



Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides

Boletín electrónico (octubre-diciembre/2006; nº 14)

Contenidos:

1. Saludo del Presidente
2. "Consecuencias psicológico/psiquiátricas del consumo de cannabinoides" (Luis Núñez)
3. "¿Te sativo o te acomplio?" (Javier Pedraza)
4. Premios de la 7ª Reunión Anual de la SEIC
 - "Los inhibidores de la recaptación más utilizados reducen la viabilidad celular de la línea de glioma C6" (Eva de Lago)
 - "Regulación de la vía PI3K/Akt/GSK-3 mediante administración aguda y crónica de Δ^9 -THC en ratón" (Emma Puighermanal)
5. Agenda
6. Últimas publicaciones sobre cannabinoides de investigadores españoles

1. Saludo del Presidente

Poco tengo que decir desde el anterior Boletín. Sin embargo, sí hay que recordar que la celebración del Congreso de Toledo fue todo un éxito, a lo cual ya estamos acostumbrados dada la calidad de todos los miembros de la SEIC. Pediros disculpas por no poder quedarme con vosotros hasta el sábado por la mañana, pero un problema familiar requirió de mi presencia en Madrid. Hay que felicitar al Comité Organizador, encabezado por el simpar Eduardo, no solo por la parte científica, sino también por como nos cebaron a comer y por lo agradable de la cena en el Cigarral.

A finales de Enero saldrá el libro sobre "los aspectos psiquiátricos del consumo del cannabis", el cual colgaremos en nuestra página, y posteriormente enviaremos un ejemplar a todos los socios que lo solicitéis.

Como ya os comenté en Toledo, el 16 de Noviembre hicimos una reunión en la Universidad Complutense sobre "adolescentes y consumo de cannabis", de la que aunque anunciada en el Boletín anterior, no había llegado al conocimiento de muchos de vosotros. ¿No será que no leéis el boletín, mandrines?. A partir de ahora cualquier reunión que planeemos la colgaremos también en la página Web.

Y dado que no tengo nada más que decir, desearos a todos unas felices fiestas, tanto a los cristianos, como a los agnósticos e incluso a los seguidores del Real Madrid en estos momentos de sufrimiento.

Un saludo

José A. Ramos

2. Consecuencias psicológico/psiquiátricas del consumo de cannabinoides

¡Bienvenidos todos a este boletín de la SEIC!

Como podréis comprobar a lo largo de la lectura del mismo, es un boletín llamémosle clínico dado que los que lo elaboramos somos clínicos y así pretendemos poneros al día en cuanto a este otro lado de la investigación de los cannabinoides. Por un lado hacemos una puesta al día de lo referente a las consecuencias psicológico/psiquiátricas del consumo de los cannabinoides; por otro lado Javier os pone al tanto de lo acaecido en la investigación de los posibles efectos terapéuticos del cannabis y sus derivados. Aparte de la secciones habituales (congresos, reuniones, etc) y publicaciones de los miembros de la SEIC a lo largo de este trimestre.

¡Espero que lo disfrutéis!

En este apartado podemos concretar lo que la investigación clínica ha llevado a cabo a lo largo del presente año, que se puede resumir en tres aspectos básicamente:

- Cannabis y psicosis
- Cannabis y trastornos afectivos
- Cannabis y dependencia

En relación a las relaciones entre consumo de cannabis y psicosis, se puede dar por confirmado lo apuntado en años previos: el consumo de cannabis es un claro factor de riesgo para el desarrollo de psicosis, y en concreto de la esquizofrenia (Fergusson, Poulton, Smith y Boden, 2006). En la actualidad, la investigación se halla centrada en la búsqueda de factores de riesgo (vulnerabilidad): aparte del ya detallado inicio en la adolescencia del consumo (hecho de gran importancia, ya que

se ha observado que el inicio del consumo en la actualidad se lleva a cabo en esta época de la vida, siendo cada vez más precoz), se están estudiando alteraciones en enzimas relacionadas con el metabolismo de la dopamina: en concreto, los sujetos con genotipo Val/Val de la COMT, si comienzan el consumo de cannabis en la adolescencia, son más vulnerables a la aparición de cuadros psicóticos (Henquet, 2006).

Tenemos que destacar un estudio de seguimiento a tres años de un grupo de casi 600 pacientes diagnosticados de psicosis cannábica (Arendt y cols., 2005), el mayor grupo en este campo de investigación, por dos motivos: en primer lugar, porque da por hecho la existencia de la psicosis cannábica, motivo de discusión desde hace mucho tiempo, y en segundo lugar, porque en dicho grupo se ha detectado la presencia de trastornos de tipo esquizofrénico en casi el 50 % de los sujetos, de inicio precoz. Este hallazgo podría presuponer que la psicosis cannábica sea un marcado de riesgo para una posible evolución hacia la esquizofrenia, por lo que es de gran importancia su detección y tratamiento para evitar dicha evolución.

Con respecto a la relación entre el consumo de cannabis y los trastornos afectivos, parece claro que el cannabis produce una peor evolución de los trastornos afectivos (Drake y cols, 2004). Se han publicado diversos trabajos que apuntan hacia una relación entre el consumo de cannabis (de nuevo de inicio en la adolescencia) y la aparición en el futuro de trastornos afectivos (en forma de cuadros depresivos, dado que aún no se ha estudiado su relación con cuadros de estirpe maniforme), aunque

no se han publicado estudios con resultados del todo concluyentes.

Algún autor ha sugerido que los pacientes que participan en estudios relacionados con usos terapéuticos de las cannabinoides presentan mayor riesgo aún, como sugiriendo que existe una relación entre el estado físico y la mayor incidencia de dichas depresiones tras consumo de cannabis (Denson y Earlewine, 2006).

Por último, se están definiendo con mayor claridad las características de la dependencia de cannabis, con el desarrollo de nuevas escalas y cuestionarios centrados en alteraciones relacionadas con la dependencia del cannabis, así como nuevas posibilidades terapéuticas para tratar la dependencia (Hill, 2006; Roffman y Stephens, 2006; Hall, 2006). Es posible que en la próxima versión del DSM y/o de la CIE, glosarios que empleamos los clínicos para el diagnóstico de los trastornos mentales, aparezca una nueva categoría relativa a los criterios para el diagnóstico de la dependencia del cannabis, con criterios de presencia de síntomas asociados, duración, intensidad, etc.

Y para terminar creo que no podemos obviar un hecho que, aunque no novedoso, dado que se venía observando hace tiempo, que es la oposición de un grupo de psiquiatras al reconocimiento de los hallazgos clínicos que han sido descritos por otros grupos de investigadores. En concreto, los grupos de investigación australianos y estadounidenses llevan a cabo estudios epidemiológicos y/o clínicos, donde describen diversos hallazgos relacionados con consecuencias psiquiátricas del consumo del cannabis y sus derivados; curiosamente (y sospechosamente) son clínicos del Reino

Unido los que no reconocen los datos hallados y parecen empeñarse en una búsqueda de defectos en los estudios, con el fin de ningunear los resultados. ¿No será que en dicho país se están pensando cambiar el status legal de los cannabinoides y para ello es preciso minimizar sus riesgos? En el año 2000, el Departamento de Salud del Gobierno del Reino Unido comenzó un programa de investigación sobre el consumo de drogas, a través del cual se financiaron durante 4 años una quincena de investigaciones, con resultados al menos llamativos: el uso prolongado de cannabis resulta "no intrusivo, no destructivo y controlado" (??????). Los autores del trabajo no señalan que el cannabis sea inocuo, pero confirman que su uso puede no resultar problemático y que no está asociado a conductas de riesgo.

Considero importante destacar que este tipo de conclusiones, diametralmente opuestas a las descritas en diversos estudios epidemiológicos, con una adecuada metodología; pueden provocar una falsa impresión entre la población general, con lo que podríamos volver a hablar del cannabis como "droga blanda".

Fergusson DM, Poutlon R, Smith PF, Boden JM (2006) Cannabis and psychosis. *BMJ*; 232, 172-5.

Henquet C (2006) Val¹⁵⁸ Met moderation of cannabis-induced effects on psychosis and cognition. Presented at the 13th Association of European Psychiatrists (AEP) Symposium by the Section on Epidemiology and Social Psychiatry; June 15-17, 2006; Bordeaux, France.

Arendt M, Rosenberg R, Foldager L, Perto G, Munk. Jorgensen P (2005) Cannabis-induced psychosis and subsequent

schizophrenia-spectrum disorders: follow-up study of 535 incident cases. *B J Psychiatry*, 187: 510-515.

Drake RE, Xie H, McHugo GJ, Shumway M (2004) Three-year outcomes of long-term patients with co-occurring bipolar and substance use disorders. *Biol Psychiatry*, 56: 749-756.

Denson TF, Earleywine M (2006). Decreased depression in marijuana users. *Addict Behav*; 31: 738-742.

Hill KP (2006) Cannabis dependence: its nature, consequences and treatment. *Addiction*, 101(11):1669.

Roffman RA, Stephens RS, eds. (2006) Cannabis dependence: its nature, consequences and treatment. Cambridge University Press, Cambridge.

Hall WD (2006) Cannabis use and the mental health of young people. *Aust N Z J Psychiatry*, 40(2):105-13.

Luis Núñez

3. ¿Te sativo o te acompio?

Nuevos aires soplan para aquellos clínicos que, como un servidor, tanto hemos aprendido sobre ratones WT y KO en las pasadas reuniones de la SEIC.

Después de varios años de impaciente espera, parece ser que, por fin, medicamentos basados en el sistema endocannabinoide están listos para salir al mercado.

Me refiero, como no, a Sativex® y a Acompia®, agonista y antagonista respectivamente de nuestros tan queridos receptores CB1.

¿Expectativas para el futuro? Todas las que queramos y más alguna. Todas aquellas que se relacionen con la "fisiología anandamídica". Imaginemos: Que mi paciente no me come por falta de apetito, toma Sativex®... que lo que ocurre es que produce anandamida en demasía y no para de atiborrarse... Acompia® que te receto.

Claro que se tardará un tiempo en ver los resultados de la práctica clínica diaria, donde los pacientes "seleccionados" poseen

varios "criterios de exclusión" al mismo tiempo, pero tengo certeza de que las indicaciones para estos dos primeros representantes del grupo terapéutico "cannabinoide" irán creciendo a lo largo de los años.

Caquexia, anorexia, hiperfagia, hipercolesterolemia, analgesia, hiperglicemia, náuseas, insulinoresistencia, ataxia, glioblastoma... la lista es tan larga que parece nunca acabar.

Sí, parece que realmente los clínicos (y como no, nuestros pacientes) vamos a poder beneficiarnos de todas esas horas que la mayor parte de vosotros, colegas de la SEIC, habéis pasado enfrascados en vuestros laboratorios, pincha que te pincha un peritoneo tras otro.

Esperando volver a vernos pronto, y con los pacientes "impacientes" por ser atendidos, me despido desde mi gabinete en Sintra, Portugal, donde espero algún día podamos organizar otra de nuestras reuniones.

Javier Pedraza

4. Premios de la 7ª Reunión Anual de la SEIC

A continuación presentamos los artículos elaborados por las autoras de dos de las cinco comunicaciones premiadas en la pasada reunión de la SEIC (Toledo 2006). En números venideros del boletín recogeremos las contribuciones del resto de las galardonadas.

Los inhibidores de la recaptación más utilizados reducen la viabilidad celular de la línea de glioma C6

Dentro de los elementos que conforman el sistema cannabinoide endógeno (SCE) nos vamos a centrar en el proceso de terminación de la señal biológica. Está formado por un sistema de internalización de los endocannabinoides al interior celular para posteriormente ser degradado por la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) en el caso de la anandamida (AEA) y otros endocannabinoides, y por la enzima monoacilglicerol lipasa en el caso del 2-araquidonoilglicerol (2-AG).

El potencial terapéutico del sistema cannabinoide endógeno es muy amplio y en ello se están dirigiendo innumerables esfuerzos de una gran cantidad de grupos de investigación. Sin embargo, las estrategias pueden variar. Una de las vías más estudiada ha sido el uso de agonistas naturales o sintéticos de los receptores. Aunque esta estrategia presenta como desventaja el hecho de poder producir efectos psicotrópicos asociados a la activación generalizada de receptores cerebrales CB1. De esta forma, la utilización de compuestos capaces de inhibir el sistema de inactivación de ligandos endógenos (inhibidores de la recaptación de AEA y de la enzima FAAH), representan una buena alternativa.

Estos compuestos reciben el nombre de agonistas indirectos, y producen una elevación del tono endocannabinoide en

aquellas circunstancias patológicas en las que se haya producido una hipofuncionalidad del SCE. De esta forma se evitarían además los efectos indeseados por la activación de los receptores CB1. Se han descrito un gran número de compuestos capaces de inhibir la recaptación de AEA, cabe destacar los compuestos AM404, VDM11, UCM707 y OMDM2 (Beltramo et al., 1997; De Petrocellis et al., 2000; López-Rodríguez et al., 2003; Ortar et al., 2003), ya que son algunos de los compuestos con uso más generalizado.

Sabemos, por datos previos, que bajas concentraciones de AM404 y VDM11, reducen la proliferación celular de la línea celular de glioma C6 y que este efecto no es revertido por el tratamiento con los antagonistas de los receptores CB1, CB2 o vanilloide (TRPV1) (Jonsson et al., 2003). Sin embargo, no existen datos acerca del potencial tóxico de estos compuestos. Debido al posible potencial terapéutico que estos compuestos pueden presentar, hemos creído importante realizar un estudio en este sentido con los inhibidores de la recaptación más utilizados en investigación, utilizando la línea celular de glioma humano C6.

En un primer grupo de experimentos, realizamos un estudio tiempo-dependiente y concentración-dependiente de viabilidad celular mediante tres métodos analíticos diferentes (kit comercial CyQuant,

calceína-AM y liberación de LDH). Observamos que AM404 y VDM11 disminuyen la viabilidad celular de forma muy rápida, ya que se observa una disminución importante tan sólo 3 horas después de haber realizado el tratamiento. Sin embargo, con los otros compuestos analizados, OMDM2 y arvanilo, los tiempos necesarios para observar un efecto similar fueron más largos (6-9 horas) y en el caso del UCM707 además fue necesaria una concentración más elevada. Aunque las concentraciones utilizadas en el estudio son elevadas (rango μM), es importante señalar que se encuentran dentro del mismo rango del que presentan estos compuestos en las curvas de inhibición del transporte de AEA.

La mayoría de los compuestos utilizados en el estudio, son derivados del ácido araquidónico (AA), o del ácido oleico en el caso del compuesto OMDM2. Por esta razón, realizamos un estudio comparativo de viabilidad con AA y otros compuestos relacionados. Los resultados que obtuvimos nos permiten concluir que el grupo araquidonoil es probablemente determinante para la toxicidad celular observada con estos compuestos.

Otros factores que hemos abordado en el estudio son: como afecta el tratamiento con los diferentes compuestos a la morfología celular, si se podían estar produciendo fenómenos de apoptosis o si la densidad celular utilizada en el estudio puede modificar la potencia del efecto observado.

Como resultado de estos estudios podemos concluir que existe una clara dependencia del efecto de los compuestos en relación a la densidad utilizada, así como en el caso del compuesto UCM707, también en

relación al tiempo de exposición. Además observamos una morfología celular que se corresponde con la presencia de fenómenos apoptóticos. Al realizar un estudio con citometría de flujo, todos los compuestos analizados inducían apoptosis, pero al mismo nivel que la AEA (utilizada como control positivo) (Maccarrone et al., 2000). Esto, junto a que estudios preliminares llevados a cabo con peróxido de hidrógeno sugieren que el efecto observado es más bien modesto, parece indicar que este mecanismo no sea el principal responsable de los efectos tóxicos observados.

Por último, hemos querido realizar un estudio detallado de las diferentes rutas metabólicas que podrían estar implicadas en los efectos descritos. Para ello, hemos utilizado inhibidores de la enzima de degradación FAAH, inhibidores de la COX, LOX, antagonistas de los diferentes receptores (CB1, CB2 y TRPV1), así como antioxidantes. El único efecto claro en este caso fue producido por el uso de antioxidantes, en concreto del antioxidante N-Acetil-L-cisteína.

Este compuesto ha sido descrito como un antioxidante no específico con efecto protector en las células C6 frente a peroxidación inducida por glutamato, depleción de glutatión y citotoxicidad (Han et al., 1997). Por lo tanto, parece que el mecanismo de toxicidad celular se puede explicar, al menos en parte, como consecuencia de un estrés oxidativo.

El reciente descubrimiento de que el paracetamol es metabolizado a AM404 *in vivo* (Högstätt et al., 2005) significa que las acciones tóxicas del AM404 pueden tener relevancia clínica ya que, al menos en teoría, podría contribuir a la toxicidad del paracetamol cuando se administra a dosis

elevadas. En este caso el uso de acetilcisteína para incrementar los niveles de glutatión y así disminuir los efectos negativos de los derivados del paracetamol podría proteger también de los efectos tóxicos del AM404.

Por lo tanto, a la hora de utilizar estos compuestos, debe tenerse en cuenta, las propiedades tóxicas descritas en esta línea celular.

Beltramo M., Stella N., Calignano A., Lin S. Y., Makriyannis A., Piomelli D. (1997) *Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition*. Science 277, 1094-1097.

De Petrocellis L., Bisogno T., Davis J.B., Pertwee R.G., Di Marzo, V. (2000). *Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity*. FEBS Lett. 483, 52-56.

Han D., Sen C.K., Roy S., Kobayashi M.S., Tritschler H.J., Packer L. (1997) *Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 273, 1771-1778.

Högstätt E.D., Jönsson B.A.G., Ermund A., Andersson D.A., Björk H., Alexander J.P., Cravatt B.F., Basbaum A.I., Zygmunt P.M. (2005). *Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acyl-phenolamine AM404*

via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. J.Biol.Chem. 280, 31 405-31 412.

Jonsson K. O., Andersson A., Jacobsson S.O.P., Vandervoort S., Lambert D.M., Fowler C.J. (2003) *AM404 and VDM11 nonspecifically inhibit C6 glioma cell proliferation at concentrations used to block the cellular accumulation of the endocannabinoid anandamide*. Arch. Toxicol. 77, 201-207.

López-Rodríguez M. L., Viso A., Ortega-Gutiérrez S., Fowler C.J., Tigre G., de Lago., Fernández-Ruiz J., Ramos J.A. (2003). *Design, síntesis and biological evaluation of new endocannabinoid transporter inhibitors: comparison with effects upon fatty acid amidohydrolase*. J.Med.Chem. 46, 1512-1522.

Macarrone M., Lorenzon T., Bari M., Melino G., Finazzi-Agró A. (2000) *Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors*. J.Biol.Chem. 275, 31 938-31 945.

Ortar G., Ligresti A., De Petrocellis L., Morera E., Di Marzo, V. (2003) *Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake*. Biochem.Pharmacol. 65, 1473-1481

Eva de Lago

Regulación de la vía PI3K/Akt/GSK-3 mediante administración aguda y crónica de Δ^9 -THC en ratón

Los receptores cannabinoides pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana, acoplados a

proteínas Gi/Go. La mayoría de los mecanismos de señalización que se activan en respuesta a su estimulación por

agonistas se han caracterizado en modelos *in vitro*. Sin embargo, las vías de señalización intracelulares moduladas por cannabinoides *in vivo* no se han estudiado en profundidad. Algunas de las respuestas celulares desencadenadas tras la activación de receptores cannabinoides incluyen la inhibición de la adenilato ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos, la modulación de la vía de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs) y la vía de la quinasa de fosfatidilinositol-3/Akt (PI3K/Akt) (Guzmán y cols, 2002). Diversos estudios indican que los cannabinoides pueden actuar como agentes neuroprotectores. Algunos de estos estudios atribuyen los efectos neuroprotectores a la activación de la vía de supervivencia celular PI3K/Akt en daños tales como la apoptosis inducida por ceramida (Gómez del Pulgar y cols., 2002), la privación de suero (Molina-Holgado y cols., 2002) o la excitotoxicidad (Molina-Holgado y cols., 2005). La activación de Akt, también conocida como PKB, requiere su migración del citoplasma a la membrana, donde es fosforilada secuencialmente en dos residuos (Thr 308 y Ser 473). Una vez activada, Akt promueve supervivencia celular inhibiendo la apoptosis a través de la fosforilación e inactivación de diversas dianas pro-apoptóticas tales como Bad, procaspasa 9, Foxo1 y GSK-3. La quinasa GSK-3 es activa en su estado defosforilado y se ha descrito su mediación en procesos de apoptosis en respuesta a una gran variedad de condiciones (Jope & Johnson, 2004). Además, GSK-3 juega un papel crucial en la enfermedad de Alzheimer, que neuropatológicamente se caracteriza por (i) la presencia de depósitos del péptido β -amiloide y (ii) la formación de ovillos neurofibrilares, debido a la hiperfosforilación de una proteína asociada a microtúbulos denominada tau. Diversos

estudios indican que la actividad de GSK-3 es necesaria para la producción del péptido β -amiloide y además contribuye a la hiperfosforilación de tau. Dada la relevancia de la actividad de GSK-3 en ésta y otras neuropatologías, existe un gran interés en la búsqueda de inhibidores selectivos con utilidad terapéutica.

Los objetivos de nuestra investigación fueron (i) estudiar los efectos de la administración aguda y crónica de THC en la vía PI3K/Akt/GSK-3 en cerebro de ratón y (ii) estudiar la relación de esta vía con otras vías de señalización moduladas también por cannabinoides.

Para ello administramos THC (10 mg/Kg) o vehículo intraperitonealmente (i.p.) en ratones machos CD1, que fueron sacrificados 30 min después, y estudiamos mediante inmunoblots los niveles de fosforilación de Akt (p-Akt) en cuatro áreas cerebrales que expresan alta densidad de receptores cannabinoides CB₁ (hipocampo, cerebelo, estriado y corteza frontal). Después de normalizar los niveles detectados de p-Akt (Ser 473) con la cantidad total de Akt de cada muestra y compararlos con el grupo control (tratado con vehículo durante el mismo tiempo), observamos que la administración aguda de THC aumenta de modo significativo los niveles de p-Akt en hipocampo, cerebelo y estriado, mientras que en corteza hay un ligero incremento no significativo. Estudiamos indirectamente la actividad de Akt midiendo los niveles de fosforilación de su diana GSK-3 β (Ser 9). Comparando los ratones que habían recibido THC con los que recibieron vehículo observamos un patrón de fosforilación similar al obtenido con p-Akt, excepto que en corteza el incremento de p-GSK-3 β era mayor y estadísticamente significativo.

Estudios de inmunohistoquímica revelaron que el incremento de p-Akt producido por THC en hipocampo tiene lugar mayoritariamente en el giro dentado, el hilus y la región CA3, mientras que en CA1 no se apreciaban cambios entre animales tratados con THC o vehículo. Además la morfología de las células marcadas sugiere que los efectos observados tienen lugar en neuronas, aunque se requieren estudios de marcaje doble con marcadores específicos para caracterizar con mayor detalle si el efecto es neuronal y/o glial.

A continuación, centrándonos en el hipocampo, analizamos si el efecto del THC en la fosforilación de Akt y GSK-3 β era dependiente de dosis. Para ello, diferentes grupos de ratones recibieron las siguientes dosis de THC: 0.3, 1, 10 y 20 mg/Kg o vehículo. Los inmunoblots mostraron un incremento de p-Akt dependiente de dosis, desde 0.3 mg/Kg hasta alcanzar niveles máximos a 10 mg/Kg. Los niveles de p-GSK-3 β siguieron una dependencia de dosis parecida a p-Akt, con un incremento significativo a 1 mg/Kg, alcanzando el pico máximo a 10 mg/Kg.

Para evaluar la contribución de los receptores CB1 en la activación de la quinasa Akt por THC, pre-tratamos los ratones con el antagonista de CB1 rimonabant (3 mg/Kg, i.p.) o el vehículo correspondiente 30 min antes de la administración de THC (10 mg/Kg, i.p.). Los ratones se sacrificaron 30 min después de la inyección del agonista cannabinoide y por inmunoblot se analizaron los niveles de p-Akt y p-GSK-3 β referido a los niveles totales respectivos en las cuatro áreas cerebrales. El incremento de ambas fosforilaciones inducido por THC fue abolido completamente por el pre-tratamiento con rimonabant, demostrando

así la implicación de CB1 en la modulación de esta vía y descartando cualquier otro mecanismo inespecífico.

Seguidamente estudiamos si el incremento de p-Akt promovido por la activación de CB₁ se produce mediante la acción de la PI3K. Para ello se implantó una cánula en el ventrículo lateral y se dejó a los ratones 4 días de recuperación postoperatoria. A continuación, se les inyectó intracerebroventricularmente wortmannina (1nmol), un inhibidor irreversible de la PI3K, o el correspondiente vehículo 1 hora antes de la administración de THC. Los animales se sacrificaron 30 min después de la administración de THC y se analizaron los niveles de p-Akt y p-GSK-3 β en hipocampo. La wortmannina bloqueó el aumento de p-Akt inducido por THC, indicando que la fosforilación de Akt se produce a través de PI3K. De forma interesante, la fosforilación de GSK-3 disminuyó ligeramente, sugiriendo la participación de otra quinasa además de Akt.

Debido a que los cannabinoides pueden activar diversas MAPKs tales como la vía MEK/ERK (Derkinderen y cols., 2003) y que se ha observado que esta vía puede modular la actividad de Akt y/o GSK-3 β , nos preguntamos si la modulación de PI3K/Akt/GSK-3 por THC estaba mediada por la acción de la vía MEK/ERK. Para ello, pre-tratamos a los ratones con SL327 (50 mg/Kg, i.p.), un inhibidor de MEK, o vehículo 30 min antes de la administración de THC. Las áreas hipocampales fueron procesadas para inmunoblot y observamos que el incremento en los niveles de p-Akt y p-GSK-3 β producido por THC se mantenía en aquellos ratones que habían recibido previamente SL327, a pesar de que hubiera una marcada reducción de los niveles de

fosforilación de ERK1/2, indicando que la modulación de p-Akt y p-GSK-3 β por THC es independiente de la vía de las MAPKs.

Finalmente, con objeto de evaluar la posible tolerancia farmacológica a los efectos agudos del THC sobre la vía de señalización PI3K/Akt/GSK-3, realizamos un tratamiento crónico con THC (20 mg/Kg, i.p. cada 12h durante 5 días) o vehículo. Se comprobó, como control de la efectividad del tratamiento, el desarrollo de tolerancia al efecto hipotérmico inducido por THC, coincidiendo éste con lo ya descrito por otros autores (Hutcheson y cols., 1998). El análisis de las muestras de hipocampo reveló que la fosforilación de Akt sigue respondiendo igualmente a la administración de THC, aun después de un tratamiento crónico. Por otro lado, la fosforilación de GSK-3 β tras la administración crónica de THC disminuye de modo parcial. Todo ello sugiere que GSK-3 podría ser fosforilada por otra quinasa además de por Akt. Una posible candidata sería PKC, ya que por un lado se sabe que diferentes isoformas de PKC pueden fosforilar GSK-3 y por otro lado se ha descrito que el THC incrementa la actividad de PKC (Hillard & Auchampach, 1994; E. Puighermanal, R. Maldonado y A. Ozaita, resultados sin publicar). No obstante, se requiere una investigación más amplia para caracterizar la inactivación de GSK-3 inducida por THC.

En resumen, la administración aguda de THC activa la vía de supervivencia celular PI3K/Akt e inhibe la quinasa pro-apoptótica GSK-3 β en hipocampo, cerebelo, estriado y corteza frontal de ratón. Este efecto es dosis-dependiente, está mediado por CB1 y es independiente de la vía de la MAPK-ERK. Un tratamiento crónico de THC no produce tolerancia al incremento de

fosforilación de Akt pero sí tolerancia parcial a los efectos observados sobre GSK-3 β . Todos estos eventos descritos *in vivo* podrían explicar parte de los efectos neuroprotectores que se atribuyen a los cannabinoides.

Guzman M, Sanchez C, Galve-Roperh I. (2002) Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther.* **95**,175-84. Review.

Gomez Del Pulgar T, De Ceballos ML, Guzman M, Velasco G. (2002) Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem.* **277**,36527-33.

Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. (2002) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci.* **22**,9742-53.

Molina-Holgado F, Pinteaux E, Heenan L, Moore JD, Rothwell NJ, Gibson RM. (2005) Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Mol Cell Neurosci.* **28**,189-94.

Jope RS, Johnson GV. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* **29**,95-102.

Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslin H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA. (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci.* **23**,2371-82.

Hutcheson DM, Tzavara ET, Smadja C, Valjent E, Roques BP, Hanoune J, Maldonado R. (1998) Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol.* **125**,1567-77.

Hillard CJ, Auchampach A. (1994) In vitro activation of brain protein kinase C by the cannabinoids. *Biochim Biophys Acta.* **1220**,163-70.

Emma Puighermanal

5. Agenda

CONGRESOS SOBRE CANNABINOIDES

3rd European Workshop on Cannabinoid Research. Nottingham, Inglaterra, 20-21 de abril de 2007. Más información en <http://www.bps.ac.uk/meetings>

CB2 Cannabinoid Receptors: New Vistas. Banff Centre, Alberta, Canada, 31 de mayo-3 de junio de 2007. Organizadores: Marnie Duncan, Ken Mackie, Ruth Ross, Keith Sharkey y Betty Yao. Más información en www.ucalgary.ca/~cb2

17th Annual Symposium on the Cannabinoids. ICRS, St-Sauveur, Québec (Canadá), 26 de junio-1 de julio de 2007. Más información en www.cannabinoidsociety.org

2nd Gordon Research Conference on Cannabinoid Function in the CNS. Les Diablerets (Suiza), 30 de septiembre-5 de octubre de 2007. Organizadores: Manuel Guzmán, Olivier Manzoni y Giovanni Marsicano. Vice Chair: Daniele Piomelli. Más información en www.grc.uri.edu/programs/2007/cannab.htm.

Programa preliminar que aparecerá en uno de los números venideros de la revista *Science* y que incluye las ocho sesiones plenarias junto con sus moderadores (en cursiva) y algo más de la mitad de los conferenciantes:

- **Opening Plenary Lecture: "Cannabinoids: Quo Vadimus"** (Raphael Mechoulam)
- **Endocannabinoid Signaling in the CNS** (*Ken Mackie / Vincenzo Di Marzo / Ben Cravatt / Daniele Piomelli*)
- **Endocannabinoids and Neuronal Circuitry: Pain** (*Andrea Hohmann / T. Philip Malan Jr. / MacDonald J. Christie*)
- **Endocannabinoids and Neuronal Circuitry: Learning and Plasticity** (*Pablo E. Castillo / David Robbe / Carsten Wotjak*)
- **Endocannabinoids and Neuronal Circuitry: Reward** (*Rafael Maldonado / Taco J. de Vries / Emmanuel Valjent*)
- **Endocannabinoids: Neuroinflammation and Signaling in Glial Cells** (*Nephi Stella / David Baker / Carmen Guaza*)
- **Endocannabinoids and Neural Development** (*David A. Greenberg / Tibor Harkany / Ismael Galve-Roperh*)
- **New Tools in Cannabinoid Research** (*Beat Lutz / Mauro Maccarrone / Joseph P.Y. Kao*)

- **Endocannabinoids in Central and Peripheral Metabolic Regulation** (*Gérard Le Fur / George Kunos / Uberto Pagotto*)
- **Closing Plenary Lecture** (*George F. Koob*)

OTROS CONGRESOS

2nd Iberoamerican Congress on Neuroimmunomodulation. Madrid, 19-22 de abril de 2007
 Simposio "Cannabinoids and opioids in brain-immune interactions". Organizadores: Carmen Guaza y Manuel Guzmán. Conferenciantes: Mario Mellado, Francisco Molina-Holgado, María López de Ceballos, Julián Romero y Ana Franchi. El simposio se celebrará el día 22 de abril para no solapar con el 3rd European Workshop on Cannabinoid Research (ver arriba). Más información en www.neuroimmunomadrid2007.com

17th Meeting of the European Society for Neurochemistry. Salamanca, 19-22 de mayo de 2007. Simposio "Role of the endocannabinoid system in neurogenesis and neurorepair". Organizador: Manuel Guzmán. Conferenciantes: David Greenberg, Ismael Galve-Roperh y Tibor Harkany. Más información en www.neurochemsoc.eu

21st Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry-American Society for Neurochemistry. Cancún (Méjico), 19-24 de agosto de 2007. Simposio "Role of the endocannabinoid system in neural development". Organizadores: Manuel Guzmán y Tibor Harkany. Conferenciantes: Patrick Doherty, Javier Fernández-Ruiz, Ismael Galve-Roperh y Tibor Harkany. Más información en www.isn-asn2007cancun.org.mx

6. Últimas publicaciones sobre cannabinoides de grupos españoles (según datos extraídos de *PubMed*)

Rodriguez-Martin I, de Velasco EM, Rodriguez RE. Characterization of cannabinoid-binding sites in zebrafish brain. *Neurosci Lett.* 2006 Dec 16

Guxens M, Nebot M, Ariza C. Age and sex differences in factors associated with the onset of cannabis use: a cohort study. *Drug Alcohol Depend.* 2006 Dec 9

Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Nov 30

Marco EM, Granstrem O, Moreno E, Llorente R, Adriani W, Laviola G, Viveros MP. Subchronic nicotine exposure in adolescence induces long-term effects on hippocampal and striatal cannabinoid-CB1 and mu-opioid receptors in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006 Nov 14

Lastres-Becker I, Fernández-Ruiz J. An overview of Parkinson's disease and the cannabinoid system and possible benefits of cannabinoid-based treatments. *Curr Med Chem.* 2006;13(30):3705-18.

Mendiguren A, Pineda J. CB1 cannabinoid receptors inhibit the glutamatergic component of KCl-evoked excitation of locus coeruleus neurons in rat brain slices. *Neuropharmacology.* 2006 Oct 26

Moranta D, Esteban S, Garcia-Sevilla JA. Acute, chronic and withdrawal effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on the sequential activation of MAPK/Raf-MEK-ERK signaling in the rat cerebral frontal cortex: Short-term regulation by intrinsic and extrinsic pathways. *J Neurosci Res.* 2006 Nov 30

Mestre L, Correa F, Docagne F, Clemente D, Ortega-Gutierrez S, Arevalo-Martin A, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C. Cannabinoid system and neuroinflammation:therapeutic perspectives in multiple sclerosis. *Rev Neurol.* 2006 Nov 1-15;43(9):541-8.

Blazquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernandez-Luna JL, Velasco G, Malumbres M, Guzman M. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J.* 2006 Dec;20(14):2633-5.

Lopez-Moreno JA, Gonzalez-Cuevas G, Navarro M. The CB1 cannabinoid receptor antagonist rimonabant chronically prevents the nicotine-induced relapse to alcohol. *Neurobiol Dis.* 2006 Oct 23

Oliva JM, Manzanares J. Gene Transcription Alterations Associated with Decrease of Ethanol Intake Induced by Naltrexone in the Brain of Wistar Rats. *Neuropsychopharmacology.* 2006 Oct 25

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 Nov;20(13):2405-7.

Rodriguez-Martin I, Herrero-Turrion MJ, Marron Fdez de Velasco E, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE. Characterization of two duplicate zebrafish Cb2-like cannabinoid receptors. *Gene.* 2006 Oct 5

Composición de la Junta Directiva de la SEIC

<u>Presidente:</u>	José Antonio Ramos (Universidad Complutense)
<u>Vicepresidente:</u>	Rafael Maldonado (Universidad Pompeu i Fabra)
<u>Tesorero:</u>	Julián Romero (Fundación Hospital Alcorcón)
<u>Vocales:</u>	Carmen Guaza (Instituto Cajal, CSIC)
	Manuel Guzmán (Universidad Complutense)
	Emilio Fernández Espejo (Universidad de Sevilla)
	Eduardo Molina-Holgado (Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo)
	Eduardo Muñoz (Universidad de Córdoba)
<u>Secretario:</u>	Javier Fernández Ruiz (Universidad Complutense)

Dirección de contacto de la SEIC

Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC)
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
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>