



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB2 EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2018

Autora: Olga Guillén Martínez

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor: Francisco Navarrete Rueda

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Descubrimiento y caracterización del sistema endocannabinoide	4
1.2 Implicación funcional del receptor CB2 en procesos neurodegenerativos	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3. RESULTADOS.....	14
3.1 Mecanismos implicados en el efecto neuroprotector del receptor CB2	14
3.2 Utilidad terapéutica del receptor CB2 en el tratamiento de las alteraciones cognitivas de la enfermedad de Alzheimer	23
3.3 Utilidad terapéutica del receptor CB2 en el tratamiento de las alteraciones motoras de la enfermedad de Parkinson	31
4. DISCUSIÓN	37
5. CONCLUSIONES	40
6. BIBLIOGRAFÍA	41
7. ANEXO: ABREVIATURAS	43



RESUMEN

Hoy en día existe una limitación en el manejo de enfermedades neurodegenerativas debido a que los tratamientos farmacológicos existentes van dirigidos a paliar su sintomatología, y no a modificar su evolución clínica. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias que aborden patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA) o la enfermedad de Parkinson (EP) mediante una aproximación etiológica. En este sentido, recientemente se ha evaluado el papel que podría jugar el sistema endocannabinoide, y más concretamente la modulación del receptor cannabinoide CB2 (rCB2) conforme a los resultados que sugieren su capacidad neuroprotectora. Por tanto, el objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre el potencial terapéutico del rCB2 en el manejo de enfermedades neurodegenerativas, y sobre los mecanismos que estarían implicados.

Se hizo una búsqueda bibliográfica en la base de datos *Medline*, a través de su buscador *Pubmed*. Se emplearon combinaciones de descriptores en inglés y operadores booleanos, y se aplicaron una serie de criterios de inclusión y exclusión para realizar la selección final de los artículos analizados. Las referencias que se incluyeron contienen aquellos estudios realizados a nivel preclínico (experimentos *in vitro* y modelos animales) y clínico (muestras cerebrales *post-mortem* de pacientes con EA y EP) relacionados con la temática objeto de análisis. Los resultados mostraron que el potencial terapéutico del rCB2 se asocia en gran parte a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, disminuyendo la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y compuestos que producen estrés oxidativo como glutatión y MDA. Además, la modulación farmacológica o genética del rCB2 en modelos animales podría mejorar las alteraciones cognitivas con las que cursa la EA mediante una menor deposición del péptido β -amiloide, así como las alteraciones motoras de la EP mediante la protección de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.

A pesar de que sigue siendo necesaria la realización de más estudios, especialmente a nivel clínico, los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que el rCB2 está muy implicado en el proceso neurodegenerativo de patologías como la EA o la EP. La manipulación farmacológica del rCB2 parece ofrecer la posibilidad de conseguir un abordaje neuroprotector, pudiendo constituir una nueva herramienta terapéutica que ayudaría de forma significativa en la mejora del tratamiento y la calidad de vida de los pacientes que padecen este tipo de enfermedades neurodegenerativas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descubrimiento y caracterización del sistema endocannabinoide

El uso medicinal del cannabis (*Cannabis sativa spp*) se remonta al segundo milenio A.C. cuando los asirios aprovechaban los efectos psicoactivos de los cannabinoides que contiene la planta para el tratamiento de diversas dolencias médicas. Una de las denominaciones que recibió el cannabis fue *ganzi-gun-nu* (“droga que se lleva la mente”) debido a sus notables efectos psicótrópos. Entre sus primeros usos médicos cabría destacar el alivio de alteraciones musculares (calambres) y el tratamiento de dolores de tipo reumático y menstrual¹.

El cannabis fue introducido en Europa por los soldados napoleónicos que regresaban de Egipto y por médicos británicos que regresaban de la India, y los efectos psicológicos de las preparaciones de cannabis se hicieron conocidos a través de las escrituras de los miembros del famoso club parisino “*Le Club des Hashischins*”, particularmente de Baudelaire, Gautier y Moreau². Éste último, psiquiatra francés, describió en su libro “Hachís y enfermedad mental”³ los efectos psicológicos que producía el consumo de cannabis en sujetos experimentales, siendo algunos de éstos sentimiento de felicidad, emoción, errores de espacio y tiempo, impulsos irresistibles y alucinaciones. Moreau informó que sus voluntarios podían experimentar un estado de locura real que cursaba, entre otros, con alteraciones cognitivas como el empeoramiento de la memoria o trastornos de tipo psicótico. Sin embargo, actualmente los consumidores de cannabis suelen referir un aumento de la relajación y posible mejora de los sentidos (probablemente por la diferencia en las cantidades consumidas), hecho que promueve notablemente su uso recreacional e incrementa el riesgo de desarrollar patologías psiquiátricas como la esquizofrenia o la adicción.

Debido a las acciones que el consumo de cannabis produce a nivel del sistema nervioso central (SNC), fue creciendo el interés en conocer los compuestos cannabinoides responsables de producir tales efectos a nivel cerebral. De esta forma, sería en el año 1964 cuando se descubrió por primera vez el principal componente psicoactivo de la planta, el Δ 9-tetrahidrocannabinol (THC) por parte del Dr. Raphael Mechoulam junto a su compañero Gaoni⁴. Ambos explicaron que el THC tiene una actividad farmacológica bifásica produciendo efectos incluso opuestos según se administre a dosis bajas o altas. De forma simultánea al descubrimiento del THC, se continuó el estudio para tratar de

identificar los principales componentes presentes en el cannabis y se descubrió otro compuesto cannabinoide mayoritario de la planta, el cannabidiol (CBD), cuya estructura fue dilucidada por Mechoulam y Shvo en el año 1963⁵. La razón por la que durante más de un siglo hubiera numerosos intentos para aislar los principales componentes activos del cannabis y estos fracasaran, se debe a que hay más de 100 compuestos cannabinoides presentes con estructuras y propiedades físicas similares, haciendo muy difícil su separación⁶.

Tras conseguir la identificación de los compuestos cannabinoides en la planta, la investigación se centró en identificar las dianas que mediaban sus efectos a nivel central⁷. A partir de aquí se fueron identificando uno a uno los componentes del sistema endocannabinoide y, para ello, se diseñaron diferentes derivados cannabinoides sintéticos (como el CP-55,245) que permitieron revelar que el THC actúa a través de sitios de acción específicos para producir sus efectos psicotrópicos típicos, lo que condujo a la identificación de los receptores cannabinoides en 1988⁸. El primer receptor que se identificó fue el CB1 (rCB1) en 1990, seguido del CB2 (rCB2) en 1993⁹, y finalmente también se identificaron sus ligandos endógenos, la anandamida (N-araquidonil-etanolamida) y el 2-araquidonil-glicerol (2-AG), en 1995¹⁰. El gran descubrimiento de los receptores cannabinoides sugirió que las moléculas endógenas (endocannabinoides) pueden modular su funcionalidad a través de su activación, lo que se traduce en una inhibición de la enzima adenilato ciclasa que, como consecuencia, impide la conversión de ATP (adenosín trifosfato) a AMP cíclico (adenosín monofosfato). Además, a diferencia de la mayoría de los neurotransmisores (como acetilcolina, dopamina (DA) o serotonina), los endocannabinoides no se almacenan en vesículas, sino que se sintetizan cuándo y dónde sea necesario.

Además de la anandamida y el 2-araquidonil-glicerol, que son los ligandos mayoritarios del sistema endocannabinoide, se conoce también la existencia de otros ligandos endógenos como podría ser la O-araquidonil-etanolamina (virodhamina) y la N-araquidonil-dopamina (NADA). En cuanto a su metabolización tras la correspondiente activación de los receptores cannabinoides, cabe destacar que la anandamida se hidroliza en la neurona postsináptica debido a la acción de la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (*Fatty acid amide hydrolase*, FAAH) dando lugar a glicerol y ácido araquidónico, mientras que el 2-araquidonil-glicerol es hidrolizado en la neurona presináptica por la acción de la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL), y se obtiene etanolamina y ácido araquidónico.

En la Figura 1 pueden apreciarse los principales componentes del sistema endocannabinoide, incluyendo los rCB1 y rCB2, así como sus ligandos endógenos y las enzimas de síntesis y metabolización.

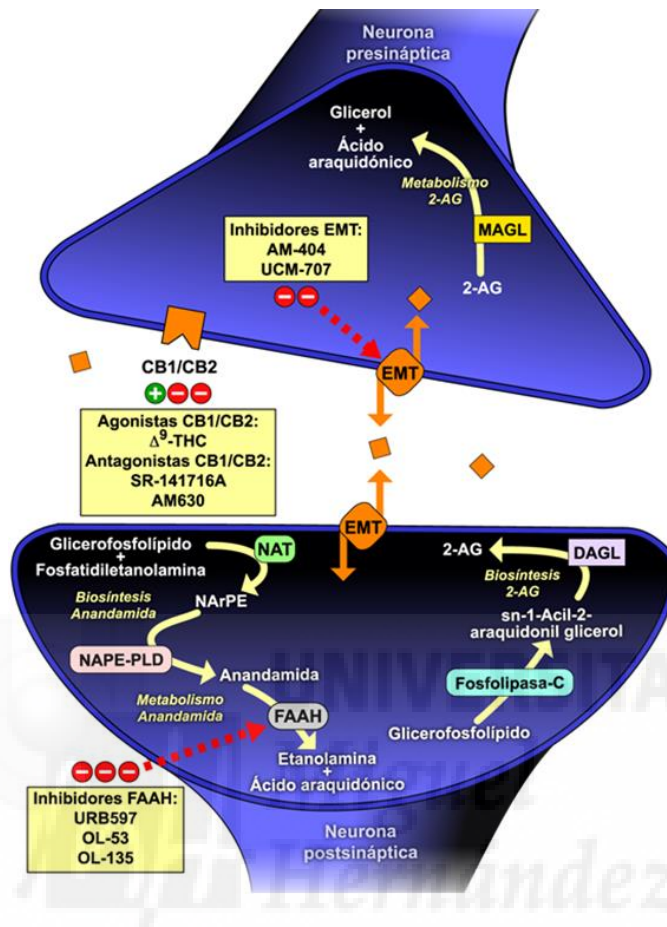


Figura 1. Representación gráfica de los principales componentes del sistema cannabinoide endógeno. MAGL: enzima monoacilglicerol lipasa, 2-AG: 2-araquidonilglicerol, EMT: sistema de transporte de cannabinoides endógenos, NAT: enzima N-aciltransferasa, NArPE: N-araquidonil-fosfatidiletanolamina, NAPE-PLD: enzima fosfodiesterasa selectiva de N-acil-fosfatidiletanolamina, FAAH: enzima amidohidrolasa de ácidos grasos, DAGL: enzima diacilglicerol lipasa.

Centrándonos en los receptores cannabinoideos, el rCB1 y el rCB2, ambos pertenecen a la misma familia de receptores acoplados a proteínas G, diferenciándose principalmente en el modo de transmitir la señal tras la unión del correspondiente ligando endógeno, así como en su distribución en los tejidos. Los rCB1 son los más abundantes a nivel del SNC, pues se encuentran distribuidos ampliamente en diversas regiones cerebrales, la médula espinal y el sistema nervioso periférico (SNP). En menor medida también se encuentran en glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y aparatos reproductor, urinario y gastrointestinal. A nivel cerebral, los rCB1 se expresan tanto en neuronas como en glía y tienen distintas implicaciones funcionales por su

presencia en multitud de regiones del cerebro pudiendo destacar, por ejemplo, aquellas responsables del movimiento como el cerebelo y el estriado, del procesamiento de la memoria como el hipocampo, de la regulación de las emociones como el núcleo accumbens y la amígdala, y de la modulación del dolor como la sustancia gris periacueductal¹¹. Sin embargo, los rCB2 son menos abundantes a nivel cerebral y poseen una importante función en la regulación de la respuesta inmune a nivel periférico, de ahí que se encuentren principalmente en las células inmunitarias (linfocitos), en el bazo y en las amígdalas¹². Los rCB2 también se expresan en menor cantidad en otros tejidos del organismo como miocardio, riñón, pulmón, estómago o hígado¹³.

Hasta hace unos años se pensaba que los rCB2 estaban presentes principalmente a nivel periférico desempeñando una función inmunomoduladora, y que sólo se expresaban a nivel cerebral cuando se producía algún tipo de daño, lesión, o ante un proceso neurodegenerativo. Sin embargo, esta afirmación era errónea y sería en el año 2005 cuando Sickle y cols.¹⁴ describieron la presencia del rCB2 en el cerebro de ratón, rata y hurón en condiciones normales (no patológicas). Este descubrimiento hizo pensar que podía tener una importante implicación funcional a nivel del SNC. De hecho, poco después se caracterizaría la distribución del rCB2 mediante técnicas inmunohistoquímicas en el cerebro de rata, tal y como se puede observar en la Figura 2.

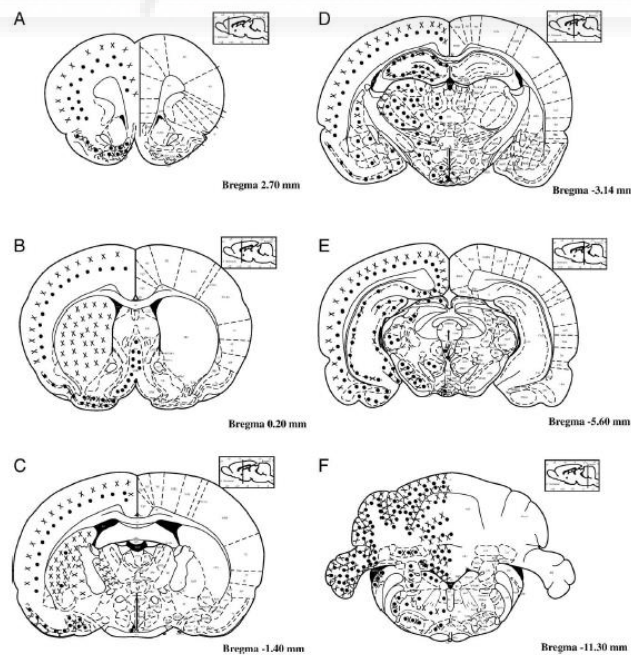


Figura 2 - Representación esquemática de las estructuras inmunopositivas al rCB2 marcadas con cruces (dendritas y axones) y puntos (somas) en diversos cortes coronales de cerebro de rata. Imagen extraída de: Gong, J.P., et al., Brain Res, 2006¹².

Además, cabe destacar que a diferencia de los efectos psicótrópos negativos que se producen tras la activación de los rCB1 a través de, por ejemplo, el consumo de cannabis (alteraciones cognitivas, trastornos psicóticos, adicción, ansiedad, etc.), la activación de los rCB2 se caracteriza por la ausencia de esos efectos adversos incrementando notablemente el interés de su modulación farmacológica con fines terapéuticos.

1.2 Implicación funcional del receptor CB2 en procesos neurodegenerativos

Debido al aumento en el número de personas afectadas por enfermedades neurodegenerativas como pueden ser el Alzheimer o el Parkinson, y que su etiología no está completamente definida, se han iniciado estudios que han mostrado que el sistema endocannabinoide, y más concretamente el rCB2, tiene un importante papel a nivel del SNC modulando la función neuronal, glial y endotelial produciendo así efectos neuromoduladores, vasodilatadores, neuroprotectores y antiinflamatorios¹². Este sistema se encarga de modular la respuesta de otros sistemas de neurotransmisión, controlando la liberación y la funcionalidad de los principales neurotransmisores como la DA, la serotonina, el ácido γ -aminobutírico (GABA) o el glutamato, entre otros.

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa devastadora en la que se produce, entre otros fenómenos, una neuroinflamación crónica debido a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como interleuquinas (IL), más concretamente IL-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)¹⁵. Entre la multitud de estudios recientes, cuyo objetivo principal es valorar la implicación del rCB2 en el proceso neurodegenerativo y la posible utilidad terapéutica de su modulación farmacológica, se ha observado precisamente que utilizando un agonista selectivo del rCB2 como es el JWH-133, se mejoran las funciones cognitivas (memoria) y se produce un descenso de los procesos neuroinflamatorios, reduciendo así la expresión de marcadores como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), TNF- α , o especies reactivas del nitrógeno (N), entre otros. Ejemplos como éste sugieren un importante papel neuroprotector del rCB2 en el proceso neuroinflamatorio de la EA¹⁶, el cual será motivo de revisión en el presente trabajo.

Por otra parte, el Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común que se caracteriza por la pérdida progresiva de producción de DA debido a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en la sustancia negra (SN) y proyectan hacia los núcleos caudado y putamen. Además, el proceso neurodegenerativo se asocia a una activación microglial que produce un aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias. De hecho, McGreer y cols.¹⁷ describieron en 1988 el fenómeno neuroinflamatorio que acontece en la EP, observando una activación de la microglía que daba lugar, al igual que en la EA, a un aumento en los niveles de ciertos mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4 e IL-6. En este punto es relevante señalar que la microglía es una población celular de macrófagos especializados que se encuentra en el SNC, encargada de la defensa inmunológica activa para un correcto mantenimiento de la función neuronal. Ante cualquier tipo de insulto o daño la microglía reacciona activando su función fagocitaria, eliminando las células que estén dañadas o los agentes que den lugar a un estado patológico. Hoy en día, se emplean tratamientos centrados en la mejora de la sintomatología motora de la EP entre los que cabe destacar la levodopa (L-DOPA), que se suele administrar junto con un inhibidor de la DOPA-descarboxilasa como la benserazida o la carbidopa. Sin embargo, se carece de abordajes terapéuticos que permitan modificar el curso de la enfermedad, cuyo objetivo sea tratar de ralentizar su progresión. En este sentido, recientemente se han realizado estudios para comprobar el efecto neuroprotector que podría aportar el rCB2. Entre éstos se podría destacar el publicado por Ternianov y cols.¹⁸, en el que se emplean ratones modificados genéticamente para que sobreexpresen el rCB2. A estos ratones se les administra 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina que permite reproducir en los ratones la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que acontece en la EP, para así simular el principal proceso neuropatológico. Tras la administración, los ratones fueron sometidos a distintas pruebas para valorar comportamiento motor, conducta emocional y estado cognitivo, pudiendo observar con el paso del tiempo cómo los ratones que sobreexpresan el rCB2 presentan menos alteraciones motoras y, además, que los marcadores inflamatorios y de oxidación se encuentran más reducidos en relación a los ratones control. Este hallazgo sugirió que la mayor presencia y funcionalidad del rCB2 proporcionaba un efecto protector frente a la lesión dopaminérgica inducida por la 6-OHDA, hecho que

servió de estímulo para pensar en la utilidad terapéutica que podría tener su modulación en la EP.

De forma general, los rCB2 se expresan en baja proporción en el tejido cerebral de sujetos sanos. Sin embargo, su expresión aumenta de forma significativa, especialmente en la microglía y los astrocitos (aunque también en neuronas), cuando se produce algún fenómeno lesivo que además implique neuroinflamación. De hecho, hay estudios *post-mortem* con cerebros de pacientes con Alzheimer¹⁹ o Parkinson²⁰, donde se ha mostrado un aumento considerable de estos receptores. Hasta el momento, los datos que se han recopilado apuntan hacia un importante papel neuroprotector por parte del aumento de la expresión de los rCB2 en condiciones patológicas. La mayor presencia del rCB2 o su activación farmacológica se ha relacionado con la restricción de algunos procesos inflamatorios y oxidativos que, por su parte, contribuyen al empeoramiento de la función neural característica de los trastornos neurodegenerativos. En este sentido, el empleo de agonistas del rCB2 puede mejorar, mediante diversos mecanismos que se revisarán más adelante, los procesos neuroinflamatorios que caracterizan a la EA y la EP, y que tienen lugar principalmente por el depósito anómalo de las proteínas β -amiloide y α -sinucleína, respectivamente.

En los últimos años, se han producido grandes avances en relación al papel que desempeña el sistema endocannabinoide, y en particular el rCB2, en las alteraciones neurobiológicas que acontecen en diversas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer. Este trabajo de revisión bibliográfica presenta especial interés debido a que el rCB2 podría constituir una nueva diana terapéutica que ayudaría en la mejora del tratamiento de estas enfermedades para las que desgraciadamente, hoy en día, no hay un tratamiento curativo o etiológico, sino meramente sintomatológico. Además, es necesario destacar que, el avance hacia nuevas terapias que logren modificar el curso de la enfermedad es imprescindible con el objetivo de conseguir mejorar la calidad de vida del paciente y enlentecer la progresión de la enfermedad. Gracias a las propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias del rCB2 que se han descrito hasta ahora, este objetivo podría lograrse y de hecho numerosos estudios avalan esta hipótesis como se mostrará más adelante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada para esta revisión se ha basado en una búsqueda bibliográfica en la principal base de datos biomédica *Medline* a través de su buscador *PubMed*. Para ello, se han incluido los artículos más relevantes publicados en los últimos 5 años, relacionados con el ámbito de estudio, incidiendo principalmente en aquellos que hacen referencia al papel neuroprotector del rCB2 en patologías neurodegenerativas como la EA o la EP. La búsqueda se ha realizado en inglés, por ser la principal lengua vehicular en el campo médico.

Las palabras clave utilizadas fueron receptor CB2, neuroprotección, Alzheimer y Parkinson. Sin embargo, para realizar la búsqueda fue necesaria su conversión a descriptores, pues son éstos los que actúan como lenguaje único de indización y permiten centrar la búsqueda en un concepto determinado, evitando así, emplear palabras similares con disparidad de significado.

Para ello se empleó la base de datos “DeCs” (Descriptores en Ciencias de Salud, <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>). Brevemente, una vez dentro de la página web se accede a la opción “Consulta al DeCS” y se busca la palabra clave en índice permutado, obteniendo así el descriptor para realizar la búsqueda en *PubMed*. Tras encontrar el descriptor, se comprueba el significado y se obtiene su equivalencia en inglés, correspondiendo con los denominados *Medical Subject Headings* (MeSH).

Palabra clave	DeCS	MeSH
Receptor CB2	Receptor Cannabioide CB2	Receptor, Cannabinoid, CB2
Neuroprotección	Neuroprotección	Neuroprotection
Alzheimer	Enfermedad de Alzheimer	Alzheimer Disease
Parkinson	Enfermedad de Parkinson	Parkinson Disease

Una vez en el buscador *PubMed*, se utilizaron los términos “MeSH” junto con el operador booleano utilizado como conector “AND”. El objetivo es centrar la búsqueda en artículos específicos y válidos en relación al objetivo de la revisión y por ello se empleó “AND” con el fin de conectar dos palabras aumentando la sensibilidad y la especificidad de la búsqueda.

A continuación, se detallan los criterios de inclusión y exclusión que se han aplicado para la selección de las referencias que se han manejado:

- Criterios de inclusión:
 - Referencias científicas publicadas en los últimos 5 años.
 - Artículos originales de carácter preclínico o clínico relacionados con los mecanismos de neuroprotección mediados por el rCB2, y su implicación en trastornos neurodegenerativos (EA y EP).
 - Se aceptan revisiones sistemáticas o meta-análisis recientes relacionados con el tema de estudio.
- Criterios de exclusión:
 - Referencias científicas no escritas en lengua inglesa o española.
 - Artículos no centrados en el papel neuroprotector del rCB2 en enfermedades neurodegenerativas.
 - No tener acceso al artículo a través de internet mediante el acceso personalizado de la UMH.

Seguidamente, se muestran las cajas de búsqueda que se emplearon conforme a los bloques temáticos en los que se ha subdividido el apartado de resultados del presente trabajo.

1. Mecanismos implicados en el efecto neuroprotector del rCB2.

✚ “Receptor, Cannabinoid, CB2” AND “Neuroprotection”

2. Utilidad terapéutica del rCB2 en el tratamiento de las alteraciones cognitivas de la enfermedad del Alzheimer.

✚ “Receptor, Cannabinoid, CB2” AND “Alzheimer Disease”

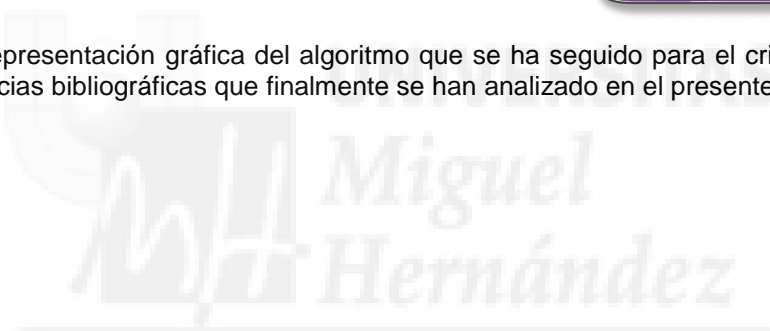
3. Utilidad terapéutica del rCB2 en el tratamiento de las alteraciones motoras de la enfermedad de Parkinson.

✚ “Receptor, Cannabinoid, CB2” AND “Parkinson Disease”

La figura que se muestra a continuación (Figura 3) recoge el proceso de búsqueda y selección de los resultados que se ha llevado a cabo, aplicando los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente.



Figura 3 - Representación gráfica del algoritmo que se ha seguido para el cribaje y selección de las referencias bibliográficas que finalmente se han analizado en el presente trabajo.



3. RESULTADOS

En este apartado se abordarán en diferentes bloques los aspectos relacionados con el papel neuroprotector que podría ejercer el rCB2 a nivel del SNC y su potencialidad terapéutica en enfermedades neurodegenerativas. Primero se revisarán los mecanismos que subyacen a los efectos antiinflamatorios y antioxidantes mediados por los rCB2, íntimamente relacionados con su capacidad neuroprotectora (bloque 3.1). Posteriormente, se comentarán las evidencias científicas acerca de la utilidad terapéutica de la manipulación funcional del rCB2 en la EA (bloque 3.2) y la EP (bloque 3.3).

3.1 Mecanismos implicados en el efecto neuroprotector del receptor CB2

En los últimos años, se ha observado que el rCB2, a través de múltiples mecanismos que producen en última instancia un efecto antiinflamatorio o antioxidante, puede ejercer un papel neuroprotector que podría ser muy útil en el manejo terapéutico de diferentes trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer o el Parkinson. En este bloque se van a mostrar los resultados tras la revisión de diversos trabajos que estudian estos mecanismos, y su implicación en el manejo de las patologías neurodegenerativas nombradas anteriormente. Para ello, en los trabajos revisados se han empleado diferentes modelos preclínicos (*in vitro* o *in vivo*) cuya utilidad es reproducir parcialmente las alteraciones neuropatológicas que caracterizan a la EA y la EP. De esta forma, se puede conocer mejor la utilidad que tendría la manipulación farmacológica o genética del rCB2 principalmente en la modulación de los procesos inflamatorios y oxidativos, muy implicados en el fenómeno neurodegenerativo que acontece en estas patologías neurológicas.

En relación al estudio de los efectos antiinflamatorios de los rCB2, Ehrhart y cols.²¹ emplearon cultivos *in vitro* de células microgliales activadas con interferón- γ (IFN- γ) expuestas al péptido β amiloide. Esta molécula se encuentra alterada en la EA dando lugar a procesos patológicos entre los que destacaría la activación microglial, responsable en parte del proceso neurodegenerativo. La exposición a dicho péptido se utiliza para reproducir la activación microglial patológica que se produce en la EA con el objetivo de poder valorar el efecto de diferentes sustancias o fármacos. De esta forma, en este estudio se administró el fármaco JWH-015, agonista cannabinoide sintético selectivo de los rCB2, dando lugar a un aumento de la fagocitosis del péptido β amiloide que a su vez se traduce en una reducción en la activación de las células microgliales. Estos efectos se producen

probablemente como consecuencia de una disminución de los niveles de óxido nítrico (NO) y TNF- α , cuya liberación se induce por parte del IFN- γ . Este estudio demuestra que la activación de los rCB2 produce una reducción en los niveles de mediadores inflamatorios *in vitro*, sugiriendo su posible utilidad en el manejo de los procesos neuroinflamatorios. Del mismo modo, Ramirez y cols.²² emplearon un modelo *in vitro* en el que se utilizaban células microgliales expuestas al péptido β -amiloide y como consecuencia se producía la activación microglial patológica. Este fenómeno se atenuó de forma significativa cuando se administró el agonista selectivo CB2, JWH-133, observándose una disminución en la liberación de TNF- α .

Con el fin de obtener información *in vivo* sobre el posible efecto antiinflamatorio del rCB2, se han realizado experimentos en modelos animales en los que se inducen fenómenos neuroinflamatorios mediante determinadas modificaciones genéticas o la administración de neurotoxinas. Martín-Moreno y cols.¹⁶ emplearon un modelo transgénico en ratón de la EA denominado Tg2576, cuya modificación genética implica la sobreexpresión de una isoforma mutada de la proteína precursora amiloide (del inglés *Amyloid Precursor Protein, APP*) consiguiendo reproducir parcialmente el proceso neuropatológico. Se administraron distintos agonistas selectivos del rCB2, como el ya mencionado JWH-133 (0,2 mg/kg, vía oral (v.o.)), observándose un bloqueo de la activación de la microglía que tiene como consecuencia la disminución en el nivel de citoquinas proinflamatorias, más concretamente del TNF- α .

Asimismo, Price y cols.²³ utilizaron un modelo neurotóxico en ratones macho C57BL/6N a los que inyectaron intracerebralmente la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), que produce la destrucción de neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, simulando así el principal proceso neuropatológico y los síntomas propios de la EP. Con el fin de demostrar el efecto antiinflamatorio se administró el agonista CB2 selectivo JWH015 (4mg/kg, vía intraperitoneal (i.p)), y el agonista no selectivo CB1/CB2 WIN55,212-2 (4mg/kg, i.p.), que produjeron la activación del rCB2 y en consecuencia el cese de la activación microglial. Esta conjugación de efectos podría estar relacionada con fenómenos de neuroprotección que implicarían una reducción de la muerte neuronal y un mejor mantenimiento de las funciones neuronales, pues se observó un aumento de los niveles de DA en la SN de los ratones lesionados con MPTP y tratados con los fármacos cannabinoides mencionados anteriormente.

Otro estudio en el que también se valora el posible efecto antiinflamatorio del rCB2, utilizando un modelo neurotóxico con MPTP en ratones macho C57BL/6, sería el publicado por Chung YC y cols.²⁴ El objetivo fue demostrar que utilizando fármacos que modulasen de forma selectiva el rCB2 se podría bloquear el aumento de expresión de citoquinas proinflamatorias inducido mediante la administración de MPTP, como IL-1 β y TNF- α , y de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) que interviene en la síntesis de mediadores inflamatorios. Al tercer día desde la última inyección de MPTP, se extrajeron los cerebros de los ratones que posteriormente se diseccionaron para evaluar mediante inmunohistoquímica el marcaje con el anticuerpo MAC-1, que sirve para detectar la activación de la microglía. Además, se determinaron los niveles de expresión génica de citoquinas y mediadores inflamatorios mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. En la Figura 4 se pueden observar los resultados de expresión génica relativos a las citoquinas proinflamatorias, IL-1 β y TNF- α , y al mediador inflamatorio, iNOS, en la SN. Cuando se administra MPTP (véase en la Figura 4 el grupo M) se produce un aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias e iNOS con respecto al grupo control (grupo C). Sin embargo, cuando se administra un agonista CB1/CB2 (WIN55,212-2, 10 μ g/kg, i.p., grupo MW) o un agonista selectivo CB2 (JWH-133, 4mg/kg, i.p., grupo MJ), previamente y posteriormente a la administración del MPTP, se produce una reducción muy notable de los niveles de las citoquinas proinflamatorias e iNOS alcanzando valores cercanos a los del grupo control, fenómeno que estaría asociado al cese de la activación de la microglía. Después se administra de forma conjunta el agonista cannabinoide, WIN55,212-2 o JWH-133, y el antagonista selectivo CB2 AM630 (grupos MWA y MJA, respectivamente), con el objetivo de valorar si el efecto de ambos agonistas sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias e iNOS estaría mediado de forma específica por el rCB2. De esta forma, la Figura 4 muestra que el antagonismo del rCB2 impide que se produzca el efecto de ambos agonistas, alcanzando valores similares a los del grupo tratado con MPTP (grupo M). Por tanto, este resultado sugiere que el efecto estaría mediado de forma específica por parte del rCB2.

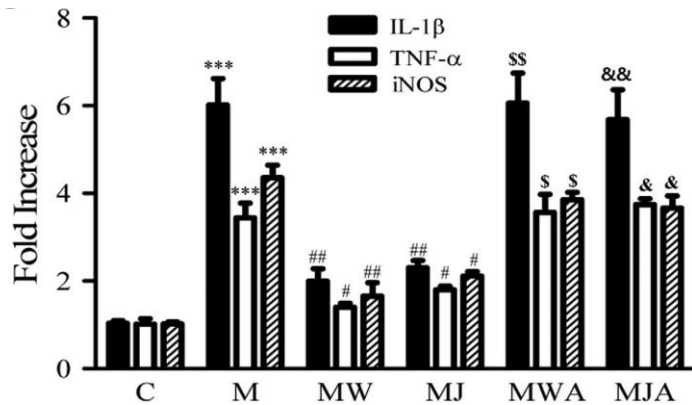


Figura 4 –Análisis de la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , y del mediador inflamatorio iNOS, mediante PCR a tiempo real. Imagen extraída de: Chung, Y.C., et al., Exp Mol Med, 2016²⁴. C: grupo control, M: grupo MPTP, MW: grupo MPTP + WIN55,212-2, MJ: grupo MPTP + JWH-133, MWA: grupo MPTP + WIN55,212-2 + AM630, MJA: grupo MPTP + JWH-133 + AM630.

Del mismo modo, el efecto antiinflamatorio que se acaba de comentar también puede apreciarse en el artículo de Javed H y cols.²⁵, cuyo fin es demostrar que la activación del rCB2 protege contra la neuroinflamación y el estrés oxidativo asociado a la EP. Para ello utilizaron un modelo neurotóxico en el que se administra rotenona (ROT, i.p.) a ratas macho de la cepa Wistar. La ROT es un pesticida que, al igual que el MPTP, produce la destrucción de las neuronas dopaminérgicas de la SN que proyectan hacia el núcleo estriado, dando lugar a alteraciones motoras similares a las que sufren los pacientes con EP. En este trabajo se utiliza un agonista selectivo CB2 para valorar si se pueden revertir los efectos inflamatorios y oxidativos que induce la administración de ROT. Dicho compuesto es el Beta-cariofileno (BCP), compuesto cannabinoide extraído de la planta *Cannabis sativa* que se caracteriza por sus potentes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. En la Figura 5 se puede observar que al administrar ROT se produce un aumento de las citoquinas proinflamatorias en el mesencéfalo (región cerebral en la que se localiza la SN), más concretamente de IL-1 β , IL-6 y TNF- α con respecto al grupo control (grupo CONT). Sin embargo, cuando se administra BCP (50mg/kg, i.p.) al grupo tratado con ROT (grupo ROT + BCP) se produce una reducción significativa de los niveles de las citoquinas proinflamatorias. Para averiguar si se trata de un efecto mediado de forma específica por el rCB2, se administró de forma conjunta el agonista BCP con el antagonista CB2 AM630 (grupo ROT + BCP + AM630). Como se muestra en la Figura 5, el bloqueo farmacológico del rCB2 evitó que se alcanzara el efecto del BCP con la consecuente elevación de los niveles de citoquinas proinflamatorias (similares a los obtenidos en el grupo ROT).

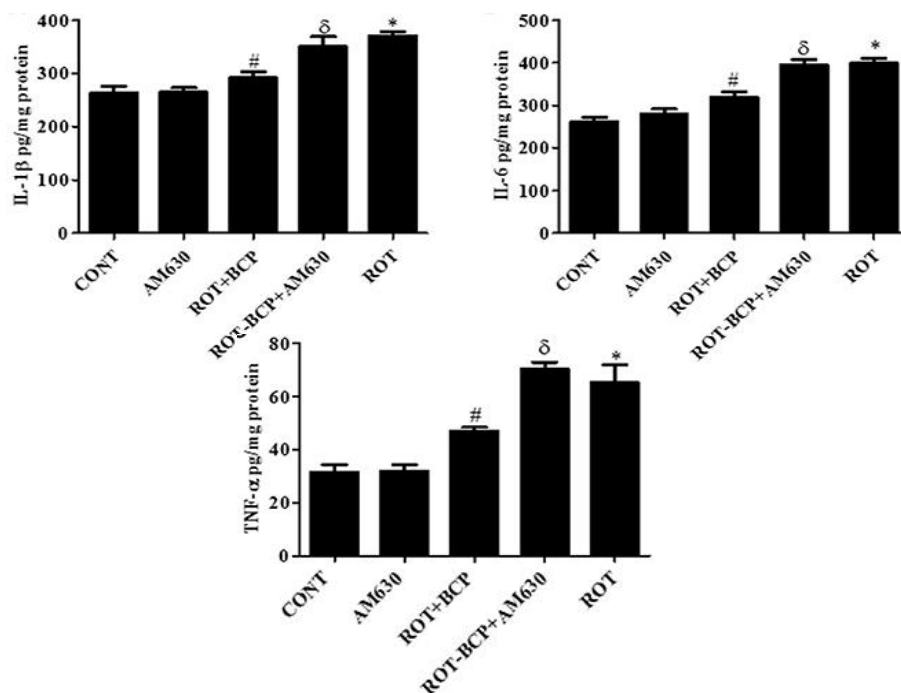


Figura 5 –Análisis de los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) mediante la técnica ELISA. Imagen extraída de: Javed, H., et al., Front Neurosci, 2016²⁵. CONT: control, ROT: rotenona, BCP: beta-cariofileno.

En la Figura 6 se puede observar que al administrar ROT también se produce un aumento en la expresión de enzimas que participan en la síntesis de mediadores inflamatorios y oxidativos en el tejido estriado, como son la ciclooxigenasa-2 (COX-2) e iNOS, con respecto al grupo control (CONT). Sin embargo, cuando se administra BCP (grupo ROT + BCP), se impide el aumento que induce la ROT en la expresión de COX-2 e iNOS. De nuevo, el efecto que se consigue mediante la administración del BCP estaría mediado específicamente por el rCB2, dado que la administración conjunta de BCP y AM630 produjo un bloqueo del efecto del BCP, con la consecuente elevación de los niveles de COX-2 e iNOS (grupo ROT + BCP + AM60).

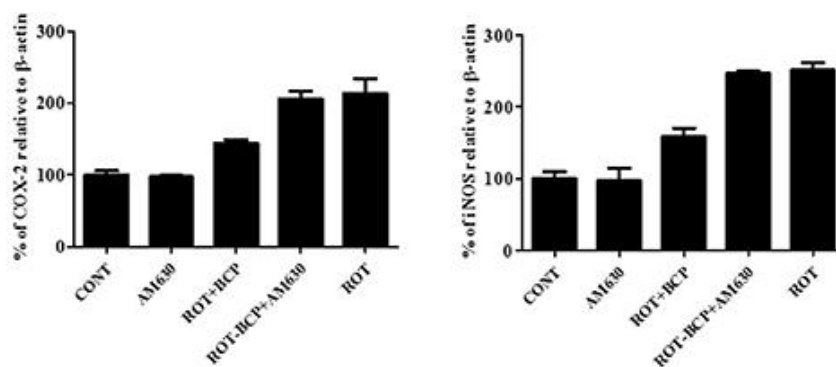


Figura 6 –Análisis de los niveles relativos de expresión de las enzimas COX-2 e iNOS mediante la técnica Western blot. Imagen extraída de: Javed, H., et al., Front Neurosci, 2016²⁵. CONT: control, ROT: rotenona, BCP: beta-cariofileno.

Además de los efectos antiinflamatorios que se producen mediante la activación selectiva del rCB2 conforme a los resultados que se han mostrado, Javed H y cols.²⁵ también evaluaron los efectos antioxidantes. Tras administrar ROT (véase Figura 7, grupo ROT) no solo se produce un aumento de los mediadores inflamatorios tal y como se ha descrito, sino que también se puede observar que la neurotoxina causa daño oxidativo, evidenciado por la reducción en la expresión de enzimas con efecto antioxidante y alteraciones en los niveles de nitrito, glutatión reducido (GSH) y malondialdehído (MDA), que son compuestos que evidencian que se está produciendo estrés oxidativo. El glutatión es el principal antioxidante que se genera debido a la vida de la célula y participa directamente en la neutralización de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, indicando que se produce estrés oxidativo cuando aumenta la forma oxidada del glutatión (GSSG) y disminuye la forma reducida (GSH). Por tanto, si el ratio GSSG:GSH es elevado, implicará un mayor nivel de estrés oxidativo. Otro compuesto que podría indicar estrés oxidativo es el MDA, producto final de la peroxidación de los lípidos, que conduce a su vez a la producción de peróxidos y sus derivados, dando lugar a una pérdida de la función de la membrana. Por lo tanto, con el fin de identificar un posible efecto antioxidante mediado por el rCB2, se administró BCP (grupo ROT + BCP) y se observó que se producía un bloqueo de la alteración que induce la ROT en los niveles de nitrito, GSH y MDA en el mesencéfalo. Sin embargo, dicho efecto es anulado cuando se administra de forma conjunta BCP y AM630 (grupo ROT + BCP + AM630), siendo un indicativo de la implicación específica del rCB2 en los efectos antioxidantes mediados por el BCP.

Tras la administración de ROT se produce una disminución en el nivel de las enzimas antioxidantes como son la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la enzima catalasa (CAT), con lo que este proceso también sería indicativo de estrés oxidativo. Con respecto a las enzimas antioxidantes, en la Figura 8 se puede observar que las ratas a las que se les inyecta ROT experimentan una bajada en el nivel de SOD y CAT en comparación con el grupo control. Sin embargo, cuando se les administra BCP se produce una menor reducción en los niveles de las enzimas antioxidantes en comparación con el grupo ROT. Una vez más, se comprueba que el efecto farmacológico está siendo mediado específicamente por el rCB2 tras administrar de forma conjunta el agonista BCP y el antagonista AM630,

observándose una disminución de los niveles de SOD y CAD similar a la que induce la ROT.

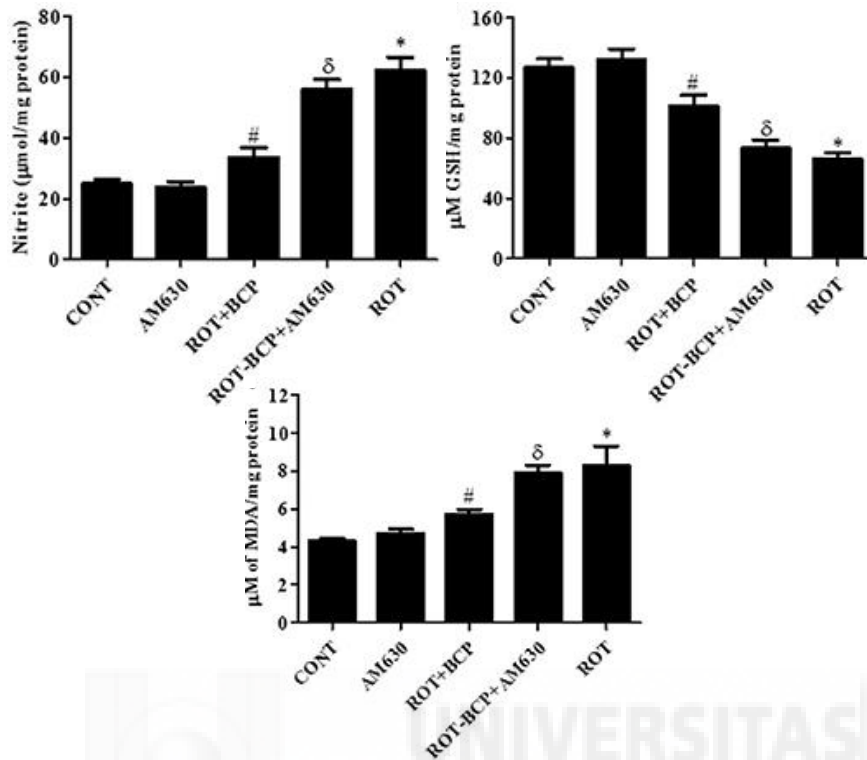


Figura 7 –Análisis de los niveles de nitrito, GSH y MDA. Extraída de: Imagen extraída de: Javed, H., et al., Front Neurosci, 2016²⁵. CONT: control, ROT: rotenona, BCP: beta-cariofileno.

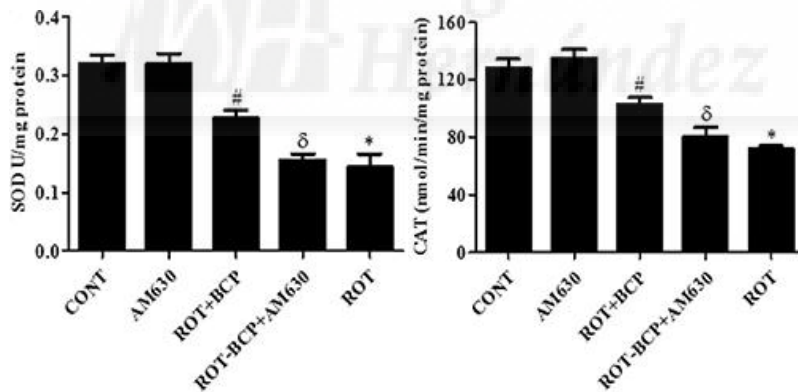


Figura 8 –Análisis de los niveles de SOD y CAT. Imagen extraída de: Javed, H., et al., Front Neurosci, 2016²⁵. CONT: control, ROT: rotenona, BCP: beta-cariofileno.

Otro artículo que evalúa los mecanismos que podrían subyacer a los efectos neuroprotectores del rCB2 es el publicado por Ternianov y cols.¹⁸ En este trabajo se emplearon ratones modificados genéticamente que sobreexpresan el rCB2 (CB2xP), así como sus respectivos controles *wild type* (WT). Éstos se exponen a la administración intracerebral de 6-OHDA, neurotoxina que induce la muerte de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal dando lugar a la sintomatología motora característica de la EP. Con el objetivo de valorar la capacidad antioxidante que tendría en este caso el aumento de la presencia del

rCB2 a nivel cerebral, los autores evaluaron el ratio GSSG:GSH y los niveles de MDA en muestras de corteza y núcleo estriado. Cuando se administra la neurotoxina en ratones WT, se produce un aumento significativo del ratio GSSG/GSH y de los niveles de MDA, lo que indica un elevado nivel de estrés oxidativo que se asociaría al proceso neurodegenerativo dopaminérgico que induce la administración de 6-OHDA (ver Figura 9). Sin embargo, en los ratones CB2xP no se modifica el ratio GSSG/GSH, y la elevación de MDA que induce la 6-OHDA es mucho menor en comparación con los ratones WT, lo que sugiere un efecto protector del rCB2 contra el estrés oxidativo.

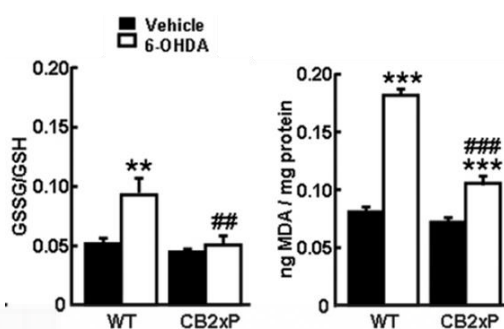


Figura 9 – Análisis del ratio GSSG/GSH y de los niveles de MDA en muestras de corteza y estriado de ratón tras la administración de la neurotoxina 6-OHDA. Imagen extraída de: Ternianov, A., et al., *Neurobiol Aging*, 2012¹⁸.

Por otro lado, Nader J y cols.²⁶ analizaron los mecanismos mediante los cuales los ligandos endocannabinoides proporcionarían neuroprotección contra la pérdida de DA inducida por la administración de metanfetamina (METH) en ratones macho C57BL/6J. Para ello utilizaron el fármaco JZL184, inhibidor de la enzima MAGL que participa en la metabolización del ligando cannabinoide endógeno 2-AG. De esta forma, en la Figura 10 se puede observar en primer lugar que la administración de METH (grupo Veh+Veh+METH) produce una reducción significativa en el marcaje de tirosina hidroxilasa (TH), enzima encargada de la transformación de tirosina a DA, que se revierte completamente al inyectar JZL184 (16mg/kg, i.p.) (grupo Veh+JZL+METH). Con el objetivo de averiguar qué receptores cannabinoides mediaban el efecto neuroprotector, se utilizaron antagonistas selectivos del rCB1 (rimonabant) y del rCB2 (AM630). Dichos antagonistas se inyectan 1 hora antes de la inyección de METH y 20 minutos antes de la inyección de JZL184. Mientras que la administración de rimonabant no es capaz de producir el bloqueo del efecto inducido por el fármaco JZL184 (grupo Rim+JZL+METH), la administración de AM630 sí que modifica dicho efecto (grupo AM630+JZL+METH). Estos resultados ofrecen importantes claves sobre la implicación específica que tendrían los rCB2 (y aparentemente no los CB1) en los

efectos neuroprotectores mediados por la elevación de los niveles del ligando endógeno 2-AG.

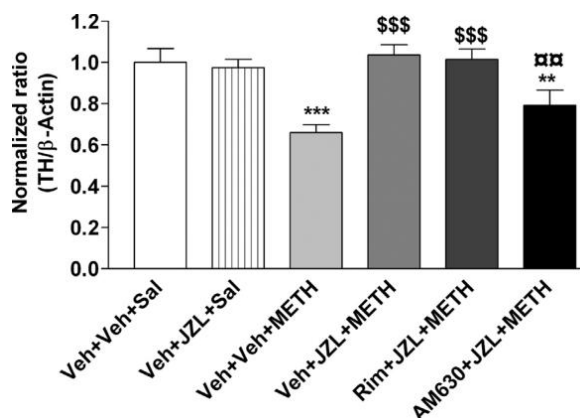


Figura 10 – Análisis del efecto de JZL184 sobre la reducción de los niveles de marcaje de TH inducida por METH mediante la técnica Western blot y evaluación de la implicación de los rCB1 y rCB2 mediante la administración de rimonabant y AM630. Imagen extraída de: Nader, J., et al., *Neuropharmacology*, 2014²⁶. Veh: vehículo, Sal: salino, METH: metamphetamine, Rim: rimonabant.

Hasta este punto, se han comentado los posibles modelos experimentales (*in vitro* o *in vivo*) a través de los que se podría demostrar el efecto neuroprotector mediado por los rCB2 en enfermedades de tipo neurodegenerativo. Sin embargo, un aspecto a tener en cuenta, que impulsa hacia una investigación más profunda y traslacional sobre los mecanismos implicados en dicho efecto y su posible utilidad terapéutica, es la existencia de evidencias de un posible papel neuroprotector del rCB2 en muestras biológicas de origen clínico. Tales evidencias pueden encontrarse en artículos como el publicado por Mulder y cols.²⁷, donde se comenta que la EA se caracteriza por la formación de placas seniles formadas por la agregación del péptido β -amiloide, visibles en cerebros *post-mortem* de pacientes con dicha enfermedad, en los que además se encuentra una sobreexpresión de los rCB2 en células asociadas a dichas placas. Del mismo modo, en el artículo de Gómez-Gálvez y cols.²⁰, se realiza un estudio con muestras cerebrales *post-mortem* de pacientes con EP en los que se observa un aumento en el nivel de expresión de los rCB2 en la SN, así como su presencia en células de la microglía. Recientemente, Navarrete y cols.²⁸ emplearon un amplio número de muestras cerebrales de pacientes con EP para realizar estudios de expresión génica e inmunohistoquímicos. Se midió la expresión génica relativa de rCB1 y rCB2, y de la enzima MAGL, mediante la técnica de PCR a tiempo real. Los resultados revelaron cambios significativos en la expresión de los rCB1 y rCB2, así como de la enzima MAGL, pudiendo destacar un aumento de aproximadamente 4 veces en la expresión del rCB2 en la SN en relación a los pacientes control. Además, se

estudió mediante microscopía confocal la localización del rCB2 en la SN, evidenciando que sólo se encontraba presente en los astrocitos. Por lo tanto, estos hallazgos en muestras de pacientes con EA o EP refuerzan aún más la idea de que la modulación farmacológica del rCB2 podría representar una nueva herramienta terapéutica potencial para el manejo de ambas patologías. Finalmente, en la imagen que se muestra a continuación²⁹, se recopilan todos los mecanismos de tipo antiinflamatorio y antioxidante a los que da lugar la activación del rCB2, en las situaciones patológicas características de la EA y la EP (depósito de β -amiloide y de α -sinucleína, respectivamente).

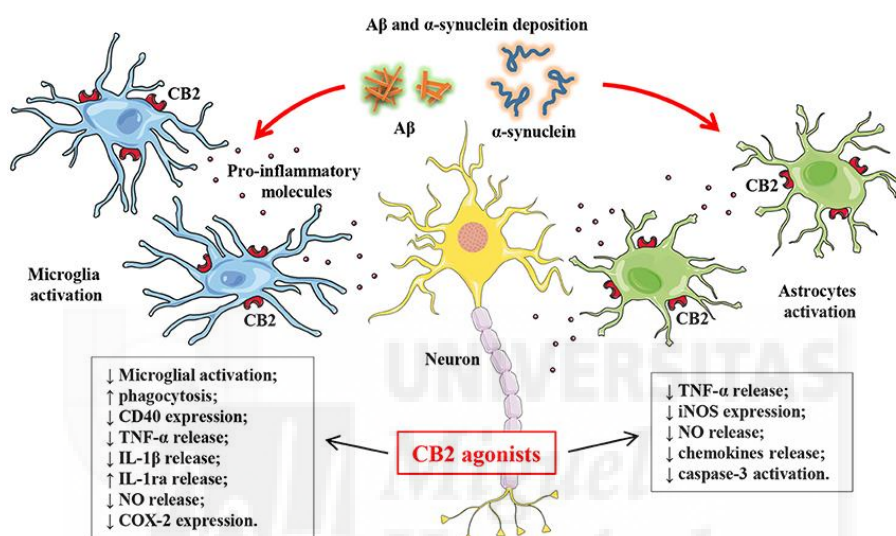


Figura 11 – Representación esquemática de los mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes producidos por la administración de agonistas del rCB2, la EA y la EP. Imagen extraída de: Cassano, T., et al., Front Neurosci, 2017²⁹.

3.2 Utilidad terapéutica del receptor CB2 en el tratamiento de las alteraciones cognitivas de la enfermedad de Alzheimer

La EA es la enfermedad neurodegenerativa más común que cursa con demencia, pérdida del lenguaje, cambios de conducta, desorientación en tiempo y espacio, y se caracteriza por la aparición de lesiones que son distintivas de esta enfermedad a lo largo del cerebro. Sus lesiones características están formadas por péptido β -amiloide y ovillos neurofibrilares, compuestos por la acumulación de proteína tau hiperfosforilada³⁰. La deposición de péptido β -amiloide tiene como consecuencia la activación de la microglía que a su vez libera moléculas proinflamatorias y también puede influir en la producción de iNOS, NO y TNF- α en los astrocitos induciendo una hiperfosforilación anormal de la proteína tau en las neuronas, que dará lugar a los ovillos neurofibrilares³¹. Con el fin de intentar disminuir la neuroinflamación producida por la deposición anómala de placas de

péptido β -amiloide, y atenuar las alteraciones cognitivas implicadas en los déficits de los procesos de aprendizaje y memoria, en los últimos años se ha evaluado la utilidad terapéutica que se podría derivar de la manipulación funcional del rCB2. Además, teniendo en cuenta que algunos estudios han mostrado que dichos receptores se encuentran sobreexpresados en células asociadas a placas seniles de cebreros *post-mortem* de pacientes con EA, parece plausible pensar que su regulación farmacológica podría resultar útil en el manejo de los síntomas característicos de la EA²⁷. Por tanto, en este segundo bloque se analizarán los estudios centrados en evaluar el papel que jugaría el rCB2 en la modulación de las principales alteraciones cognitivas de esta patología.

Una de las pruebas más utilizadas en animales (roedores) para valorar los déficits en los procesos de consolidación de la memoria espacial y de trabajo en la EA, y cómo se pueden mejorar mediante aproximaciones genéticas o farmacológicas, es el laberinto acuático de Morris³². Brevemente, dicho test valora la memoria de tipo espacial y consiste en un recipiente (o piscina) redondo lleno de agua que se encuentra dividido en 4 cuadrantes (Q1, Q2, Q3 y Q4). En alguno de éstos se encuentra situada una plataforma, que no llega a sobresalir sobre el nivel del agua, que permite al roedor escapar colocándose sobre ella. El diseño experimental de la prueba se divide en dos fases: adquisición y retención. Durante la **fase de adquisición** el roedor debe aprender dónde se encuentra situada la plataforma para poder escapar y se mide el tiempo de escape, es decir, el tiempo que tarda en encontrar la plataforma. En la Figura 12 se muestra una imagen correspondiente al primer día de entrenamiento en la que se puede observar que la trayectoria que realiza el animal para alcanzar la plataforma sumergida no es directa y el tiempo de escape es mayor. Sin embargo, después de un proceso de entrenamiento, el roedor realiza una trayectoria mucho más directa, tardando menos tiempo en encontrar la plataforma (menor tiempo de escape), fruto del proceso de aprendizaje y memorización de las claves contextuales externas a la piscina. Después comienza la **fase de retención**, en la que se retira la plataforma del recipiente y se evalúa cuánto tiempo discurre el animal en el cuadrante donde antes se situaba dicha plataforma. Si el animal no presenta problemas en los procesos de consolidación de memoria, es capaz de recordar dónde se encontraba situada la plataforma y nadará durante más tiempo en el cuadrante en el que estaba situada (ver imagen de la fase de retención en la Figura 12).

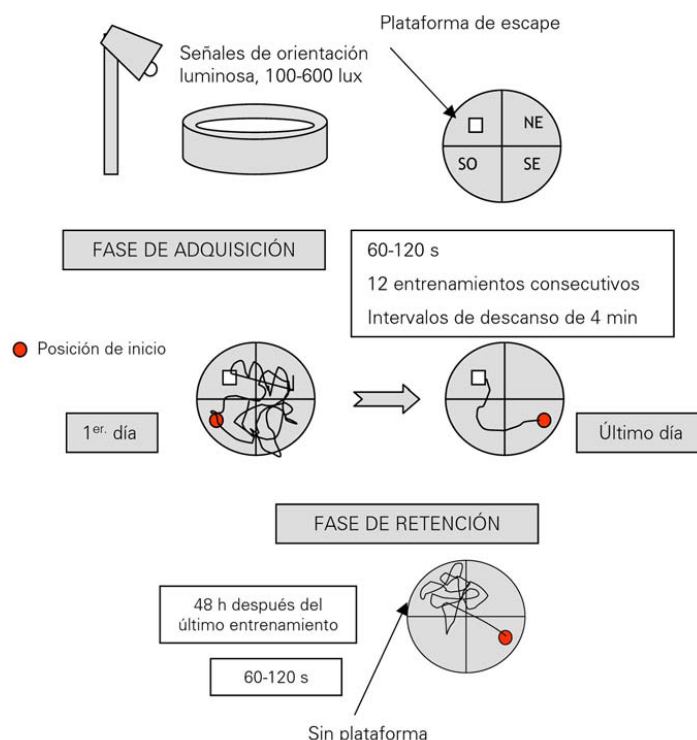


Figura 12 – Representación esquemática del laberinto acuático de Morris y las fases experimentales de las que consta para la evaluación de los procesos de consolidación de la memoria espacial y de trabajo. Imagen extraída de: Navarrete, F., et al., Rev Neurol., 2008³³.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la modulación del rCB2 sobre los déficits cognitivos asociados a la EA, se han hecho numerosos experimentos empleando modelos animales de la patología. Shalini Jayant y cols.³⁴ intentaron demostrar los beneficios farmacológicos que podría tener la modulación selectiva del rCB2 en la EA y para ello utilizaron un modelo neurotóxico murino en el cual simulan la EA administrando estreptozocina (STZ) o tricloruro de aluminio + D-galactosa (AlCl₃) a ratones Swiss albino (machos y hembras). Ambos modelos han sido utilizados en numerosos estudios para la inducción de rasgos de la alteración cognitiva propia de la EA, ya que producen un deterioro en el aprendizaje y en la memoria³⁵. Se empleó el test de Morris, cuyo diseño experimental se ha explicado anteriormente, en el que se evaluaron distintos grupos de tratamiento con el fin de valorar cambios en el tiempo de escape. Tras la administración de los distintos tratamientos (véase Figura 13) se puede observar que en los ratones control (grupo C), el tiempo de escape disminuye significativamente durante el cuarto día con respecto al día 1, ya que han podido aprender donde se sitúa la plataforma para poder escapar. Sin embargo, los ratones tratados con STZ (grupo STZ), presentan un mayor tiempo de escape durante el cuarto día con respecto al resto de grupos. Por tanto, se puede deducir que la administración de STZ produce una afectación de la memoria como ocurriría de manera similar en un paciente con EA.

Cuando se añade 1-fenilisatina (P) (10/20mg/kg, v.o.), modulador selectivo del rCB2 (grupos STZ+P D1 y STZ+P D2), se observa que el tiempo de escape en el cuarto día disminuye con respecto al grupo STZ, alcanzando un efecto similar al conseguido con la administración de donepezilo (D) (0,1mg/kg, i.p.), inhibidor de la acetilcolinesterasa (grupo STZ+D) empleado en la clínica para el tratamiento de la EA. Estos hallazgos plantean que el hecho de administrar fármacos que modulen selectivamente el rCB2 mejoraría tanto el aprendizaje como la memoria afectadas por la administración de STZ.

Con la administración de $AlCl_3$ + D-galactosa (véase Figura 14), ocurre lo mismo que con STZ, se altera la capacidad de aprendizaje y la memoria que se refleja en un aumento del tiempo de escape en el cuarto día comparado con el resto de grupos que no reciben $AlCl_3$ + D-galactosa. Por tanto, cuando se activa de nuevo el rCB2 mediante la administración de 1-fenilisatina, se produce una reducción del tiempo de escape en comparación con el grupo que solo recibe $AlCl_3$ + D-galactosa, que además es similar a la que induce el tratamiento con donepezilo.

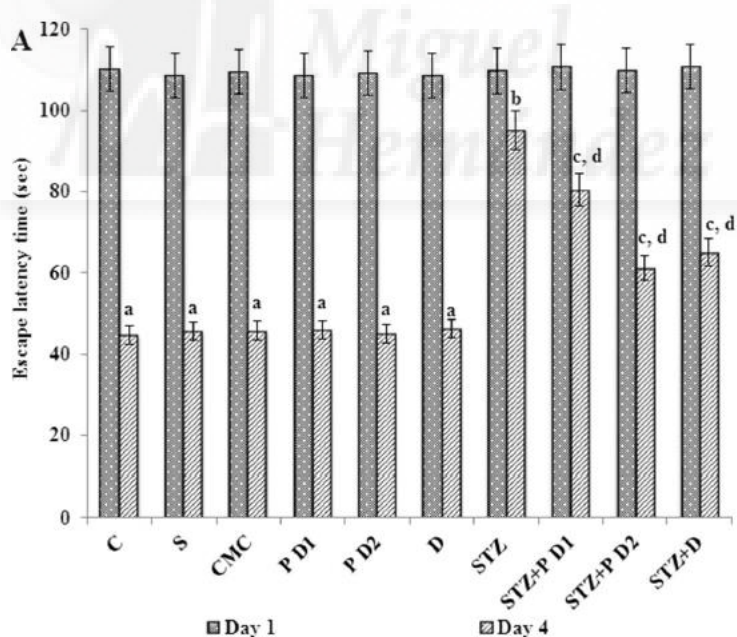


Figura 13 – Análisis del tiempo de escape en el día 1 y día 4 en el laberinto acuático de Morris, en un modelo de la EA mediante la administración de STZ (estreptozocina). Imagen extraída de: Jayant, S., et al., Pharmacol Biochem Behav, 2016³⁴. C: control, S: solución salina, CMC: carboximetilcelulosa; P D1 y P D2: 1-fenilisatina dosis 1 y 2; D: donepezilo, STZ: estreptozocina.

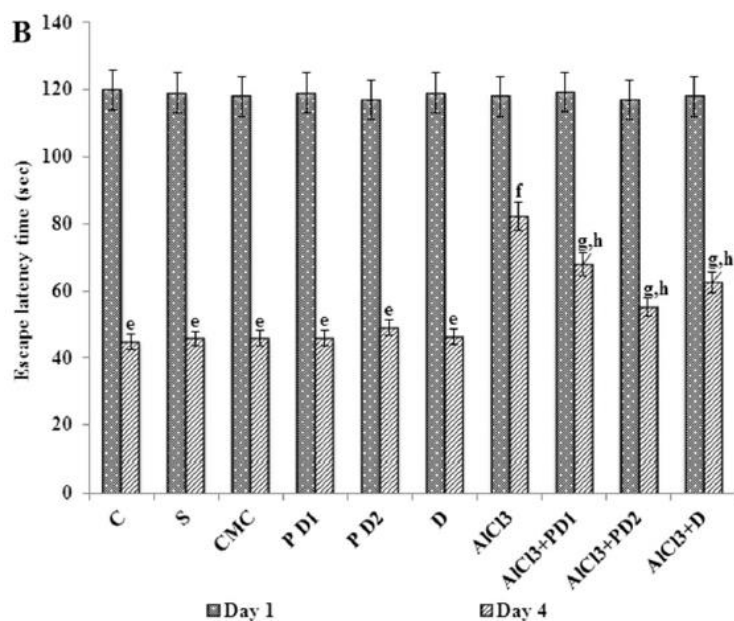


Figura 14 – Análisis del tiempo de escape en el día 1 y día 4 al emplear AlCl_3 + D-galactosa en el laberinto acuático de Morris. Imagen extraída de: Jayant, S., et al., *Pharmacol Biochem Behav*, 2016³⁴. C: control, S: solución salina, CMC: carboximetilcelulosa; P D1 y P D2: 1-fenilisatina dosis 1 y 2; D: donepezilo, STZ: estreptozocina.

Otro artículo en el que se empleó el test de Morris para demostrar el efecto positivo que podrían tener los fármacos que modulan selectivamente el rCB_2 es el publicado por Wu y cols.³⁶ Estos autores emplearon ratones transgénicos APP/PS1, en los que se detectan placas seniles a la edad de 4 meses con la ayuda de una tinción con Tioflavina S, que mide la deposición amiloide. Con estos ratones se pretende simular la EA (tanto a nivel conductual como neuropatológico) y el déficit cognitivo que desarrollan se valoró con el laberinto acuático de Morris. En la Figura 15 se muestran los resultados de la evaluación del tiempo de escape en la que se observa que al ratón APP/PS1 le cuesta más tiempo encontrar la plataforma, aunque esté visible, en comparación con el ratón WT. Sin embargo, tras la administración a los ratones APP/PS1 del agonista CB_2 selectivo, MDA7 ((1-((3-bencil-3-metil-2,3-dihidro-1-benzofuran-6-il) carbonil) piperidina), 15mg/kg, i.p.), el tiempo de escape se reduce e iguala al de los ratones WT. Durante la segunda fase de la prueba, cuando la plataforma está escondida, se observan resultados similares. Los ratones APP/PS1 poseen tiempos de escape significativamente superiores, y cuando se administra el agonista CB_2 el tiempo de escape disminuye llegándose a igualar al de los ratones WT en el último día (ver Figura 15).

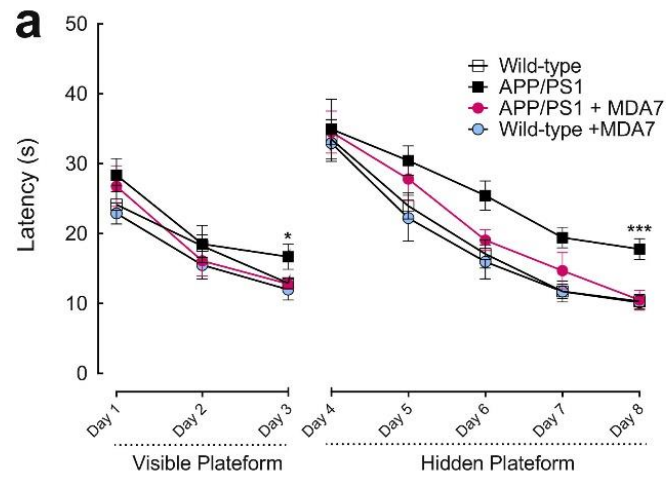


Figura 15 – Análisis del tiempo de escape en ratones WT y ratones APP/PS1 tras administración de MDA7. Imagen extraída de: Wu, J., et al., Eur J Pharmacol, 2017³⁶.

Por otro lado, Wu y cols.³⁶ también valoraron el posible efecto del agonista MDA7 sobre los niveles de placas de β -amiloide en el hipocampo de ratones APP/PS1, con el objetivo de encontrar una correlación entre la mejoría conductual y modificaciones en las alteraciones neuropatológicas características del modelo (aumento del depósito de β -amiloide). Como se observa en la Figura 16, los autores evaluaron el depósito de placas de β -amiloide mediante una tinción con Tioflavina S, obteniendo que los ratones a los que se les administra MDA7 presentan niveles muy inferiores. Este resultado sugiere que la activación del rCB2 disminuye la deposición de placas, efecto que podría atenuar los fenómenos neuroinflamatorios asociados y estar relacionado con la mejoría en los procesos de consolidación de la memoria.

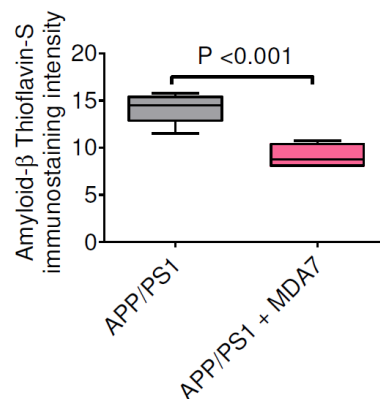


Figura 16 – Evaluación de los niveles de β amiloide mediante tinción con Tioflavina S en ratones APP/PS1 tratados con MDA7, en relación a sus respectivos controles. Imagen extraída de: Wu, J., et al., Eur J Pharmacol, 2017³⁶.

El test de reconocimiento de objetos es otra prueba que se emplea para valorar memoria de tipo no espacial (Figura 17). Desde que Ennauer y cols.³⁷ introdujeron esta prueba en 1997, su uso como herramienta experimental para valorar los mecanismos neurobiológicos implicados en el aprendizaje y la memoria, y su posible modulación farmacológica, ha ido incrementando notablemente³⁸⁻⁴⁵. Dicha prueba se fundamenta en la tendencia natural de los ratones a explorar nuevos objetos y consiste en colocar al animal en un campo abierto en el que se colocan una serie de objetos para que el ratón los explore y así poder medir el tiempo de exploración de cada uno de ellos, equivalente al tiempo que el animal olisquea o toca el objeto. En primer lugar, se realiza una fase de habituación, en la que se coloca al animal en el campo abierto sin ningún objeto, y se deja transcurrir un tiempo para que se familiarice con el entorno.

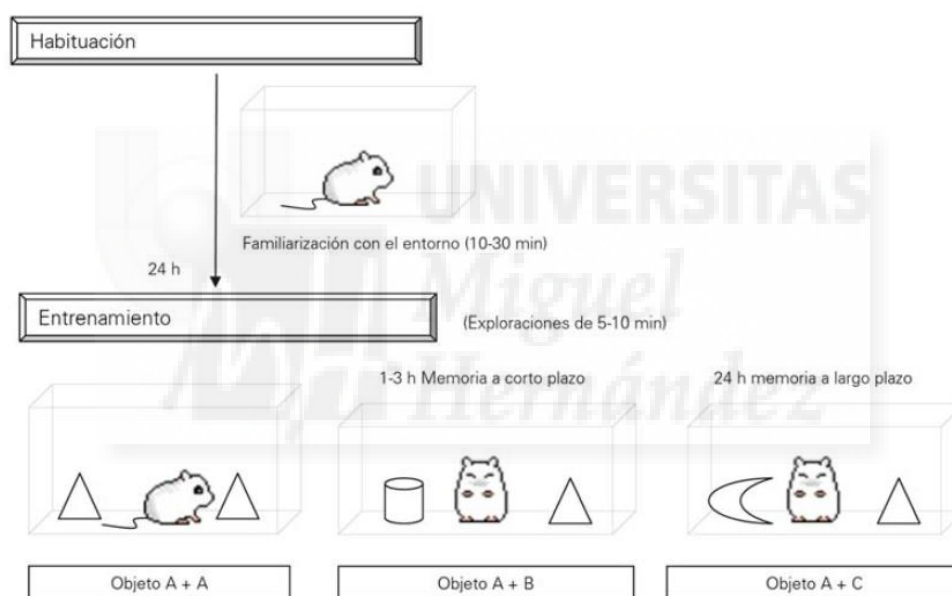


Figura 17 – Representación esquemática del test de reconocimiento de objetos y las fases experimentales de las que consta para la evaluación de los procesos de consolidación de la memoria no espacial. Imagen extraída de: Navarrete, F., et al., Rev Neurol., 2008³³.

A las 24 horas se inicia la fase de entrenamiento, y se colocan dos objetos idénticos (objetos A o familiares) en distinta posición, midiendo el tiempo de exploración. En la siguiente fase, se pretende medir la memoria a corto y medio plazo, volviendo a situar al animal en el campo abierto a la hora y a las tres horas desde el entrenamiento. Para ello se cambia uno de los objetos, teniendo un objeto A (familiar) y un objeto B (nuevo), y se mide el tiempo de exploración para cada uno de éstos. Trascurridas 24 horas desde el entrenamiento se mide la memoria a largo plazo volviendo a reexponer al animal, cambiando el objeto B (ahora familiar) por un objeto C (nuevo), y empleando el mismo objeto A (familiar). Se mide de

nuevo el tiempo de exploración y el resultado esperado es que los ratones que no presentan deterioro cognitivo explorarán más tiempo el objeto nuevo que el objeto familiar (conducta que se mide mediante el parámetro “índice de reconocimiento de objetos”). Sin embargo, un ratón que presente alguna alteración en los procesos de consolidación de la memoria podría explorar por igual el objeto nuevo y el familiar, no habiendo diferencia en los tiempos de exploración, por lo que su índice de discriminación entre ambos objetos será nulo o muy reducido.

Un artículo en el que se emplea esta prueba para valorar el papel del rCB2 en un modelo simulado de EA es el estudio realizado por Aso y cols.⁴⁶ Para ello emplearon 4 genotipos distintos de ratón conforme a lo que viene recogido en la Figura 18. Por una parte, utilizaron ratones A β PP/PS1 (grupo A β PP/PS1/CB2 WT) que presentan placas seniles, simulando así la EA, y sus respectivos controles WT (grupo WT/CB2 WT). Y, por otra parte, también emplearon otros 2 genotipos que carecían del rCB2: CB2 KO (grupo WT/CB2 KO) y A β PP/PS1/CB2 KO.

En la Figura 18, se muestra que, a los 3 meses de edad, los ratones WT/CB2KO presentan una clara tendencia hacia un deterioro cognitivo, con valores inferiores en relación al índice de reconocimiento de objetos. Sin embargo, en este punto no se producen aparentemente alteraciones en los ratones A β PP/PS1/CB2 WT en comparación con el grupo control. Cuando se evalúa la afectación a largo plazo (6 meses), los ratones WT/CB2KO siguen mostrando una afectación cognitiva, y los ratones A β PP/PS1/CB2 WT experimentan una reducción muy significativa en el índice de reconocimiento de objetos que refleja un deterioro notable en los procesos de consolidación de la memoria, tal y como sería esperable.

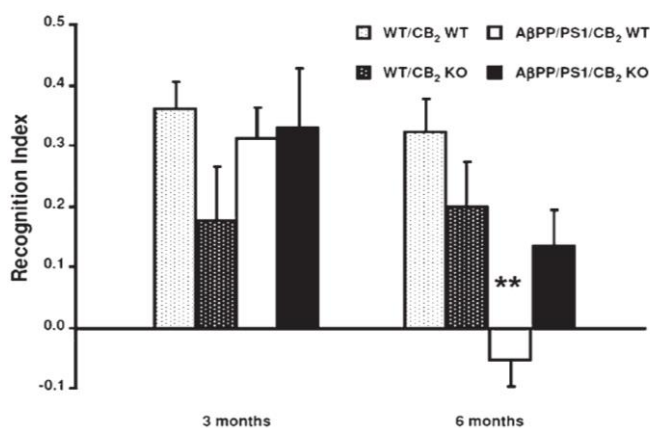


Figura 18 – Análisis del índice de discriminación en la prueba de reconocimiento de objetos tras eliminación del rCB2. Imagen extraída de: Aso, E., et al., J Alzheimers Dis, 2016⁴⁶.

Por el contrario, los ratones que además carecen del rCB2 (A β PP/PS1/CB2 KO) no muestran un deterioro tan acusado, hecho que resulta paradójico ya que cabría esperar que la ausencia del rCB2 pudiera dar lugar a una mayor afectación cognitiva. Este resultado da idea de la complejidad en los mecanismos de regulación mediados por el rCB2 en relación a las alteraciones en los procesos de consolidación de la memoria, y motivan la realización de estudios adicionales que puedan explicar mejor los procesos que subyacen a los efectos observados.

3.3 Utilidad terapéutica del receptor CB2 en el tratamiento de las alteraciones motoras de la enfermedad de Parkinson

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, caracterizada por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SN⁴⁷, que afecta a su vez al correcto funcionamiento de los circuitos que conectan los ganglios basales. Cuando se produce una pérdida superior al 70% aparecen los síntomas característicos de la EP como la bradicinesia, la rigidez, el temblor y la inestabilidad postural, muy presentes en las últimas etapas⁴⁸. La etiología de la EP no se ha podido definir aún con exactitud, pero las mutaciones en la proteína α -sinucleína que dan lugar a la formación de agregados que constituyen los cuerpos de Lewy, son el principal hallazgo neuropatológico de esta patología cuya detección *post-mortem* constituye actualmente el único método de diagnóstico definitivo.

Hoy en día existen tratamientos farmacológicos de reemplazo de la pérdida de DA causada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas, que pueden paliar o atenuar algunos de los síntomas motores nombrados anteriormente⁴⁹. Sin embargo, no existen tratamientos que sean capaces de modificar el curso de la enfermedad interviniendo en los procesos que inducen la neurodegeneración dopaminérgica. De esta forma, con el fin de intentar hallar un posible tratamiento de tipo etiológico, en los últimos años el rCB2 se ha postulado como una posible diana terapéutica para el manejo de la enfermedad desde una aproximación neuroprotectora. Dicha estrategia se basa en numerosos estudios que han mostrado que dicho receptor se encuentra sobreexpresado en modelos de la EP, así como en cebreros *post-mortem* de pacientes con EP²⁰, relacionando esta sobreexpresión con un efecto neuroprotector. Por tanto, actuar sobre este receptor podría ser de gran utilidad no solo a nivel sintomático, mejorando los problemas de tipo motor y no motor (cabe destacar, a modo de inciso, que el rCB2 tiene una

clara implicación en la regulación de alteraciones psiquiátricas como la ansiedad⁵⁰, la depresión⁵¹ o la psicosis⁵², que a su vez suelen producir una incapacidad significativa en los pacientes con EP), sino también a nivel neuropatológico, ralentizando la pérdida neuronal o incluso pudiendo llegar a revertirla.

Un ejemplo que demuestra el posible papel protector del rCB2 en la EP sería el estudio de Ternianov y cols.¹⁸, donde emplearon un modelo murino de EP administrando intracerebralmente 6-OHDA en un hemisferio para lesionar las neuronas dopaminérgicas que se sitúan en la vía nigroestriatal. Dicha neurotoxina se administró tanto al grupo control (WT) como al grupo CB2xP, y para poder valorar las alteraciones motoras producidas por la neurotoxina se administró apomorfina. Ésta produce una hiperactivación del hemisferio que se encuentra dañado (a nivel estriatal) produciendo que el animal gire hacia el lado contrario a donde se localiza la lesión, dando lugar a lo que se conoce como rotaciones contralaterales. El resultado de este experimento, que se puede observar en la Figura 19, indica que los ratones CB2xP tuvieron un menor número de rotaciones contralaterales en comparación con los ratones WT, hecho que implica una menor afectación motora. Por tanto, esto sugiere que una mayor expresión de rCB2 podría proteger contra las alteraciones a nivel del sistema motor que se producen ante la lesión dopaminérgica inducida por la 6-OHDA.

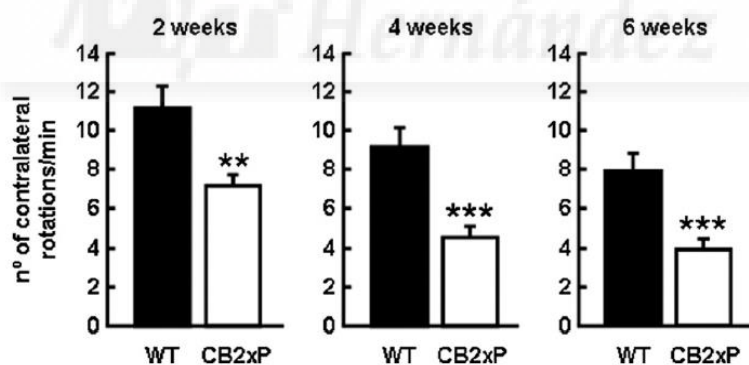


Figura 19 – Evaluación del número de rotaciones contralaterales inducidas por la administración de apomorfina en ratones WT y CB2xP lesionados con 6-OHDA. Imagen extraída de: Ternianov, A., et al., *Neurobiol Aging*, 2012¹⁸.

La mejora de las rotaciones contralaterales debido a la sobreexpresión del rCB2 también guarda relación con la neuroprotección que ejerce dicho receptor a nivel de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, como se puede mostrar en la Figura 20 extraída del artículo de Ternianov y cols.¹⁸ En ésta se representa el análisis de la presencia de neuronas dopaminérgicas en el núcleo estriado. Para ello se mide el marcaje inmunohistoquímico de la enzima TH, encargada de la

transformación de tirosina a DA. En los ratones vehículo de ambos genotipos se observa que no existen diferencias en el marcaje de TH, sin embargo, en los ratones a los que se les inyecta 6-OHDA sí que se evidencia una pérdida significativa de marcaje TH, siendo esta notablemente menor en los ratones CB2xP. Este resultado sugiere que la sobreexpresión de rCB2 estaría ejerciendo un papel neuroprotector evitando la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.

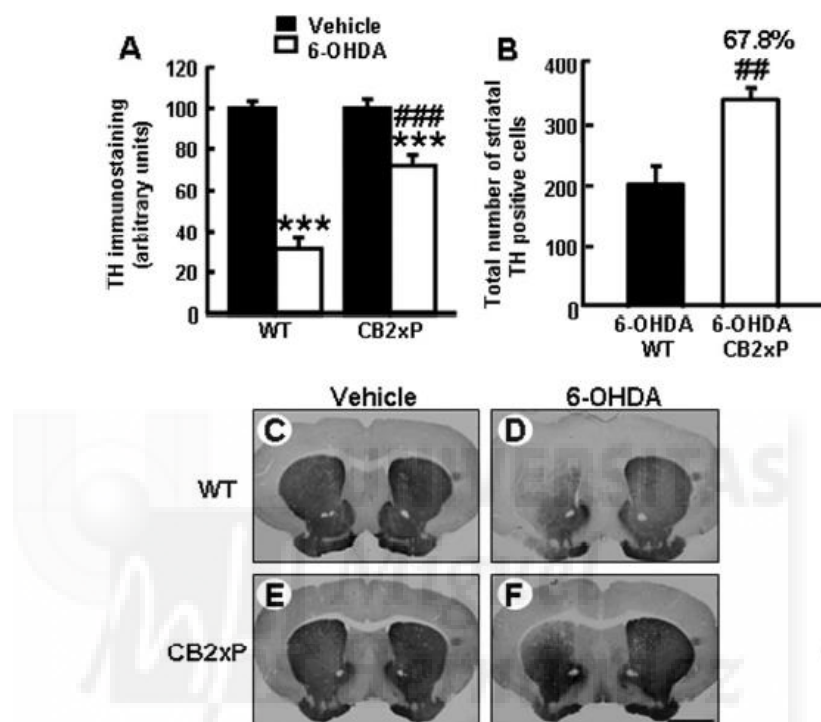


Figura 20 – Evaluación del efecto de la administración de 6-OHDA sobre la expresión de TH en el núcleo estriado de ratones WT y ratones CB2xP (A y B). Imágenes representativas de cortes cerebrales coronales en los que se evalúa el marcaje de TH en el núcleo estriado (C-F). Imagen extraída de: Ternianov, A., et al., *Neurobiol Aging*, 2012¹⁸.

Por su parte, Shi y cols.⁵³ emplearon la neurotoxina MPTP y evaluaron los déficits motores empleando el test Rotarod⁵⁴. Esta prueba consiste en un cilindro en el que se coloca a los ratones y la velocidad de rotación del cilindro se va variando y el parámetro que se evalúa principalmente es el tiempo de latencia hasta que el animal se precipita, es decir, el tiempo que logra permanecer girando de forma coordinada en el cilindro. Como se puede ver en la Figura 21, los ratones control mostraron un mayor tiempo sobre el cilindro, mientras que los ratones tratados con MPTP se cayeron mas fácilmente disminuyendo así el tiempo de latencia. Para evaluar si los déficits motores ocasionados por MPTP podrían ser revertidos mediante la activación del rCB2, se administró el agonista selectivo CB2, AM1241. De forma dosis dependiente (0,75-12mg/kg i.p.), se observó que el fármaco aumentaba de manera significativa el tiempo de latencia en relación al

grupo MPTP, pues en la gráfica puede observarse que tras la administración de la dosis más elevada (12mg/kg, barra de color amarillo), el tiempo de latencia se iguala prácticamente al de los ratones control. Por tanto, estos resultados indican que el agonista CB2 fue capaz de revertir las alteraciones motoras inducidas por la administración MPTP.

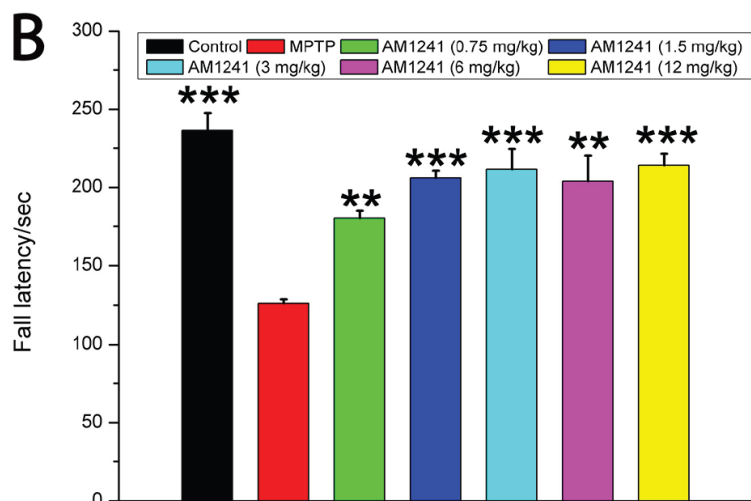


Figura 21 – Evaluación del tiempo de latencia hasta la caída mediante el test de Rotarod. Imagen extraída de: Shi, J., et al., Oncotarget, 2017⁵³.

Los resultados de Shi y cols.⁵³ también revelaron una disminución de los niveles de DA en los ratones tratados con MPTP en comparación con los ratones control (véase Figura 22, barras de color rojo y negro, respectivamente). Sin embargo, la administración del agonista CB2, AM1241, produjo un aumento notable y dosis dependiente de los niveles de DA, alcanzando en algunas regiones cerebrales (SN, corteza o hipocampo) niveles similares al grupo control con la dosis más elevada (12 mg/kg).

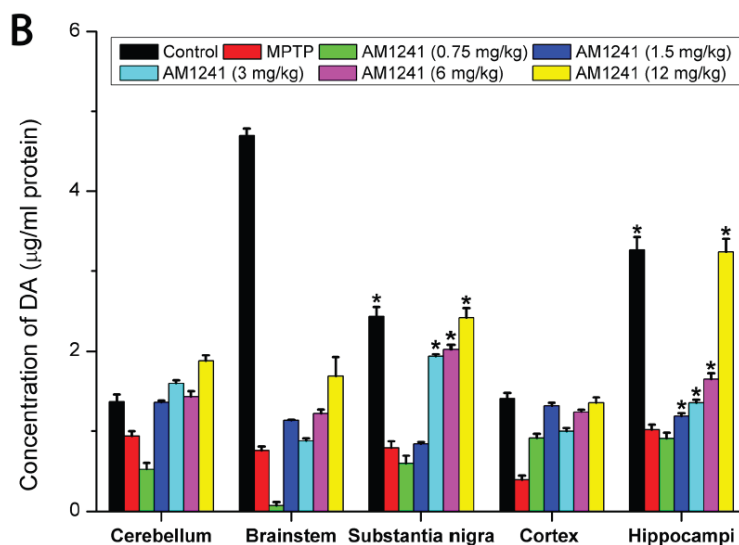


Figura 22 – Concentración de DA en distintas regiones cerebrales de ratones controles, tratados con MPTP. Imagen extraída de: Shi, J., et al., Oncotarget, 2017⁵³.

Estos hallazgos sugieren que la mejoría de las alteraciones motoras evidenciadas en la prueba Rotarod mediante la activación farmacológica del rCB2, guardaría una estrecha relación con el aumento de los niveles de DA en diversas regiones cerebrales implicadas en la regulación de la función motora.

Finalmente, se incluyen a continuación 3 tablas en las que se recopila toda la información que se ha revisado en este apartado.

TIPO DE ESTUDIO	Aproximación para evaluar efecto de rCB2	EFEECTO	REFERENCIA
<i>in vitro</i> : células microgliales activadas con IFN- γ	JWH-015 5 μ M	↑ Fagocitosis péptido β amiloide ↓ NO y TNF- α	21
<i>in vitro</i> : células microgliales	JWH-133	↓ Activación microglial ↓ TNF- α	22
<i>in vivo</i> : ratón Tg2576 (modelo transgénico)	JWH-133 0,2 mg/kg, v.o.	↓ Activación microglial ↓ TNF- α	16
<i>in vivo</i> : ratón macho C57BL/6N lesionado con MPTP (modelo neurotóxico)	WIN55,212-2 4mg/kg, i.p. JWH-015 4mg/kg, i.p.	↓ Activación microglial ↓ Reducción de la muerte neuronal ↑ Niveles de dopamina	23
<i>in vivo</i> : ratón macho C57BL/6 lesionado con MPTP (modelo neurotóxico)	WIN55,212-2 10 μ g/kg, i.p. JWH-133 4mg/kg, i.p.	↓ Activación microglial ↓ IL-1 β , TNF- α ↓ Expresión iNOS	24
<i>in vivo</i> : rata macho Wistar lesionado con ROT (modelo neurotóxico)	BCP 50mg/kg, i.p.	↓ IL-1 β , IL-6, TNF- α ↓ Expresión COX-2, iNOS ↓ Nitrito, MDA ↑ GSH	25
<i>in vivo</i> : ratón macho lesionado con 6-OHDA (modelo neurotóxico)	Modelo genético de sobreexpresión de rCB2 (CB2xP)	↓ MDA	18
<i>in vivo</i> : ratón macho C57BL/6J lesionado con METH (modelo neurotóxico)	JZL184 16mg/kg, i.p.	↓ Reducción del marcaje de TH	26
<i>Post-mortem</i> EA	--	↑ Expresión CB2 en células asociadas a placas de β amiloide	27
<i>Post-mortem</i> EP	--	↑ Expresión CB2 en sustancia negra	20
<i>Post-mortem</i> EP	--	↑ Expresión CB2 en sustancia negra	28

Tabla 1: Selección de estudios preclínicos y clínicos en los que se evalúan las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes del rCB2. v.o: vía oral, i.p: vía intraperitoneal.

TIPO DE ESTUDIO	Aproximación para evaluar efecto de rCB2	EFEECTO	REFERENCIA
<i>in vivo</i> : ratón Swiss albino (ambos sexos) lesionado con STZ ó AICI3 (modelo neurotóxico)	1-fenilisatina 10/20mg/kg, v.o. Donepezilo 0,1mg/kg, i.p.	↓ Tiempo de escape	34
<i>in vivo</i> : ratón hembra APP/PS1 (modelo transgénico)	MDA7 15mg/kg, i.p.	↓ Tiempo de escape ↓ Niveles de placas de β amiloide	36
<i>in vivo</i> : ratón AβPP/PS1 (modelo transgénico)	Modelo de eliminación genética del rCB2 (CB2KO)	↓ Índice de discriminación en la prueba de reconocimiento de objetos en ratones CB2KO ↑ Índice de discriminación en relación en relación a los ratones AβPP/PS1 WT)	46

Tabla 2: Selección de estudios preclínicos y clínicos en los que se evalúa la utilidad terapéutica del rCB2 en la EA. v.o: vía oral, i.p: vía intraperitoneal.

TIPO DE ESTUDIO	Aproximación para evaluar efecto de rCB2	EFEECTO	REFERENCIA
<i>in vivo</i> : ratón macho lesionado con 6-OHDA (modelo neurotóxico)	Modelo genético de sobreexpresión de rCB2 (CB2xP)	↓ Rotaciones contralaterales ↓ Reducción del marcaje de TH ↓ Pérdida de neuronas dopaminérgicas	18
<i>in vivo</i> : ratón lesionado con MPTP (modelo neurotóxico)	AM1241 0,75-12mg/kg, i.p.	↑ Tiempo de latencia en Rotarod ↑ Niveles de DA	53

Tabla 3: Selección de estudios preclínicos y clínicos en los que se evalúa la utilidad terapéutica del rCB2 en la EP. v.o: vía oral, i.p: vía intraperitoneal.

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de revisión bibliográfica se ha analizado la literatura disponible en relación a la posible utilidad terapéutica del rCB2 en diferentes patologías neurodegenerativas como son el Alzheimer o el Parkinson. Las evidencias científicas que se han recopilado sitúan al rCB2 como un elemento prometedor en la modificación del curso de las enfermedades nombradas anteriormente debido a su papel neuroprotector, relacionado a su vez con efectos de tipo antiinflamatorio y antioxidante. Asimismo, los resultados de la modulación funcional del rCB2 en modelos animales de patologías neurodegenerativas como la EA o la EP, sugieren que podría ser útil en el manejo de los síntomas característicos de estas patologías.

Los estudios realizados en modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo* indican que las propiedades antiinflamatorias más relevantes, relacionadas con la activación del rCB2, serían la reducción de la activación microglial y, en consecuencia, de la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α ²⁴. En cuanto a las propiedades antioxidantes, también mediadas por el rCB2, destacarían la modulación de las alteraciones de los niveles de GSH, MDA y nitrito²⁵, así como evitar la reducción de los niveles de enzimas antioxidantes como SOD y CAT, alterados en modelos animales neurodegenerativos²⁵. Estos efectos beneficiosos pueden observarse cuando se activa el rCB2 mediante fármacos agonistas selectivos como son el JWH-015²³, el JWH-133²⁴, o el BCP²⁵. Además, para poder determinar que los mecanismos de protección están mediados de forma específica por el rCB2, los estudios farmacológicos empleando antagonistas CB2 resultaron muy útiles. De hecho, cuando se administran tanto agonistas puros CB2 como agonistas duales CB1/CB2, de forma conjunta con un antagonista CB2, como sería el AM630²⁶, se produce un bloqueo de la actividad antiinflamatoria y antioxidante. Adicionalmente, si se administra conjuntamente un antagonista selectivo del rCB1, como el rimonabant²⁶, no se observa la anulación del efecto que producían los agonistas cannabinoides. Estos experimentos farmacológicos son de gran importancia ya que indican que los efectos antiinflamatorios y antioxidantes estarían específicamente mediados por el rCB2, incrementando el interés sobre su potencial implicación en la modulación de procesos neurodegenerativos.

Además de emplear agonistas selectivos del rCB2 para perseguir un efecto neuroprotector, el aumento del tono cannabinoide endógeno también puede ofrecer utilidad. De hecho en el estudio de Nader y cols.²⁶ se puede observar que la administración de JZL184, que inhibe la metabolización del ligando cannabinoide endógeno 2-AG, protege las neuronas dopaminérgicas frente a un estímulo tóxico como la inyección de metanfetamina. Este resultado sugiere que estrategias farmacológicas que tengan como objetivo potenciar la acción cannabinoide endógena también podrían ser muy útiles en el manejo de patologías neurodegenerativas, aunque es necesario realizar más estudios que puedan aportar datos adicionales en este sentido.

Los beneficios que podrían derivarse de la modulación funcional del rCB2 en la EA han sido evidenciados en numerosos estudios empleando modelos *in vitro* e *in vivo* que muestran los resultados obtenidos en relación a la memoria y el aprendizaje en modelos que simulan la EA. En estos estudios se han empleado distintas pruebas como son el laberinto de Morris³² y el test de reconocimiento de objetos³⁷, para valorar los procesos de consolidación de la memoria y aprendizaje a nivel preclínico, los cuales han demostrado que la activación del rCB2 mediante fármacos como 1-fenilisatina³⁴ o MDA7³⁶, produce una mejora a nivel cognitivo que podría tener su base en la normalización de las alteraciones neuropatológicas, como sería una menor deposición de β amiloide³⁶. Asimismo, estudios *post-mortem* realizados con cerebros de pacientes con EA como el de Benito y cols.¹⁹, observaron que el rCB2 se encuentra elevado de forma significativa, sugiriendo que este aumento podría guardar relación con un mecanismo neuroprotector. Por tanto, desde un punto de vista traslacional, la activación farmacológica del rCB2 podría tener implicaciones a nivel clínico, pudiendo mejorar las alteraciones cognitivas de un paciente con la EA. Sin embargo, todavía es necesario realizar más estudios que nos permitan conocer mejor el perfil farmacológico, toxicológico y farmacocinético de los fármacos agonistas CB2, con el objetivo de poder realizar ensayos clínicos en los que valorar su potencial utilidad neuroprotectora.

En cuanto a la EP, con los datos obtenidos en esta revisión se puede apreciar que el rCB2 podría presentar una gran utilidad terapéutica mediante su manipulación farmacológica a nivel clínico. Los posibles beneficios derivados de la actuación sobre el rCB2 pueden evidenciarse en modelos *in vivo* que simulan la EP. Para ello, se administran fármacos agonistas CB2 como AM1241⁵³, apreciándose una mejora de la sintomatología de tipo motor evaluada mediante

pruebas como el test de Rotarod⁵⁴. Además, el efecto que se deriva de la activación del rCB2 se asocia a una menor pérdida de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal y, probablemente, a una mayor funcionalidad dopaminérgica a ese nivel¹⁸. Asimismo, numerosos estudios *post-mortem* realizados con cerebros de pacientes con EP, como los publicados por Gómez-Galvez y cols.²⁰ o Navarrete y cols.²⁸, han mostrado que el rCB2 se encuentra elevado en la SN, sugiriendo que el aumento del rCB2 podría estar relacionado con un efecto neuroprotector. En resumen, se podría decir que la activación del rCB2 podría mejorar las alteraciones motoras en pacientes con EP y proveer propiedades neuroprotectoras que puedan ralentizar la pérdida neuronal y traducirse en un mejor control de la sintomatología motora. Sin embargo, al igual que en la EA, todavía es necesario realizar más estudios que permitan conocer el perfil farmacológico completo y la seguridad de los fármacos que se podrían emplear para modificar el curso de esta enfermedad.

Como conclusión, cabe destacar que conforme a las evidencias preclínicas y clínicas que existen en relación a la implicación del rCB2 en los procesos neuropatológicos de trastornos neurodegenerativos, parece lógico pensar que si se modificase la función del receptor CB2 se estaría en disposición de poder modificar el curso clínico de patologías tan prevalentes como la EA o la EP. Sin embargo, para poder conseguir en un futuro una terapia modificadora de la enfermedad a través de la manipulación farmacológica del rCB2, es necesario disponer de biomarcadores específicos y sensibles que permitan realizar un diagnóstico temprano o precoz de la patología, y que así se pueda intervenir antes mediante estrategias neuroprotectoras. Además, todavía queda mejorar el conocimiento sobre los mecanismos que subyacen a los efectos neuroprotectores del rCB2, y realizar más ensayos probando diferentes aproximaciones farmacológicas dirigidas hacia dicho receptor, para obtener más evidencias sobre los efectos que su modulación produce tanto a nivel de los procesos neurodegenerativos como de las alteraciones cognitivo-conductuales con las que cursan patologías como la EA o la EP. A pesar de ello, las evidencias de las que se disponen actualmente resultan muy alentadoras y apuntan a que el rCB2 podría ser una futura diana farmacológica en el manejo no sólo de la EA o la EP, sino también de aquellas patologías que afecten al SNC y que cursen con alteraciones neuroinflamatorias.

5. CONCLUSIONES

1. El manejo terapéutico actual de las enfermedades neurodegenerativas carece de una aproximación etiológica que logre modificar su evolución clínica, hecho que motiva la búsqueda de nuevas estrategias que puedan proporcionar un efecto neuroprotector.

2. La modulación farmacológica y genética del rCB2 es capaz de regular procesos neuroinflamatorios y oxidativos en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas como la EA o la EP, efectos que estarían relacionados con su potencial neuroprotector.

3. Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que la manipulación funcional del rCB2 podría mejorar las alteraciones cognitivas con las que cursa la EA, habiéndose propuesto como mecanismo subyacente la reducción del depósito anómalo del péptido β amiloide.

4. La activación selectiva del rCB2 podría tener utilidad terapéutica en relación a las alteraciones motoras propias de la EP mediante mecanismos de neuroprotección que evitarían la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.

5. Los datos recopilados en esta revisión bibliográfica indican que la manipulación farmacológica del rCB2 podría tener en un futuro una aplicación terapéutica en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA o la EP. Sin embargo, es necesaria la realización de más estudios que permitan caracterizar mejor los mecanismos implicados, así como evaluar la eficacia, seguridad y tolerabilidad a nivel clínico.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Campbell Thomson, R., *A Dictionary of Assyrian Botany*. London: British Acad., 1949.
2. Mechoulam, R., *The most comprehensive history of the recreational and medicinal use of Cannabis throughout the centuries*. CRC Press Boca Raton, 1986.
3. Moreau, J., *Hashish and Mental Illness*. New York: Raven, 1973/1845.
4. Gaoni, Y. and R. Mechoulam, *Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish*. J. Am. Chem. Soc., 1964. **86**: p. 1646-47.
5. Mechoulam, R. and Y. Shvo, *The structure of cannabidiol*. Tetrahedron, 1963. **19**: p. 2073-78.
6. ElSohly, M. and W. Gul, *Handbook of Cannabis*. Oxford, UK: Oxford University Press, 2014: p. 20.
7. Mechoulam, R. and L.A. Parker, *The endocannabinoid system and the brain*. Annu Rev Psychol, 2013. **64**: p. 21-47.
8. Devane, W.A., et al., *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol Pharmacol, 1988. **34**(5): p. 605-13.
9. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature, 1993. **365**(6441): p. 61-5.
10. Di Marzo, V. and A. Fontana, *Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1995. **53**(1): p. 1-11.
11. Grotenhermen, F., *Cannabinoids*. International Association for Cannabis as Medicine, 2006. **1**(1): p. 10-14.
12. Gong, J.P., et al., *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain*. Brain Res, 2006. **1071**(1): p. 10-23.
13. Zogopoulos, P., G. Vretakos, and D. Rologis, *Therapeutic implications of the endocannabinoid system in neurodegenerative diseases*. Clin Case Rep Rev, 2015. **1**(4): p. 73-79.
14. Van Sickle, M.D., et al., *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. Science, 2005. **310**(5746): p. 329-32.
15. Sastre, M., T. Klockgether, and M.T. Heneka, *Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms*. Int J Dev Neurosci, 2006. **24**(2-3): p. 167-76.
16. Martin-Moreno, A.M., et al., *Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers beta-amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 8.
17. McGeer, P.L., et al., *Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains*. Neurology, 1988. **38**(8): p. 1285-91.
18. Ternianov, A., et al., *Overexpression of CB2 cannabinoid receptors results in neuroprotection against behavioral and neurochemical alterations induced by intracaudate administration of 6-hydroxydopamine*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(2): p. 421 e1-16.
19. Benito, C., et al., *Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains*. J Neurosci, 2003. **23**(35): p. 11136-41.
20. Gomez-Galvez, Y., et al., *Potential of the cannabinoid CB(2) receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2016. **64**: p. 200-8.
21. Ehrhart, J., et al., *Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation*. J Neuroinflammation, 2005. **2**: p. 29.
22. Ramirez, B.G., et al., *Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation*. J Neurosci, 2005. **25**(8): p. 1904-13.
23. Price, D.A., et al., *WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease*. Eur J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 2177-86.
24. Chung, Y.C., et al., *CB2 receptor activation prevents glial-derived neurotoxic mediator production, BBB leakage and peripheral immune cell infiltration and rescues dopamine neurons in the MPTP model of Parkinson's disease*. Exp Mol Med, 2016. **48**(1): p. e205.
25. Javed, H., et al., *Cannabinoid Type 2 (CB2) Receptors Activation Protects against Oxidative Stress and Neuroinflammation Associated Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone Model of Parkinson's Disease*. Front Neurosci, 2016. **10**: p. 321.
26. Nader, J., et al., *Prior stimulation of the endocannabinoid system prevents methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in the striatum through activation of CB2 receptors*. Neuropharmacology, 2014. **87**: p. 214-21.
27. Mulder, J., et al., *Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease*. Brain, 2011. **134**(Pt 4): p. 1041-60.
28. Navarrete, F., et al., *Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors, and Monoacylglycerol Lipase Gene Expression Alterations in the Basal Ganglia of Patients with Parkinson's Disease*. Neurotherapeutics, 2018.
29. Cassano, T., et al., *Cannabinoid Receptor 2 Signaling in Neurodegenerative Disorders: From Pathogenesis to a Promising Therapeutic Target*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 30.

30. Vinters, H.V., *Emerging concepts in Alzheimer's disease*. *Annu Rev Pathol*, 2015. **10**: p. 291-319.
31. White, J.A., et al., *Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation*. *Neurobiol Dis*, 2005. **18**(3): p. 459-65.
32. Morris, R., *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat*. *J Neurosci Methods*, 1984. **11**: p. 47-60.
33. Navarrete, F., et al., *Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales*. *Rev Neurol.*, 2008. **47**(3): p. 137-145.
34. Jayant, S., et al., *Pharmacological benefits of selective modulation of cannabinoid receptor type 2 (CB2) in experimental Alzheimer's disease*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2016. **140**: p. 39-50.
35. Zhang, L., et al., *Effects of subchronic aluminum exposure on spatial memory, ultrastructure and L-LTP of hippocampus in rats*. *J Toxicol Sci*, 2013. **38**(2): p. 255-68.
36. Wu, J., et al., *Activation of CB2 receptor system restores cognitive capacity and hippocampal Sox2 expression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *Eur J Pharmacol*, 2017. **811**: p. 12-20.
37. Ennaceur, A., N. Neave, and J. Aggleton, *Sponthaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix*. *Exp Brain Res*, 1997. **113**: p. 509-19.
38. Baker, K. and J. Kim, *Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats*. *Learn Mem*, 2002. **9**: p. 58-65.
39. Okuda, S., B. Roozendaal, and J. McGaugh, *Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. **101**(853-8).
40. Puma, C. and J. Bizot, *Intraseptal infusions of a low dose of AP5, a NMDA receptor antagonist, improves memory in an object recognition task in rats*. *Neurosci Lett*, 1998. **248**: p. 183-6.
41. Rampon, C., et al., *Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**: p. 238-44.
42. Rosa, R., et al., *Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice*. *Neurosci Lett*, 2003. **341**: p. 217-20.
43. Sargolini, F., et al., *Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice*. *Behav Brain Res*, 2003. **138**: p. 153-63.
44. Schroder, N., S. O'Dell, and J. Marshall, *Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats*. *Synapse*, 2003. **49**: p. 89-96.
45. Tang, Y., et al., *Genetic enhancement of learning and memory in mice*. *Nature*, 1999. **401**: p. 63-9.
46. Aso, E., et al., *Cannabinoid Receptor 2 Participates in Amyloid-beta Processing in a Mouse Model of Alzheimer's Disease but Plays a Minor Role in the Therapeutic Properties of a Cannabis-Based Medicine*. *J Alzheimers Dis*, 2016. **51**(2): p. 489-500.
47. Bartels, A.L. and K.L. Leenders, *Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology*. *Cortex*, 2009. **45**(8): p. 915-21.
48. Bisogno, T., et al., *Type-2 cannabinoid receptors in neurodegeneration*. *Pharmacol Res*, 2016. **111**: p. 721-730.
49. Calne, D., et al., *Treatment for the progression of Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2005. **4**(4): p. 206.
50. Garcia-Gutierrez, M.S. and J. Manzanares, *Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice*. *J Psychopharmacol*, 2011. **25**(1): p. 111-20.
51. Onaivi, E.S., et al., *Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects*. *PLoS One*, 2008. **3**(2): p. e1640.
52. Ishiguro, H., et al., *Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, 2010. **67**(10): p. 974-82.
53. Shi, J., et al., *AM1241 alleviates MPTP-induced Parkinson's disease and promotes the regeneration of DA neurons in PD mice*. *Oncotarget*, 2017. **8**(40): p. 67837-67850.
54. Deacon, R.M., *Measuring motor coordination in mice*. *J Vis Exp*, 2013(75): p. e2609.

7. ANEXO: Abreviaturas

Abreviatura	Significado
2-AG	2-araquidonil-glicerol
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AlCl₃	Tricloruro de aluminio
AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
Anandamida	N-araquidonil-etanolamida
BCP	Beta-cariofileno
CAT	Catalasa
CBD	Cannabidiol
COX-2	Ciclooxigenasa-2
D	Donepezilo
DA	Dopamina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EP	Enfermedad de Parkinson
FAAH	Amidohidrolasa de ácidos grasos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
i.p.	Vía intraperitoneal
IL	Interleuquina
INF-γ	Interferón γ
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
L-DOPA	Levodopa
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MDA	Malondialdehído
MDA7	1-((3-bencil-3-metil-2,3-dihidro-1-benzofuran-6-il) carbonil)
METH	Metanfetamina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
NADA	N-araquidonil-dopamina
NO	Óxido nítrico
P	1-fenilisatina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rCB1	Receptor CB1
rCB2	Receptor CB2
ROT	Rotenona
SN	Sustancia negra
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SOD	Superóxido dismutasa
STZ	Estreptozocina
TH	Tirosina hidroxilasa
THC	Δ 9-tetrahidrocannabinol
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
v.o.	Vía oral
Virodhamina	O-araquidonil-etanolamina
WT	Wild type