normal brain development and aging. *AJNR Am J Neuroradiol* 15:231-238.
- Norris PJ, Faull RLM, Emson PC (1996) Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA expression and NADPH-diaphorase staining in the frontal cortex, visual cortex and hippocampus of control and Alzheimer's disease brains. *Molecular Brain Research* 41:36-49.
- Novarino G, Fabrizi C, Tonini R, Denti MA, Malchiodi-Albedi F, Lauro GM, Sacchetti B, Paradisi S, Ferroni A, Curmi PM, Breit SN, Mazzanti M (2004) Involvement of the intracellular ion channel CLIC1 in microglia-mediated beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Neurosci* 24:5322-5330.
- Oberg J, Spenger C, Wang FH, Andersson A, Westman E, Skoglund P, Sunnemark D, Norinder U, Klason T, Wahlund LO, Lindberg M (2008) Age related changes in brain metabolites observed by 1H MRS in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 29:1423-1433.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Ortega-Gutierrez S, Molina-Holgado E, Guaza C (2005) Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia* 52:163-168.
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE (2004) Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol* 18:502-508.

- Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R (2007) Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem* 102:1105-1114.
- Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, Julien B, Carrasco C, Resel E, Sagredo O, Benito C, Romero J, Azcoitia I, Fernandez-Ruiz J, Guzman M, Galve-Roperh I (2009) Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain* 132:3152-3164.
- Palkovits M, Harvey-White J, Liu J, Kovacs ZS, Bobest M, Lovas G, Baga AG, Kunos G (2008) Regional distribution and effects of postmortal delay on endocannabinoid content of the human brain. *Neuroscience* 152:1032-1039.
- Panegyres PK (1997) The amyloid precursor protein gene: a neuropeptide gene with diverse functions in the central nervous system. *Neuropeptides* 31:523-535.
- Panikashvili D, Mechoulam R, Beni SM, Alexandrovich A, Shohami E (2005) CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:477-484.
- Panikashvili D, Shein NA, Mechoulam R, Trembovler V, Kohen R, Alexandrovich A, Shohami E (2006) The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis* 22:257-264.
- Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E (2001) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413:527-531.
- Park JH, Gimbel DA, GrandPre T, Lee JK, Kim JE, Li W, Lee DH, Strittmatter SM (2006) Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *J Neurosci* 26:1386-1395.
- Pasinetti GM (1998) Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: Experimental approaches and clinical interventions. *J Neurosci Res* 54:1-6.
- Pavia J, Alberch J, Alvarez I, Toledano A, de Ceballos ML (2000) Repeated intracerebroventricular administration of beta-amyloid(25-35) to rats decreases muscarinic receptors in cerebral cortex. *Neurosci Lett* 278:69-72.
- Perez JL, Carrero I, Gonzalo P, Arevalo-Serrano J, Sanz-Anquela JM, Ortega J, Rodriguez M, Gonzalo-Ruiz A (2000) Soluble oligomeric forms of beta-amyloid (Abeta) peptide stimulate Abeta production via astrogliosis in the rat brain. *Experimental Neurology* 223:410-421.
- Perry VH, Cunningham C, Holmes C (2007) Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7:161-167.

- Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology and Therapeutics* 74:129-180.
- Pfefferbaum A, Sullivan EV, Jernigan TL, Zipursky RB, Rosenbloom MJ, Yesavage JA, Tinklenberg JR (1990) A quantitative analysis of CT and cognitive measures in normal aging and Alzheimer's disease. *Psychiatry Res* 35:115-136.
- Phelps ME (2000) Inaugural article: positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9226-9233.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (2003) GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423:435-439.
- Philipson O, Lord A, Gumucio A, O'Callaghan P, Lannfelt L, Nilsson LN (2010) Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. *FEBS J* 277:1389-1409.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: The role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13:1676-1687.
- Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW (1995) Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: Contributions of the beta25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 64:253-265.
- Pimplikar SW (2009) Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1261-1268.
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A (1999) Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5802-5807.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1020-1024.
- Price JL, Morris JC (1999) Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:358-368.
- Puffenbarger RA, Boothe AC, Cabral GA (2000) Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia* 29:58-69.
- Raivich G (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* 28:571-573.
- Rajesh M, Pan H, Mukhopadhyay P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Haska G, Liaudet L, Gao B, Pacher P (2007) Pivotal Advance: Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects

- against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology* 82:1382-1389.
- Ramani A, Jensen JH, Helpert JA (2006) Quantitative MR imaging in Alzheimer disease. *Radiology* 241:26-44.
- Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML (2005) Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25:1904-1913.
- Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS, Chen K, Bandy D, Minoshima S, Thibodeau SN, Osborne D (1996) Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the delta4 allele for apolipoprotein E. *New England Journal of Medicine* 334:752-758.
- Rhee MH, Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z (2000) Differential superactivation of adenylyl cyclase isozymes after chronic activation of the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Phar* 57:746-752.
- Righi M, Mori L, De Libero G, Sironi M, Biondi A, Mantovani A, Donini SD, Ricciardi-Castagnoli P (1989) Monokine production by microglial cell clones. *Eur J Immunol* 19:1443-1448.
- Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R (2002) Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 40:260-269.
- Rovira A, Cordoba J, Ragner N, Alonso J (2002) Magnetic resonance imaging measurement of brain edema in patients with liver disease: resolution after transplantation. *Curr Opin Neurol* 15:731-737.
- Rusinek H, De Santi S, Frid D, Tsui WH, Tarshish CY, Convit A, de Leon MJ (2003) Regional brain atrophy rate predicts future cognitive decline: 6-year longitudinal MR imaging study of normal aging. *Radiology* 229:691-696.
- Ryberg E, Larsson N, Sjagren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *BJ Pharmacol* 152:1092-1101.
- Saario SM, Palomaki V, Lehtonen M, Nevalainen T, Jarvinen T, Laitinen JT (2006) URB754 Has No Effect on the Hydrolysis or Signaling Capacity of 2-AG in the Rat Brain. *Chemistry and Biology* 13:811-814.
- Sacerdote P, Martucci C, Vaccani A, Bariselli F, Panerai AE, Colombo A, Parolaro D, Massi P (2005) The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. *J Neuroimmunol* 159:97-105.

- Sacerdote P, Massi P, Panerai AE, Parolaro D (2000) In vivo and in vitro treatment with the synthetic cannabinoid CP55, 940 decreases the in vitro migration of macrophages in the rat: involvement of both CB1 and CB2 receptors. *J Neuroimmunol* 109:155-163.
- Sakamoto S, Ishii K, Sasaki M, Hosaka K, Mori T, Matsui M, Hirono N, Mori E (2002) Differences in cerebral metabolic impairment between early and late onset types of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 200:27-32.
- Sakuma H, Nomura Y, Takeda K, Tagami T, Nakagawa T, Tamagawa Y, Ishii Y, Tsukamoto T (1991) Adult and neonatal human brain: diffusional anisotropy and myelination with diffusion-weighted MR imaging. *Radiology* 180:229-233.
- Sanchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramon y Cajal S, Guzman M (2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res* 61:5784-5789.
- Sanchez MG, Ruiz-Llorente L, Sanchez AM, Diaz-Laviada I (2003) Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal* 15:851-859.
- Sandson TA, Felician O, Edelman RR, Warach S (1999) Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10:166-171.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 64:193-198.
- Schaefer PW, Grant PE, Gonzalez RG (2000) Diffusion-weighted MR imaging of the brain. *Radiology* 217:331-345.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:278-287.
- Schenk D et al. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177.
- Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, Hanisch UK (2006) Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 29:68-74.
- Selkoe D, Kopan R (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:565-597.
- Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487-498.

- Shen M, Thayer SA (1998) The cannabinoid agonist Win55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 783:77-84.
- Shin J, Lee SY, Kim SJ, Kim SH, Cho SJ, Kim YB (2010) Voxel-based analysis of Alzheimer's disease PET imaging using a triplet of radiotracers: PIB, FDDNP, and FDG. *Neuroimage*.
- Shinotoh H, Aotsuka A, Fukushi K, Nagatsuka S, Tanaka N, Ota T, Tanada S, Irie T (2001) Effect of donepezil on brain acetylcholinesterase activity in patients with AD measured by PET. *Neurology* 56:408-410.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Bio Chem* 270:3726-3731.
- Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 278:989-999.
- Small GW, Ercoli LM, Silverman DHS, Huang SC, Komo S, Bookheimer SY, Lavretsky H, Miller K, Siddarth P, Rasgon NL, Mazziotta JC, Saxena S, Wu HM, Mega MS, Cummings JL, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Barrio JR, Phelps ME (2000) Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6037-6042.
- Soares DP, Law M (2009) Magnetic resonance spectroscopy of the brain: review of metabolites and clinical applications. *Clin Radiol* 64:12-21.
- Song F, Poljak A, Smythe GA, Sachdev P (2009) Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 61:69-80.
- Steele C, Rovner B, Chase GA, Folstein M (1990) Psychiatric symptoms and nursing home placement of patients with Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 147:1049-1051.
- Stefano GB, Salzet M, Rialas CM, Mattocks D, Fimiani C, Bilfinger TV (1998) Macrophage behavior associated with acute and chronic exposure to HIV GP120, morphine and anandamide: endothelial implications. *Int J Cardiol* 64 Suppl 1:S3-13.
- Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard JL, Mach F (2005) Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* 434:782-786.
- Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I (2009) Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118:475-485.

- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K (2002) Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:173-192.
- Sun SW, Song SK, Harms MP, Lin SJ, Holtzman DM, Merchant KM, Kotyk JJ (2005) Detection of age-dependent brain injury in a mouse model of brain amyloidosis associated with Alzheimer's disease using magnetic resonance diffusion tensor imaging. *Exp Neurol* 191:77-85.
- Tehrani R, Hasanvan H, Iverfeldt K, Post C, Schultzberg M (2001) Early induction of interleukin-6 mRNA in the hippocampus and cortex of APPsw transgenic mice Tg2576. *Neuroscience Letters* 301:54-58.
- Tham CS, Whitaker J, Luo L, Webb M (2007) Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Letters* 581:2899-2904.
- Thambisetty M, Hye A, Foy C, Daly E, Glover A, Cooper A, Simmons A, Murphy D, Lovestone S (2008) Proteome-based identification of plasma proteins associated with hippocampal metabolism in early Alzheimer's disease. *J Neurol* 255:1712-1720.
- Thiessen JD, Glazner KA, Nafez S, Schellenberg AE, Buist R, Martin M, Albensi BC Histochemical visualization and diffusion MRI at 7 Tesla in the TgCRND8 transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 215:29-36.
- Tiffany HL, Lavigne MC, Cui YH, Wang JM, Leto TL, Gao JL, Murphy PM (2001) Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J Biol Chem* 276:23645-23652.
- Tran MH, Yamada K, Nabeshima T (2002) Amyloid beta-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: A minireview. *Peptides* 23:1271-1283.
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411.
- Tulunay FC, Ayhan IH, Sparber SB (1982) The effects of morphine and δ^9 -tetrahydrocannabinol on motor activity in rats. *Psychopharmacology* 78:358-360.
- Urenjak J, Williams SR, Gadian DG, Noble M (1993) Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *J Neurosci* 13:981-989.
- Valla J, Chen K, Berndt JD, Gonzalez-Lima F, Cherry SR, Games D, Reiman EM (2002) Effects of image resolution on autoradiographic measurements of posterior cingulate activity in

- PDAPP mice: implications for functional brain imaging studies of transgenic mouse models of Alzheimer's Disease. *Neuroimage* 16:1-6.
- van der Flier WM, van den Heuvel DM, Weverling-Rijnsburger AW, Bollen EL, Westendorp RG, van Buchem MA, Middelkoop HA (2002) Magnetization transfer imaging in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 52:62-67.
- van der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Matias I, Petrosino S, De Filippis D, Micale V, Steardo L, Drago F, Iuvone T, Di Marzo V (2006) Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci* 63:1410-1424.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329-332.
- van Waesberghe JH, van Walderveen MA, Castelijns JA, Scheltens P, Lycklama a Nijeholt GJ, Polman CH, Barkhof F (1998) Patterns of lesion development in multiple sclerosis: longitudinal observations with T1-weighted spin-echo and magnetization transfer MR. *AJNR Am J Neuroradiol* 19:675-683.
- Vandevorde S, Jonsson KO, Labar G, Persson E, Lambert DM, Fowler CJ (2007) Lack of selectivity of URB602 for 2-oleoylglycerol compared to anandamide hydrolysis in vitro. *Br J Pharmacol* 150:186-191.
- Varvel SA, Lichtman AH (2002) Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *J Pharmacol Exp Ther* 301:915-924.
- Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, Weidner J, Mumford R, Webber R, Nathan C, Roberts AB, Lippa CF, Sporn MB (1996) Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* 184:1425-1433.
- Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ (1997) Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 12:913-919.
- von Kienlin M, Kunnecke B, Metzger F, Steiner G, Richards JG, Ozmen L, Jacobsen H, Loetscher H (2005) Altered metabolic profile in the frontal cortex of PS2APP transgenic mice, monitored throughout their life span. *Neurobiol Dis* 18:32-39.
- Waksman Y, Olson JM, Carlisle SJ, Cabral GA (1999) The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Phar Exp Ther* 288:1357-1366.

- Waleh NS, Cravatt BF, Apte-Deshpande A, Terao A, Kilduff TS (2002) Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene. *Gene* 291:203-210.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N (2002) Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem* 277:20869-20876.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23:1398-1405.
- Walter L, Stella N (2004) Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol* 141:775-785.
- Walther S, Mahlberg R, Eichmann U, Kunz D (2006) Delta-9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia. *Psychopharmacology (Berl)* 185:524-528.
- Wang Z, Zhao C, Yu L, Zhou W, Li K (2009) Regional metabolic changes in the hippocampus and posterior cingulate area detected with 3-Tesla magnetic resonance spectroscopy in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Acta Radiol* 50:312-319.
- Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22:1858-1867.
- Westlake TM, Hewlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M (1994) Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: An in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 63:637-652.
- Whishaw IQ, O'Connor WT, Dunnett SB (1985) Disruption of central cholinergic systems in the rat by basal forebrain lesions or atropine: effects on feeding, sensorimotor behaviour, locomotor activity and spatial navigation. *Behav Brain Res* 17:103-115.
- Wiley RG (1992) Neural lesioning with ribosome-inactivating proteins: Suicide transport and immunolesioning. *Trends in Neurosciences* 15:285-290.
- Wiley RG, Oeltmann TN, Lappi DA (1991) Immunolesioning: Selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. *Brain Res* 562:149-153.
- Wolfe MS, Guenette SY (2007) APP at a glance. *J Cell Sci* 120:3157-3161.
- Woo DC, Lee SH, Lee DW, Kim SY, Kim GY, Rhim HS, Choi CB, Kim HY, Lee CU, Choe BY (2010) Regional metabolic alteration of Alzheimer's disease in mouse brain expressing mutant human APP-PS1 by 1H HR-MAS. *Behav Brain Res* 211:125-131.
- Yasuno F, Imamura T, Hirono N, Ishii K, Sasaki M, Ikejiri Y, Hashimoto M, Shimomura T, Yamashita H, Mori E (1998) Age at onset and regional cerebral glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 9:63-67.

- Zhang J, Chen C (2008) Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation. *J Biol Chem* 283:22601-22611.
- Zhang R, Barker L, Pinchev D, Marshall J, Rasamoeliso M, Smith C, Kupchak P, Kireeva I, Ingratta L, Jackowski G (2004) Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics* 4:244-256.
- Zipp F, Aktas O (2006) The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 29:518-527.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-457.