



Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides

Boletín electrónico (marzo/junio 2009; nº 23)

Contenido:

1. Saludo del Presidente
2. Artículo de Javier Fernández-Ruiz: "Un análisis socio-sentimental de la evolución de la productividad científica en la investigación sobre cannabinoides en España"
3. Premio de la 9ª Reunión Anual de la SEIC, Córdoba, 2008: "Efecto antitumoral de los cannabinoides en un modelo genético de cáncer de mama" (María Muñoz-Caffarel)
4. Premio de la 9ª Reunión Anual de la SEIC, Córdoba, 2008: "La activación del receptor de cannabinoides CB₂ en células microgliales ejerce un efecto neuroprotector en modelos animales de la enfermedad de Huntington" (Javier Palazuelos)
5. Agenda
6. Últimas publicaciones sobre cannabinoides de investigadores españoles

1. Saludo del Presidente

Me toca de nuevo escribir el saludo de presentación de este nuevo boletín, en el que como siempre vais a encontrar muchas y útiles noticias y comentarios, así que me he puesto a darle vueltas a las novedades de las que tendría que hablaros. Lo cierto es que el saludo que escribí para el último boletín está todavía relativamente reciente y no hay muchas nuevas cosas que comentar, más allá de resaltar los éxitos y parabienes de la pasada Reunión Europea y de pronosticar que vamos a ser fenomenalmente acogidos en Santander en Noviembre por Ángel Pazos y su gente, y que vamos a disfrutar de mucha y buena ciencia al lado de la playa de El Sardinero. Estrujándome la cabeza para encontrar más cosas que comentaros me he acordado de una antigua historia que quería haber escrito hace ya al menos un par de años y que se había quedado ahí olvidada en el cajón de las cosas pendientes. Fue una idea que se me ocurrió allá por los primeros meses del 2007 cuando estaba preparando el ejercicio para el concurso local a Catedrático al que me presenté por aquel tiempo. Quise acabar ese ejercicio con una brevísima reflexión sobre la evolución de la productividad científica en el campo de la investigación en cannabinoides en España y en el Mundo, reflexión con la que quería poner de manifiesto como se ha producido en ambos casos un incremento casi exponencial que habla a favor de la importancia, de la vigencia y de la fortaleza de este tipo de estudios. A cuenta de aquella breve reflexión pensé en profundizar un poco más en el tema e intentar hacer una especie de pseudo-estudio sociológico de esa evolución que podría dejar plasmado en un artículo para el boletín de la SEIC, para el que creo que éste puede ser un buen momento, así que he recuperado aquellas notas y me he puesto manos a la obra. Finalizo aquí este breve saludo para continuarlo con el artículo que recoge esa reflexión que *a priori* pretende ser "sociológica", pero que, dado que está hecha por alguien que no sabe mucho de sociología, creo que lo que realmente ha salido se puede más bien calificar de una mezcla de divertimento, sentimentalismo o ganas de sacarle cierta punta al tema. Leerlo sin

demasiada esperanza de encontrar un sesudo estudio sociológico, tan solo como lectura fácil, y espero que entretenida, o al menos curiosa, para estos días calurosos de verano. Por supuesto, que os pido disculpas si creéis que puede faltarle el necesario rigor a la hora de la interpretación de los datos, ya os digo que el objetivo no ha sido producir algo muy elaborado y pensado, sino tan solo reflexionar sobre hechos en los que muchos de nosotros hemos sido actores y también espectadores en primera fila. Espero que os guste y os anime a seguir sacándole punta al tema...

2. Un análisis socio-sentimental de la evolución de la productividad científica en la investigación sobre cannabinoides en España (Javier Fernández Ruiz)

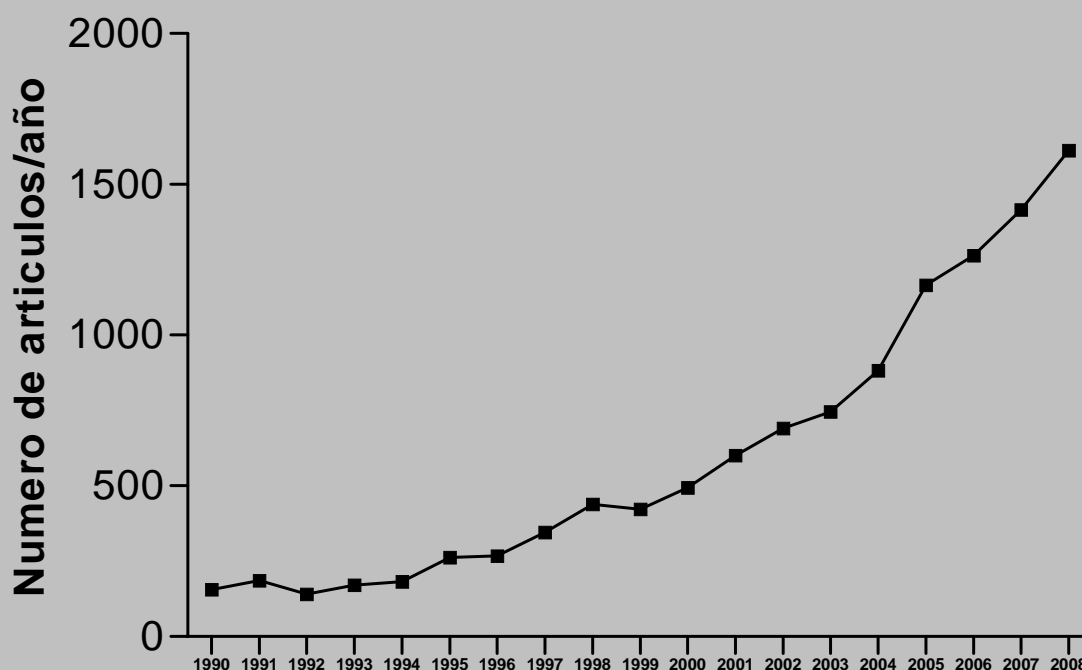
Nadie duda ahora mismo que la investigación en cannabinoides ha experimentado un importante auge en las dos últimas décadas, lo que coincide más o menos con el periodo en el que se describe el sistema de señalización cannabinoide y se sientan las bases para entender su fisiología y especialmente su fisiopatología. Este auge se puede demostrar a nivel mundial y también a nivel de España simplemente recurriendo a buscar en el PubMed las publicaciones en cada uno de los años de esas dos últimas

décadas, utilizando las dos siguientes combinaciones de palabras:

- `cannab* [all fields] + año [publication date]`, para la productividad a nivel mundial, y
- `lo mismo + Spain [affiliation]`, para la productividad nacional.

Estos son los datos que se obtienen a nivel de la productividad científica general en el campo de los cannabinoides:

Evolución de las publicaciones sobre cannabinoides entre 1990-2008



En esta gráfica a nivel mundial se puede ver claramente como la productividad se ha multiplicado por 10 (desde 156 en 1990 hasta 1613 en 2008) en estas casi dos décadas, especialmente en el segundo tramo de este periodo donde la productividad se ha multiplicado casi por 4 (desde 423 en 1999 hasta 1613 en 2008) frente al primer tramo en el que el incremento solo se multiplicó por poco menos de 3. Desde mi punto de vista, estos incrementos son atribuibles a la publicación de importantes avances ocurridos durante estos años, primero desde un punto de vista básico: identificación de nuevos elementos del sistema cannabinoide (nuevos receptores y/o enzimas, nuevos genes, nuevas vías de señalización), descripción de nuevas funciones en el

SNC o fuera del SNC, etc; pero también desde una perspectiva más aplicada: nuevas enfermedades en las que los cannabinoides pueden ser de utilidad. También tiene un peso importante el desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de este sistema: nuevos agonistas y antagonistas con selectividad por los diferentes tipos de receptores, inhibidores del transportador o de las enzimas de degradación, anticuerpos, animales modificados genéticamente, etc.

Algo parecido ha ocurrido en España con la lógica diferencia en los valores absolutos. En el caso nacional, aparte de las mismas anteriores razones, habría que considerar otros hechos como la aparición de nuevos grupos de investigación en este área que surgen,

bien de la segregación de investigadores formados en los grupos veteranos en el campo, o bien por la llegada al área de investigadores de otros campos cercanos. Esto, a mi juicio, explica los incrementos que se observan en la gráfica que resume la evolución en el caso de España, y que ocurren especialmente entre los años:

- 1994-1995: aparece como grupo independiente el formado por Miguel Navarro y Fernando Rodríguez de Fonseca, quienes hasta ese momento estaban vinculados al grupo de José Antonio Ramos
- 1996-1998: se dispara la productividad de los grupos de Manuel Guzmán y de Carmen Guaza quienes habían empezado en el área poco antes, y llegan al área los grupos de Rafael Maldonado y de Emilio Ambrosio
- 2001-2002: aparece como grupo nuevo el de Julián Romero,

también vinculado hasta entonces al grupo de José Antonio Ramos, y llegan al área los grupos de Ángel Pazos y Javier Meana, Inés Díaz-Laviada, Mariluz López Rodríguez y María de Ceballos

- 2003-2005: llegan al área los grupos de Pilar Goya, Maribel Martín, María Paz Viveros, Emilio Fernández Espejo, Eduardo Muñoz y Jesús García-Sevilla, así como la gente de Cataluña que empieza los ensayos con el Sativex (Dolors Capellá y Marta Durán) y varios grupos de la Universidad del País Vasco. También en estos años se producen las primeras publicaciones de los hermanos Molina-Holgado ya como grupos independientes del grupo de Carmen Guaza

A continuación se puede ver la gráfica donde se reflejan esos datos:

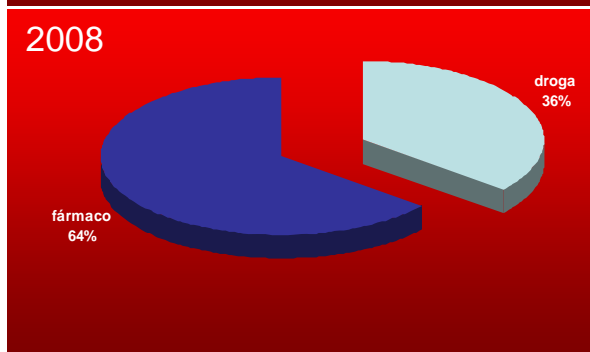
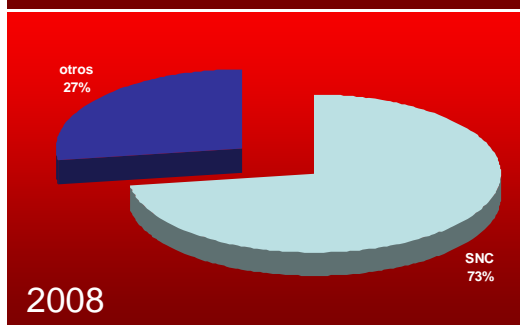
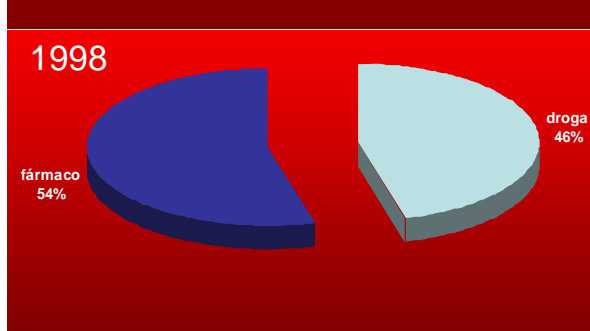
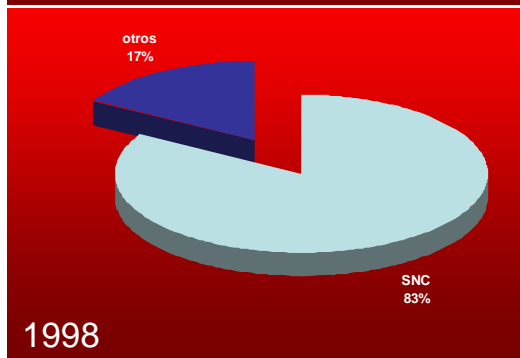
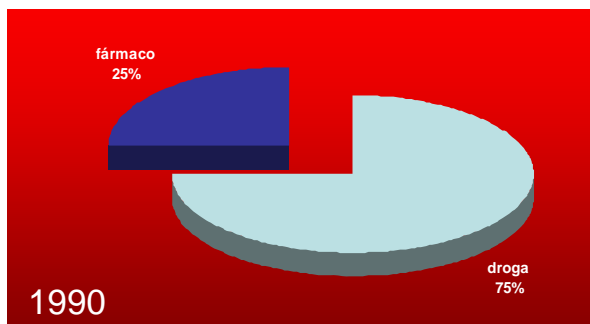
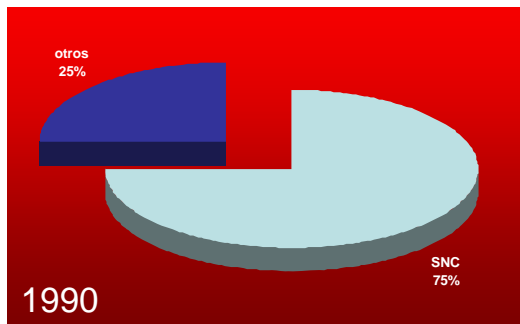


La comparación de la evolución de las publicaciones a nivel mundial y a nivel nacional indica que la productividad en cannabinoides en España viene a representar en términos de valor medio aproximadamente entre un 4-5% de la productividad mundial, aunque ha habido algunos años con valores más bajos (entre 1990 y 1992 era menor del 3%, mientras que ha habido un par de años que casi ha alcanzado el 6%, concretamente el 5.8% los años 2005 y 2007, y el 5.5% en 1998 que ha sido uno de los años utilizados para la parte más pormenorizada de este estudio que abordaremos más adelante). En el año pasado fue del 5.2% lo que significa que la proporción en la que los investigadores españoles han contribuido a la productividad mundial en esta área se ha multiplicado por 2 en casi 20 años, incrementado desde el 2.6% en 1990 hasta el 5.2% en 2008. Esto es en términos porcentuales, pero es importante que nos fijemos también en los valores absolutos. Por ejemplo, en el año 1990 (que ha sido el año a partir del cual se han empezado a recoger datos para este estudio) solo se publicaron en España 4 artículos incluidos en el PubMed. Consultando años anteriores solo aparecen 3 artículos más (descendiendo hasta 1960), por lo que se puede considerar que 1990 representa realmente el año en el que se inicia de forma ininterrumpida la contribución de los cannabinólogos españoles en esta área de investigación. Aunque este estudio intenta ser riguroso y basado en datos, no puedo dejar de lado algunos otros aspectos más subjetivos que me han llevado a titularlo como un estudio socio-sentimental. Entenderéis esto cuando os diga que el año 1990 es el año en que José Antonio Ramos liderando nuestro grupo publica el primer artículo sobre el tema. Fue en la revista *Developmental Brain Research* y

constituyó el primer artículo de la tesis de Fernando Rodríguez de Fonseca, dirigido por José Antonio y por este servidor. Entenderéis ahora lo de "sentimental", espero.

Cuatro fueron las publicaciones en 1990 (con solo 3 anteriores desde 1960, todas ellas clínicas y centradas en el carácter de los cannabinoides como drogas de abuso), por supuesto siempre con datos del PubMed, y como veréis en la gráfica, 24 fueron las de 1998 y 84 han sido las de 2008. Por medio, la evolución que tenéis en la gráfica, siempre picando hacia arriba. Estos dos años junto con 1990 han sido los tres años que he elegido para realizar un análisis más pormenorizado. Las razones para elegir esos tres años son obvias: 1990 y 2008 porque representan los límites inferior y superior del intervalo con el que se pretende demostrar que la investigación sobre cannabinoides en España ha experimentado un fuerte auge durante las dos últimas décadas, y el año 1998 porque representa un año intermedio en el que la productividad científica en España alcanzó un valor aceptable (5.5%) sobre la producción mundial. Vamos, pues, a ese análisis más pormenorizado.

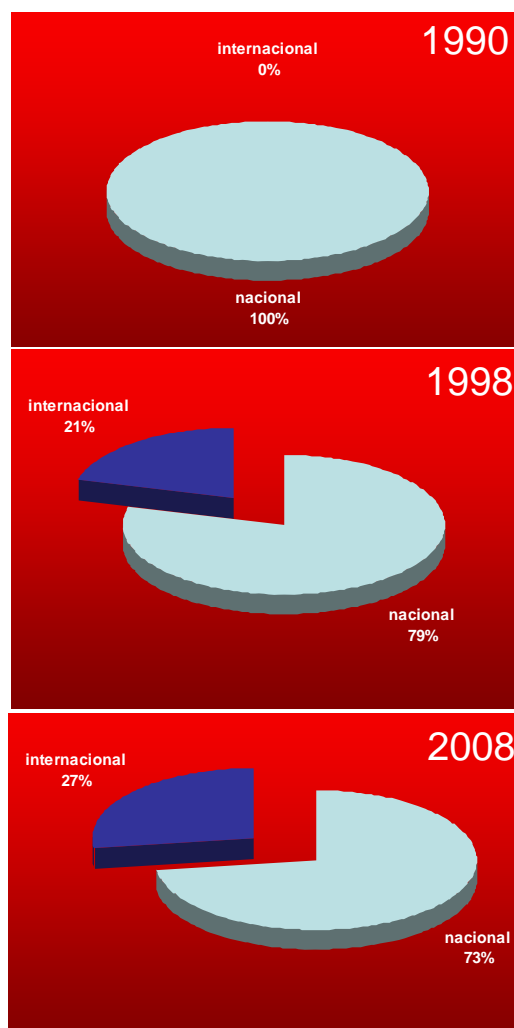
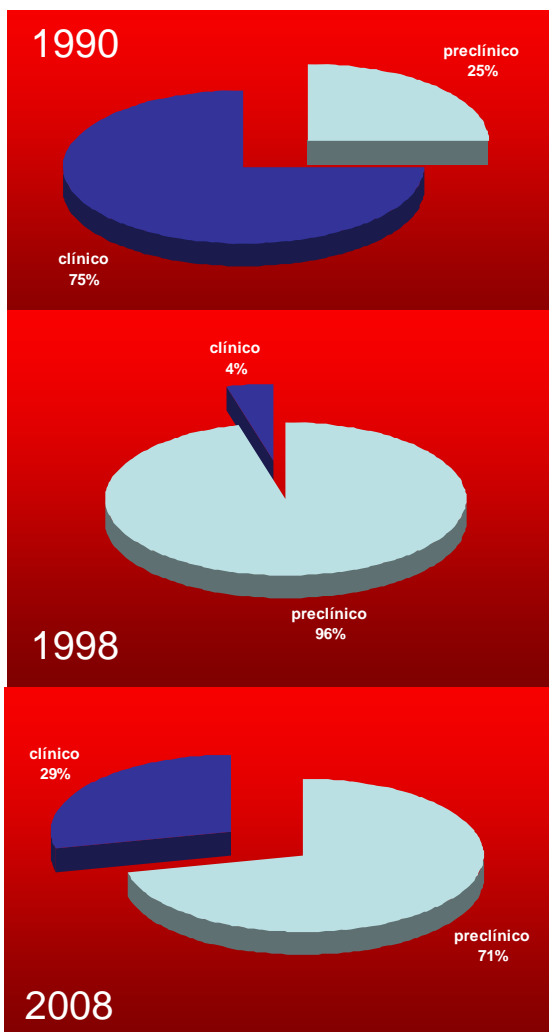
Por un lado, me he fijado en algunos aspectos que podríamos llamar "binarios" y que reflejan las características más primarias de los estudios publicados en el PubMed por investigadores españoles. Por ejemplo ¿Cuántos estudios se han hecho en el SNC y cuantos sobre otros sistemas? ¿Cuántos han considerado a los cannabinoides como un fármaco y cuantos como una droga? La respuesta a ambas preguntas se puede ver en los siguientes "quesitos":



La primera de las comparaciones, SNC-otros, se ha mantenido más o menos constante ya que, si 3 de cada 4 artículos publicados en 1990 se centraban en el SNC, algo parecido se puede ver con los datos en 2008, aunque sí que se aprecia un pequeño incremento en los estudios centrados en el SNC que se publicaron durante el año intermedio (1998). Respecto a la consideración de los cannabinoides como droga o como fármaco, aquí sí que se han producido evoluciones importantes, ya que si vemos los estudios que consideran a los cannabinoides como fármacos, pasamos de solo 1 de cada 4 trabajos en 1990 a aproximadamente un 50% en 1998 y a más de un 60% en 2008. Sacad vosotros mismos las conclusiones que consideréis pertinentes pero a mi juicio esto

claramente refleja el creciente interés por la medicalización de aquellas sustancias capaces de actuar sobre el sistema cannabinoide.

Hay otro par de preguntas interesantes que también permiten distribuir los estudios en dos partes bien diferenciadas. Por un lado, el carácter preclínico o clínico del estudio, por otro, si el estudio se realizó solo con investigadores nacionales o en que medida se colaboró con investigadores o grupos de otros países. Estos datos se recogen en los dos siguientes grupos de "quesitos":



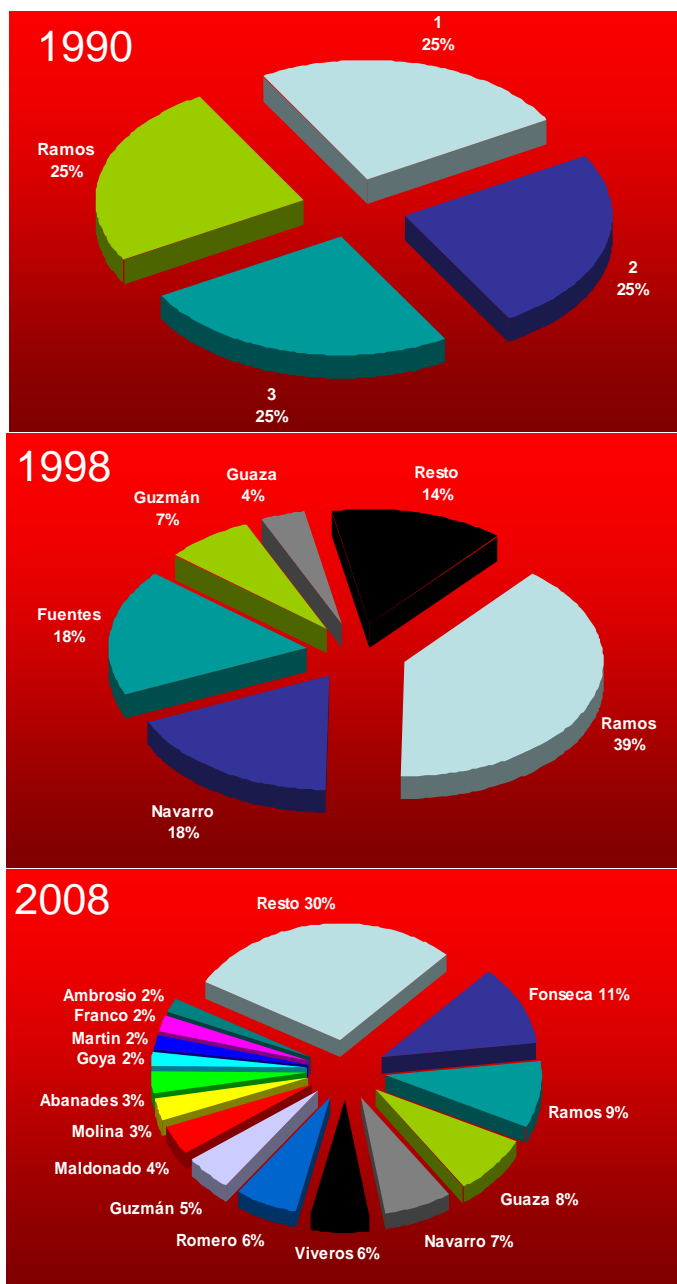
Parece claro que hay una clara inversión en el carácter clínico/preclínico de los estudios que se publican en el PubMed por grupos españoles durante el primer tramo de años estudiados, seguramente reproduciendo la misma tendencia a nivel mundial, es decir, pasamos de un único estudio preclínico de cada 4 en 1990 a más de un 95% en 1998. Este proceso claramente es paralelo al avance en la identificación del sistema de señalización cannabinoide, sobre todo al periodo donde se describen los aspectos más básicos de este sistema. Posteriormente, y en el segundo tramo estudiado, se puede observar una recuperación parcial de los estudios clínicos (alcanzan casi el 30% en 2008) que probablemente refleje el actual interés de progresar desde los estudios básicos, que siguen siendo la mayoría

(más del 70%), hacia una progresiva utilización clínica del sistema cannabinoide, por lo que, como conclusión adicional, podemos pensar en que en los estudios clínicos que se publican en 2008 hay una mayor predominancia de estudios que buscan una utilidad terapéutica de los cannabinoides para los pacientes, mientras que los estudios clínicos publicados en 1990 suelen estar centrados más en aspectos relacionados con los efectos de los cannabinoides como drogas de abuso.

El segundo aspecto que refleja la gráfica anterior tiene que ver con el progresivo incremento del grado de internacionalización de la investigación que han realizado los diferentes grupos en España. En 1990, ninguno de los estudios publicados incluía

investigadores o grupos extranjeros, pero este valor subió hasta más del 20% en 1998 para alcanzar un 27% en 2008. A mi juicio este hecho es muy significativo y sitúa a la ciencia que se hace aquí en esta área en una posición internacional relevante, por la importancia que tiene la colaboración a nivel internacional, en particular a nivel europeo en el reclutamiento de fondos de instituciones internacionales.

Y ya para acabar este estudio de la productividad en España en el campo de los cannabinoides, entraré a comentar algunos aspectos que tienen que ver con los diferentes grupos que han trabajado o trabajan actualmente en este campo de investigación. En la última serie de "quesitos" se recogen de nuevo los datos de los tres años seleccionados pero organizados ahora en función de los diferentes grupos que han contribuido a generarlos:



Esta es la parte en la que más ha aflorado la cuestión de la sentimentalidad que antes he mencionado, obviamente porque me siento afectado a nivel personal, siempre en el buen sentido, se entiende. Veamos: en 1990 solo se publican 4 artículos en España de los que uno corresponde al grupo de José Antonio Ramos, como ya he mencionado del que yo he formado parte desde el inicio de mi actividad investigadora, como muchos sabéis. Los otros 3 artículos son de grupos clínicos que luego no han tenido una continuidad y un peso en este campo. En 1998, sin embargo, aparte de que el número de publicaciones se incrementa globalmente (24), como ya se ha dicho, aparecen ya en escena grupos que han contribuido de forma notable a la productividad en esta área, por ejemplo, el grupo de Miguel Navarro y Fernando Rodríguez de Fonseca (casi el 20%), el de José Angel Fuentes y Jorge Manzanares (también cerca del 20%), y también el grupo de Manuel Guzmán y el de Carmen Guaza, mientras que el grupo de José Antonio Ramos contribuye con cerca del 40% de las publicaciones. En un 14% total se sitúan los datos de varios grupos que solo aportan un estudio publicado ese año. Si en 1998 la situación ya refleja una pluralidad en cuanto al número de grupos que trabajan en el campo en España, los datos de 2008 consolidan completamente esta tendencia con más de 35 grupos diferentes publicando en esta área en ese año. Destacan los datos del grupo de Fernando Rodríguez de Fonseca (ya separado del grupo de Miguel Navarro aunque comparten algunas publicaciones) con 11 artículos, el de José Antonio Ramos con 9, el de Carmen Guaza con 8, el de Miguel Navarro con 7, los de Julián Romero y María Paz Viveros, cada uno con 6 artículos, el de Manuel Guzmán con 5, el de Rafael Maldonado con 4, los de Eduardo Molina-Holgado y Sergio Abanades, cada uno con 3, y los de Pilar Goya, Maribel Martín-Fontelles, Emilio Ambrosio y Rafael Franco, cada uno con 2. Después hay hasta 5 grupos

más con 2 publicaciones y varios más con solo 1, entre los que se deben destacar los grupos andaluces de Emilio Fernández Espejo y el de Eduardo Muñoz. Obviamente, esta es una distribución de datos centrada exclusivamente en el número y en los trabajos que se recogen en el PubMed, pero que no tiene en cuenta el factor calidad (índice de impacto de las revistas) o el factor "difusibilidad" (número de citas), variables que quizás me anime a considerar para otro capítulo de esta historia. Quiero con esto último transmitir la idea de que no estamos valorando el potencial y la calidad de los grupos por el número de publicaciones que tienen al año, sino que hay otras variables que también tienen que ser consideradas, aunque imagino que esto está en el ánimo de todos. Otra excepción que también es oportuno mencionar tiene que ver la productividad de algunos grupos de investigadores clínicos, generalmente de psiquiatras, que trabajan en el campo de los cannabinoides y que están (o lo han estado) vinculados a la SEIC. Muchos de estos grupos utilizan vías para publicar su investigación que no están generalmente incluidas en el PubMed, por lo que puede ocurrir que los datos que se han analizado en este artículo puedan tener un cierto sesgo hacia los grupos más básicos, obviando algunos aspectos de los grupos más clínicos, especialmente en el campo de la Psiquiatría. Dicho queda para que los lectores de este artículo lo valoren también en su justa medida.

Bien, creo que aquí acaba este capítulo, es posible que pueda haber más y que, obviamente, no tengo porque ser yo quién los escriba, os animo a que cualquiera de vosotros se ponga a bucear más en estos datos y que nos dé una nueva visión, complementaria, o quizás diferente de estos datos y que ello contribuya al análisis que este artículo pretende hacer de los casi 20 años de investigación científica en el campo de los cannabinoides en España. Espero que lo que yo he aportado aquí sirva para iniciar ese análisis.

3. Premio de la 9ª Reunión Anual de la SEIC, Córdoba, 2008

EFFECTO ANTITUMORAL DE LOS CANNABINOIDES EN UN MODELO GENÉTICO DE CÁNCER DE MAMA

María Muñoz-Caffarel

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid

Está bien documentado que los cannabinoides ejercen efecto antiproliferativo en una gran variedad de células tumorales en cultivo y reducen la progresión tumoral en modelos de xenotrasplantes de células de carcinoma de pulmón, páncreas, mama y piel, así como de glioma, epiteloma de tiroides, linfoma y melanoma (Guzmán, 2003 y Alexander y cols., 2009). Sin embargo, estos modelos animales, aunque útiles, poseen una relevancia fisiológica limitada (Frese y Tuveson, 2007). Al basarse en la inoculación de una única línea celular tumoral obvian algunos aspectos cruciales de los tumores humanos como su gran heterogeneidad genética y celular, la interacción del tumor con otros órganos como el sistema inmune o el propio proceso de tumorigénesis.

Para avanzar en el conocimiento de la acción antitumoral de los cannabinoides nos planteamos la utilización de un modelo genético de cáncer, mucho más fisiológico que los xenotrasplantes empleados hasta la fecha. Para ello elegimos el modelo MMTV-neu, basado en la sobre-expresión del oncogén ErbB2 de rata (neu) selectivamente en la glándula mamaria, lo que hace que dichos animales generen espontáneamente tumores de mama

con un periodo de latencia de aproximadamente siete meses (Guy y cols., 1992). Por otro lado, el oncogén ErbB2 es importante porque está sobre-expresado en un tercio de las pacientes con cáncer de mama, lo que da lugar a un tipo de tumor agresivo y de mal pronóstico, para el que se precisan en la clínica nuevas terapias (Moasser, 2007), ya que sólo un tercio de estos tumores responden al tratamiento con el anticuerpo monoclonal trastuzumab que se emplea normalmente, muchas veces se genera resistencia al fármaco y las recidivas suelen ser letales. Otra razón por la que elegimos este modelo genético de cáncer es porque previamente habíamos descrito que el THC es más efectivo en las líneas tumorales de mama más agresivas (entre las que se encuentran las que sobre-expresan ErbB2) y que la expresión del receptor CB2 se correlaciona con la de dicho oncogén en tumores de mama humanos (Caffarel y cols., 2006), lo que nos hacía suponer que los cannabinoides podrían ser efectivos en los tumores de mama ErbB2 positivos.

Para evaluar el efecto de los cannabinoides sobre el crecimiento tumoral en el modelo animal MMTV-neu elegimos como agonistas de estudio 1) el THC, que había mostrado previamente efecto antiproliferativo en las células tumorales de mama en cultivo (Caffarel y cols. 2006), y 2) el agonista selectivo del receptor CB2 JWH-133. Datos previos indicaban que el efecto antiproliferativo de los cannabinoides en estas células estaba mediado, al menos en parte, por este receptor. Puesto que la activación selectiva de CB2 evitaría los efectos psicotrópicos asociados a los cannabinoides y debidos al receptor CB1 (Piomelli, 2003), nos propusimos

evaluar su implicación en el posible efecto antitumoral de dichos compuestos mediante la utilización de este agonista selectivo. La activación de CB2 ya había mostrado un potente efecto antitumoral en modelos animales de glioma, melanoma y carcinomas de páncreas y piel (Guzmán, 2003 y Alexander y cols., 2009). En nuestro modelo, más del 70% de los animales respondieron al tratamiento con cannabinoides (60% para THC y 83% para JWH-133). Esta respuesta consistió en una reducción muy significativa de la carga total tumoral debida fundamentalmente a i) la reducción de la tasa de crecimiento de los tumores, lo que se tradujo en tumores de menor tamaño y peso tras el periodo de tratamiento y ii) al bloqueo de la propia generación tumoral ya que las hembras tratadas con THC o con JWH desarrollaron menor número de tumores que las tratadas con vehículo. Así, mientras que los animales control llegaron a desarrollar hasta 6 tumores cada uno, en los grupos tratados gran parte de los animales generaba un solo tumor y en ningún caso se detectaron más de 3 tumores por animal.

Aunque todavía desconocemos el mecanismo por el que los cannabinoides pueden estar afectando al proceso de la tumorigénesis y disminuyendo así el número de tumores generados por animal, sí tenemos ciertas pistas de cómo dichos compuestos reducen la tasa de crecimiento tumoral. Hemos observado que el THC y el JWH-133 disminuyen la proliferación de las células tumorales y producen su muerte celular por apoptosis, parámetros determinados mediante tinción de Ki67 y de caspasa 3 activa, respectivamente.

Además, el tratamiento con cannabinoides afectó a otros parámetros de la progresión tumoral como la metástasis. En el modelo

MMTV-neu está descrito que un alto porcentaje de hembras con tumor (alrededor del 80%) desarrolla metástasis en pulmón. Hemos observado que dicho porcentaje se redujo significativamente en los animales tratados con THC. A pesar de que el JWH-133 no redujo la proporción de animales con metástasis sí fue capaz de disminuir la gravedad de la lesión ya que en dicho grupo experimental la mitad de las metástasis que se generaron fueron únicamente detectables por análisis microscópico mientras que en el grupo de animales control todas ellas eran macroscópicas. Otro parámetro muy importante para la progresión de un tumor es la angiogénesis. Hemos observado que, en nuestro modelo, los cannabinoides son también capaces de inhibir dicho proceso ya que en los tumores tratados con cannabinoides se redujo significativamente el número de vasos sanguíneos, determinado mediante tinción con un anticuerpo frente a CD31.

Actualmente, nos encontramos en el laboratorio finalizando algunos experimentos que nos permitan conocer el mecanismo molecular del efecto antitumoral de los cannabinoides en este modelo. La vía de señalización de ErbB2 es una vía que está frecuentemente desregulada en cáncer. La sobre-expresión de este oncogén confiere al tumor ciertas ventajas como una mayor proliferación, un elevado potencial metastático y un mayor grado histológico (Moasser, 2007). Por esta razón, quisimos ver si el tratamiento con cannabinoides estaba afectando sus niveles y observamos, mediante PCR cuantitativa, que no había cambios tras el tratamiento ni en los niveles de ErbB2 endógeno ni en los del ortólogo de rata neu, que está sobre-expresado en nuestro sistema. Una de las principales dianas de ErbB2 es la vía de señalización Pi3K-Akt, cuya importancia en cáncer ha sido ampliamente

demostrada. En nuestro modelo hemos comprobado, mediante Western Blot, que el tratamiento con THC inhibe la quinasa Akt. Hemos comenzado una serie de experimentos con distintas líneas celulares que sobre-expresan la forma activa de Akt, para estudiar la importancia de la vía Pi3K-Akt en el efecto antitumoral de los cannabinoides en tumores de mama ErbB2 positivos. Por el momento, hemos demostrado que las células que sobre-expresan la forma miristoilada de Akt (forma constitutivamente activa) son más resistentes al efecto antiproliferativo de los cannabinoides que sus correspondientes células control.

En resumen, los resultados obtenidos en el modelo genético de cáncer de mama MMTV-neu suponen una evidencia preclínica sólida que apoya la posible utilización de cannabinoides como agentes antitumorales. Además, nuestros datos indican, por primera vez, que estos compuestos podrían afectar no sólo a la progresión sino también a la propia generación del tumor, lo que haría mucho más atractiva la actividad antitumoral de los cannabinoides desde el punto de vista tanto biológico como terapéutico.

Bibliografía

Alexander, A., Smith, P.F., and Rosengren, R.J. 2009. Cannabinoids in the treatment of cancer, *Cancer Lett* doi:10.1016/j.canlet.2009.04.005

Caffarel, M.M., Sarrio, D., Palacios, J., Guzman, M., and Sanchez, C. 2006. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res* 66:6615-6621.

Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. 1992. Expression of the neu protooncogene in the mammary

epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10578-10582.

Guzman, M. 2003. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3:745-755.

Frese, K.K. and Tuveson, D.A. 2007. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7:645-658.

Moasser, M.M. 2007. Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene* 26:6577-6592.

Piomelli, D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.

4. Premio de la 9ª Reunión Anual de la SEIC, Córdoba, 2008

LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES CB₂ EN CÉLULAS MICROGLIALES EJERCE UN EFECTO NEUROPROTECTOR EN MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Javier Palazuelos

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid

La enfermedad de Huntington es una patología autosómica dominante debida a mutaciones en el gen de la Huntingtina lo cual conlleva a un proceso neurodegenerativo en el que se ve mayormente afectada la funcionalidad de las neuronas estriatales de carácter inhibitorio llamadas medium-sized spiny neurons - MSNs-. Distintos estudios han destacado la importancia de un temprano y progresivo estado neuroinflamatorio (Sapp et al., 2001; Bjorkqvist et al., 2008), en el que la regulación de la activación de células gliales (microglía y astrogía) podría contribuir a la muerte neuronal y la progresión de la patología (Block et al., 2007).

En los últimos años numerosos estudios han puesto de manifiesto que la alteración de alguno de los componentes del sistema endocannabinoide se relaciona con la etiopatología de diferentes enfermedades neurodegenerativas (Macarrone et al., 2007; Sagrado et al., 2007). En particular, en la enfermedad de Huntington, uno de los cambios neuroquímicos más tempranos que aparecen durante la progresión de la patología es una importante

disminución de los receptores de cannabinoides CB₁ en neuronas de los ganglios basales (Richfield and Herkenhan, 1994), lo cual sugiere que la deficiencia en CB₁ podría contribuir a la disfunción estriatal y al proceso neurodegenerativo característicos de esta patología. Este trabajo se ha centrado sobre el papel del otro principal receptor de cannabinoides CB₂ en la etiopatología de la enfermedad de Huntington, focalizándolo en el papel que ejerce este receptor sobre el control de la activación de células microgliales y su implicación en el proceso neurodegenerativo.

Para abordar este problema utilizamos un modelo de animales transgénicos R6/2 de la enfermedad de Huntington, generado mediante la inserción del exón 1 del gen de la huntingtina humana, con ~150 repeticiones del triplete CAG. La expresión de la forma mutada de la huntingtina induce un proceso neurodegenerativo, mayormente estriatal y por ello acompañado de problemas motores, similar al descrito en humanos. Con el fin de estudiar la implicación de CB₂ en este proceso, se analizó la expresión de este receptor durante la progresión de la patología en animales R6/2. El análisis por PCR cuantitativa junto con estudios por microscopía confocal evidenciaron, al contrario que el receptor CB₁, se produce un incremento en la expresión de CB₂ en células microgliales Iba-1⁺ en estriado de animales R6/2 en etapas presintomáticas y sintomáticas de la patología. De modo paralelo, se observó un incremento en la reactividad glial y el estado neuroinflamatorio. Con el objetivo de determinar si estas alteraciones ocurren también en pacientes afectados por la enfermedad, se analizó la expresión de CB₂ en el

caudado putamen de muestras post-mortem de pacientes e individuos sanos. De modo similar a las observaciones en animales R6/2, estudios por Western-blot mostraron una inducción en la expresión del receptor CB₂ en pacientes afectados por la enfermedad frente a individuos sanos. Además la expresión de este receptor parecía verse restringida a células del linaje microglial, estando ausente en células astrogiales.

Con el fin de estudiar el papel del aumento de los niveles de CB₂ en la progresión de la enfermedad, generamos animales R6/2 carentes del receptor CB₂, mediante el cruce de ratones R6/2 con ratones deficientes en CB₂. Estos animales fueron entrenados para realizar la prueba de coordinación motora Rotarod como una medida funcional de la neurodegeneración estriatal. La ablación genética del receptor CB₂ en animales R6/2 se tradujo en un empeoramiento en la capacidad de estos animales para realizar la prueba de Rotarod, con una aparición más rápida y severa de la sintomatología motora comparada con los ratones hermanos R6/2:CB₂^{+/+}. Asimismo, la ausencia de CB₂ redujo significativamente la supervivencia de los animales R6/2. El análisis por inmunofluorescencia de secciones de cerebro de estos animales a las 12 semanas de edad mostró un mayor estado de activación microglial y astrogial, además de niveles superiores de la enzima iNOS en los animales R6/2:CB₂^{-/-}. Además, este estado neuroinflamatorio exacerbado en ausencia del receptor CB₂ se relacionaba con unos niveles disminuidos del marcador presináptico neuronal sinaptofisina. Así durante la progresión de la enfermedad en los animales R6/2 se produce un aumento del estado de activación microglial en paralelo a un aumento de la expresión de CB₂, el cual parece controlar el estado de activación microglial y de

este modo ejercer un efecto neuroprotector frente a la disfunción estriatal.

En la enfermedad de Huntington, la pérdida de neuronas estriatales –MSNs– va acompañada de un proceso de excitotoxicidad, que a su vez contribuye al proceso neurodegenerativo. Para confirmar los resultados obtenidos en animales R6/2 y profundizar en el mecanismo de acción del efecto neuroprotector de CB₂ en la enfermedad de Huntington, usamos un modelo animal de excitotoxicidad, mediante la administración intra-estriatal de ácido quinolínico (QA), un agonista natural de los receptores de NMDA. Tras la inyección de QA se observó mediante PCR cuantitativa, un incremento en los niveles de mRNA de CB₂ en estriado. El análisis por microscopía confocal confirmó un aumento de CB₂, restringida su expresión, al igual que en animales R6/2 y pacientes afectados, a células microgliales. La inyección de QA en animales CB₂^{-/-} produjo un aumento en la frecuencia de aparición de espasmos (clonic-tonic seizures) reflejo de una mayor susceptibilidad a la excitotoxicidad. Estudios de análisis mediante imagen por resonancia magnética mostraron un incremento en el volumen de edema cerebral en animales carentes de CB₂. El estudio del proceso neuroinflamatorio mediante estudios de microscopía confocal de secciones estriatales, mostró un mayor estado de activación tanto microglial como astrogial en animales CB₂^{-/-}. El análisis del patrón de expresión génica mediante PCR cuantitativa tras la lesión estriatal, confirmaron esta respuesta glial exacerbada en animales CB₂^{-/-}, junto con niveles superiores de mRNA de marcadores inflamatorios como iNOS, IL6, IL1β y TNFα. La mayor susceptibilidad de los animales CB₂^{-/-} a la excitotoxicidad y su respuesta inflamatoria exacerbada, nos llevó a estudiar por inmunofluorescencia la

degeneración de neuronas estriatales - MSNs-, mediante la cuantificación del marcador DARPP32. Así los animales carentes del receptor CB₂ presentaron una mayor pérdida neuronal, lo que se correlacionaba con un empeoramiento en la coordinación motora en la prueba de Rotarod.

Con el fin de determinar si la mayor neurodegeneración observada en los animales CB₂^{-/-} era una consecuencia de la respuesta neuroinflamatoria, utilizamos el antiinflamatorio minociclina. Así al tratar a los animales con este compuesto antes de la administración con QA, vimos que se prevenía el fenotipo exacerbado observado en animales CB₂^{-/-}, al atenuarse la susceptibilidad a convulsiones, reducirse la activación microglial y prevenirse la exacerbada pérdida neuronal y problemas motores, restaurando estos parámetros a los observados en animales silvestres. Estos resultados indican que la mayor susceptibilidad a la neurodegeneración en ausencia del receptor CB₂ es debida a una respuesta inflamatoria exacerbada.

Dado que la pérdida de los receptores CB₂ conlleva una mayor severidad en la neurodegeneración característica de la EH, a continuación estudiamos el efecto de su activación farmacológica mediante la administración del agonista selectivo HU-308. De manera opuesta a lo observado en animales CB₂^{-/-}, la activación selectiva del receptor CB₂ tras la inyección con QA atenuó el edema cerebral determinado por MRI, la activación microglial observada en secciones de cerebro por inmunofluorescencia y reduciendo los niveles estriatales de expresión de moléculas pro-inflamatorias como iNOS, IL6, IL1β y TNFα. De modo similar a los estudios con minociclina, la atenuación del proceso inflamatorio se tradujo en una prevención de la pérdida de neuronas estriatales DARPP32, así

como de la disminución de los problemas motores.

Debido a que los resultados obtenidos apuntan que la neuroprotección ejercida por la administración del agonista selectivo de CB₂ está mediada por la regulación de la activación microglial, se realizaron nuevas aproximaciones experimentales para confirmar la diana celular de los receptores CB₂. Así estudiamos el efecto neuroprotector inducido por la activación de los receptores CB₂ en animales transgénicos GFAP-TK, ratones que expresan la enzima timidina quinasa bajo el control del promotor astroglial GFAP y que tras la administración del compuesto ganciclovir, permite la depleción selectiva de los astrocitos que entran en proliferación. Así vimos que la administración del agonista CB₂ era igualmente efectiva atenuando la inflamación y activación microglial así como reduciendo la pérdida de neuronas estriatales y problemas motores asociados, en presencia y ausencia de astrocitos proliferantes, excluyendo así la participación de células astrogliales y confirmando que la regulación de la activación microglial de los receptores CB₂ ejerce un efecto neuroprotector frente al daño estriatal por excitotoxicidad.

En resumen, los estudios realizados ponen de manifiesto la importante participación de los receptores CB₂ en la progresión de la enfermedad de Huntington, ejerciendo un control de la activación microglial y previniendo así la degeneración de neuronas estriatales. Debido a la temprana pérdida de los receptores CB₁ durante la progresión de la enfermedad, el uso de agonistas CB₂ carentes de efectos psicoactivos indeseados, se presenta como una atractiva alternativa para el tratamiento de esta patología, previniendo la neurodegeneración

estriatal mediante el control de la respuesta neuroinflamatoria.

Bibliografía

Bjorkqvist M et al. (2008) A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med* 205:1869-1877.

Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.

Maccarrone M, Battista N, Centonze D (2007) The endocannabinoid pathway in Huntington's disease: a comparison with other neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 81:349-379.

Richfield EK, Herkenham M (1994) Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann Neurol* 36:577-584.

Sagredo O, García-Arencibia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J (2007) Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol* 36:82-91.

Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, Tohyama K, Bhide PG, Vonsattel JP, DiFiglia M (2001) Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:161-172.

5. Agenda

Congresos sobre cannabinoides

19th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society
8-11 julio, 2009
St. Charles, Illinois (Estados Unidos)
Más información: <http://www.cannabinoidsociety.org>

3rd Gordon Research Conference on Cannabinoid Function in the CNS
2-7 agosto, 2009
Biddeford, Maine (Estados Unidos)
Más información: <http://www.grc.org>

IACM 5th Conference on Cannabinoids in Medicine
2-3 octubre, 2009
Colonia, Alemania

10ª Reunión Anual de la SEIC
26-28 noviembre, 2009
Santander
Más información: <http://www.ucm.es/info/seic-web>

Otros congresos de interés

4th European Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders
11-14 julio, 2009
Leipzig, Alemania

Más información: <http://esntagung.uniklinikum-leipzig.de>

Incluye el simposio "Endocannabinoid signaling in neuropsychiatric disorders: the rise of novel therapeutic targets"

- Pat Doherty. New insights into endocannabinoid signalling and function based on the expression of the DAG lipases
- Beat Lutz. Endocannabinoid control of epileptogenesis
- María de Ceballos. Cannabinoid effects in Alzheimer's disease: focus on neuroinflammation
- Attila Köfalvi. When modulators of synaptic plasticity meet at endocannabinoid signalling: comparing dyskinesias with psychosis

International Narcotics Research Conference 2009

12-17 julio, 2009

Portland, Oregón (Estados Unidos)

Más información: <http://www.inrcworld.org>

13th European Behavioural Pharmacology Society Meeting

4-7 septiembre, 2009

Roma (Italia)

Más información: <http://www.ebps.org>

22nd ECNP (European College of Neuropsychopharmacology) Meeting

12-16 septiembre, 2009

Estambul (Turquía)

Más información: <http://www.ecnp.eu/emc.asp>

XIII Congreso de la SENC

16-19 septiembre 2009

Tarragona

Más información: <http://www.senc.es>

Incluye el simposio "El receptor cannabinoide CB₂ como nueva diana terapéutica en enfermedades neurológicas"

- Carmen Guaza. Receptor CB₂ y enfermedades desmielinizantes
- Manuel Guzmán. Receptor CB₂ y tumores cerebrales
- Julián Romero. Receptor CB₂ y diferentes tipos de demencias
- Javier Fernández-Ruiz. Receptor CB₂ y enfermedades de los ganglios basales

XXXII Congreso de la SEBBM

23-26 septiembre, 2009

Oviedo

Más información: <http://sebbm.bq.ub.es>

Incluye el simposio "Señalización por el sistema endocannabinoide"

- Manuel Guzmán. Papel del sistema endocannabinoide en la patogénesis de la enfermedad de Huntington
- Alfonso Araque. Los endocannabinoides median la comunicación bidireccional entre neuronas y astrocitos
- Rafael Maldonado. Implicación de la microglía en la modulación ejercida por el sistema endocannabinoide en el dolor
- Ismael Galve-Roperh. Regulación de la neurogénesis por el sistema endocannabinoide

39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

17-21 octubre, 2009

Chicago, Illinois (Estados Unidos)
Más información: <http://www.sfn.org>

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

Mingorance C, Alvarez de Sotomayor M, Jiménez-Palacios FJ, Callejón Mochón M, Casto C, Marhuenda E, Herrera MD.

Effects of Chronic Treatment With the CB1 Antagonist, Rimonabant on the Blood Pressure, and Vascular Reactivity of Obese Zucker Rats.

Obesity (Silver Spring). 2009 Jul;17(7):1340-7. Epub 2009 Feb 19.

Oesch S, Walter D, Wachtel M, Pretre K, Salazar M, Guzmán M, Velasco G, Schäfer BW.

Cannabinoid receptor 1 is a potential drug target for treatment of translocation-positive rhabdomyosarcoma.

Mol Cancer Ther. 2009 Jun 9. [Epub ahead of print]

Tolón RM, Núñez E, Pazos MR, Benito C, Castillo AI, Martínez-Orgado JA, Romero J.

The activation of cannabinoid CB(2) receptors stimulates in situ and in vitro beta-amyloid removal by human macrophages.

Brain Res. 2009 Jun 6. [Epub ahead of print]

González-Zobl G, Carrillo-Santistevé P, Rodríguez-Martos A, Brugal MT.

Emergencies in cannabis users in Barcelona, Spain.

Med Clin (Barc). 2009 Jun 5. [Epub ahead of print] Spanish. No abstract available.

Campillo NE, Páez JA.

Cannabinoid system in neurodegeneration: new perspectives in Alzheimer's disease.

Mini Rev Med Chem. 2009 May;9(5):539-59.

Barbano MF, Castañé A, Martín-García E, Maldonado R.

Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances food reinforcement in a mouse operant conflict test.

Psychopharmacology (Berl). 2009 May 19. [Epub ahead of print]

Oviedo-Joekes E, Romero M, Carles March J, López Rus MA, Perea-Milla E; Asociación AVALON.

Use and evaluation of the health care services and the antiretroviral medication in HIV diagnosed people.

Gac Sanit. 2009 Mar-Apr;23(2):121-6. Epub 2009 Feb 13. Spanish.

Baeza I, Graell M, Moreno D, Castro-Fornieles J, Parellada M, González-Pinto A, Payá B, Soutullo C, de la Serna E, Arango C.

Cannabis use in children and adolescents with first episode psychosis: Influence on psychopathology and short-term outcome (CAFEPS study).

Schizophr Res. 2009 May 6. [Epub ahead of print]

Sánchez-Duffhues G, Calzado MA, de Vinuesa AG, Appendino G, Fiebich BL, Loock U, Lefarth-Risse A, Krohn K, Muñoz E.

Denbinobin inhibits nuclear factor-kappaB and induces apoptosis via reactive oxygen species generation in human leukemic cells.

Biochem Pharmacol. 2009 Apr 15;77(8):1401-9. Epub 2009 Jan 21.

Postigo C, Lopez de Alda MJ, Viana M, Querol X, Alastuey A, Artiñano B, Barceló D.

Determination of drugs of abuse in airborne particles by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry.

Anal Chem. 2009 Jun 1;81(11):4382-8.

Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, García S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, González-Feria L, Iovanna JL, Guzmán M, Boya P, Velasco G.

Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells.

J Clin Invest. 2009 May;119(5):1359-72.

Bedoya F, Rubio JC, Morales-Gutierrez C, Abad-Barahona A, Lora Pablos D, Meneu JC, Moreno-Gonzalez E, Enriquez de Salamanca R, Vegh I.

Single nucleotide change in the cannabinoid receptor-1 (CNR1) gene in colorectal cancer outcome.

Oncology. 2009;76(6):435-41. Epub 2009 May 5.

Pérez-Rial S, García-Gutiérrez MS, Molina JA, Pérez-Nievas BG, Ledent C, Leiva C, Leza JC, Manzanares J.

Increased vulnerability to 6-hydroxydopamine lesion and reduced development of dyskinesias in mice lacking CB1 cannabinoid receptors.

Neurobiol Aging. 2009 May 4. [Epub ahead of print]

Abalo R, Cabezos PA, López-Miranda V, Vera G, González C, Castillo M, Fernández-Pujol R, Martín MI.

Selective lack of tolerance to delayed gastric emptying after daily administration of WIN 55,212-2 in the rat.

Neurogastroenterol Motil. 2009 Apr 20. [Epub ahead of print]

Zaldívar Basurto F, García Montes JM, Flores Cubos P, Sánchez Santed F, López Ríos F, Molina Moreno A.

Validity of the self-report on drug use by university students: correspondence between self-reported use and use detected in urine.

Psicothema. 2009 May;21(2):213-9.

Burillo-Putze G, Borreguero León JM, García Dopico JA, Fernández Rodríguez JF, Pérez Carrillo MA, Jorge Pérez MJ, de Vera González AM, Vallbona Afonso E, Jiménez Sosa A. Incidence and impact of undisclosed cocaine use in emergency department chest pain and trauma patients.

Int J Emerg Med. 2008 Sep;1(3):169-72. Epub 2008 Jun 7.

Orgado JM, Fernández-Ruiz J, Romero J.

The endocannabinoid system in neuropathological states.

Int Rev Psychiatry. 2009 Apr;21(2):172-80.

Bedoya F, Meneu JC, Macías MI, Moreno A, Enríquez-De-Salamanca R, Gonzalez EM, Vegh I.

Mutation in CNR1 gene and VEGF expression in esophageal cancer.

Tumori. 2009 Jan-Feb;95(1):68-75.

Santamariña-Rubio E, Pérez K, Ricart I, Rodríguez-Sanz M, Rodríguez-Martos A, Brugal MT, Borrell C, Ariza C, Díez E, Beneyto VM, Nebot M, Ramos P, Suelves JM.

Substance use among road traffic casualties admitted to emergency departments.

Inj Prev. 2009 Apr;15(2):87-94.

Calafat A, Blay N, Juan M, Adrover D, Bellis MA, Hughes K, Stocco P, Siamou I, Mendes F, Bohrn K.

Traffic risk behaviors at nightlife: drinking, taking drugs, driving, and use of public transport by young people.

Traffic Inj Prev. 2009 Apr;10(2):162-9.

Jiménez-Muro Franco A, Beamonte San Agustín A, Marqueta A, Gargallo Valero P, Nerín de la Puerta I.

Addictive substance use among first-year university students.

Adicciones. 2009;21(1):21-8. Spanish.

Joya X, Papaseit E, Civit E, Pellegrini M, Vall O, Garcia-Algar O, Scaravelli G, Pichini S.

Unsuspected exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city detected by hair analysis.

Ther Drug Monit. 2009 Jun;31(3):391-5.

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) Moisés García Arencibia (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>