



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología molecular

Amido Hidrolasa de Ácidos Grasos (FAAH) durante la progresión de la Enfermedad del Alzheimer

Autor:
Paula Ramos González
Director/a:
Rafael Rodríguez-Puertas
Codirector/a:
Iván Manuel Vicente

ÍNDICE

1. Introducción.....	2
2. Objetivo.....	5
3. Materiales y métodos	
3.1 Tinción de tionina.....	6
3.2 Detección de proteína	
3.2.1 Muestras	6
3.2.2 Electroforesis SDS-PAGE.....	7
3.2.3 <i>Western Blot</i>	7
3.2.4 Análisis estadístico.....	8
4. Resultados.....	8
5. Discusión.....	11
6. Conclusiones.....	13
7. Bibliografía.....	14

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA), descrita por Alois Alzheimer en 1907, es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva. Es la causa más común de demencia, afectando a un 20% de las personas mayores de 75 años y al 40-50% de los mayores de 80 años.

Esta patología se caracteriza por una serie de anomalías neuroquímicas que afectan a regiones cerebrales específicas como neocórtex, hipocampo, núcleos amigdalinos, núcleo basal de Meynert o tálamo anterior. En el cerebro de un paciente con EA se pueden encontrar determinadas alteraciones histopatológicas, como la aparición de depósitos protéicos insolubles tanto intracelulares como extracelulares, pérdida sináptica, y disfunción y muerte neuronales en las regiones afectadas.

En cuanto a la aparición de depósitos insolubles, se han descrito ovillos neurofibrilares (ONF) y las placas seniles. Los ONF son inclusiones intracelulares, que contienen filamentos helicoidales apareados. Estos filamentos están compuestos por la forma hiperfosforilada de una proteína estabilizadora de microtúbulos, la proteína Tau, la cual en circunstancias normales no se encuentra anormalmente agregada. Las placas seniles por su parte, son agregados de la proteína β -amiloide que se encuentran rodeados de axones y dendritas distróficas, así como de astrocitos y microglía activada. Estos depósitos amiloides son consecuencia del procesamiento incorrecto de la proteína APP (proteína precursora amiloide) por parte del complejo de secretasas. La APP se procesa por la β y γ secretasa por la vía amiloidogénica en vez de por la vía de la α secretasa (Herrera-Rivero et al., 2010).

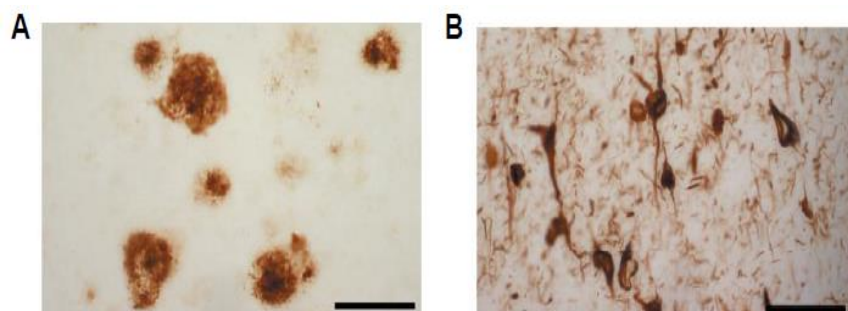


Figura 1. Fotografías de la neuropatología principal de la enfermedad de Alzheimer en corteza cerebral de un paciente. Se aprecian las placas de amiloide (A) y los ovillos neurofibrilares (B). Barra de escala 62,5 μ m (LaFerla y Oddo, 2005).

Por otro lado, La pérdida sináptica es una importante causa neurobiológica de la disfunción cognitiva en la EA (Terry et al., 1991). La disminución en la función sináptica es un

evento que aparece en las primeras etapas de la patogénesis de la enfermedad y ha sido descrita, principalmente, en corteza e hipocampo, ambas regiones inervadas por células colinérgicas procedentes del núcleo basal de Meynert. Además, se ha observado que algunas de las proteínas presentes en las vesículas sinápticas, como la sinaptofisina, se encuentran reducidas en la EA, lo que produce deficiencias durante la exocitosis, y la disfunción en el tráfico vesicular, alterando así los procesos de neurotransmisión y pudiendo ser una de las causas de los síntomas clínicos de demencia (Lassmann et al., 1992).

Además de la pérdida sináptica, la EA se caracteriza por la pérdida neuronal, cuya consecuencia principal es una reducción en la producción de neurotransmisores, y por tanto, una alteración en la sinapsis. En diversos estudios, se ha observado que esta pérdida neuronal afecta principalmente a las vías de señalización del sistema colinérgico en el hipocampo y en la corteza, lo que explicaría la pérdida de memoria y el déficit de aprendizaje (Lang et al., 1983). Por otro lado, se han observado cambios también en otros sistemas, como el adrenérgico y el serotoninérgico. Del mismo modo se han descrito alteraciones en algunos sistemas peptídicos encargados de regular la neurotransmisión en dichos sistemas es el caso de los neuropéptidos como la galanina (Rodríguez-Puertas et al., 1997).

En las últimas décadas, ha crecido el interés sobre otros tipos de moléculas de señalización endógena en la EA. Estas tienen, de forma similar a los neuropéptidos, importantes propiedades neuromoduladoras de diferentes sistemas de neurotransmisión. Estas moléculas tienen la estructura química lipídica y se sintetizan a partir glicerofosfolípidos. Uno de los ejemplos más representativos de estos neurotransmisores de naturaleza lipídica, o neurolípidos, son los endocannabinoides (EC).

Estudios recientes sugieren que el estudio del sistema endocannabinoide (ECS) es particularmente interesante en las enfermedades neurodegenerativas, ya que se han observado cambios en la expresión de algunos componentes de dicho sistema en este tipo de enfermedades (Westlake et al., 1994). Además, parece ser que el ECS está implicado también en funciones como la coordinación motora, aprendizaje y memoria, antinocicepción, control de las emociones, desarrollo neuronal, neuroprotección... (Martín-Moreno, 2010)

Durante las últimas décadas se han descrito y caracterizado muchos de los componentes del ECS. Algunos de esos componentes son los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, que son receptores de membrana acoplados a proteínas G. Entre estos dos subtipos se mantiene un 44% de homología y, principalmente, se diferencian en su distribución (Grundy et al., 2001). El receptor CB₁ está presente en la mayoría de tejidos, especialmente en el sistema nervioso, siendo muy abundante en elementos neuronales del hipocampo y de la corteza, y sugiriendo su implicación en el aprendizaje y en la memoria (Pazos et al., 2004). Se

ha comprobado que la expresión y actividad del receptor CB₁ se ven aumentadas en las placas seniles, en contraste con las neuronas alejadas de dichas placas, en las que la expresión está reducida (Riedel et al., 2005). El receptor CB₂, sin embargo, se expresa principalmente en células del sistema inmune y en la microglía del SNC, regulando así procesos neuroinflamatorios y participando en la supervivencia neuronal. Se ha descrito que tanto su expresión como su actividad se han visto aumentadas en la EA (Benito et al., 2003).

Otros de los componentes del ECS son los ligandos endógenos de estos receptores, siendo los más importantes la araquidonoiletanolamina (anandamida o AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Se trata de compuestos lipofílicos que exhiben importantes diferencias en cuanto a su distribución así como en su selectividad por los receptores cannabinoides. El 2-AG es más abundante que la AEA en el cerebro y se comporta como agonista completo de CB₁ y CB₂, mientras que la AEA actúa como agonista parcial del CB₁ (Sugiura et al., 2000). Se ha comprobado que cuando la AEA se une al receptor CB₁ es capaz de prevenir la neurotoxicidad inducida por los depósitos de Aβ (Pazos et al., 2004). Por otro lado, otros de los componentes del sistema endocannabinoide son los enzimas de degradación de estos compuestos. Estos enzimas, son la amido hidrolasa de ácidos grasos, FAAH y la monoacilglicerol lipasa o MAGL. De su modulación dependen a primera instancia la abundancia y disponibilidad de los endocannabinoides. El primero de los enzimas, objeto de este estudio, es una serina hidrolasa de amidas de ácidos grasos, FAAH, que es considerado un factor clave en la regulación de la función del ECS. Se trata de una proteína integral de membrana capaz de degradar la AEA en ácido araquidónico y etanolamina (Deutch et al., 2002). En humano, la FAAH está distribuida en tejidos de diversos órganos como hígado, intestino delgado, riñón o en los astrocitos del cerebro (Fezza et al., 2008). En recientes estudios, se ha demostrado una sobreexpresión y un aumento de la actividad de FAAH en muestras de tejido de pacientes con Alzheimer en la astrogliosis asociada a las placas. Esto sugiere que FAAH podría jugar un importante papel en la respuesta glial ante los depósitos de Aβ (Benito et al., 2003). Sin embargo se desconoce cómo es la expresión de FAAH en otras zonas del cerebro afectadas en la EA.

Se ha propuesto un modelo que describe el papel de los endocannabinoides en la progresión del Alzheimer, que sugiere que tras la deposición de Aβ, la AEA y el 2-AG pueden activar los receptores CB₁ en las neuronas intentando paliar su degeneración. Además, ambos endocannabinoides podrían activar también los receptores CB₂ localizados en las células gliales, modificando la producción de distintas moléculas proinflamatorias. Por último, la AEA recaptada por los astrocitos podría ser degradada por el enzima FAAH, provocando un

aumento en los niveles de ácido araquidónico y en consecuencia, de moléculas proinflamatorias (Pazos et al., 2004).

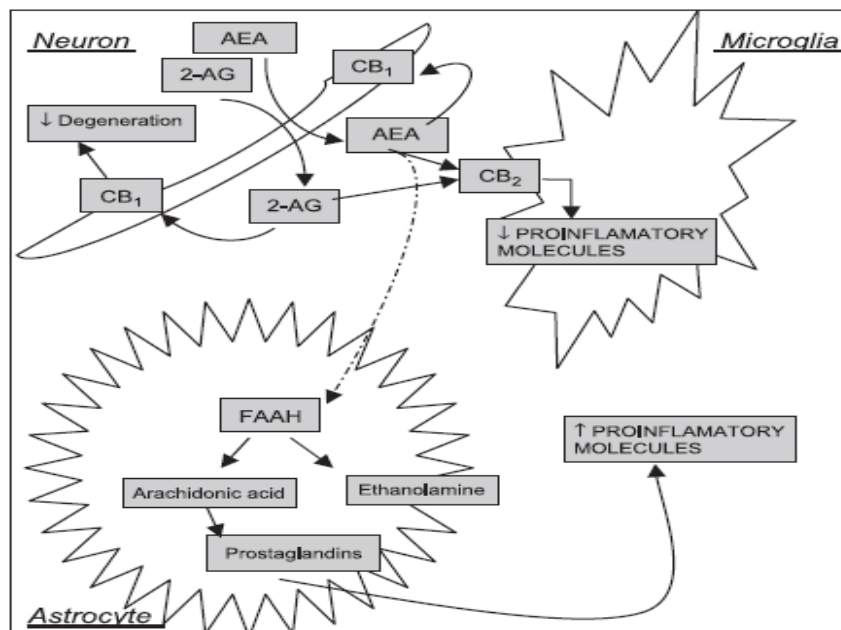


Figura 2. Modelo propuesto del posible papel de algunos elementos del sistema endocannabinoide en la enfermedad del Alzheimer (Pazos et al., 2004).

De este modo, agonistas tanto de CB₁ como de CB₂, así como inhibidores de FAAH podrían tener efectos beneficiosos en la prevención de la respuesta inflamatoria asociada a la deposición de Aβ (Pazos et al., 2004).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que este modelo se ajusta a una visión general de la enfermedad, sin tener en cuenta las distintas fases o estadios en los que podemos dividir la progresión de la misma. La expresión y la actividad de los componentes del sistema endocannabinoide podrían variar a lo largo de las distintas fases de la progresión de la enfermedad. Conocer estas variaciones nos permitirá conocer mejor dicha progresión y abordar de forma específica el tratamiento de la enfermedad según el estadio.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es el análisis de la densidad o expresión del enzima FAAH en cortex prefrontal procedente de tejido cerebral *post-mortem* de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad del Alzheimer a fin de encontrar variaciones importantes en la misma. Para ello los pacientes fueron divididos en tres grupos de acuerdo a las fases

neuropatológicas según la clasificación de Braak (I-II, III-IV y V-VI) en función de la progresión de la manifestación de la patología neurofibrilar.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tinción de Tionina

A fin de mostrar la región de la que obtuvimos las muestras que se utilizarían posteriormente en los ensayos *Western Blotting*, se obtuvieron varios cortes de 20 μ m con el microtomo (Microm HM550) de una sección de la corteza frontal (área de Brodmann 8), para después teñirla durante 5 min con tionina. Una vez teñido, se lavó el corte con agua destilada durante varios minutos. Por último, se cubrió con un cubreobjetos para poder visualizarlo al microscopio y escanearlo para delimitar el área objeto de la investigación.

3.2 Detección de la proteína

3.2.1. Muestras:

Las muestras de tejido cerebral *post-mortem* de humanos se obtuvieron del banco de tejido cerebral del Instituto de Neuropatología del Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona. La recogida y seguimiento de los expedientes médicos de tejidos se realizaron en estricta confidencialidad en todo momento y siguiendo los protocolos éticos y otros adaptados para los estudios *post-mortem* (CEISH/244/2014/Rodríguez-Puertas).

El tejido cerebral del grupo Control se obtuvo de 5 pacientes sin ninguna enfermedad neuropsiquiátrica o neurológica en sus registros médicos. La media de edad \pm DE fue de 57 \pm 14 años y el tiempo *post-mortem* fue de 4 \pm 2 h. Los pacientes de EA se dividieron en tres grupos de acuerdo a la clasificación de Braak de la EA (I-II, III-IV, y V-VI). La edad media de los pacientes en estadios I-II fue de 62 \pm 4 años (media \pm DE); tiempo *post-mortem* fue de 8 \pm 5 h. La edad media de los pacientes en estadios III-IV fue de 78 \pm 7 años; tiempo *post-mortem* fue de 8 \pm 5 h. Por último, la edad media de los pacientes en las etapas más graves (V-VI) fue de 75 \pm 4 años; tiempo *post-mortem* fue de 9 \pm 6 h.

Las muestras de tejido corresponden al área 8 de Brodmann de la corteza frontal de cerebros control y con EA. Una vez obtenida la sección deseada, las muestras se homogeneizaron con el *Potter* en 1,5 volúmenes de tampón RIPA, que contenía 150mM de NaCl, 1% Tritón x-100, 0,5% deoxocolato sódico, 0,1% SDS, 50mM Tris pH 8 y un inhibidor de proteasa. Se dejaron lisando durante 45 min y se congelaron a -80 °C.

Muestras	Edad (media \pm DE) (años)	Post-mortem (media \pm DE) (horas)
Control (n=5)	57 \pm 14	4 \pm 2
EA I-II (n=5)	62 \pm 4	8 \pm 5
EA III-IV (n=5)	78 \pm 7	8 \pm 5
EA V-VI (n=5)	75 \pm 4	9 \pm 6

Tabla 1. Edad (media \pm ED) y retraso post-mortem (media \pm ED) de las muestras utilizadas en el ensayo.

3.2.2 Electroforesis SDS-PAGE:

La electroforesis en SDS-PAGE es utilizada para separar proteínas en función de la longitud de la cadena polipeptídica, masa molecular y modificaciones postraduccionales. Los geles de resolución se polimerizaron sobre los cristales limpios y desengrasados con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación. Los utilizados fueron geles al 12% de acrilamida, preparados con 4.40 ml de H₂O, 2.50 ml de 1M Tris pH 8.8, 100 μ l de SDS 10%, 3 ml de poliacrilamida 40%, 5 μ l de TEMED y 50 μ l de APS 10%. Una vez polimerizados, se añadió el gel de concentración, que se preparó añadiendo 6.50 ml de H₂O, 1 μ l de 1M Tris pH 6.8, 80 μ l de SDS 10%, 1.20 ml de poliacrilamida 40%, 8 μ l de TEMED y 80 μ l de APS 10%. Una vez polimerizado el segundo gel, se procedió a la carga de las muestras. Para ello, primero, se añadió *Sample Buffer 4x* a las muestras en una proporción 1:4 y se calentaron a 100°C durante 10 minutos con el objetivo de reducir las proteínas. Después, se montó la cubeta con el sistema de migración en la que se introdujo el gel y se cargaron los pocillos. Por último, se aplicó corriente eléctrica (90-120 V) con la fuente de alimentación para que las proteínas migraran.

3.2.3 Western Blot

Con objeto de visualizar las proteínas objeto de estudio, se preparó el soporte que incluye la membrana (activada 2 min en MeOH, 1 min en H₂O y 10 min en tampón de transferencia) y el gel migrado, se introdujo en la cubeta refrigerada y se le añadió tampón de transferencia. Seguidamente, se trasladó la cubeta preparada a la cámara fría a 4°C y se conectó a una fuente de alimentación que generaba 60V constante durante 3 h. Al cabo de este tiempo, se retiró la membrana y con objeto de verificar que no había habido ningún incidente durante la transferencia, las proteínas se visualizaron mediante la tinción reversible

Rojo Ponceau. Posteriormente las membranas se lavaron, y se bloquearon con una solución que contenía leche desnatada al 5% en TBST durante 1 h a Tª ambiente en balanceo suave. Después se lavaron tres veces con TBST, se añadió el anticuerpo primario 1:2000 contra FAAH durante toda la noche en balancín suave a 4°C. Tras realizar tres lavados con tampón Tris +Tween 20 (TBST) de 10 min cada uno, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (1:2000) durante 2 h a Tª ambiente. Después, se realizaron los tres lavados, dos en TBST y uno final en TB, los tres de 10 min. A continuación, se reveló la banda inmunorreactiva correspondiente a FAAH, incubando con un sustrato quimioluminiscente (dilución 1:1 de solución luminol y solución peróxido). Posteriormente, se realizó un *stripping* de forma que fuera posible detectar ahora la banda correspondiente a la actina para así poder realizar la normalización. Tras el *stripping*, que supone realizar varios lavados de la membrana (5 min en TBS, 2 lavados de 10 min en *stripping buffer*, 2 lavados de 5 min en PBS Y 2 lavados de 5 min en TBST) se incubó la membrana con el anticuerpo primario (1:7500) contra la β -actina durante 1h a Tª ambiente en balancín suave. Después, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno en TBST y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario durante 1h 30 min a Tª ambiente. Finalmente, se lavó 2 veces 10 min con TBST y una vez 10 min con TBS para, por último, revelar la banda correspondiente a la actina de la misma forma que la anterior pero con un tiempo de exposición menor.

Proteína	Anticuerpo	Concentración
FAAH	Ratón Anti-FAAH	1:2000
β -Actina	Ratón Anti- β Actin	1:7500

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de *Western Blotting*

3.2.4 Análisis estadístico

La intensidad de las bandas obtenidas se midió mediante un análisis densitométrico utilizando el programa Image J (NIH, Bethesda, USA).

Todos los resultados fueron expresados como la media \pm el error estandar. Las diferencias estadísticas en los niveles de expresión de FAAH fueron calculados utilizando el test no paramétrico U de Mann-Whitney con el programa Prism 5 (GraphPad Software INC., San Diego, CA) para la comparación entre los grupos control y EA. Para los cuatro grupos se utilizó el análisis de Kruskal Wallis seguido de un test de Dunn.

4. RESULTADOS

4.1 Tinción tionina

En la sección mostrada en la Figura 3 correspondiente a la corteza frontal de un cerebro humano (área de Brodmann 8) teñido con tionina, se observan la sustancia gris (A) y la sustancia blanca (B). Las muestras de corteza que se utilizaron después para la detección de la proteína FAAH, fueron obtenidas en todos los casos de de la sustancia gris (A), realizándose cortes consecutivos de la misma región.

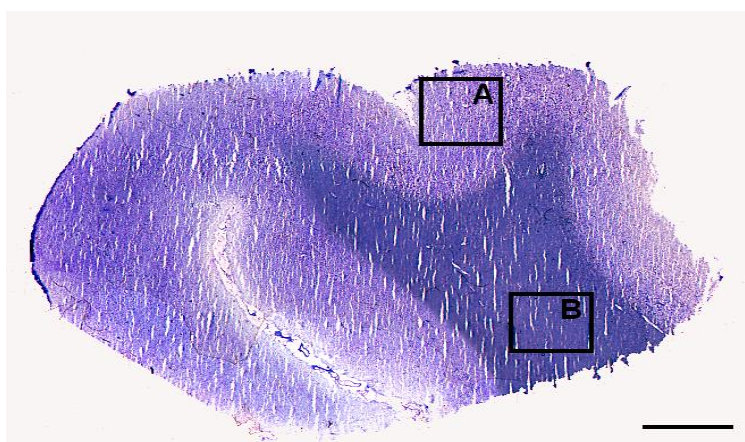


Figura 3. Corte representativo correspondiente a corteza frontal (área de Brodmann 8) de cerebro humano en el que se diferencian la sustancia gris (A) y la sustancia blanca (B). Barra de escala 3,5 mm.

4.2. Detección de proteína por *Western Blotting*

Se utilizó esta técnica para determinar la banda correspondiente a nuestra proteína, FAAH, de aproximadamente 63 KDa. Se obtuvo también la banda correspondiente a la β -actina, una proteína abundante cuya expresión no varía en la progresión de la enfermedad y que nos permite la normalización de los resultados obtenidos.

Tras realizar los *Western Blottings* correspondientes a todos los casos y obtener las correspondientes bandas, se realizaron diversos análisis. En primer lugar se quiso comparar la expresión de FAAH en los casos control, con la expresión de dicha proteína en la EA en general, sin realizar una división de la progresión de la enfermedad por estadios (Figura 4).

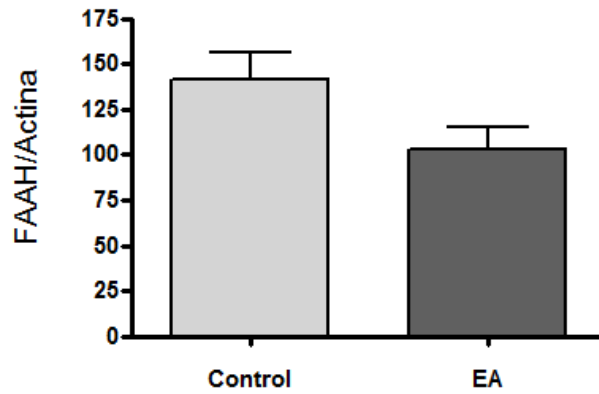


Figura 4. Análisis de la expresión de FAAH en los individuos control y en los sujetos con Alzheimer (EA). Valores de la media \pm error estandar.

En este caso se observa una disminución de la expresión de la proteína FAAH en los pacientes con EA, en comparación con los controles sanos (Control: 141,2 \pm 14,92 n=5; EA: 102,7 \pm 12,29 n=15)

A continuación se compararon los datos con la finalidad de determinar si existen diferencias en la expresión de esta proteína en las distintas fases de la enfermedad, divididas en tres grupos (I-II, III-IV, y V-VI) según la clasificación de Braak. (Figura 5)

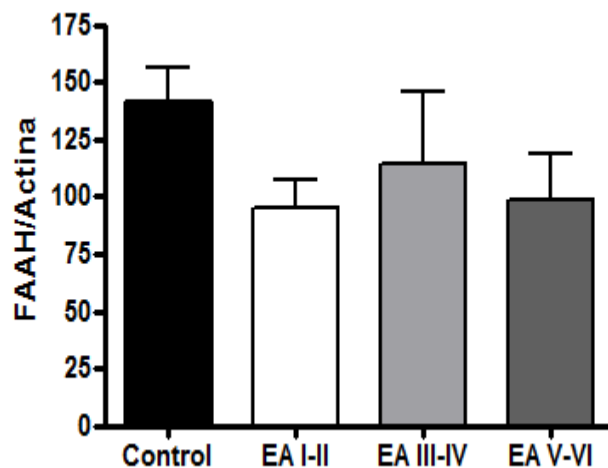


Figura 5. Análisis de la expresión de FAAH en los individuos control y en los pacientes con EA, separados según las fases de acuerdo a la clasificación de Braak. Valores de la media \pm error estandar.

Se observa una disminución en la expresión de FAAH en las primeras etapas de la enfermedad (EA I-II) en comparación con el control. Sin embargo, en los estadios moderados

(EA III-IV) se observa un aumento en la expresión con respecto al grupo EA I-II, aunque sin llegar al nivel de expresión en los casos control. Finalmente, en las últimas fases o estadios de la enfermedad (EA V-VI) se vuelve a observar una pequeña tendencia a la disminución en la expresión de la proteína (Control $141,2 \pm 14,92$ n=5; EA I-II $95,40 \pm 12,06$ n=; EA III-IV $114,4 \pm 31,16$ n=5; EA V-VI $98,20 \pm 20,44$ n=5).

Sin embargo, aunque se han observado cambios, ninguno de ellos llega a ser estadísticamente significativo posiblemente porque el número de muestras utilizado en total (n=20) no es muy elevado.

Por último (Figura 6), se muestran las bandas correspondientes a FAAH y a la actina, en las que podemos ver a simple vista, las diferencias en los niveles de expresión de esta proteína.

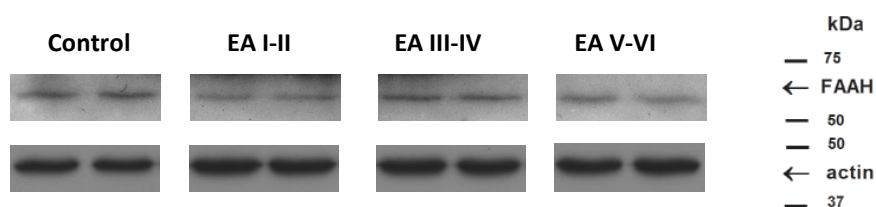


Figura 6. Bandas correspondientes a FAAH y a la β -actina obtenidas por Western Blotting. Se observan todos los casos del estudio (Control, EA I-II, EA II-IV, y EA V-VI) por duplicado.

5. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue analizar el estado de uno de los componentes del ECS durante la progresión de la EA, el enzima hidrolítico FAAH. Los pacientes fueron divididos en tres grupos de acuerdo a las etapas neuropatológicas de Braak definidas para la EA (estadios I-II, III-IV, y V-VI) (Braak y Braak., 1991). Se midió la densidad del enzima en una de las áreas más afectadas del cerebro, la corteza frontal, área implicada en el aprendizaje y la memoria. La degeneración de esta área parece responsable de gran parte de los síntomas clínicos de la EA.

En nuestro estudio, observamos una disminución de la expresión de la proteína FAAH en los pacientes con EA, en comparación con los controles sanos. Además, cuando comparamos los cuatro grupos, observamos una disminución en los niveles de proteína en los primero estadios en comparación con el control. En los estadios intermedios se vió un aumento en la expresión de FAAH con respecto a los estadios I-II, y finalmente se observó una disminución en la expresión de la proteína en los estadios más tardíos.

La EA es un desorden neurodegenerativo crónico del cerebro considerado la mayor causa de demencia en ancianos (Strohmeyer y Rogers, 2001). La histopatología de la enfermedad es actualmente bien conocida, incluyendo las placas seniles, los ovillos neurofibrilares, la pérdida neuronal y sináptica, y la gliosis reactiva (Giulian, 1999). Además, recientemente muchos estudios han documentado el papel de ECS en varias enfermedades neurológicas, entre las que se encuentra la EA. Es por esto que este campo se considera una prometedora área de investigación para descubrir nuevas dianas terapéuticas (Bisogno y Di Marzo, 2008).

FAAH es uno de los enzimas involucrados en la terminación de señalización endocannabinoide, capaz de hidrolizar AEA y otras amidas de ácidos grasos. La proteína FAAH, aunque se distribuye de forma heterogénea, es muy abundante en las grandes neuronas piramidales de la corteza, y se ha comprobado que dicha distribución se superpone con la de los receptores cannabinoides CB₁ (Tsou et al 1998).

Hasta ahora, se conoce que en determinadas áreas implicadas en la enfermedad, hay una variación en la expresión de la proteína. La presencia de FAAH en astrocitos ha sido observada en el SNC de humano, lo que podría sugerir su papel como regulador en la transmisión sináptica en el cerebro (Romero et al., 2002). Además, se ha descrito un aumento la expresión de FAAH en la glía asociada a las placas neuríticas. Teniendo en cuenta que la AEA y de forma parcial el 2-AG son sustratos de FAAH, se podría considerar al enzima como una fuente de ácido araquidónico y otras moléculas proinflamatorias en las placas, con su consiguiente efecto perjudicial (Benito et al., 2003). Es por ello que se haya propuesto la utilización de inhibidores de FAAH para evitar una excesiva respuesta.

Nuestro estudio ha revelado una disminución en los niveles de la proteína FAAH por lo general en todos los casos con EA estudiados. Además, se ha observado una disminución más acusada en la expresión de FAAH en las primeras etapas de la enfermedad (EA I-II), con un posterior aumento en los estadios III-IV, y finalmente una disminución en la expresión de la proteína en las etapas más tardías de la enfermedad (EA V-VI).

Para determinar la importancia o la implicación de estas variaciones en la progresión de la enfermedad, es importante conocer lo que ocurre en esta misma área con otros componentes del sistema endocannabinoide cuya actividad está relacionada con la de FAAH, como por ejemplo, el receptor CB₁ o la AEA.

Algunos estudios que analizaron la expresión de CB₁ en áreas corticales no describieron cambios en la EA (Westlake et al., 1994). Análisis posteriores, sin embargo, mostraron una disminución en la densidad de este receptor en la corteza frontal (Ahmad et al., 2013). Esto se

asemeja a lo encontrado en nuestro estudio, ya que también se observa una disminución en la expresión de nuestra proteína, FAAH.

Por otro lado, la actividad y densidad de receptores CB₁ ha sido recientemente estudiada en la corteza de los mismos paciente utilizados en el presente estudio, teniendo también en cuenta las diferentes fases al igual que en nuestro estudio, según la clasificación de Braak. En este estudio no se observaron grandes cambios en la densidad del receptor CB₁ en los primeros estadios (I-II), sin embargo, al igual que ocurre en nuestro análisis de la FAAH, en los estadios intermedios de la enfermedad se observa un aumento en los niveles de proteína, es decir una sobrerregulación de la misma. En este mismo estudio, no se obtuvieron resultados significativos relacionados con lo que ocurría en las últimas etapas de la enfermedad, debido a la escasez de muestras de este tipo (Manuel et al., 2014).

Todos los datos sugieren que en la EA la primera respuesta es la regulación de la actividad tanto de enzimas como receptores y después un aumento de la densidad de estos últimos (Manuel et al., 2014). Este aumento podría indicar una acción neuroprotectora mediada por endocannabinoides en respuesta al daño neuronal (Campbell y Gowran., 2007). Los cannabinoides podrían actuar como protectores neuronales mediante la inhibición de la actividad de la microglía proinflamatoria (Campbell y Gowran., 2007).

Sabiendo que la expresión y localización anatómica de FAAH es semejante a la de CB₁, sería importante realizar un estudio de actividad de nuestro enzima, para determinar, si se está produciendo una regulación similar a la que ocurre en el receptor cannabinoide CB₁.

Por otro lado, estudios recientes han concluido que se produce una reducción en la enzima responsable de la síntesis de la anandamida, N-araquidonoil-fosfatidil-etanolamina (NArpE), en la corteza de los pacientes con EA, así como un déficit en la producción de la anandamida (Jung et al., 2012). Por tanto, la regulación tanto de la densidad como de la actividad de los receptores de cannabinoides, podría ser un mecanismo de compensación para equilibrar la señalización de la anandamida. Así mismo, este déficit en la producción de anandamida en pacientes con EA podría explicar la reducción en la producción del enzima FAAH, encargado de su hidrólisis.

6. CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio aporta nueva información sobre las alteraciones del sistema endocannabinoide, concretamente sobre las variaciones en los niveles de expresión del enzima FAAH durante la progresión de la EA en la corteza prefrontal, relacionada directamente con la memoria y el aprendizaje.

Además, sugiere un posible papel de FAAH como marcador de la enfermedad, así como una nueva diana terapéutica posible para la EA. Por otro lado, este estudio deja la puerta abierta a nuevos ensayos que nos permitan conocer entre otras cosas las variaciones en la actividad de este enzima en la progresión de la enfermedad, lo cual nos aportaría nueva información de utilidad para comprender la implicación del sistema endocannabinoide en la EA.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad R, Goffin K, Van den Stock J, De Winter FL, Cleeren E, Bormans G, Tournoy J, Persoons P, Van Laere K, Vandebuckle M (2013) In vivo type 1 cannabinoid receptor availability in Alzheimer's disease. *Eur Neuropsychopharmacol* 24,242-250.
- Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, Romero J (2003) Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23, 11136-41.
- Bisogno T, Di Marzo V (2008) The role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: facts and hypotheses. *CurrPharm Des* 14: 2299–3305.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer - related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-59.
- Campbell VA, Gowran A (2007) Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids. *Br J Pharmacol* 152, 655-62.
- Deutsch D.G., Ueda N., Yamamoto S., (2002).The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66, 201–210.
- Fezza, F., De Simone, C., Amadio, D., & Maccarrone, M. (2008). Fatty acid amide hydrolase: a gate-keeper of the endocannabinoid system. In *Lipids in Health and Disease* (pp. 101-132). Springer Netherlands.
- Giulian D (1999) Microglia and the immune pathology of Alzheimer's disease. *Am J Hum Genet* 65:13–18.
- Grundy R.I., Rabuffetti M., Beltramo M., (2001).Cannabinoids and neuroprotection. *Molecular Neurobiology* 24, 29–51.
- Herrera-Rivero, M., Hernández-Aguilar, M. E., Manzo, J., & Aranda-Abreu, G. E. (2010). Enfermedad de Alzheimer: inmunidad y diagnóstico. *Revista de Neurología*, 51(3), 153-164.

- Jung KM, Astarita G, Yasar S, Vasilevko V, Cribbs DH, Head E, Cotman CW, Piomelli D (2012) An amyloid $\beta(42)$ -dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33,1522-32.
- Lang W, Henke H (1983) Cholinergic receptor binding and autoradiography in brain of non-neurological and senile dementia of Alzheimer-type patients. *Brain Res* 267, 271-280.
- Lassmann H, Weiler R, Fischer P, Bancher C, Jellinger K, Floor E, Danielczyk W, Seitelberger F, Winkler H (1992) Synaptic pathology in Alzheimer's disease: immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. *Neuroscience* 46, 1-8.
- Manuel I, González de San Román E, Giralt M.T, Ferrer I, Rodríguez-Puertas R (2014) Type 1 cannabinoid receptor activity During Alzheimer's progresión. *Journal of Alzheimer's disease* 42, issue 3.
- Martín Moreno A.M (2010) Mecanismos de la acción neuroprotectora de los cannabinoides en la enfermedad del Alzheimer. Tesis doctoral.
- Pazos, M. R., Nunez, E., Benito, C., Tolon, R. M., & Romero, J. (2004). Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. *Life sciences*, 75(16), 1907- 1915.
- Riedel G, Davies SN (2005) Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb Exp Pharmacol* 168, 445-77.
- Rodríguez-Puertas R, Nilsson S, Pascual J, Pazos A, Hökfelt T (1997) ^{125}I -galanin binding sites in Alzheimer's disease: increases in hippocampal subfields and a decrease in the caudate nucleus. *J Neurochem* 68, 1106-13.
- Romero J, Hillard CJ, Calero M, RabanoA (2002) Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res* 100:85–93.
- Strohmeyer R, Rogers J (2001) Molecular and cellular mediators of Alzheimer's disease inflammation. *J AlzDis* 3:131–157.
- Sugiura T., Kondo S., Kishimoto S., Miyashita T., Nakane S., Kodaka T., Suhara Y., Takayama H., Waku K., (2000). Evidence that 2-arachidonylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *Journal of Biological Chemistry* 275, 605–612.
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of neurology*, 30(4), 572-580.

- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998a) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393–411.
- Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M (1994) Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 63, 637-52.