

Contenido:

1. Saludo del Presidente
2. Premio de la 10ª reunión anual de la SEIC, Santander, 2009: "El tratamiento con WIN 55,212-2 promueve la recuperación del tejido neural lesionado tras hipoxia-isquemia neonatal en rata" (David Fernández López)
3. Premio de la 10ª reunión anual de la SEIC, Santander, 2009: "Dominios sinápticos del receptor de cannabinoides CB1 en el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratones mutantes condicionales" (Leire Reguero)
4. Cannabinoides sintéticos como drogas de diseño (Ángel Arévalo Martín)
5. Agenda
6. Últimas publicaciones sobre cannabinoides de investigadores españoles

1. Saludo del Presidente

Estimados miembros de la SEIC,

Llevaba algunos días, por no decir semanas, queriendo finalizar la carta del Presi para esta edición del boletín, y el hecho es que no he conseguido finalizarla en los distintos momentos en que lo he intentado. Me he hecho esquemas de lo que quería contaros, por ejemplo, cosas sobre la próxima Reunión de Pontevedra. También he mirado los contenidos del resto del boletín, principalmente los artículos de algunos de los premiados en el congreso anterior, para comentar algo sobre ellos, pero el caso es que no he conseguido decidirme a dar por acabada esta carta. Creo que había algo en mi cabeza que me decía que esperase, que tendría que buscar un momento más apropiado donde me resultaría más fácil dar por acabada esta carta. Siempre tuve claro que la carta tendría que contener como elemento central todas las sensaciones e inquietudes que me iban poco a poco embargando según se acercaba el momento de emprender viaje para participar en el Congreso que ha servido de homenaje a Raphael Mechoulam y que se ha celebrado en estos días en Jerusalem. Quise primero centrar la carta precisamente en esas sensaciones, el reto de viajar a Israel, un país que nunca había visitado, visitar Jerusalem, una ciudad ciertamente especial por razones religiosas o culturales, y encontrarme de nuevo con Raphi, con su familia y con sus amigos en estos momentos tan especiales. Intenté reflejar todo eso en la carta pero he de reconocer que nada de lo que escribí acababa por convencerme. A Ángel y a Eduardo, que han llevado la coordinación de este boletín, les prometí que lo acabaría durante el último fin de semana de octubre, justo los días antes de iniciar mi viaje, pero no fui capaz, así que hice las maletas, metí los regalos y cartas que algunos me disteis para Raphi, terminé mi presentación para el congreso, y me vine para Jerusalem. Realmente pensé que lo mejor sería escribir la carta directamente desde el mismo corazón de la reunión y enviársela a Ángel o a Eduardo por e-mail. Esto también lo intenté, os lo aseguro, a pesar de lo apretado del programa científico de la reunión y de las celebraciones por los 80 años de Raphi, pero una vez más fui incapaz de cerrar la carta. Creo que tampoco era el momento, algo me decía que tenía que esperar todavía más, y ese momento parece que ya ha llegado. Ahora sí que todas las emociones y sensaciones fluyen deprisa y las puedo convertir en estas líneas que estoy escribiendo en mi portátil, sentado ante

la puerta D8 de la terminal 3 del aeropuerto Ben-Gurion de TelAviv, esperando el embarque de mi vuelo a Madrid, cansado después de lo intenso de estos días y del estrés de tener que atravesar medidas extremas de seguridad en la ciudad y sobre todo ahora en el aeropuerto, pero con la sensación de que ahora sí, ya está todo en mi cabeza y en mi corazón, y ahora puedo contarlo y expresarlo con la tranquilidad de haberlo vivido.

¿Qué os puedo contar de Raphi? Muchos, por no decir todos, ya le conocéis, cómo es, cómo piensa, cómo siente, cómo actúa... También cómo se siente de cercano a sus muchos amigos españoles, a los que él de forma cariñosa llama la "Spanish Cannabinoid Mafia". Como os imaginareis, la reunión ha sido un "Tutto Raphi". Todo el mundo que ha participado no ha dejado de recordar cómo conoció a Raphi, cómo ha sido la experiencia de colaborar con él y cómo ha recibido siempre todo su apoyo en forma de ideas para investigar, enfermedades donde experimentar, compuestos que ensayar... También se han contado anécdotas, recuerdos, experiencias vividas a lo largo de todos estos años, se han proyectado multitud de fotos tomadas de los innumerables viajes de Raphi a lo largo del mundo. Nadie ha escatimado en alabanzas y en agradecimientos, sin el más mínimo asomo de obligación o convencionalismo, obviamente todos expresados desde el corazón porque todo lo que se ha dicho allí no es más que el resultado del mucho cariño que Raphi ha sabido generar. Raphi, el hombre de la eterna sonrisa, como le han definido sus más cercanos colaboradores en el video que le hicieron, y que se proyectó en la recepción del último día, con las fotos que se han mandado desde diferentes partes del mundo. Creo que sería bonito que encontrásemos algún momento en la próxima reunión de Pontevedra para proyectar ese video, del que tengo una copia en DVD para todos los que estéis interesados en tenerlo.

Debería hablaros del congreso también como una actividad científica, al fin y al cabo eso ha sido. Contaros si ha habido alguna novedad interesante que se haya presentado allí, pero creo que todos los que hemos tenido el honor de ser invitados a presentar nuestro trabajo allí, hemos optado por lo mismo, por hacer un resumen de nuestro trabajo en colaboración con Raphi, trabajo que en la mayor parte de los casos ya ha sido publicado y seguro que sois conocedores de ello. No obstante, quiero deciros que me alucina la cantidad de personas, grupos de investigadores y temas de investigación donde Raphi ha participado colaborando con otros.

Y todo esto ha ocurrido en Jerusalem, una ciudad increíble, llena de sentido para todos los que desde su religión la sienten como propia, pero también para aquellos que, aún no creyendo, se admiran de la vida, del arte, del crisol de culturas y religiones que allí conviven, a veces desgraciadamente no de una forma civilizada. Deberían aprender de Raphi y de su capacidad de ser integrador, como creo que ya he escrito en alguna carta anterior. Conocer esta ciudad ha sido una de las mejores cosas de este viaje. Os dejo un par de fotos muy representativas de la ciudad y que tomé en la visita-guiada que hicimos todos los asistentes al congreso. Una es del Muro de las Lamentaciones y la otra de la Iglesia construida en el monte donde Jesús fue crucificado, en concreto de la piedra donde Jesús ya muerto fue lavado tras la crucifixión y envuelto en la Sábana Santa antes de ser enterrado.



Me hubiera gustado haber tomado también una foto representativa del mundo musulmán, por ejemplo, en la Explanada de las Mezquitas, pero por razones de seguridad (no os podéis imaginar las medidas de seguridad que hemos tenido), no pudimos visitarla.

Y no quiero acabar esta carta sin decir algo del momento más entrañable de la reunión, la recepción en honor a Raphi del día final. Una cena en un sitio típico israelí con toda su familia, hijos e hijas, nietos y nietas, y su inseparable Dalia. También con sus muchos amigos procedentes de muchas partes del mundo, científicos o no, y sus muchos colaboradores, algunos de hace muchos años como Gaoni, el de "Gaoni and Mechoulam" de los primeros descubrimientos de Raphi. Como ya os he comentado, se proyectó un hermoso y emotivo video de Raphi, de su vida, tanto personal como profesional, y de sus mejores momentos, que espero que podáis ver en Pontevedra. Los aplausos y las muestras de cariño a Raphi de ese día serán inolvidables para todos los que estuvimos allí. Para acabar, ahí va una foto de un emocionado Raphi agradeciendo todo el cariño recibido en esos días.



Un abrazo y nos vemos en Pontevedra.
Javier Fernández Ruiz

2. Premio de la 10ª Reunión Anual de la SEIC, Santander, 2009

**EL TRATAMIENTO CON WIN 55,212-2
PROMUEVE LA RECUPERACIÓN DEL
TEJIDO NEURAL LESIONADO TRAS
HIPOXIA-ISQUEMIA CEREBRAL
NEONATAL EN RATA**

**David Fernández López
Universidad Complutense de Madrid**

La patología conocida como encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal es un cuadro clínico complejo derivado de episodios agudos de asfixia durante el periodo

perinatal. La incidencia de estos episodios asfícticos es elevada, afectando a 4 de cada 1000 recién nacidos a término y pudiendo alcanzar una proporción del 60% en el caso de los recién nacidos prematuros (1). La asfixia conduce de forma rápida a una hipotensión sistémica que implica una reducción significativa del flujo sanguíneo cerebral, especialmente en las regiones encefálicas de irrigación arterial terminal como la sustancia blanca subcortical y periventricular. La disminución del aporte de oxígeno y nutrientes en el tejido

cerebral da lugar a la formación de edema citotóxico, liberación masiva de glutamato, excitotoxicidad, neuroinflamación y daño celular oxidativo y nitrosativo, conduciendo finalmente a la degeneración y muerte de grandes poblaciones celulares en el tejido afectado (1). La población de células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs) muestra una sensibilidad selectiva al daño hipóxico-isquémico cerebral neonatal (2-4). Dado que la maduración de la sustancia blanca es un proceso activo durante la edad postnatal, la muerte selectiva de OPCs conduce con elevada frecuencia a la aparición de secuelas neurológicas permanentes en los recién nacidos afectados (5). La población neuronal también resulta ampliamente disminuida por el daño hipóxico-isquémico, pudiendo aparecer grandes focos de muerte neuronal en estructuras cerebrales como el neocórtex, el hipocampo y el estriado. En contraste, el cerebro del recién nacido muestra una gran capacidad de respuesta regenerativa a largo plazo frente a situaciones de daño agudo, induciéndose procesos de angiogénesis, neurogénesis y plasticidad sináptica orientados a la recuperación de la funcionalidad del tejido cerebral afectado. Se ha descrito que la hipoxia-isquemia neonatal provoca la inducción de una respuesta proliferativa y neurogénica en la zona subventricular (SVZ) (6-8), así como la formación de nuevas OPCs capaces de generar oligodendrocitos maduros que contribuyen a la remielinización de la sustancia blanca lesionada (9). Dado el escaso éxito de las terapias neuroprotectoras contra el daño hipóxico-isquémico cerebral neonatal en la práctica clínica, la identificación de compuestos y sistemas endógenos implicados en los procesos de reparación neural a largo plazo ha adquirido una gran relevancia en la investigación básica.

A este respecto existen datos experimentales que indican que el sistema endocannabinoide podría ser uno de los sistemas de neuromodulación implicados en la regulación de los procesos de reparación neural a largo plazo en respuesta a daño cerebral agudo. Se conoce por trabajos anteriores que las células progenitoras neurales expresan los componentes principales del sistema endocannabinoide (receptores CB1 y CB2, FAAH y endocannabinoides), y que estos componentes modulan de forma activa los

procesos de proliferación celular, supervivencia y diferenciación de dichos progenitores (10-14). Se ha observado que la activación del sistema endocannabinoide puede favorecer la respuesta proliferativa y neurogénica en situaciones de daño cerebral agudo así como la supervivencia de OPCs en condiciones adversas (15;16). La administración del agonista de los receptores CB1 y CB2 WIN55,212-2 durante el periodo postnatal aumentó la generación de OPCs en la SVZ y la consiguiente mielinización de la cápsula externa mediante la inducción del factor de transcripción Olig2, conocido inductor de la diferenciación celular hacia el fenotipo oligodendroglial (17). La suma de estas observaciones nos llevó a estudiar el posible efecto de la activación del sistema endocannabinoide en la recuperación del tejido cerebral a medio y largo plazo tras hipoxia-isquemia cerebral neonatal. Para ello empleamos el conocido agonista de los receptores CB1 y CB2 WIN55,212-2 (WIN). Nuestro estudio abarcó el efecto del tratamiento sobre los procesos de proliferación celular, oligodendrogénesis, mielinización y neurogénesis durante las semanas posteriores a la inducción de daño hipóxico-isquémico cerebral.

Para nuestro estudio empleamos ratas en el séptimo día postnatal (P7) sobre las que se practicó el modelo de Rice-Vannucci de hipoxia-isquemia (HI) cerebral neonatal, consistente en la ligadura unilateral y permanente de la arteria carótida común seguida de la exposición de las ratas a 8% O₂/92%N₂ durante un periodo de 90 minutos (18). Este protocolo generó una lesión cerebral permanente observable y cuantificable mediante técnicas de imagen e histología en aproximadamente el 70% de las ratas. Las ratas que no mostraron un edema cerebral observable mediante imagen de resonancia potenciada en T2 a las 24 horas tras la inducción de HI fueron excluidas del estudio. El resto recibieron dos dosis diarias de WIN (1 mg/kg) o del correspondiente vehículo por vía subcutánea durante 7 días, siendo la primera dosis administrada inmediatamente tras la finalización del periodo de hipoxia. Los animales recibieron además dos dosis diarias de BrdU (50 mg/kg) durante los días 5-7 tras la HI, con el fin de marcar de forma permanente las células en estado proliferativo. Los animales fueron sacrificados mediante perfusión

transcardíaca con PFA a diferentes tiempos para el estudio de la progresión de la lesión cerebral a largo plazo, incluyendo 24 horas, 7, 14 y 28 días tras la HI. Los cortes histológicos fueron procesados para la inmunotinción de diferentes marcadores de interés mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. Se incluyó un grupo de animales sacrificados a las 48 horas tras la HI con el fin de observar el perfil de expresión y la distribución celular de los receptores CB1 y CB2 en la SVZ mediante PCR cuantitativa e inmunofluorescencia.

Nuestro primer objetivo fue observar el efecto del tratamiento con WIN sobre la pérdida de mielina en la sustancia blanca tras HI. Observamos que la HI indujo una reducción de aproximadamente un 40% en la densidad de la proteína básica de la mielina (MBP) en la cápsula externa del hemisferio cerebral lesionado a las 24 horas tras la lesión. Esta lesión se vio acompañada de una reducción significativa del número de OPCs en la misma región. En los animales tratados con vehículo se produjo una recuperación completa de la densidad de MBP en la cápsula externa a los 14 días tras la lesión, que fue considerada espontánea ya que ha sido previamente descrita en animales no tratados (2). Los animales que fueron tratados con WIN mostraron sin embargo una recuperación completa de la densidad de MBP tan sólo tras 7 días tras la HI, indicando que el tratamiento con WIN produjo una aceleración significativa de la recuperación completa de la mielina tras HI, que permaneció a los 14 días tras la HI. El tratamiento con WIN provocó además el aumento del número de OPCs en la cápsula externa a los 7 días tras la HI. Dicho aumento se observó tanto en células doblemente positivas para el marcador de OPCs en fase temprana NG2 y el marcador de proliferación celular BrdU ($\text{BrdU}^+/\text{NG2}^+$), como para células $\text{BrdU}^-/\text{NG2}^+$. Esto nos llevó a plantearnos si las OPCs generadas durante el tratamiento con WIN habían sido originadas localmente en la cápsula externa o en la SVZ, desde la cual podrían haber migrado, o en ambas. Dado que nuestro marcaje de las células proliferativas con BrdU fue realizado tan sólo durante los días 5 a 7 tras la HI y nuestras observaciones tenían lugar en el día 7 tras la isquemia, las células $\text{BrdU}^+/\text{NG2}^+$ observadas en la cápsula externa podrían tener un máximo de tan sólo dos días de

vida, un tiempo que puede resultar limitado para su migración desde la SVZ. Sin embargo cabía también la posibilidad de que el mayor número de células $\text{BrdU}^-/\text{NG2}^+$ observadas en los animales tratados con WIN se debiera a la migración de nuevas OPCs generadas antes del marcaje con BrdU, cuando el agonista cannabinoide ya estaba siendo administrado a los animales. En ese caso, las células $\text{BrdU}^-/\text{NG2}^+$ podrían haber migrado desde la SVZ hacia la cápsula externa, contribuyendo a aumentar la población de OLPs $\text{BrdU}^-/\text{NG2}^+$ en los animales tratados con WIN. Esta última hipótesis se vio favorecida por la observación de la inducción transitoria de la expresión del receptor CB2 en OLPs en la SVZ 48 horas tras la HI. En cualquier caso la respuesta concluyente a la contribución local o de la SVZ al aumento de la población de OPCs tempranas en la cápsula externa de los animales tratados con WIN requeriría del marcaje selectivo de las células de la SVZ con un trazador como la proteína fluorescente verde GFP, por ejemplo mediante transfección viral por inyección intracerebroventricular, una técnica que no ha sido desarrollada en nuestro trabajo. Con el fin de observar la supervivencia y diferenciación de los OPCs generados durante el tratamiento con WIN llevamos a cabo el conteo de células doblemente positivas para el marcador de oligodendrocitos maduros APC y BrdU ($\text{BrdU}^+/\text{APC}^+$) y de células $\text{BrdU}^-/\text{APC}^+$ en límite entre la cápsula externa y el estriado adyacente a los 14 y 28 días tras la HI. Los animales tratados con WIN mostraron un mayor número de células de ambos tipos en esta región tanto a los 14 como a los 28 días tras la lesión, indicando que WIN es capaz de inducir oligodendrogénesis a largo plazo tras HI neonatal.

Nuestra siguiente observación se centró en la SVZ y en su proyección dorsolateral, una estructura neurogénica altamente activa en respuesta a HI neonatal. Dado que se ha descrito que la activación de los receptores de cannabinoides en las células madre neurales induce su actividad proliferativa (10;13;14), quisimos estudiar si el tratamiento con WIN producía un aumento en la respuesta proliferativa de la SVZ tras la HI. Observamos mediante conteo por estereología (19) que el número de total de células BrdU^+ en la proyección dorsolateral de la SVZ era significativamente mayor en los animales tratados con WIN en

comparación con los tratados con vehículo (182570±10335 *versus* 144373±7427, respectivamente) al finalizar el tratamiento con WIN a los 7 días tras la HI. Dado que la SVZ es una región neurogénica caracterizada por su capacidad de generar no sólo progenitores gliales sino también neuronales, quisimos observar si el tratamiento con WIN resultaba en un aumento en el número de neuroblastos. Observamos mediante análisis por western blot que los animales tratados con WIN mostraban una mayor expresión de la proteína característica de neuroblastos doblecortina al final de tratamiento con WIN 7 días tras la HI. Este dato se correlacionó con una mayor presencia de neuroblastos de nueva generación (BrdU⁺/Dcx⁺) en el estriado de los animales tratados con WIN 14 días tras la HI. Sin embargo este efecto del tratamiento mostró un carácter transitorio ya que a los 28 días tras la HI no se pudo observar un mayor número de células BrdU⁺/Dcx⁺ en el estriado de los animales tratados con WIN. Este cambio no pudo explicarse por la diferenciación de los neuroblastos en neuronas maduras entre los días 14 y 28 tras las HI ya que no se observó presencia significativa de células doblemente positivas para el marcador de neuronas maduras NeuN y BrdU (BrdU⁺/NeuN⁺) en el estriado en ninguno de los grupos experimentales. Estos datos implican que los neuroblastos generados durante el tratamiento con WIN muestran una tasa muy limitada de supervivencia a largo plazo y diferenciación en neuronas maduras. Queda por responder la cuestión de si una administración más prolongada de WIN tras la HI favorecería la supervivencia, migración y diferenciación de los neuroblastos en neuronas maduras en el estriado lesionado tras la HI neonatal.

En conclusión, nuestro estudio ha mostrado que el agonista de los receptores CB1 y CB2 WIN55,212-2 administrado de forma repetida tras la inducción de hipoxia-isquemia neonatal en rata es capaz de favorecer la recuperación del tejido cerebral lesionado. Esta recuperación se traduce tanto en la oligodendrogénesis y remielinización de la sustancia blanca afectada como en la mayor proliferación y generación transitoria de neuroblastos en la zona subventricular próxima a la lesión. Estos datos, unidos a las anteriores observaciones del efecto neuroprotector de

diversos cannabinoides frente a daño cerebral hipóxico-isquémico (20-23), aportan un nuevo punto de vista para el empleo de estos compuestos en la fase de recuperación a largo plazo tras lesiones cerebrales agudas.

Bibliografía

- (1) Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001; 7(1):56-64.
- (2) Liu Y, Silverstein FS, Skoff R, Barks JD. Hypoxic-ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatr Res* 2002; 51(1):25-33.
- (3) Segovia KN, McClure M, Moravec M, Luo NL, Wan Y, Gong X et al. Arrested oligodendrocyte lineage maturation in chronic perinatal white matter injury. *Ann Neurol* 2008; 63(4):520-530.
- (4) Skoff RP, Bessert DA, Barks JD, Song D, Cerghet M, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury results in acute disruption of myelin gene expression and death of oligodendroglial precursors in neonatal mice. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19(2):197-208.
- (5) Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001; 50(5):553-562.
- (6) Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. *Pediatr Res* 2005; 58(3):600-606.
- (7) Plane JM, Liu R, Wang TW, Silverstein FS, Parent JM. Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse. *Neurobiol Dis* 2004; 16(3):585-595.
- (8) Yang Z, Covey MV, Bitel CL, Ni L, Jonakait GM, Levison SW. Sustained neocortical neurogenesis after neonatal hypoxic/ischemic injury. *Ann Neurol* 2007; 61(3):199-208.

- (9) Zaidi AU, Bessert DA, Ong JE, Xu H, Barks JD, Silverstein FS et al. New oligodendrocytes are generated after neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rodents. *Glia* 2004; 46(4):380-390.
- (10) Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B et al. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J* 2005; 19(12):1704-1706.
- (11) Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B et al. The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci* 2006; 26(5):1551-1561.
- (12) Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO et al. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 2004; 66(2):204-208.
- (13) Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, Garcia-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arevalo-Martin A et al. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci* 2007; 25(3):629-634.
- (14) Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzman M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J* 2006; 20(13):2405-2407.
- (15) Aguado T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G et al. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J Biol Chem* 2007; 282(33):23892-23898.
- (16) Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J et al. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 2002; 22(22):9742-9753.
- (17) Arevalo-Martin A, Garcia-Ovejero D, Rubio-Araiz A, Gomez O, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E. Cannabinoids modulate Olig2 and polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the subventricular zone of post-natal rats through cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. *Eur J Neurosci* 2007; 26(6):1548-1559.
- (18) Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci* 2005; 27(2-4):81-86.
- (19) Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96(10):857-881.
- (20) Castillo A, Tolon MR, Fernandez-Ruiz J, Romero J, Martinez-Org. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis* 2010; 37(2):434-440.
- (21) Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, Mielgo VE, Gastiasoro E, Rueda M et al. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res* 2008; 64(6):653-658.
- (22) Fernandez-Lopez D, Pazos MR, Tolon RM, Moro MA, Romero J, Lizasoain I et al. The cannabinoid agonist WIN55212 reduces brain damage in an in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. *Pediatr Res* 2007; 62(3):255-260.
- (23) Fernandez-Lopez D, Martinez-Org, Nunez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA et al. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res* 2006; 60(2):169-173.

3. Premio de la 10ª Reunión Anual de la SEIC, Santander, 2009

DOMINIOS SINÁPTICOS DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES CB1 EN EL NUCLEO VENTROMEDIAL DEL HIPOTALAMO DE RATONES MUTANTES CONDICIONALES

Leyre Reguero
Universidad del País Vasco

El sistema endocannabinoide participa en multitud de procesos fisiológicos, entre los que se incluyen el apetito, la ingesta y el balance energético, funciones en las que también interviene el hipotálamo. El núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) es un núcleo bilateral, con forma elíptica, situado adyacente al tercer ventrículo, y en el que se distinguen los subnúcleos dorsomedial, central y ventrolateral, los cuales presentan tipos celulares y conexiones específicas. El VMH realiza múltiples conexiones intra y extrahipotalámicas, participando en la regulación del comportamiento alimentario y balance energético (principalmente la región dorsomedial), la conducta sexual (controlada fundamentalmente por la región ventrolateral), la función cardiovascular y el dolor.

Los estudios del laboratorio del Dr. Giovanni Marsicano (Nat Neurosci. 2010 Mar;13:281-3) indican que el sistema endocannabinoide podría modular el comportamiento alimentario en función de las subpoblaciones neuronales en las que se active. Así, la activación del receptor de cannabinoides CB1 (RCB1) en las neuronas GABAérgicas mediaría la disminución de la ingesta, mientras que su activación en las neuronas glutamatérgicas estaría implicado en el aumento de la misma.

Por todo ello, el objetivo general de nuestro estudio consiste en investigar los sistemas neuronales y mecanismos que subyacen al papel del sistema endocannabinoide en la modulación de la ingesta. En este estudio nos centramos en la localización del RCB1 en el VMH y su distribución en los perfiles glutamatérgicos y GABAérgicos de dicho núcleo.

Para ello, utilizamos ratones C57 silvestres (CB1-WT), ratones knockout para el RCB1

(CB1-KO) y ratones mutantes condicionales CB1-Glu-KO (carecen del RCB1 en las neuronas glutamatérgicas telencefálicas corticales) y CB1-GABA-KO (carecen del RCB1 en las neuronas GABAérgicas). Empleamos las técnicas de avidina-biotina peroxidasa para microscopía de luz e inmunofluorescencia, así como el método de alta resolución de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica.

En primer lugar, realizamos controles de especificidad para el anticuerpo CB1, tomando como control positivo el hipocampo. El animal CB1-KO y el control negativo no muestran inmunomarcado, tanto en los cortes de hipocampo como de hipotálamo, corroborando la especificidad del anticuerpo.

A nivel de microscopía de luz observamos que el RCB1 se distribuye por todo el VMH de los ratones CB1-WT y CB1-Glu-KO. Sin embargo, este marcado disminuye en la región dorsomedial del ratón CB1-GABA-KO, sugiriendo que las terminales inmunopositivas para RCB1 en esta región serían predominantemente GABAérgicas. La inmunorreactividad tiene una apariencia punteada, rellenando el neuropelo, lo que sugiere la presencia del RCB1 en las terminales nerviosas.

En los experimentos de inmunofluorescencia el patrón de expresión para CB1 es similar, observándose una disminución de la fluorescencia en la región dorsomedial del ratón CB1-GABA-KO. Por otro lado, el patrón de expresión para el transportador vesicular de glutamato tipo 1 (vGluT-1), que identifica las terminales excitadoras, aumenta en la zona que rodea al núcleo. A mayor amplificación, la inmunofluorescencia presenta una apariencia punteada y el marcado para el RCB1 desaparece en el CB1-KO, manteniéndose el marcado para vGluT-1.

A nivel de microscopía electrónica, el RCB1 en el animal CB1-WT se distribuye por la membrana de terminales axónicas, alejado de la zona de especialización sináptica. En algunas ocasiones, las terminales inmunopositivas para RCB1 hacen sinapsis asimétricas que presentan una evidente

densidad postsináptica (es decir excitadoras), mientras que otras son de tipo simétrico (es decir inhibitoras). Por lo tanto, el RCB1 se distribuye en terminales sinápticas tanto excitadoras como inhibitoras en el animal CB1-WT. Para corroborar este hecho, empleamos los ratones mutantes condicionales.

En el ratón CB1-GABA-KO, las inmunopartículas se localizan a nivel presináptico sobre la membrana de terminales que establecen sinapsis principalmente asimétricas (excitadoras) sobre perfiles dendríticos, así como en porciones preterminales de los axones. Estos animales carecen del RCB1 en las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo, por lo que el inmunomarcado observado corresponde a la localización de RCB1 en terminales sinápticas excitadoras.

En el ratón CB1-Glu-KO, el RCB1 aparece distribuido en la membrana de botones terminales que sinaptan sobre perfiles dendríticos. También observamos preterminales inmunopositivos para RCB1. En este caso, las terminales inmunopositivas para RCB1 hacen principalmente sinapsis de tipo simétrico, es decir, inhibitoras, lo que concuerda con el genotipo de los ratones ya que carecen del RCB1 en la mayoría de las neuronas glutamatérgicas corticales.

Finalmente, la cuantificación de las partículas de inmuno-oro en los terminales inmunopositivos para RCB1 indica que la densidad es similar en el ratón CB1-WT y los mutantes condicionales.

Por todo ello, los resultados de este estudio demuestran la presencia de RCB1 en el núcleo ventromedial del hipotálamo, localizándose en membranas de terminales sinápticas excitadoras e inhibitoras que contienen una densidad similar de RCB1. Estos hallazgos junto con los experimentos que están en marcha contribuirán a entender la compleja regulación de las conductas de ingesta por el sistema endocannabinoide, en concreto en el núcleo ventromedial que juega un papel clave en la transmisión de señales de saciedad.

AGRADECIMIENTOS: El trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Pedro Grandes ha sido financiado por la ayuda del Gobierno Vasco GIC07/70-IT-432-07 y la Red de Trastornos Adictivos, RETICS, Instituto de Salud Carlos III, MICINN, RD07/0001/2001 y MICINN SAF2009-07065. L. Reguero dispone de una beca predoctoral del Gobierno Vasco y N. Puente disfruta de una Beca Postdoctoral de Especialización de Investigadores de la Universidad del País Vasco.

4. Cannabinoides sintéticos como drogas de diseño

En 2004 se comenzó a comercializar en "Smartshops" de Europa una mezcla de hierbas para fumar, usarse como incienso o como infusión con el nombre de "Spice" o "K2" que, según sus creadores, mimetiza los efectos de la marihuana. El objetivo era ofrecer un producto con las propiedades de los cannabinoides pero "falso", sin emplear cannabinoides, como alternativa legal a la marihuana. Debido al éxito que tuvo, se convirtió en un negocio rentable y comenzaron a aparecer más marcas ofreciendo el mismo producto, que de forma genérica pasó a conocerse como "Spice". Según el "Financial Times"¹, este mercado movió en el Reino Unido cerca de 900.000 libras en 2007.

Sin embargo, análisis realizados en diversos laboratorios, descubrieron que en

realidad los efectos cannabimiméticos de estas preparaciones eran debidos a que se les había añadido cannabinoides sintéticos. El primero de estos compuestos encontrado fue el JWH-018, seguido de un análogo del CP47497. En análisis posteriores, se encontró de nuevo el CP47497, pero no el JWH-018; en su lugar, se halló JWH-073². Es decir, que estos preparados son drogas de diseño en las que tanto los cannabinoides sintéticos encontrados como sus cantidades relativas varían con cada lote. Así, en Estados Unidos, se ha detectado HU-210 y en la página web del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) figuran, además de algunos de los compuestos anteriores, el Δ^9 -TCH y el JWH-250.

En el Reino Unido "Spice" está catalogada desde diciembre de 2009 como droga de clase B, es decir, como su análoga natural, el cannabis. Suiza y Rumanía han seguido la misma senda y han clasificado a "Spice" como una droga ilegal. En otros países europeos, se han declarado estupefacientes los cannabinoides sintéticos detectados en las preparaciones (Francia, Alemania, Suecia) y, en algunos casos, también se ha prohibido la venta de alguna de las hierbas declaradas en los ingredientes (Rusia, Polonia). En Eslovaquia, Canadá y Nueva Zelanda es un producto legal. En Estados Unidos se han declarado ilegales los cannabinoides sintéticos en algunos estados y está pendiente de declaración en otros³.

España no aparece en el listado de países de la EMCDDA en los que "Spice" o los cannabinoides sintéticos se encuentren bajo control por las autoridades⁴. En la página web del Plan Nacional Sobre Drogas⁵ tampoco figuran los cannabinoides sintéticos en la legislación nacional vigente sobre drogas.

En cualquier caso, nos encontramos ante el uso de cannabinoides sintéticos como drogas de diseño cuya formulación se cambia rápidamente para hacer frente a los cambios en el estado jurídico de los compuestos psicoactivos empleados y poder venderlo legalmente. Y todo esto sin tener en cuenta que en internet se puede comprar "Spice" (<http://buyk2spice.com/>),

y hay foros donde se dan "[Trip reports](#)" de quien ha probado cannabinoides sintéticos como, entre otros, el WIN55212-2, hasta la fecha no detectado en "Spice".

En definitiva, pese a todos los riesgos que conlleva la administración en humanos de compuestos cannabinoides más potentes que los presentes en la marihuana y cuya toxicidad se desconoce, el uso de los cannabinoides sintéticos no se restringe al laboratorio y es cada vez más frecuente en las drogas de diseño.

1. Financial Times:

<http://www.ft.com/cms/s/2/1721e2da-f8a0-11dd-aae8-000077b07658.html>

2. Lindingeit y col. (2009). Spice: A never ending story?. Forensic Science International 191: 58-63.

3. The New York Times:

<http://www.nytimes.com/2010/07/11/us/11k2.html? r=1&src=me>

4. EMCDDA:

<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cannabinoids>

5. Plan Nacional Sobre Drogas:

<http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/legisla/home.htm>

Ángel Arévalo Martín
Hospital Nacional de Parapléjicos,
SESCAM, Toledo

5. Agenda

Congresos sobre cannabinoides

11ª Reunión Anual SEIC
25-27 noviembre de 2010
Pontevedra

Más información: <http://www.ucm.es/info/seic-web/>

Cannabinoid Function in the CNS Gordon Research Conference
22-27 mayo de 2011
Les Diablerets, Suiza

Más información: <http://www.grc.org/programs.aspx?year=2011&program=cannab>

Otros congresos de interés

40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience
13-17 noviembre de 2010
San Diego, California (Estados Unidos)
Más información: <http://www.sfn.org>

V Reunión de la Red Glial Española
16 y 17 de diciembre de 2010
Málaga
Más información: <http://www.redglial.es/>

6. Últimas publicaciones sobre cannabinoides de investigadores españoles

Blázquez C, Chiarlone A, Sagredo O, Aguado T, Pazos MR, Resel E, Palazuelos J, Julien B, Salazar M, Börner C, Benito C, Carrasco C, Diez-Zaera M, Paoletti P, Díaz-Hernández M, Ruiz C, Sendtner M, Lucas JJ, de Yébenes JG, Marsicano G, Monory K, Lutz B, Romero J, Alberch J, Ginés S, Kraus J, Fernández-Ruiz J, Galve-Roperh I, Guzmán M. Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease. *Brain*. 2010 Oct 7. [Epub ahead of print]

Calafat A, Blay NT, Hughes K, Bellis M, Juan M, Duch M, Kokkevi A. Nightlife young risk behaviours in Mediterranean versus other European cities: are stereotypes true? *Eur J Public Health*. 2010 Sep 30. [Epub ahead of print]

Gomez O, Arevalo-Martin A, Garcia-Ovejero D, Ortega-Gutierrez S, Cisneros JA, Almazan G, Sánchez-Rodríguez MA, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E. The constitutive production of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol participates in oligodendrocyte differentiation. *Glia*. 2010 Sep 27.

Viveros MP, Marco-López EM, López-Gallardo M, Garcia-Segura LM, Wagner EJ. Framework for sex differences in adolescent neurobiology: A focus on cannabinoids. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Sep 30.

Ferrer I, Martinez A, Blanco R, Dalfó E, Carmona M. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease. *J Neural Transm*. 2010 Sep 23.

Alonso-Alconada D, Alvarez FJ, Alvarez A, Mielgo VE, Goñi-de-Cerio F, Rey-Santano MC, Caballero A, Martinez-Orgado J, Hilarario E. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 reduces the initial cerebral damage alter hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *Brain Res*. 2010 Sep 18.

Larrinaga G, Sanz B, Pérez I, Blanco L, Cándenas ML, Pinto FM, Gil J, López JI. Cannabinoid CB1 Receptor Is Down-regulated in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 2010 Sep 17.

Higuera-Matas A, Soto-Montenegro ML, Montoya GL, García-Vázquez V, Pascau J,

Miguéns M, Del Olmo N, Vaquero JJ, García-Lecumberri C, Desco M, Ambrosio E. Erratum to: Chronic Cannabinoid Administration to Periadolescent Rats Modulates the Metabolic Response to Acute Cocaine in the Adult Brain. *Mol Imaging Biol.* 2010 Sep 17.

González-Pinto A, Reed C, Novick D, Bertsch J, Haro JM. Assessment of Medication Adherence in a Cohort of Patients with Bipolar Disorder. *Pharmacopsychiatry.* 2010 Sep 14. [Epub ahead of print]

García A-Gutiérrez MA, Manzanares J. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J Psychopharmacol.* 2010 Sep 13. [Epub ahead of print]

Agudo J, Martín M, Roca C, Molas M, Bura AS, Zimmer A, Bosch F, Maldonado R. Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia.* 2010 Sep 11. [Epub ahead of print]

Rodríguez-Sánchez JM, Ayesa-Arriola R, Mata I, Moreno-Calle T, Pérez-Iglesias R, González-Blanch C, Periañez JA, Vazquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. Cannabis use and cognitive functioning in first-episode schizophrenia patients. *Schizophr Res.* 2010 Sep 6. [Epub ahead of print]

Andradas C, Caffarel MM, Pérez-Gómez E, Salazar M, Lorente M, Velasco G, Guzmán M, Sánchez C. The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene.* 2010 Sep 6. [Epub ahead of print]

López-Miranda V, Dannert MT, Herradón E, Alasua A, Martín MI. Cytochrome P450 Pathway Contributes to Methanandamide-induced Vasorelaxation in Rat Aorta. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010 Sep 4. [Epub ahead of print]

Al-Massadi O, Gabellieri E, Trujillo ML, Señaris R, Pagotto U, Pasquali R, Casanueva FF, Seoane LM. Peripheral endocannabinoid system mediated actions of rimonabant on GH secretion are ghrelin dependent. *J Neuroendocrinol.* 2010 Aug 30. [Epub ahead of print]

Jiménez-Iglesias A, Moreno C, Oliva A, Ramos P. [An approach to the assessment of the effectiveness of a drug use prevention program in Secondary Education in Andalusia]. *Adicciones.* 2010;22(3):253-65. Spanish.

Sánchez-Martínez F, Ariza Cardenal C, Pérez Giménez A, Diéguez Ferrer M, López Medina MJ, Nebot Adell M. [Process evaluation of the school-based cannabis use prevention program "xkpts.com" in adolescents from Barcelona in 2006]. *Adicciones.* 2010;22(3):217-26. Spanish.

García-Bueno B, Pérez-Nievas BG, Leza JC. Is there a role for the nuclear receptor PPAR γ in neuropsychiatric diseases? *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010 Nov;13(10):1411-29. Epub 2010 Aug 27.

Higuera-Matas A, Soto-Montenegro ML, Montoya GL, García-Vázquez V, Pascau J, Miguéns M, Del Olmo N, Vaquero JJ, García-Lecumberri C, Desco M, Ambrosio E. Chronic Cannabinoid Administration to Periadolescent Rats Modulates the Metabolic

Response to Acute Cocaine in the Adult Brain. *Mol Imaging Biol.* 2010 Jul 31. [Epub ahead of print]

Postigo C, de Alda ML, Barceló D. Evaluation of drugs of abuse use and trends in a prison through wastewater analysis. *Environ Int.* 2010 Jul 22. [Epub ahead of print].

Caffarel MM, Andradas C, Mira E, Pérez-Gómez E, Cerutti C, Moreno-Bueno G, Flores JM, García-Real I, Palacios J, Mañes S, Guzmán M, Sánchez C. Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Mol Cancer.* 2010 Jul 22;9:196.

García-Gutiérrez MS, Pérez-Ortiz JM, Gutiérrez-Adán A, Manzanares J. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br J Pharmacol.* 2010 Aug;160(7):1773-84.

Mato S, Victoria Sánchez-Gómez M, Matute C. Cannabidiol induces intracellular calcium elevation and cytotoxicity in oligodendrocytes. *Glia.* 2010 Nov 1;58(14):1739-47.

Larrinaga G, Varona A, Pérez I, Sanz B, Ugalde A, Cándenas ML, Pinto FM, Gil J, López JI. Expression of cannabinoid receptors in human kidney. *Histol Histopathol.* 2010 Sep;25(9):1133-8.

Suárez J, Rivera P, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP. Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. *Brain Res.* 2010 Aug 19;1349:162-73.

Gutierrez-Lopez MD, Llopis N, Feng S, Barrett DA, O'Shea E, Colado MI. Involvement of 2-arachidonoyl glycerol in the increased consumption of and preference for ethanol of mice treated with neurotoxic doses of methamphetamine. *Br J Pharmacol.* 2010 Jun;160(3):772-83.

Alvaro-Bartolomé M, Esteban S, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, Valverde O, García-Sevilla JA. Regulation of Fas receptor/Fas-associated protein with death domain apoptotic complex and associated signalling systems by cannabinoid receptors in the mouse brain. *Br J Pharmacol.* 2010 Jun;160(3):643-56.

Composición de la Junta Directiva de la SEIC

<u>Presidente:</u>	Javier Fernández Ruiz (Universidad Complutense de Madrid)
<u>Vicepresidente:</u>	Carmen Guaza (Instituto Cajal, CSIC, Madrid)
<u>Tesorero:</u>	Julián Romero (Fundación Hospital Alcorcón, Madrid)
<u>Vocales:</u>	Koldo Callado (Universidad del País Vasco) Emilio Fernández-Espejo (Universidad de Sevilla) Onintza Sagredo (Universidad Complutense de Madrid) Eduardo Molina-Holgado (Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo) Eduardo Muñoz (Universidad de Córdoba) José Antonio Ramos (Universidad Complutense de Madrid)
<u>Secretario:</u>	Manuel Guzmán (Universidad Complutense de Madrid)

Dirección de contacto de la SEIC

Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC)
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III
Facultad de Medicina, Universidad Complutense
Ciudad Universitaria, s/n, 28040 Madrid
Teléfonos: 913941450/913941454; fax: 913941691; e-mail: seic@med.ucm.es
Dirección Web: <http://www.ucm.es/info/seic-web>