

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología

*FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA*

---

# TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

---

TRATAMIENTO CON ANTAGONISTA CANNABINOIDE EN  
RATAS CON LESIÓN COLINÉRGICA DEL  
PROSENCÉFALO BASAL

**Alumno:** *Antón Bañuelos, Jaime*

**Fecha:** Julio 2017

**Director**

Dr. Rafael Rodríguez  
Puertas

**Curso Académico**

2016/2017



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	1
1.1.1. Introducción	1
1.1.2. Etiopatogenia	2
1.2. EL SISTEMA DE NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICO	4
1.3. EL SISTEMA DE NEUROTRANSMISIÓN CANNABINOIDE	5
1.4. INTERACCIÓN ENTRE LOS SISTEMAS CANNABINOIDE Y COLINÉRGICO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	5
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. ANIMALES	7
3.2. LESIÓN CON <sup>192</sup> IgG-SAPORINA	7
3.3. TEST DE LABERINTO DE BARNES	8
3.3.1. Procedimiento	9
3.3.1.1. Habitación	9
3.3.1.2. Entrenamientos	9
3.3.1.3. Prueba	10
3.4. PRUEBA DE EVITACIÓN PASIVA	10
3.4.1. Procedimiento	11
3.4.1.1. Entrenamiento	11
3.4.1.2. Prueba	11
3.5. PAUTA DE TRATAMIENTO	12
3.5.1. Grupos de tratamiento	12
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
4. RESULTADOS	13
4.1. LATENCIA DE LOS ENTRENAMIENTOS	13

4.2. LATENCIA DEL ENTRENAMIENTO 1	14
4.3. LATENCIA DEL ENTRENAMIENTO 13	14
4.4. PRUEBA DEL LABERINTO DE BARNES	16
4.5. PRUEBA DE EVITACIÓN PASIVA	16
5. DISCUSIÓN	17
5.1. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	20
6. BIBLIOGRAFÍA	21
7. ANEXOS	25
7.1. ABREVIATURAS EMPLEADAS	25

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

### 1.1.1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que da lugar a atroñas en diferentes zonas del cerebro y la muerte de células neuronales, provocando consecuentemente pérdidas de memoria, así como fallos en el aprendizaje, toma de decisiones y otras capacidades cognitivas. Es la causa más común de demencia, se estima presente entre en 10-30 % de la población mayor de 65 años (Masters *et al.* 2015) y se trata de uno de los mayores retos a los que se enfrenta la medicina actual. El avance de la enfermedad difiere ampliamente entre personas, y en la mayoría de los casos comienza a manifestarse a partir de los 60 años de edad, aunque existe un tipo de Alzheimer temprano cuya causa tiene un componente genético (Lambert *et al.* 2009).

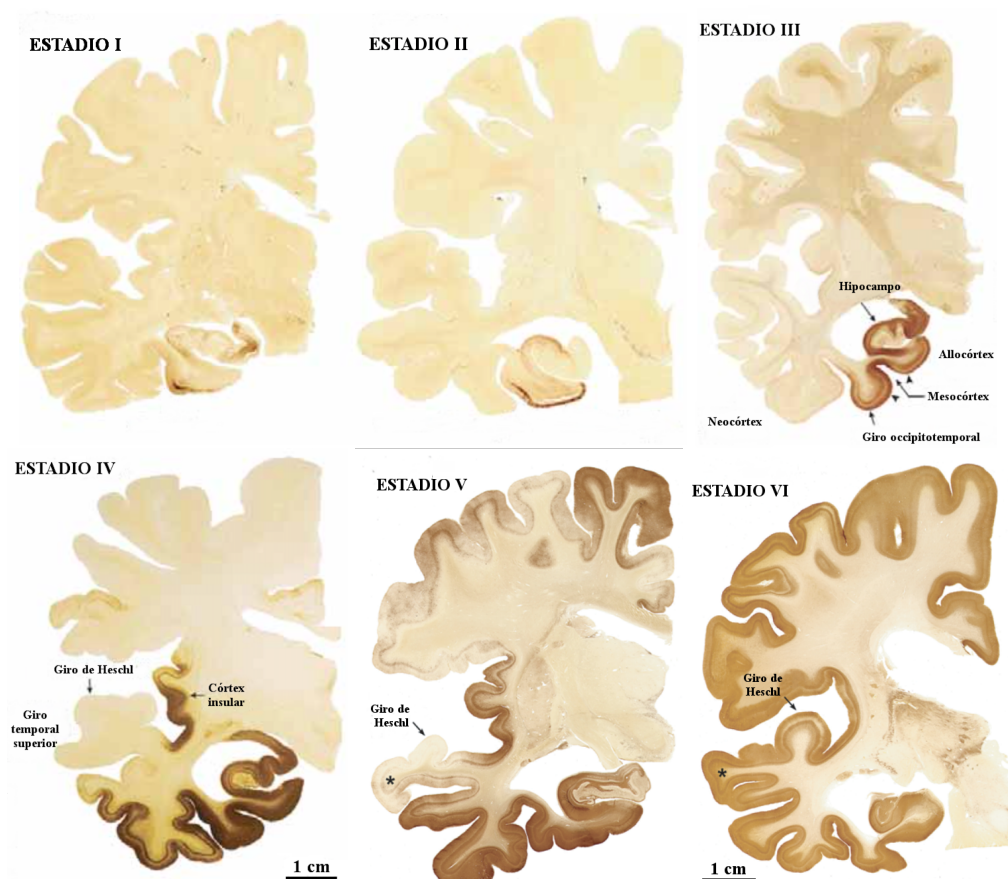


Figura 1. Evolución de los cambios neurofibrilares de la corteza en los diferentes estadios de la enfermedad de Alzheimer (tinción inmunohistoquímica de la proteína Tau). Imagen adaptada de Braak *et al.* (2006).

Patológicamente se caracteriza por la aparición de ovillos neurofibrilares intracelulares y depósitos extracelulares de proteínas amiloides que contribuyen a la formación de placas seniles (**Fig. 1**). Durante el avance de la degeneración se ha observado una pérdida significativa de la inervación colinérgica de la corteza cerebral, sobre todo en las zonas del hipocampo y el neocórtex. Asimismo, también se ha descrito una disminución de los niveles de actividad de la acetilcolintransferasa (enzima que sintetiza el neurotransmisor acetilcolina -ACh-) y de acetilcolinesterasa (hidroliza la acetilcolina) en comparación con cerebros sanos. Esto se ha correlacionado con la muerte de neuronas colinérgicas en zonas implicadas en procesos de memoria y aprendizaje (revisado en Barage y Sonawane 2015).

### **1.1.2. Etiopatogenia**

La etiopatogenia de la EA permanece prácticamente desconocida un siglo después de la primera descripción de esta patología neurodegenerativa. Aunque las características neuropatológicas de la EA se conocen, las complejidades subyacentes del mecanismo aún no han sido claramente definidas. La falta de información acerca del proceso patogénico es la razón de la ausencia de tratamientos efectivos que puedan prevenir el avance de la enfermedad y sus etapas finales.

A pesar de la falta de información, existe consenso en que el deterioro selectivo del sistema colinérgico en el prosencéfalo basal y sus áreas de proyección es determinante en el progresivo deterioro cognitivo en la EA. Una región importante del prosencéfalo basal es el núcleo basal de Meynert (NBM) (revisado en Lun Liu *et al.* 2015). Se trata de una región formada principalmente por neuronas colinérgicas (50-75 % del total de sus células) caracterizada por constituir la principal inervación colinérgica del manto cortical, con proyecciones aferentes al córtex cerebral, hipocampo, bulbo olfatorio y amígdala. La función colinérgica se considera vital en la atención, la memoria y otros procesos cognitivos (Everitt y Robbins, 1997, Sarter *et al.* 2005), y la patología neuronal colinérgica, como la que tiene lugar en la EA, se ve acompañada de déficits cognitivos. Debido a la importancia de la función colinérgica cortical en la creación de nuevos recuerdos, se considera al NBM implicado en procesos de atención y memoria. Esta región sufre degeneración en la EA y es de las zonas más tempranamente afectadas, y el nivel de atrofia de dicha

zona se encuentra bien correlacionado con el grado de pérdida cognitiva medido objetivamente (Sankar *et al.* 2014).

A día de hoy no se ha conseguido formular una hipótesis integradora que haya permitido el desarrollo de terapias efectivas. Las hipótesis que más respaldo científico presentan son la de proteínas tau, la de cascada amiloide y la colinérgica.

- La hipótesis tau afirma que la hiperfosforilación de las proteínas tau da lugar a la formación de los ovillos neurofibrilares característicos de la EA (Köpke *et al.* 1993), afectando al mantenimiento de la morfología, transporte axonal, disfunción sináptica y neurodegeneración (Roy *et al.* 2005).
- La hipótesis de la cascada amiloide explica la degeneración ocurrida en la EA por la acumulación anómala de placas de beta amiloides en diferentes zonas del cerebro. Dicha acumulación activaría una cascada que daría lugar a lesiones neuríticas, ovillos neurofibrilares vía proteínas tau, disfunción neuronal y muerte celular (Hardy y Higgins 1992).
- La hipótesis colinérgica establece que la causa de la EA es una reducción en los niveles de síntesis o disponibilidad de acetilcolina (neurotransmisor del sistema colinérgico). Es la hipótesis en la que se basan la mayoría de los tratamientos disponibles actualmente, y la que se ha tenido en cuenta para la realización de este trabajo de investigación.

En los pacientes de la EA se ha observado una disminución en la actividad de la acetilcolintransferasa y de acetilcolinesterasa en la corteza cerebral y en hipocampo, así como defectos en su transporte (Whitehouse *et al.* 1981). También se ha observado una menor síntesis y liberación de acetilcolina, así como niveles más bajos de absorción de colina. Estas observaciones permiten pensar que la degeneración de neuronas colinérgicas y la consiguiente pérdida de neurotransmisión colinérgica contribuyen de manera significativa al deterioro de la función cognitiva en pacientes de EA, ya que existe correlación entre el grado de degeneración observado en este tipo neuronal y el grado de demencia (Perry *et al.* 1978).

Durante las últimas dos décadas de investigación se han desarrollado diferentes estrategias, tales como inhibidores de acetilcolinesterasa, precursores de colina, y estimulación colinérgica presináptica y postsináptica mediante agonistas

muscarínicos y nicotínicos. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa han demostrado tener efectos beneficiosos en los síntomas cognitivos, funcionales y de comportamiento en la EA (Galimberti y Scarpini 2016).

Se desarrolló una segunda generación de inhibidores tales como donepezilo, rivastigmina y galantamina, que presentan menor número de efectos secundarios, vidas medias más largas y una mayor eficacia. Desafortunadamente, los ensayos clínicos basados en la administración a largo plazo de inhibidores de acetilcolinesterasa a pacientes con discapacidad cognitiva moderada no consiguieron reducir o retrasar la aparición de la EA, además de provocar efectos adversos a tener en cuenta (Contestabile 2010).

Por lo tanto, se hace imprescindible una investigación más exhaustiva con el objetivo de esclarecer los mecanismos subyacentes de la EA, así como modelos animales que simulen las características fisiopatológicas y de comportamiento observadas en humanos, y tratamientos eficaces que permitan predecirla, diagnosticarla y tratarla.

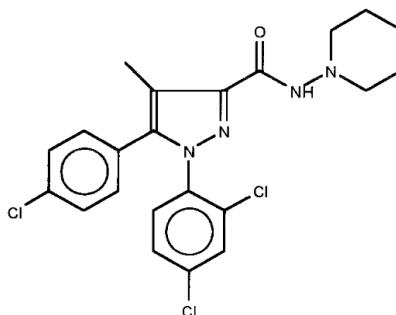
## **1.2. EL SISTEMA DE NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICO**

El sistema colinérgico está formado por las neuronas colinérgicas, que son capaces de sintetizar y liberar el neurotransmisor acetilcolina. La acetilcolina es sintetizada por la acetilcolintransferasa a partir de sus dos componentes (acetil-CoA y colina). Se almacena en vesículas en el terminal presináptico de las neuronas colinérgicas y es liberada tras la llegada del impulso nervioso. Una vez en la hendidura sináptica, la acetilcolina puede unirse a dos tipos de receptores: los receptores ionotrópicos nicotínicos y los receptores metabotrópicos muscarínicos. Los receptores nicotínicos están compuestos de cinco subunidades que dan lugar a una estructura similar a un canal iónico. Los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de receptores transmembrana acoplados a proteínas G. La degradación de la acetilcolina tiene lugar en el terminal postsináptico mediante la acetilcolinesterasa (Tata *et al.* 2014). El sistema colinérgico en las vías que parten del prosencéfalo basal modula los procesos de memoria y aprendizaje, aunque existen otros sistemas que afectan a dichos procesos.



### 1.3. EL SISTEMA DE NEUROTRANSMISIÓN CANNABINOIDE

El sistema de neurotransmisión cannabinoide está compuesto por dos tipos de receptores (CB1 y CB2), sus ligandos endógenos (siendo la anandamida y el 2-araquidonilglicerol los más estudiados) y los enzimas que los sintetizan y degradan (revisado en Lu y Mackie 2016). Los endocannabinoides son sintetizados a demanda a partir de distintas fosfolipasas. Los receptores CB1 y CB2 son receptores transmembrana acoplados a proteínas G de tipo inhibitorio. El receptor CB2 se expresa fundamentalmente en las células del sistema inmune, mientras que el CB1 lo hace tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Matías y Di Marzo 2007), expresándose en mayor medida en zonas como la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo caudado-putamen y el cerebelo. Puede ser agonizado y antagonizado por cannabinoides sintéticos. En esta investigación se hizo uso del compuesto SR141716A (**Fig. 2**), antagonista específico de los receptores CB1 (Rinaldi-Carmona *et al.* 1995).



**Figura 2. Estructura del antagonista específico SR141716A. Imagen extraída de Rinaldi-Carmona *et al.* (1995).**

### 1.4. INTERACCIÓN ENTRE LOS SISTEMAS CANNABINOIDE Y COLINÉRGICO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Hoy en día existe gran cantidad de literatura que afirma que los agonistas cannabinoides producen déficits potentes y específicos en la memoria de trabajo y a corto plazo en roedores, y se considera mediado por activación de receptores CB1 en regiones relacionadas con la memoria. Existen indicios de que podría ser debido a una reducción en la liberación de acetilcolina (hipofunción colinérgica). Lichtman y Martin (1996) demostraron que la administración de dosis altas de  $\Delta^9$ -THC provocaba un deterioro en la memoria de los roedores de manera dosisdependiente,

que fue revertido por el antagonista SR141716A (también de manera dosisdependiente). En este sentido, la administración crónica de dosis bajas de  $\Delta^9$ -THC fue capaz de revertir el deterioro cognitivo asociado a la edad en ratones de 12 y 18 meses (Bilkei-Gorzo *et al.* 2017). Además, se ha observado que dosis bajas de cannabinoides aumentan la liberación de acetilcolina. Acquas *et al.* (2000) demostraron que la administración de dosis bajas de los agonistas cannabinoides WIN 55,212.2 (10, 37,5, 75 y 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y HU210 (1 y 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) provocaban un aumento en la liberación de acetilcolina en dializados de córtex prefrontal e hipocampo. Asimismo, el aumento provocado por las concentraciones 150 y 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de WIN 55,212.2 y HU210 respectivamente era revertido mediante el compuesto SR141716A (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Existe gran controversia en relación al efecto que ejercen los cannabinoides sobre la memoria. En el experimento realizado por Terranova *et al.* (1996) una dosis de 1 mg/kg de SR141716A facilitaba la memoria olfativa a corto plazo, y era parcialmente revertido por escopolamina. Estos estudios apoyan la hipótesis de la existencia de la interacción entre ambos sistemas en el control de los procesos de memoria y aprendizaje.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como ya se ha descrito, el sistema colinérgico juega un papel determinante en los procesos de aprendizaje y memoria que se ven afectados en la EA. Diversos estudios relacionan alteraciones de la señalización de los endocannabinoides con dicho deterioro de las funciones cognitivas en la EA. Además se ha encontrado que los compuestos cannabinoides ejercen diferentes efectos, desde aumentar la liberación de acetilcolina hasta producir daños en la memoria y el aprendizaje dependiendo de la dosis, la posología, el test de comportamiento o la vía de administración utilizada.

Por todo ello, los **objetivos** de este estudio fueron:

- Validar un modelo experimental de lesión colinérgica en el prosencéfalo basal de rata que refleje los déficits de memoria y aprendizaje observados en los pacientes de EA.
- Evaluar el efecto del antagonista de receptores cannabinoides SR141716A a 0,5 mg/kg administrado intraperitonealmente (i.p.) en aprendizaje y memoria

mediante la utilización del test de laberinto de Barnes (LB) y la prueba de evitación pasiva (EP). Se analizará la posible capacidad del tratamiento de revertir los déficits cognitivos causados por la lesión.

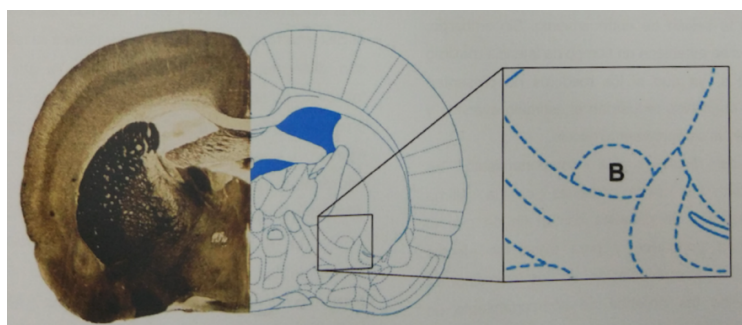
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. ANIMALES

El experimento se realizó en ratas macho de Sprague Dawley de aproximadamente 250 g de peso y 8 semanas de edad, las cuales disponían de comida y bebida *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados cumplían las directivas europeas (European animal research laws (Directive 2010/63/EU), así como españolas (Spanish National Guidelines for Animal Experimentation (RD 53/2013, Law 32/2007)). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la UPVEHU (CEEA 388/2014).

#### 3.2. LESIÓN CON 192IgG-SAPORINA

Las ratas se anestesiaron con una solución de ketamina a 90 mg/kg y xylacina a 10 mg/kg en dos tandas: subcutánea e intraperitoneal (50/50). Las operaciones se realizaron colocando los animales en un aparato estereotáxico que mantenía su cabeza en una posición fija. La toxina se inyectó en el NBM (**Fig. 3**). Tomando como punto de origen Bregma, se realizaron orificios en el cráneo (1,5 mm anteroposterior,  $\pm$  3 mm laterodorsal, - 8 mm ventral) mediante un trepanador acoplado a un micromotor de 0,5-1 mm de diámetro.



**Figura 3. Imagen esquemática representativa del lugar donde se realiza la lesión con 192IgG-Saporina. B: localización del núcleo basal de Meynert. Imagen extraída de Manuel I (2010). Tesis doctoral.**

A través de los agujeros se introdujo una microjeringa (Hamilton Co., Suiza) con un diámetro muy pequeño, para minimizar los daños que pudieran producirse al introducirla en el tejido. Las coordenadas utilizadas fueron calculadas con la ayuda del Atlas de Paxinos y Watson (2014). Empleando una bomba de infusión (SP100IZ Syringe Pump, WPI, EE.UU.) se introdujo en cada hemisferio 135 ng de toxina 192IgG-Saporina (SAP) disuelta en 1  $\mu\text{L}$  de líquido cefalorraquídeo (CSF), a una velocidad de 0,25  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La SAP se acopla a un anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor de factores de crecimiento neuronal de baja afinidad (p75). Este receptor abunda en la superficie de las neuronas colinérgicas del NBM, y la unión al receptor internaliza la toxina. Una vez dentro, la proteína produce la inactivación de los ribosomas, deteniendo la maquinaria de síntesis de proteínas y provocando la muerte celular (Wiley *et al.* 1991).

Posteriormente, se inyectaron 2,25 mg/kg de oxitetraciclina (antibiótico de amplio espectro) para evitar infecciones. Son necesarios 7 días para que la lesión se estabilice. Finalmente, se evaluó la capacidad de aprendizaje mediante el test de laberinto de Barnes y la prueba de evitación pasiva.

### **3.3. TEST DE LABERINTO DE BARNES (LB)**

El LB consiste en un plataforma circular blanca de 130 cm de diámetro que presenta 20 agujeros idénticos de 10 cm de diámetro y equidistantes entre sí (7,5 cm), situados a 4 cm del borde a una altura de 1 metro. A cada animal se le asignó un agujero determinado (diana). Dicho agujero será el único que permanezca abierto durante el experimento, bajo el cual se colocó un recipiente negro (caja de salida) donde entrará el animal. No se hizo uso de ningún procedimiento aversivo, salvo el empleo de iluminación mediante focos, valiéndose de la preferencia de las ratas por los lugares cerrados y oscuros. En cada una de las paredes de la habitación se colocó una figura con una forma geométrica diferente que el animal pudiera emplear como estímulo visual. Los ensayos se grabaron desde el punto de vista apical mediante una cámara conectada a un ordenador, empleando el programa Smart 3.0. Se contabilizó que el animal había encontrado su agujero una vez introducía la cabeza en él.



**Figura 4. Plataforma del laberinto de Barnes. En la imagen se aprecian los agujeros de escape, la caja de inicio y una cartulina para la orientación espacial del animal.**

### **3.3.1. Procedimiento**

#### **3.3.1.1. Habitación**

El primer contacto del animal con el laberinto de Barnes consistió en la habitación. Se colocó al animal en el centro del laberinto y se le permitió moverse libremente por la superficie. Al cabo de un tiempo, se le guió de manera tranquila hacia su agujero correspondiente.

#### **3.3.1.2. Entrenamientos**

Para llevar a cabo los entrenamientos (E) se colocó al animal en el centro del laberinto tapado con un recipiente opaco (caja de inicio) durante 1 minuto. Se levantó la caja de inicio y el investigador se alejó para no interferir. Se detuvo el entrenamiento cuando la rata encontró su agujero diana. El animal se dejó durante otro minuto en la caja de salida, tras lo cual se le depositó cuidadosamente en su jaula. El tiempo de corte fue de 180 segundos, de manera que si el animal no fue capaz de encontrar su agujero en dicho tiempo límite se consideró que no había entrado. Una vez finalizado cada intento, se limpiaron minuciosamente la superficie del LB y los compartimentos con una solución de alcohol al 10 % para disipar cualquier olor remanente que pudiera ser detectado por otras ratas y alterar los resultados. El aprendizaje consistió en cuatro entrenamientos cada día (separados 15

minutos entre sí) durante cuatro días. En esta fase del aprendizaje se evaluó el tiempo empleado por cada animal en encontrar su agujero diana. Latencia (s).

### 3.3.1.3. Prueba

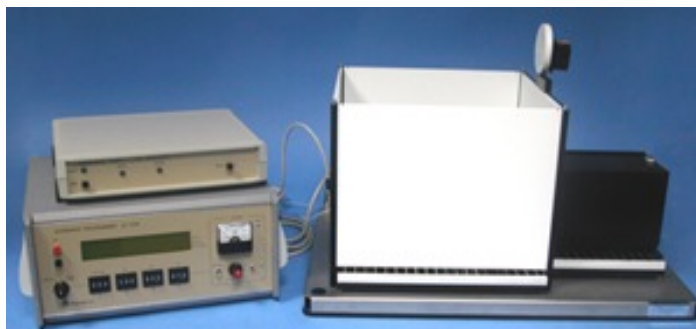
El quinto día se realizó la prueba, que consistió en dejar al animal durante 180 segundos encima del laberinto. En esta fase todos los agujeros permanecerán cerrados. Para el análisis de datos el LB se dividió en cuatro cuadrantes: diana, positivo, negativo y opuesto (**Fig. 5**). El día de la prueba se midió el tiempo que el animal pasa en el cuadrante diana. Tiempo en cuadrante (s).



**Figura 5. División en cuadrantes del tablero del laberinto de Barnes para el análisis de datos en la prueba de aprendizaje.**

### 3.4. PRUEBA DE EVITACIÓN PASIVA (EP)

El aparato de EP (Panlab, S.L., España) consiste en dos compartimentos de diferente tamaño y color unidos por una puerta de tipo guillotina (**Fig. 6**). El compartimento de mayor tamaño tiene unas dimensiones de 31x31x24 cm, mientras que el de menor tamaño de 19,5x10,8x12 cm. El suelo de este aparato está constituido por barras de metal capaces de conducir la electricidad.



**Figura 6. Aparato para la realización del test de evitación pasiva. Pueden apreciarse los dos compartimentos, así como el dispositivo de control y el encargado de suministrar la descarga eléctrica. Imagen extraída de Manuel I (2010). Tesis doctoral.**

### **3.4.1. Procedimiento**

La prueba cognitiva constó de una sesión de entrenamiento y de la prueba de retención 24 horas después.

#### **3.4.1.1. Entrenamiento**

El animal se colocó en el compartimento de color blanco permitiendo que lo inspeccionara. A los 30 segundos, se abrió la puerta y el animal pasó al compartimento oscuro, ya que los roedores tienen preferencia por los lugares oscuros y cerrados. El paso del animal al compartimento oscuro provocó el cierre de la puerta de entrada y que la rata recibiera un estímulo aversivo a modo de leve descarga eléctrica en las patas (0,4 mA, 2 s). Después de 10 segundos, se retiró al animal de este compartimento y se depositó en su jaula.

#### **3.4.1.2. Prueba**

Se siguió el mismo protocolo que en la sesión de entrenamiento, estableciéndose un tiempo de latencia máximo de 300 s, de manera que si el animal no entró al compartimento oscuro en dicho tiempo límite se consideró que recordaba el estímulo aversivo. En la prueba se evaluó el denominado porcentaje de supervivencia; este parámetro nos indica el porcentaje de ratas que recuerda el estímulo aversivo.

### 3.5. PAUTA DE TRATAMIENTO

#### 3.5.1 Grupos de tratamiento

Los animales empleados en la investigación se dividieron en tres grupos (n=9): control (C), lesionado (L) y lesionado tratado (LT). Durante la operación, al grupo control se le administró CSF, mientras que a los dos grupos restantes se les administró la toxina SAP. Además, a los animales del grupo lesionado tratado se les realizó un tratamiento con 5 dosis del antagonista cannabinoide del receptor CB1, SR141716A, una hora antes de cada entrenamiento del LB. La administración se realizó i.p. a una concentración de 0,5 mg/kg en 5 mL/kg disuelto en Kolliphor:DMSO:salino 1:1:18 de vehículo. Al grupo control y al grupo lesionado no se les administró vehículo, ya que en experimentos anteriores realizados por este grupo de investigación se comprobó que no presenta ningún efecto.

	Día 0	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
<b>C</b>	Operación (CSF)	E1 E2 E3 E4	E5 E6 E7 E8	E9 E10 E11 E12	E13 E14 E15 E16	Prueba LB Entrenamiento EP	Prueba EP
<b>L</b>	Operación (SAP)	E1 E2 E3 E4	E5 E6 E7 E8	E9 E10 E11 E12	E13 E14 E15 E16	Prueba LB Entrenamiento EP	Prueba EP
<b>LT</b>	Operación (SAP)	Administración SR141716A E1 E2 E3 E4	Administración SR141716A E5 E6 E7 E8	Administración SR141716A E9 E10 E11 E12	Administración SR141716A E13 E14 E15 E16	Administración SR141716A Prueba LB Entrenamiento EP	Administración SR141716A Prueba EP

Figura 7. Pautas de tratamiento de los diferentes grupos. E: entrenamiento. C: grupo control. L: grupo lesionado. LT: grupo lesionado tratado. CSF: líquido cefalorraquídeo. SAP: toxina <sup>192</sup>IgG-Saporina. LB: laberinto de Barnes. EP: prueba de evitación pasiva.



### 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los animales se grabaron empleando el software Smart 3.0 desarrollado por la compañía Harvard Apparatus. Tras comprobar que los datos extraídos del estudio seguían una distribución normal, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Una vez comprobado que los datos eran paramétricos, se llevó a cabo el postest Bonferroni, que permite realizar comparaciones entre medias de diferentes grupos. En el caso del test de evitación pasiva, el test llevado a cabo fue el Log rank (Mantel-Cox), que permite contrastar las funciones de supervivencia de dos poblaciones distintas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. LATENCIA DE LOS ENTRENAMIENTOS

Como se ha comentado en el LB, se midió el tiempo que requiere cada animal para encontrar su agujero diana con el objetivo de evaluar la memoria de trabajo y la memoria espacial.

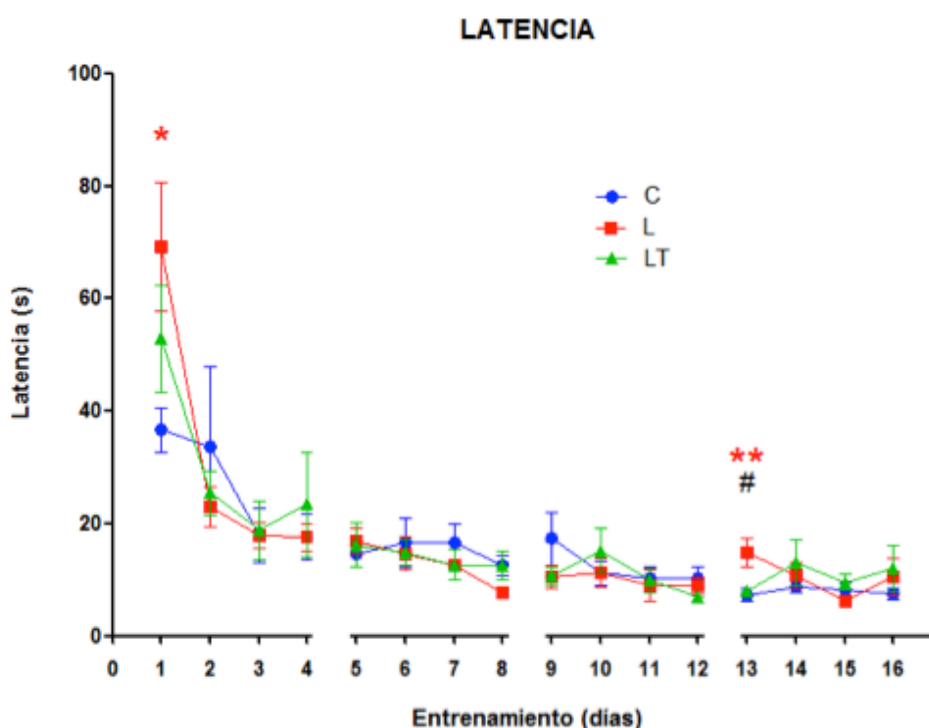
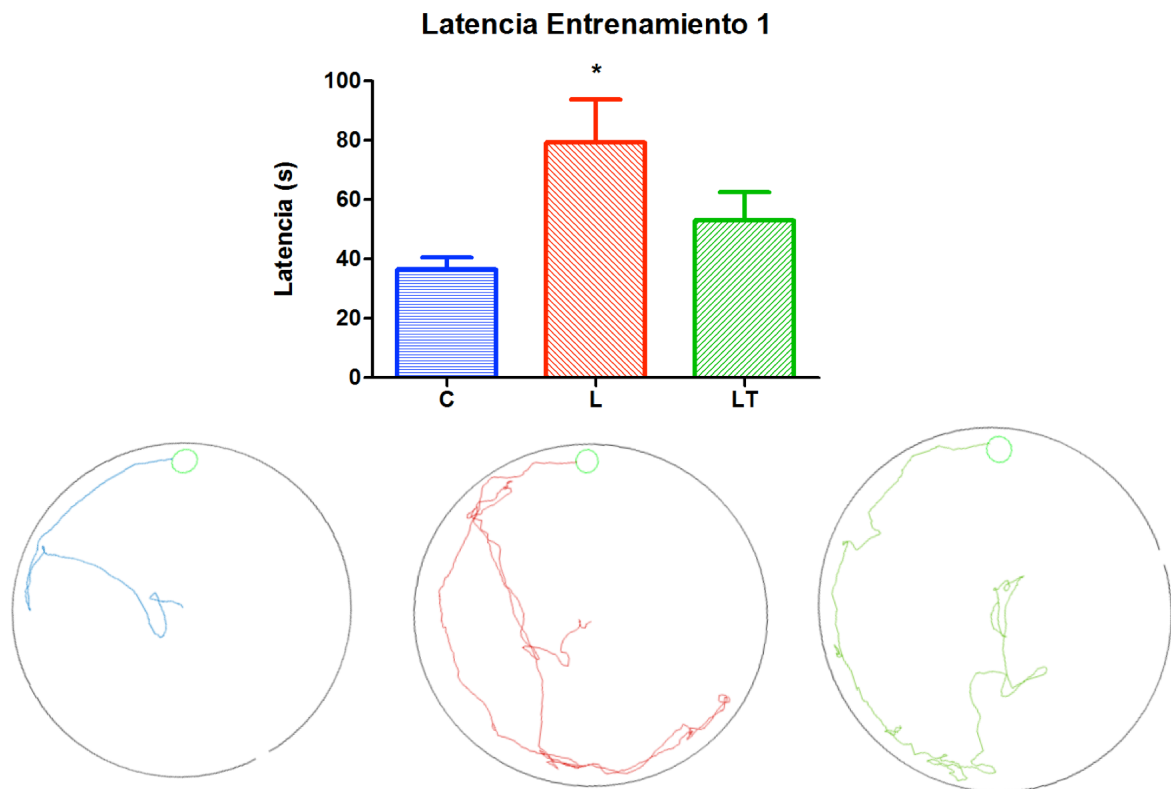


Figura 8. Representación gráfica del tiempo medio empleado (en segundos) por los distintos grupos en encontrar su agujero diana a lo largo de los 16 entrenamientos durante 4 días. C: control. L: lesionada. LT: lesionada tratada. \*: control vs lesionada. #: lesionada vs lesionada tratada. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ .

#### 4.2. LATENCIA DEL ENTRENAMIENTO 1

El Entrenamiento 1 (Fig. 9) muestra diferentes comportamientos con respecto a la primera exposición al test. Las ratas control tardan  $36,6 \pm 3,9$  s en encontrar la diana, de manera que recuerdan la habituación recibida. Por el contrario, las ratas lesionadas requieren un tiempo de  $79,4 \pm 14,3$  s, lo que indica que no recuerdan la habituación. En el caso de las lesionadas tratadas el tratamiento conlleva una ligera recuperación del déficit observado en el comportamiento de las lesionadas ( $52,9 \pm 9,6$  s), ya que la diferencia deja de ser significativa.

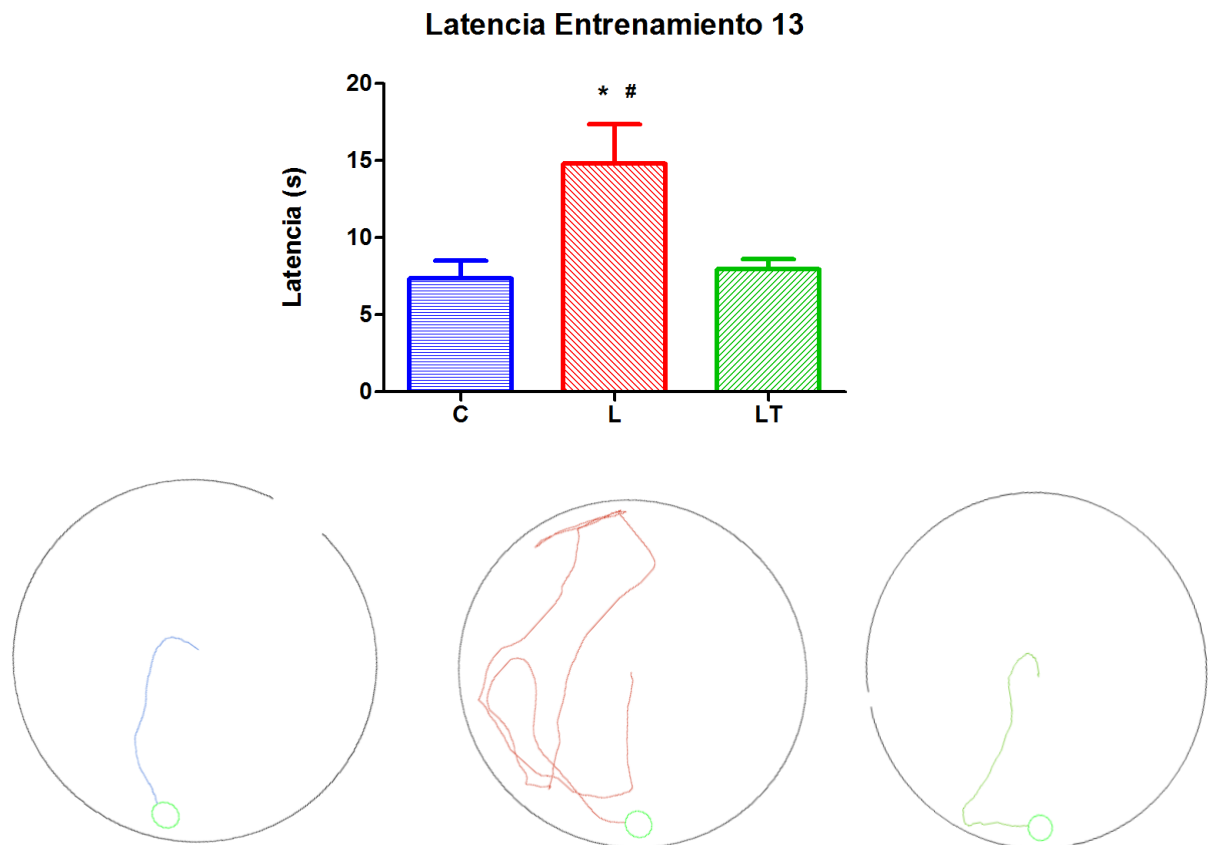


**Figura 9.** Arriba: tiempo empleado (en segundos) por los distintos grupos en el Entrenamiento 1 en encontrar el agujero diana. C: control. L: lesionada. LT: lesionada tratada. \*: control vs lesionada. \* $p < 0,05$ . Abajo: trayectoria descrita hasta encontrar el agujero diana por un sujeto representativo de cada grupo. Azul: control. Rojo: lesionada. Verde: lesionada tratada.

#### 4.3. LATENCIA DEL ENTRENAMIENTO 13

En el caso del E13, el tiempo requerido por las ratas control fue  $7,4 \pm 1,1$  s, de manera que recuerdan los entrenamientos. Las ratas lesionadas necesitaron  $14,8 \pm 2,6$  s en encontrar la diana, por lo que el efecto de los 12 entrenamientos previos en la

memoria de este grupo no fue tan satisfactorio como para el grupo control. Las ratas lesionadas tratadas tardaron  $8 \pm 0,6$  s, de manera que recordaron la posición de su agujero diana. Por tanto, en el E13 el tratamiento fue capaz de revertir el déficit cognitivo producido por la lesión. Las trayectorias descritas por los tres grupos fueron más directas que las observadas en el E1, de manera que las ratas recordaron lo aprendido en los entrenamientos (memoria de trabajo).



**Figura 10.** Arriba: tiempo empleado (en segundos) por los distintos grupos en el Entrenamiento 13 en encontrar el agujero diana. C: control. L: lesionada. LT: lesionada tratada. \*: control vs lesionada. #: lesionada vs lesionada tratada. \* $p < 0,05$ , # $p < 0,05$ . Abajo: trayectoria descrita hasta encontrar el agujero diana por un sujeto representativo de cada grupo. Azul: control. Rojo: lesionada. Verde: lesionada tratada.

#### 4.4. PRUEBA DEL LABERINTO DE BARNES

En la prueba del laberinto de Barnes se midió el tiempo que los animales pasaban en cada uno de los cuadrantes (**Fig. 5**) para analizar su memoria tras los entrenamientos. El grupo control pasó  $89,1 \pm 6,7$  s sobre el cuadrante diana, por lo que recuerdan la posición de su agujero, mientras que el grupo lesionado no fue capaz ( $45,4 \pm 6,6$  s). Las ratas lesionadas tratadas estuvieron  $65,2 \pm 3,7$  s sobre el cuadrante diana. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias significativas entre el grupo control y lesionado, así como entre el control y el lesionado tratado. A pesar de que el tratamiento no fue capaz de revertir en su totalidad los efectos negativos producidos por la lesión, sí provocó una tendencia a la mejora, indicando un ligero efecto del tratamiento sobre la memoria en el test de LB.

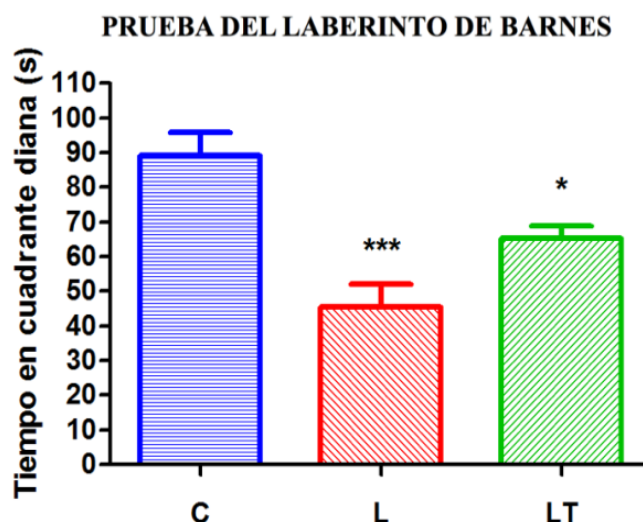
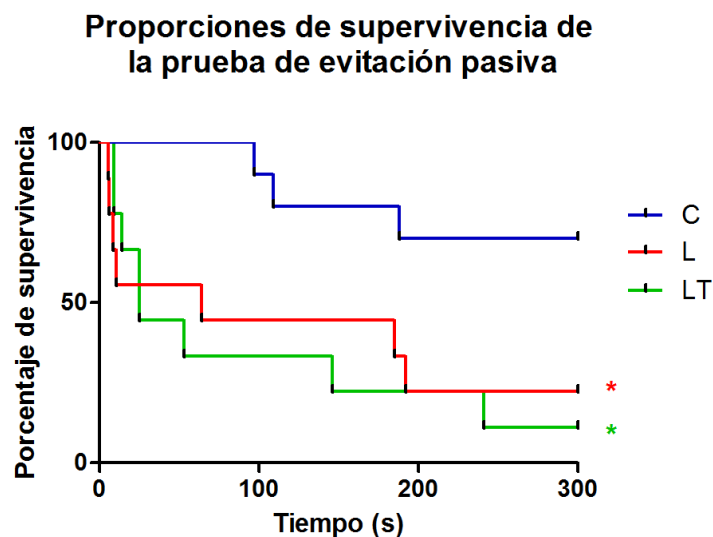


Figura 11. Tiempo dedicado (en segundos) por los distintos grupos en el cuadrante diana durante la prueba del laberinto de Barnes. C: control. L: lesionada. LT: lesionada tratada. \*\*\*: control vs lesionada. \*: control vs lesionada tratada. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.5. PRUEBA DE EVITACIÓN PASIVA

En la prueba de evitación pasiva se analizó el porcentaje de animales que recordó el estímulo aversivo. Para ello se contabilizó el número de ratas que accedieron al compartimento oscuro, indicativo de déficit de memoria al no recordar dicho estímulo.

Durante la prueba de evitación pasiva (**Fig. 12**), el 77 % de los controles; el 22 % de lesionados; y el 11 % de lesionados tratados no entró al compartimento oscuro. En este caso, el tratamiento con SR141716A no provocó una tendencia a mejorar el déficit producido por la lesión, a diferencia lo observado en el LB.



**Figura 12.** Representación de la curva de supervivencia de la prueba de evitación pasiva. C: control. L: lesionada. LT: lesionada tratada. \*(rojo): control vs lesionada. \*(verde): control vs lesionada tratada. \* $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSIÓN

La existencia de la hipersensibilidad del sistema cannabinoide en pacientes con EA (Manuel *et al.* 2014), además de lo descrito en trabajos previos, llevó a la hipótesis de que usar un antagonista cannabinoide podría utilizarse como tratamiento para la mejora de la memoria. En el presente estudio se ha evaluado el efecto del antagonista cannabinoide, SR141716A, sobre la memoria y el aprendizaje de ratas lesionadas mediante la toxina 192IgG-saporina como modelos de simulación de los efectos de déficit cognitivo observados en pacientes de EA. La administración del SR141716A parece producir una reversión del déficit mostrado por las ratas lesionadas en los resultados obtenidos en el test de comportamiento del laberinto de Barnes, pero no en el de evitación pasiva.

El primer resultado significativo se encuentra en la latencia del E1. El mayor tiempo requerido por los animales lesionados podría deberse a un estado de ansiedad

provocado por la muerte de las neuronas colinérgicas y el proceso de la operación. Harkany *et al.* (2001) lesionaron las neuronas colinérgicas del NBM de ratas y observaron niveles de ansiedad aparente mayores que las ratas control. Además, la operación sin administración de la toxina también causó niveles de comportamiento tipo ansioso, aunque no de manera significativa. Navarro *et al.* (1997) observaron niveles de comportamiento ansioso superiores en ratas tras la administración de dosis altas de SR141716A. Por lo tanto, como existe una dosisdependencia en los efectos de la administración de antagonistas cannabinoideos (Tzavara *et al.* 2003), el efecto ansiolítico provocado por nuestro tratamiento podría deberse al empleo de dosis bajas.

El comportamiento observado en el E13 demuestra que las ratas lesionadas presentan un déficit cognitivo, por lo que se infiere que no han sido capaces de retener la memoria de trabajo durante los entrenamientos. El tratamiento realizado con el antagonista cannabinoide consigue que una rata lesionada se comporte aparentemente como una rata control. Este hecho podría ser debido a que el SR141716A podría tener la capacidad de producir mejoras en la memoria de ratas. En el experimento realizado por Terranova *et al.* (1996), la inyección subcutánea de 1 mg/kg de SR141716A produjo mejoras en la memoria a corto plazo. Lichtman (2000) observó que la administración i.p. de SR141716A veinte minutos antes de los entrenamientos reducía el número de errores cometidos por los animales. Estos resultados contrastan con otros estudios en la literatura. Wolff y Leander (2003) observaron una mejora al administrar el SR141716A después de la prueba, y Takahashi *et al.* (2005) al suministrarlo tras los entrenamientos. Por lo tanto, la posología parece tener un papel decisivo en los resultados. En otro experimento de dicha investigación, el grupo de Takahashi realizó un modelo de bloqueo farmacológico muscarínico con escopolamina (1 mg/kg), que en estudios previos produjo déficit de memoria en el test de laberinto elevado (ETM) (De-mello y Carobrez, 2002). La administración de SR141716A (1 mg/kg) veinte minutos antes de los entrenamientos produjo una reversión total de dicho deterioro cognitivo, por lo que parece ser primordial que exista un bloqueo colinérgico para que se produzcan mejoras. Estos resultados apoyan los obtenidos en nuestra investigación.

No obstante, también existen investigaciones donde el SR141716A produjo déficits en la memoria, o no tuvo efecto alguno. En el experimento llevado a cabo por Robinson *et al.* (2007), la administración intraperitoneal de SR141716A (3 mg/kg) treinta minutos antes de los entrenamientos provocó un empeoramiento del aprendizaje espacial en los animales. Sin embargo, este deterioro era inhibido cuando los animales recibían un preentrenamiento, de modo similar al realizado en el presente trabajo. Las diferencias en los resultados obtenidos podrían deberse a la utilización de un test de comportamiento diferente (laberinto de Morris). Dicho test provocaría unos niveles de ansiedad en los animales mayores a los esperados en el laberinto de Barnes, pudiendo influir en los resultados obtenidos.

Una posible explicación de la mejora provocada por el SR141716A en el E13 podría ser un aumento de ACh ocasionada por el bloqueo de los receptores cannabinoides de tipo 1 (CB1). En la literatura se pueden encontrar artículos que respaldan un aumento en la liberación de ACh a causa del SR141716A, que podría facilitar las sinapsis neuronales y ser la causa de las mejoras en la memoria y el aprendizaje. En el experimento realizado por Gifford y Ashby (1996), el SR141716A duplicaba los niveles de ACh liberada por estimulación eléctrica en muestras de hipocampo. Asimismo, la administración intraperitoneal de SR141716A a 1 y 3 mg/kg se había descrito que aumentaba la liberación de ACh en el hipocampo, aunque no a 0,1 mg/kg (Gessa *et al.* 1998). También se había comprobado que existía una relación dosisdependiente entre la cantidad de SR141716A administrado y el aumento en la liberación de ACh (Degroot *et al.* 2006).

En los resultados anteriores se analizaba la memoria asociada a los procesos de aprendizaje. A continuación se examinará la memoria a largo plazo en la prueba del LB. Las ratas control pasan la mayor parte del tiempo sobre el cuadrante diana, lo cual demuestra que recuerdan correctamente la posición de su agujero. Por el contrario, las ratas lesionadas no son capaces de recordar los entrenamientos previos, mostrando un déficit cognitivo en la memoria a largo plazo. En el caso de las ratas lesionadas tratadas, el tratamiento no es capaz de revertir en su totalidad los efectos cognitivos producidos por la lesión, pero se observa una tendencia a mejorar. El comportamiento de los grupos control y lesionado tratado fue diferente durante la prueba. En el caso de los controles, las ratas permanecían en la posición donde

recordaban su agujero, a pesar de que éste estaba cerrado. Las ratas lesionadas tratadas se dirigían hacia su agujero, pero al no encontrarlo seguían buscando. Esta falta de insistencia de las ratas lesionadas tratadas podría deberse a una habituación al proceso del LB. La memoria a largo plazo no asociativa se refiere al comportamiento aprendido por exposición repetida a un estímulo (revisado en Camina y Güell 2017). La repetición de un estímulo puede conllevar una reducción en la respuesta a dicho estímulo, conocida como habituación. La habituación puede deberse a un proceso de depresión sináptica como resultado de una activación repetida, pudiendo estar causado por la administración del SR141716A.

Los resultados refutan la hipótesis de que la administración del SR141716A produce una reversión de los efectos de la toxina. Aunque el tratamiento no consigue retornar hasta los niveles del grupo control, existe una leve mejora en las ratas lesionadas.

La prueba de EP evalúa la memoria asociada a un estímulo aversivo. Una rata no manipulada recuerda dicho estímulo y no atraviesa la compuerta. En el caso de las ratas control, el 77 % no entró al compartimento pequeño. Podría esperarse que ninguna de ellas lo hiciera, al no haberles provocado un deterioro cognitivo. Sin embargo, aunque se les administró CSF (que no produce muerte celular), la operación y la inserción de la aguja en el cerebro podría explicar esos déficits cognitivos en las ratas control en comparación con ratas no manipuladas.

Las ratas lesionadas no recuerdan el estímulo aversivo al que fueron sometidas el día anterior y cruzan la compuerta. En este caso, el tratamiento con SR141716A no produjo ningún efecto. Las diferencias entre los mecanismos subyacentes de almacenamiento de la memoria asociativa y la memoria de trabajo podrían explicar la ausencia de mejora en la realización de esta prueba.

## **5.1. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

Los resultados obtenidos en este estudio deben corroborarse con nuevos resultados experimentales. Se ha conseguido un modelo animal que refleja algunos de los comportamientos de aprendizaje y memoria observados en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Además, se han obtenido indicios de posibles efectos positivos en la memoria y el aprendizaje de las ratas lesionadas a causa de la administración de SR141716A.



No cabe duda de que aún hacen falta un gran número de estudios para esclarecer los mecanismos subyacentes de las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer. Sin embargo, la modulación del sistema cannabinoide es una posible diana terapéutica para la obtención de tratamientos que logren al menos retrasar el deterioro cognitivo característico de esta enfermedad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Acquas E, Pisanu A, Marrocu P, Di Chiara G (2000). Cannabinoid CB1 receptor agonists increase rat cortical and hippocampal acetylcholine release in vivo. *Eur J Pharmacol* 401:179–185.
- [2] Barage SH, Sonawane KD (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015 Aug;52:1-18.
- [3] Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A, Michel K, Piyanova A, Oppenheimer H, Dvir-Ginzberg M, Rácz I, Ulas T, Imbeault S, Bab I, Schultze JL, Zimmer A (2017). A chronic low dose of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat Med*. 2017 Jun;23(6):782-787.
- [4] Braak H, Rüb U, Schultz C, Del Tredici K (2006). Vulnerability of cortical neurons to Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(3 Suppl):35-44.
- [5] Camina E, Güell F (2017). The Neuroanatomical, Neurophysiological and Psychological Basis of Memory: Current Models and Their Origins. *Front Pharmacol*. 2017 Jun 30;8:438.
- [6] Contestabile, A (2011). The history of the cholinergic hypothesis. *Behav. Brain Res*. 221, 334–340.
- [7] Degroot A, Köfalvi A, Wade RM, Davis RJ, Rodrigues RJ, Rebola N, Cunha RA, Nomikos GG (2006). CB1 receptor antagonism increases hippocampal acetylcholine release: site and mechanism of action. *Mol. Pharmacol*. 70, 1236–1245 (2006).
- [8] Everitt BJ, Robbin TW (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annu. Rev. Psychol*. 48, 649–684.
- [9] Galimberti D, Scarpini E (2016). Old and new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Expert Opin. Investig. Drugs* (2016) 1–7.

- [10] Gessa GL, Casu MA, Carta G, Mascia MS (1998). Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR141716A. *European Journal of Pharmacology* 355 (2–3), 119–124.
- [11] Gifford AN, Ashby Jr CR (1996). Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR141716A. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1431–1436.
- [12] Hardy JA, Higgins GA (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- [13] Harkany T, O'Mahony S, Keijser J, Kelly JP, Kónya C, Borostyánkői ZA, Gorcs TJ, Zarándi M, Penke B, Leonard BE, Luiten PGM (2001).  $\beta$ -Amyloid Induced Cholinergic Lesions in Rat Nucleus Basalis Bidirectionally Modulate Serotonergic Innervation of the Basal Forebrain and Cerebral Cortex. *Neurobiology of Disease* 8, 667–678 (2001).
- [14] Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993). Microtubule associated protein tau: abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 1993;268:24 374–24 384.
- [15] Lambert JC *et al.* (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1094-9.
- [16] Lichtman AH (2000). SR141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. *Eur. Jour. of Pharmacology* 404 (2000). 175–179.
- [17] Lichtman AH, Martin BR (1996).  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology* (1996) 126:125-131.
- [18] Lu HC, Mackie K (2016). An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol Psychiatry.* 2016 April 1; 79(7): 516–525.
- [19] Lun liu AK, Chan RCC, Pearce RKB, Gentleman SM (2015). Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* (2015) 129:527–540.
- [20] Manuel I (2010). Tesis doctoral: Receptores muscarínicos, galaninérgicos y cannabinoides en la enfermedad de Alzheimer. (UPV/EHU). 2010.

- [21] Manuel I, González de San Román E, Giralt MT, Ferrer I, Rodríguez-Puertas R (2014). Type-1 cannabinoid receptor activity during Alzheimer's disease progression. *J Alzheimers Dis.* 2014;42(3):761-6.
- [22] Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015 Oct 15;1:15056.
- [23] Matias I, Di Marzo V (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab.* 2007 Jan-Feb;18(1):27-37.
- [24] Mechoulam R, Parker LA (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol.* 2013;64:21-47.
- [25] Navarro M, Hernández E, Muñoz RM, Del Arco I, Villanúa MA, Carrera MR, Rodríguez de Fonseca F (1997). Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport.* 1997 Jan 20;8(2):491-6.
- [26] Paxinos G, Watson W (2014). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th ed. Academic Press.
- [27] Pepeu G, Grossi C, Casamenti F (2016). The Brain Cholinergic System in Neurodegenerative Diseases. *Annual Research & Review in Biology* 6(1):1-19, 2015.
- [28] Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British Medical Journal*, 1978, 2, 1457-145.
- [29] Pertwee RG (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sciences* 76 (2005) 1307–1324.
- [30] Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur G (1994). SR1417 16A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Letters* 350 (1994) 240-244.
- [31] Robinson L, McKillop-Smith S, Ross NL, Pertwee RG, Hampson RE, Platt B, Riedel G (2008). Hippocampal endocannabinoids inhibit spatial learning and limit spatial memory in rats. *Psychopharmacology* (2008) 198:551–563.

- [32] Roy S, Zhang B, Lee VM, Trojanowski JQ (2005). Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 2005 Jan;109(1):5-13.
- [33] Sankar T, Lipsman N, Lozano AM (2014). Deep brain stimulation for disorders of memory and cognition. *Neurotherapeutics.* 2014 Jul;11(3):527-34.
- [34] Sarter M, Hasselmo ME, Bruno JP, Givens B (2005). Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005 Feb;48(1):98-111.
- [35] Takahashi RN, Pamplona FA, Fernandes MS (2005). The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett.* 2005 Jun 3;380(3):270-5.
- [36] Tata AM, Velluto L, D'Angelo C, Reale M (2014). Cholinergic system dysfunction and neurodegenerative diseases: cause or effect? *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014;13(7):1294-303.
- [37] Terranova JP, Storme JJ, Lafon N, Péfio A, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Soubrié P (1996). Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology (Berl).* 1996 Jul;126(2):165-72.
- [38] Tzavara ET, Wade M, Nomikos GG (2003). Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *J Neurosci.* 2003 Oct 15;23(28):9374-84.
- [39] Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR (1981). Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol.* 1981 Aug;10(2):122-6.
- [40] Wiley RG, Oeltmann TN, Lappi DA (1991). Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. *Brain Res.* 1991 Oct 18;562(1):149-53.
- [41] Wolff MC, Leander JD (2003). SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. *Eur J Pharmacol.* 2003 Sep 23;477(3):213-7.

## **7. ANEXOS**

### **7.1. ABREVIATURAS EMPLEADAS**

ACh = Acetilcolina.

C = Rata Control.

CSF = Líquido cefalorraquídeo.

EA = Enfermedad de Alzheimer.

EP = Prueba de evitación pasiva.

ETM = Test de laberinto elevado.

i.p.= Vía intraperitoneal.

L = Rata lesionada con saporina.

LB = Laberinto de Barnes.

LT = Rata lesionada con saporina tratada con SR141716A.

NBM = Núcleo basal de Meynert.

SAP = 192IgG-Saporina.