

# El sistema cannabinoide y su importancia en el período perinatal

J.A. Martínez Orgado<sup>a</sup>, D. Fernández López<sup>b</sup>, B. Bonet Serra<sup>a</sup>,  
I. Lizasoain Hernández<sup>b</sup> y J. Romero Paredes<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Área de Pediatría y Neonatología, Fundación Hospital Alcorcón.

<sup>b</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense.

<sup>c</sup>Laboratorio de Apoyo a la Investigación. Fundación Hospital Alcorcón. Madrid. España.

El cannabinoide es un sistema de reciente descubrimiento, constituido por unos ligandos endógenos, que mayoritariamente derivan del ácido araquidónico, y sus receptores específicos. Los endocannabinoides participan en la regulación de la transmisión sináptica, mediante la cual ejercen sus efectos psicoactivos, motores y anticonceptivos, entre otros; asimismo desarrollan efectos extraneurales, especialmente inmunomodulación y vasodilatación. Los descubrimientos recientes apuntan a un papel relevante de este sistema en la ontogenia del ser humano, postulándose una participación destacada en la implantación y desarrollo inicial del embrión, en el desarrollo cerebral fetal, y en el inicio de la lactancia tras el nacimiento. Asimismo, sus efectos vasodilatadores e inhibidores de la liberación de aminoácidos excitotóxicos y de citocinas, así como moduladores del estrés oxidativo y de la producción tóxica de óxido nítrico, justifican la creciente evidencia de un posible papel neuroprotector de los cannabinoides en la asfixia perinatal.

## Palabras clave:

*Cannabinoides. Recién nacido. Desarrollo. Neuroprotección.*

## THE CANNABINOID SYSTEM AND ITS IMPORTANCE IN THE PERINATAL PERIOD

The cannabinoid system has been recently described, including the endogenous ligands, mainly arachidonic acid derivatives, and their specific receptors. Endocannabinoids are involved in the modulation of synaptic transmission, through which they exert their psychoactive, motor and antinociceptive effects, among others; they also exert extraneural effects, mainly immunomodulation and vasodilation. Recent data suggest that the

cannabinoid system might play an important role in human ontogeny and could participate in the implantation and early development of the embryo, in fetal brain development, and in the beginning of breast feeding after birth. In addition, the vasodilatory effect of cannabinoids, together with inhibition of the release of excitotoxic amino acids and cytokines, as well as modulation of oxidative stress and the toxic production of nitric oxide, justify the growing evidence pointing to a possible neuroprotective effect of cannabinoids in perinatal asphyxia.

## Key words:

*Cannabinoids. Newborn. Development. Neuroprotection.*

## INTRODUCCIÓN

Los primeros registros sobre el uso terapéutico o recreativo del consumo de cannabis aparecen ya en los vedas hindúes, y en textos chinos o árabes de hace más de mil años<sup>1-4</sup>. Existen datos sobre el uso de derivados del cannabis hasta el siglo XIX en Europa, con pacientes tan ilustres como la reina Victoria del Imperio Británico, quien los empleaba para aliviar sus migrañas y la dismenorrea. Incluso existen referencias de preparados a la venta en Estados Unidos a finales de ese siglo, que incluían derivados del cannabis para el tratamiento de los cólicos del lactante. A partir de la Primera Guerra Mundial, y en gran medida ante la alarma generada por la proliferación de morfomanos, su uso empezó a ser cuestionado, hasta que en 1924 el cannabis fue declarado narcótico en la Conferencia Internacional sobre Opiáceos, y su tráfico perseguido; en 1941 se retiró de la farmacopea norteamericana y, en 1971, la División de Narcóticos de la Or-

**Correspondencia:** Dr. J.A. Martínez Orgado.  
Área de Pediatría y Neonatología.  
Fundación Hospital Alcorcón.  
Budapest, 1. 28922 Alcorcón. Madrid. España.  
Correo electrónico: jamartinezo@fhacorcon.es

Recibido en mayo de 2005.

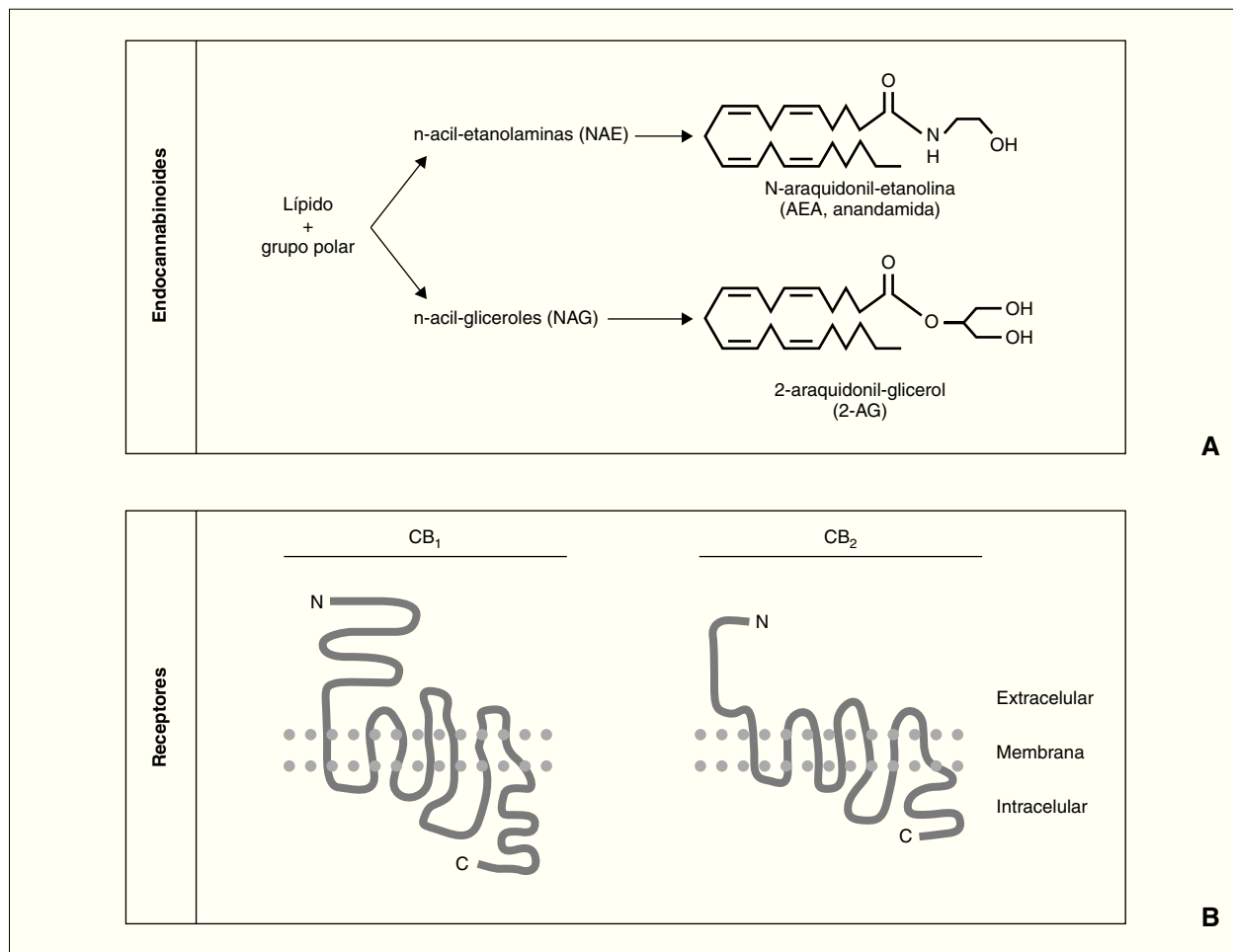
Aceptado para su publicación en mayo de 2005.

ganización de la Naciones Unidas (ONU) lo declara sustancia con alto potencial de abuso, y sin efecto terapéutico; actualmente este último concepto está siendo sometido a revisión<sup>4</sup>.

Paralelamente, la búsqueda del responsable de los efectos psicoactivos clásicos del cannabis (euforia, relajación, hipotermia, taquicardia refleja) permitió en los años sesenta que Mechoulam y Gaoni descubrieran el principio activo, un derivado del benzopireno denominado  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC)<sup>5</sup>. Esta sustancia se aisló en la resina amarillenta que cubre las hojas, pero sobre todo la inflorescencia de la planta hembra; posteriormente se han ido describiendo varios compuestos con actividad similar al THC, que iniciaron la familia de los llamados cannabinoide<sup>1-3</sup>. Como en el caso de los opioides, el aislamiento de una molécula foránea con efectos en nuestro cerebro orientó a la búsqueda de los posibles receptores sobre los que actuaría dicha sustancia. Tras demostrarse su existencia en los años ochenta, en los años noventa se consiguió describir la estructura de un receptor, vinculado a pro-

teínas G, específico para cannabinoide, denominado CB1<sup>6</sup> (fig. 1). Este receptor es el más abundante y ubicuo de los de su tipo presentes en el sistema nervioso central (SNC), con una densidad similar a la de los receptores de GABA o glutamato<sup>7</sup>. Tres años después se consiguió describir la existencia de un segundo receptor, llamado CB2 (de distribución preferentemente extraneural, especialmente en tejidos del sistema inmunitario)<sup>8</sup> (fig. 1).

Descubiertos y descritos unos receptores específicos para los cannabinoide fue sólo cuestión de tiempo el hallazgo de sus ligandos endógenos, que pasarían a denominarse endocannabinoide<sup>1-3,9</sup> (fig. 1). Su aislamiento fue dificultoso, por su estructura química y sus características sintéticas, pero apenas 2 años después de la descripción del CB1 se aisló una sustancia lipofílica de características funcionales similares al THC; esta sustancia, la etanolamida del ácido araquidónico (AEA), recibió el poético nombre de anandamida (de “ananda”, “paz interior” en sánscrito)<sup>10</sup>. Desde entonces, se han descrito múltiples moléculas que comparten una estructura básica común



**Figura 1. A)** Esquema de la estructura química general de los endocannabinoide, y un ejemplo del principal representante de cada grupo. **B)** Esquema de la estructura bidimensional de los receptores cannabinoide CB1 y CB2.

(un radical lipídico, habitualmente derivado del ácido araquidónico, y un grupo polar), con actividad cannabimimética<sup>2,3,9</sup>. Junto con la AEA, el endocannabinoide más importante es el 2-araquidonoilglicerol (2-AG)<sup>11</sup>, hasta 200 veces más abundante que la AEA en condiciones normales en diferentes tejidos y fluidos corporales<sup>2,9</sup>. Siguiendo la estructura de estos endocannabinoides, se han definido dos grupos generales: las N-acil-etanolaminas (NAE), como, por ejemplo, AEA, virodamina, palmitoiletanolamina, oleiletanolamina, etc.; y los N-acil-gliceroles (NAG), como, por ejemplo, 2-AG, noladin-éter, N-araquidonil-dopamina, etc.<sup>2,3,9</sup>. Finalmente, la secuenciación de los receptores y la identificación de los ligandos endógenos permitió el diseño de antagonistas específicos de los receptores CB, lo que permitió acelerar los estudios sobre el papel fisiológico y terapéutico de los cannabinoides, así como el descubrimiento de nuevos receptores con los que interactuarían los cannabinoides, como los vanilloides (VR1) y otros<sup>2,7,12</sup>.

En la tabla 1 se resumen los diversos efectos de los cannabinoides y los receptores implicados en éstos.

### FISIOLOGÍA DE LOS ENDOCANNABINOIDES

La síntesis de los endocannabinoides es un proceso dependiente de calcio y que responde a la demanda, es decir, que los endocannabinoides se sintetizan cuando son necesarios, pero no se almacenan<sup>1-3,9</sup>. El aumento del calcio intracelular activa diferentes enzimas, como N-acetiltransferasa, fosfolipasas A, C y D, o diacilglicerolipasa, que a partir de lípidos de membrana como la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina, o el diacilglicerol, sintetizan el endocannabinoide correspondiente. El endocannabinoide es liberado, y se une al receptor CB. Los NAE, especialmente la AEA, son ligandos de CB1 y de VR1, mientras que los NAG, especialmente el 2-AG, son ligandos tanto de CB1 como de CB2. La unión al receptor, especialmente si es CB1, induce la inhibición de la adenilato-ciclasa; la hiperpolarización presináptica debido al cierre de canales de calcio dependientes de voltaje y la apertura de canales de potasio; la expresión de cinasas como la regulada por señales extracelulares (ERK), la c-Jun N-terminal (JNK), la proteincinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK), o la proteincinasa B (PKB); la inhibición del factor nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B); y la activación de ceramidas<sup>1-3,9,13</sup>.

Posteriormente, el endocannabinoide es recaptado gracias a un transportador de membrana, y se ha descrito al menos uno, el transportador de membrana de anandamida (AMT). Una vez recaptado, el endocannabinoide es degradado por una enzima ligada a la membrana, la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH, especialmente para NAE) o la monoglicerolipasa (MGL, especialmente para NAG), que producen, respectivamente, ácido araquidónico más etanolamina o glicerol<sup>2,3</sup>. Así, la degradación de los endocannabinoides puede participar en la síntesis de prostanoides.

TABLA 1. Efectos de los cannabinoides, y receptores implicados

Efecto	Receptor
Sistema nervioso	
Efectos psicoactivos	CB1
Relajación muscular	CB1
Efecto orexígeno	CB1
Efecto antiemético	CB1
Hipotermia	CB1
Analgesia	CB1, CB2?, VR1?
Ojo	
Disminución de la presión intraocular	VR1
Sistema cardiovascular	
Vasodilatación:	
hipotensión ortostática,	
hiperemia conjuntival	CB1, VR1
Taquicardia refleja	CB1, VR1
Efecto antiagregante	CB1
Sistema respiratorio	
Broncodilatación	CB1
Tracto gastrointestinal	
Disminución de secreción glandular	CB1
Reducción del peristaltismo	CB1
Sistema endocrino	
Disminución de liberación de hormonas sexuales	CB1
Aumento de liberación de hormonas de estrés	CB1
Alteración del metabolismo de la glucosa	CB1
Reducción del número y la motilidad de los espermatozoides	CB1, CB2
Sistema inmunitario	
Efecto inmunomodulador	CB2, VR1?

CB1: receptor cannabinoide tipo 1; CB2: receptor cannabinoide tipo 2; VR1: receptor vaniloide.

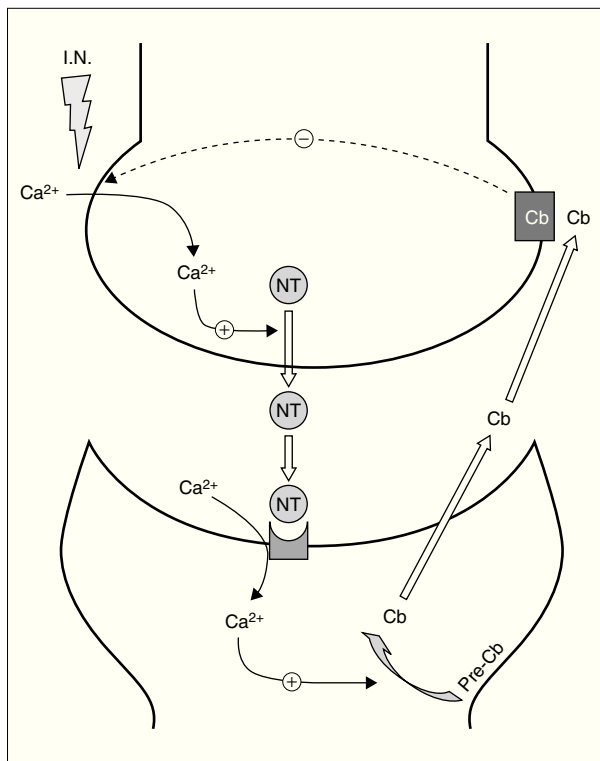
Los receptores CB1 se han hallado principalmente en el SNC; en el adulto, se distribuyen sobre todo en ganglios de la base (sustancia negra y pálido), cerebelo, hipocampo y corteza límbica; también se han hallado en médula y en terminaciones nerviosas sensitivas, y en nervios autonómicos<sup>7,12</sup>. En virtud de estas localizaciones, los endocannabinoides participan en circuitos relacionados con la coordinación y el control del movimiento, funciones cognitivas superiores, en la respuesta al estrés y al dolor, en la regulación del sueño y en los mecanismos de recompensa; también intervendrían en la regulación de la temperatura corporal, el vómito y las náuseas, y el hambre<sup>2-4</sup>.

Los receptores CB2 se encuentran preferentemente en tejido linfóide, sobre todo en bazo, amígdalas y timo, atribuyéndosele un efecto inmunomodulador<sup>4,7,12-14</sup>. Se ha localizado en linfocitos B, células *natural killer*, macrófagos, monocitos, microglia, mastocitos y linfocitos T<sup>7</sup>.

## FUNCIONES DE LOS ENDOCANNABINOIDES

### Sistema nervioso

Para muchos autores, el principal papel de los endocannabinoides es el de actuar como moduladores de la transmisión sináptica<sup>2,9,15</sup> (fig. 2). Llegado el estímulo nervioso despolarizante al terminal presináptico, la apertura de canales de calcio induce un aumento de calcio intracelular, que determina la translocación de las vesículas conteniendo el neurotransmisor, y su liberación; unido al receptor postsináptico, el neurotransmisor induce la apertura de canales de calcio, despolarizando la célula y culminando así la transmisión sináptica. El aumento del calcio intracelular en la neurona postsináptica activa la síntesis de endocannabinoides, que hiperpolarizan la neurona presináptica, anulando la liberación del neurotransmisor<sup>2,3,9</sup>. Este proceso se denomina



**Figura 2.** Esquema de la supresión de la neurotransmisión inducida por despolarización (DS) por parte de los endocannabinoides. Llegado el impulso nervioso (IN) al botón terminal sináptico, se induce la entrada de calcio, que determina la translocación de la vesícula con el neurotransmisor (NT) y su consiguiente liberación al espacio intersináptico. Unido a su receptor postsináptico, el neurotransmisor activa la entrada de calcio en la neurona postsináptica. El aumento de calcio intracelular activa las enzimas responsables de transformar el precursor endocannabinoide (Pre-Cb) en el cannabinoide (Cb). Éste, tras ser liberado, se une retrógradamente con el receptor cannabinoide presináptico, cuya activación tiene como consecuencia final la inhibición de la entrada de calcio y, por ende, de la liberación del neurotransmisor.

supresión inducida por la despolarización (DS); si se desarrolla sobre neuronas que liberan neurotransmisores inhibitorios, como el GABA, se considera una DS de la inhibición (DSI), proceso dependiente de receptores CB1; si el neurotransmisor es excitador, como el glutamato, será una DS de la excitación (DSE), proceso que puede verificarse en ausencia de receptores CB1<sup>2,15</sup>. El papel del endocannabinoide como inductor de DSE o DSI depende por tanto del tipo de neurona, pero también parece influido por ciertas condiciones basales, especialmente en relación con la concentración de calcio<sup>2,3</sup>. La DSE y la DSI son de crucial importancia en procesos de plasticidad sináptica y de reafirmación de circuitos y redes neuronales determinados, base de los procesos de aprendizaje y memoria<sup>2</sup>. Por otra parte, los endocannabinoides también modulan la liberación de otros neurotransmisores como acetilcolina, serotonina, dopamina, adrenalina, etc., por lo que se postula su implicación en otros muchos procesos neurofisiológicos<sup>2,7</sup>.

Un efecto adicional, pero de importancia, es que los endocannabinoides liberados en virtud de la transmisión sináptica aumentan la actividad enzimática de los astrocitos vecinos, proceso esencial para que estas células garanticen la nutrición de las neuronas<sup>9</sup>. Así, los endocannabinoides, además de modular la transmisión sináptica, preservarían el aporte energético a las neuronas necesario para mantener dicha actividad<sup>2,9</sup>.

### Sistema inmunitario

Los cannabinoides han demostrado diferentes efectos inmunomoduladores; en dosis bajas, los cannabinoides son inmunoestimulantes, y en dosis altas, inmunosupresores<sup>4,13</sup>. Estos efectos requieren la intermediación de receptores CB2, y probablemente también VR1, pero igualmente pueden ser independientes de receptores<sup>14</sup>. Se ha demostrado un aumento de la producción de endocannabinoides, así como de la expresión de receptores CB2, en células inmunitarias estimuladas por bacterias o por lipopolisacárido; diversos estudios sugieren que los endocannabinoides serían importantes moduladores de la quimiotaxis<sup>14</sup>. Por otra parte, los cannabinoides han demostrado un potente efecto antiinflamatorio en diversos modelos de enfermedad, como neurodegeneración, neuroinflamación, enfermedad inflamatoria intestinal o artritis<sup>4,14</sup>. Este efecto antiinflamatorio se debe especialmente a la inhibición de la liberación y la síntesis de citocinas (especialmente IL-1 y factor de necrosis tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ]<sup>4,14</sup>), efecto este último que incluye la inhibición de la expresión génica<sup>14</sup>. Además, los cannabinoides ejercen efecto modulador sobre linfocitos T helper<sup>4,13,14</sup>.

### Sistema cardiovascular

Los cannabinoides son vasodilatadores, por un doble mecanismo: en primer lugar, por modular la liberación de catecolaminas<sup>4</sup> y, en segundo lugar, por acción directa sobre los VR1 y posiblemente sobre otros receptores aún no

definidos, que inducen la relajación de la fibra muscular vascular mediante un mecanismo dependiente de calcio y que conduciría a la hiperpolarización de dicha fibra muscular en virtud de la apertura de canales de potasio<sup>12</sup>. El hecho de que este mecanismo vasodilatador sea especialmente potente en las arterias mesentéricas ha hecho suponer a algunos autores que los endocannabinoides podrían participar en la vasodilatación esplácnica posprandial, que se pondría en marcha tras el aumento de calcio extracelular que conlleva la absorción de nutrientes<sup>12</sup>.

### Muerte celular

Los cannabinoides han demostrado un efecto inductor de apoptosis en células en cultivo, especialmente en precursores gliales<sup>13</sup>. Este efecto, relacionado con la estimulación de la producción de ceramida y la expresión de genes de respuesta rápida, parece muy dependiente del grado de diferenciación celular, lo que ha motivado la investigación del posible uso de los cannabinoides en el tratamiento de tumores de baja diferenciación, como los gliomas o el adenocarcinoma de mama<sup>4,13</sup>.

## FUNCIONES ESPECÍFICAS RELACIONADAS CON LA PERINATOLOGÍA

### Gestación

Se ha descrito la presencia de cannabinoides en todos los tejidos y fluidos relacionados con la procreación<sup>16</sup>: se encuentran receptores CB en espermatozoides, y se han detectado concentraciones significativas de endocannabinoides en líquido seminal, capa granulosa del ovocito, líquido folicular y líquido oviductal, y en útero. Estos datos, junto con el hecho de que el THC reduzca la movilidad de los espermatozoides, ha llevado a algunos autores a hipotetizar que los endocannabinoides desempeñarían un papel en la capacitación de los espermatozoides, ayudando a seleccionar los más activos para alcanzar el ovocito, y que además garantizarían la fecundación monoespermática: mediante un proceso similar al DSI, la entrada de un espermatozoide induciría la liberación de AEA por el ovocito, lo que inmovilizaría al resto de espermatozoides<sup>16</sup>.

Por otra parte, se sabe que en presencia de altas concentraciones de THC o de AEA no progresa la división celular del ovocito fecundado para alcanzar la fase de mórula, y no se verifica el anidamiento del cigoto en el útero<sup>17,18</sup>. Estudios histológicos demuestran una disminución de la densidad de receptores CB y un aumento de la actividad de FAAH, tanto en el blastocisto en las horas siguientes a la fecundación, como selectivamente en la zona de implantación del útero, lo que avalaría la necesidad de reducir la actividad de AEA<sup>17</sup>. Aunque aún no hay pruebas decisivas que avalen la importancia de los endocannabinoides en la fisiología de la fecundación, estudios en mujeres sometidas a fertilización *in vitro* han hallado una correlación negativa entre la actividad de FAAH medida en

linfocitos y la probabilidad de una nidación exitosa del óvulo fecundado, lo que sugiere realmente cierto papel de los endocannabinoides en los mecanismos de implantación<sup>18</sup>. Además, la actividad inmunomoduladora de los endocannabinoides podría ser importante, ya que las células NK (*natural killer*), fundamentales en la inmunotolerancia al embrión, son ricas en CB2<sup>7</sup>.

Finalmente, estudios *in vitro* con fibras miométriales extraídas tras cesárea han demostrado un efecto inhibitorio de la AEA sobre la contractilidad del útero gestante<sup>19</sup>, aunque no hay pruebas que impliquen de forma destacada a los cannabinoides, tanto en la quiescencia uterina durante la gestación como en el inicio de la actividad contráctil durante el parto.

### Lactancia

Se han detectado concentraciones significativas de endocannabinoides, sobre todo de 2-AG (200 veces más abundante que la AEA) en la leche. Estudios del grupo de la Dra. Fride realizados con ratones recién nacidos han demostrado la función esencial de la activación de los receptores CB1 en el inicio y mantenimiento de la lactancia, especialmente en las primeras 24 h de vida<sup>20,21</sup>. Así, la administración de un bloqueante de CB1 a los ratones recién nacidos en su primer día de vida conduce a la muerte por inanición de todas las crías tratadas, mortalidad que se reduce al 50% si el tratamiento se inicia el segundo día, y al 0% si se inicia a partir del tercer día<sup>20,21</sup>. Asimismo, las crías recién nacidas de ratones manipulados genéticamente para no expresar CB1 no lactan el primer día de vida, presentando una mortalidad espontánea mucho más elevada que los ratones no manipulados<sup>20,21</sup>. Los estudios más detallados demuestran que la ausencia de activación de los CB1 el primer día de vida anula el interés de las crías por alimentarse, y en caso de obligarles a introducir el pezón en la boca no son capaces de sujetarlo con fuerza<sup>20</sup>. Todos estos resultados, junto con el hallazgo de un espectacular pico de producción de 2-AG en el cerebro en el primer día de vida<sup>22</sup>, llevaron al grupo de la Dra. Fride a proponer que los endocannabinoides serían básicos para el inicio de la conducta de lactancia, que luego se preservaría con el auxilio de otros sistemas, especialmente el opioide<sup>21</sup>.

### Desarrollo cerebral

Existen múltiples datos indirectos que apuntan a un papel relevante de los endocannabinoides en el desarrollo del SNC<sup>23</sup>. En primer lugar, la densidad, localización y actividad de los receptores CB en el cerebro varía desde la etapa prenatal a la neonatal, y desde ésta a la edad adulta. Así, dichos receptores se encuentran abundantemente expresados en el feto y el recién nacido en "áreas atípicas", como región subventricular, neocorteza, tronco encefálico y, lo más llamativo, en la sustancia blanca, especialmente en fibras comisurales como cuerpo calloso o comisura an-

terior<sup>23,24</sup>. Todas estas localizaciones desaparecen en el adulto, y, por el contrario, las zonas con más riqueza de receptores en el adulto son notablemente pobres en el feto y el recién nacido. Ya que, como se ha expuesto previamente, la abundancia de receptores CB en las zonas típicas del adulto explica los efectos psicoactivos de los cannabinoides, la diferente distribución de receptores explicaría, en primer lugar, la ausencia dichos efectos observada en niños con cáncer tratados con cannabinoides como antieméticos o analgésicos<sup>20</sup>. Por otra parte, las zonas ricas en receptores CB en el feto y recién nacido son precisamente las más implicadas en procesos de proliferación<sup>23</sup>. Todo ello apunta a que los endocannabinoides podrían estar involucrados en procesos de migración, proliferación y sinaptogénesis. Finalmente, la presencia de receptores CB en la sustancia blanca<sup>24</sup>, junto con la descripción de receptores para endocannabinoides en precursores gliales y el efecto remielinizante de los cannabinoides en modelos animales de desmielinización<sup>25</sup> sugieren que los endocannabinoides, además de participar en procesos proliferativos, podrían ser importantes en procesos de mielinización del cerebro inmaduro.

Por el contrario, también se ha descrito que los cannabinoides actúan sobre la expresión de enzimas reguladoras de la síntesis de neurotransmisores<sup>23</sup>. Aunque se duda de la significación fisiológica de este hecho, no cabe duda de que éste podría ser uno de los mecanismos que explicarían los efectos a largo plazo de la exposición prolongada a cannabinoides durante la época fetal, ya que esto podría determinar algún tipo de impronta sobre un cerebro en formación.

### Neuroprotección

Diversos estudios en los últimos años sugieren que los cannabinoides podrían desarrollar un importante papel en la neuroprotección, tanto ante los procesos neurodegenerativos agudos como el daño cerebral hipóxico-isquémico o el traumático, como ante procesos crónicos como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer<sup>26,27</sup>. El ámbito neonatológico del presente escrito hará que nos fijemos al posible papel de los cannabinoides en la encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal (EHIN).

Varios efectos fisiológicos de los cannabinoides justificarían este papel. Es conocido que tras un episodio hipóxico-isquémico, la disfunción de las bombas iónicas, con la consiguiente alteración de la polaridad transmembrana, permite la entrada de masivas cantidades de calcio en la neurona, lo que activa diferentes enzimas destructivas<sup>28</sup>; la disfunción de las bombas permite asimismo la acumulación de neurotransmisores excitotóxicos, como el glutamato, que diversos estudios, incluidos algunos realizados por nuestro grupo<sup>29</sup>, han señalado como una pieza de extraordinaria importancia en la cascada neurotóxica<sup>28,29</sup>. La acumulación de glutamato crece progresivamente, como

causa y efecto de un aumento de la entrada de calcio en la célula<sup>28</sup>; asimismo, el glutamato coadyuva a la activación de la síntesis de citocinas, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), así como a la inducción de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS)<sup>29</sup> que conduce a la producción de masivas cantidades de NO<sup>28</sup>; tanto citocinas como NO resultan lesivos para la neurona, *per se* y por participar en la inducción de mecanismos de apoptosis. Finalmente, durante la fase de reperfusión la llegada de grandes cantidades de radicales libres de oxígeno inicia un proceso de estrés oxidativo, ampliado y agravado por el NO, así como por la llegada de células inflamatorias activadas que liberan más radicales libres y más citocinas<sup>28</sup>.

En este escenario, los cannabinoides aportan, como primer efecto positivo, el de reducir sustancialmente la entrada de calcio en la neurona<sup>2,3,9</sup>. Además, cannabinoides como la AEA son antioxidantes, vasodilatadores, inmunomoduladores y potencian la actividad de los astrocitos<sup>9,26,27</sup>. Estos datos explican resultados como el de nuestro grupo, demostrando que el agonista cannabinoide WIN55212 ejerce un potente efecto neuroprotector en ratas recién nacidas<sup>30</sup>. En este trabajo, ratas de 7 días de vida fueron sometidas a una variante del llamado modelo de Rice-Vannucci, siéndoles ligada la carótida izquierda y siendo sometidas posteriormente a asfixia con N<sub>2</sub> al 100% durante 10 min; este procedimiento provoca una lesión cerebral, cuantificable en términos de muerte neuronal precoz y tardía<sup>30</sup>. En este modelo, el WIN55212 previene ambos tipos de muerte neuronal, y, lo que es más importante, lo consigue pese a ser administrado después del episodio asfíctico<sup>30</sup>; este tipo de eficacia, además de ser poco frecuente en los modelos experimentales, que a menudo administran el neuroprotector antes del episodio asfíctico, avala su posible empleo en situación real. En sintonía con estos resultados, otros grupos han demostrado similar efecto protector en modelos de excitotoxicidad cerebral en ratas recién nacidas<sup>31</sup>, así como previamente se había demostrado en modelos de isquemia cerebral en animales adultos<sup>32</sup>.

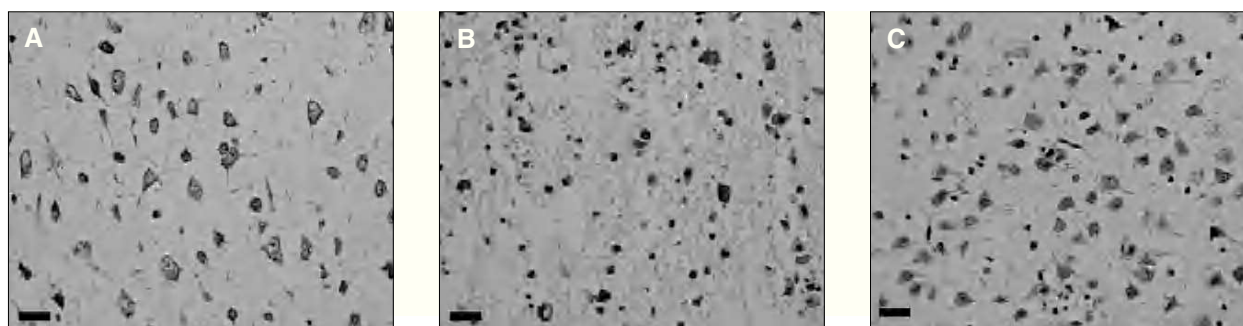
En la actualidad, nuestro grupo trabaja con un modelo *ex vivo* de EHIN, denominado privación de oxígeno y glucosa (POG), en el que unas secciones de cerebro de rata recién nacida (ratas Wistar de 7 días de vida), mantenidas en una solución fisiológica oxigenada, son privadas de oxígeno y glucosa durante 20 min, lo que induce una lesión prácticamente idéntica a la que se obtiene en modelos *in vivo*<sup>29</sup>. El modelo de POG de secciones cerebrales no sólo permite el estudio histológico de la lesión, sino que tiene además la ventaja de que la gravedad de dicha lesión puede cuantificarse en términos de cantidad de lactato deshidrogenasa (LDH), enzima intracelular, liberada al medio; esta liberación de LDH sigue un perfil temporal, con un pico 30 min después de la POG y un descenso posterior durante 180 min, por lo que el cálculo del área bajo la curva ofrece un valor correspondiente con la severidad del

daño. En este modelo *ex vivo*, el agonista cannabinoide WIN-55212 previene la muerte celular inducida por la POG, efecto visible en el estudio histológico del cerebro (fig. 3); en el análisis cuantitativo, la protección es aún más eficaz que la de un neuroprotector tan reputado en estudios *in vitro* como el MK-801, bloqueador de los receptores NMDA (tabla 2). Además, en este modelo se comprueba que el agonista cannabinoide consigue su efecto neuroprotector actuando precisamente sobre varios de los factores más determinantes del daño cerebral hipóxico-isquémico, ya que el WIN-55212 reduce la liberación de glutamato y de TNF- $\alpha$ , e impide la inducción de la iNOS (tabla 2). Además, nuestros datos sugieren que este efecto neuroprotector se media tanto por receptores CB1 como CB2, ya que tanto el SR141716 (antagonista de receptores CB1), como el SR144528 (antagonista de receptores CB2), inhiben los efectos del WIN-55212 (tabla 2).

Las características de los endocannabinoides han conducido a varios autores a postular que el cannabinoide podría constituir un sistema natural de neuroprotección<sup>1</sup>. El que eventos relevantes de la cascada neurotóxica, como el aumento intracelular de calcio y la activación de

lipasas, sean precisamente los inductores de la síntesis de cannabinoides, justificaría este papel. Experimentos que demuestran una elevación de la concentración cerebral de NAE tras inducir una lesión cerebral en ratas recién nacidas mediante inyección intracerebral de NMDA o mediante un traumatismo cerrado<sup>33</sup>, apuntan en este sentido. No deja de ser sugerente el hallazgo ya comentado de una importante elevación de la concentración cerebral de 2-AG en el cerebro en el primer día de vida<sup>22</sup>, justo después de que el cerebro haya tenido que afrontar las vicisitudes del parto y se vea expuesto a un aumento dramático del estrés oxidativo. El principal problema de este efecto neuroprotector natural estriba en que la recaptación y posterior degradación de los endocannabinoides es tan rápida que la vida media de estos compuestos es extraordinariamente breve<sup>1-3</sup>.

El posible uso de los cannabinoides como neuroprotectores en la EHIN queda limitado por el riesgo, no confirmado pero teórico, de unos posibles efectos secundarios sobre el cerebro en desarrollo incluso con la administración de estos compuestos durante breve tiempo. Mientras este extremo se dilucida, dos grandes vías de investigación



**Figura 3.** Microfotografías mostrando la celularidad del núcleo estriado de secciones de cerebro de ratas de 7 días de vida, teñidas con técnica de Nissl (microscopía óptica, 400 aumentos en el original; escala: 100  $\mu$ m). **A)** Secciones mantenidas en solución fisiológica con glucosa y oxigenada. **B)** Secciones expuestas a privación de oxígeno y glucosa (POG) durante 30 min. **C)** Secciones sometidas a POG pero en presencia del agonista cannabinoide WIN55212 (50  $\mu$ M). Obsérvese la disminución de la densidad de neuronas viables en B, y el efecto protector del WIN en C.

**TABLA 2. Efectos del agonista cannabinoide WIN-55212 sobre distintos factores relacionados con la muerte celular en un modelo *ex vivo* de lesión hipóxico-isquémica en cerebro de rata recién nacida**

	Control (n = 28)	POG (n = 30)	MK (n = 10)	WIN (n = 14)	WIN + SR1 (n = 7)	WIN + SR2 (n = 8)
LDH (UA) <sup>a,b</sup>	74,4 (2,4)	142,4 (6,8)*	108,9 (4,8)*	82,9 (5,5)	136,8 (6,5)*	151,5 (6,8)*
Glutámico <sup>a</sup> (ng/ml)	51,3 (5,9)	1.215 (53,1)*	–	526,4 (46)**	–	–
TNF- $\alpha^a$ (pg/ml)	49,2 (3,1)	84,4 (4,2)*	–	20,1 (0,7)	–	–
iNOS <sup>c</sup> (% control)	100	300 (35)*	–	163 (21)**	–	–

Datos expresados como media (error estándar de la media).

\*ANOVA  $p < 0,05$  frente a control.

\*\*ANOVA  $p < 0,05$  frente a POG.

<sup>a</sup>Medido en sobrenadante.

<sup>b</sup>Área bajo la curva (unidades arbitrarias).

<sup>c</sup>Análisis densitométrico de bandas obtenidas en *Western-blot* de homogeneizado de cerebro al final del experimento.

POG: privación de oxígeno y glucosa; MK: MK-801 (100 nM); WIN: WIN-55212 (50  $\mu$ M); SR1: SR141716 (50  $\mu$ M); SR2: SR144528 (50  $\mu$ M); LDH: lactato deshidrogenasa; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tisular alfa; iNOS: sintasa inducible de óxido nítrico.

podrían aportar una solución. Una contempla la posibilidad de prolongar el "tono endocannabinoide", inhibiendo la recaptación y/o degradación de éstos, ya que actualmente se han sintetizado compuestos que bloquean tanto la AMT como la FAAH; habida cuenta de que, tras un episodio isquémico cerebral en animales, se ha observado un aumento de la expresión de los receptores CB en las zonas de penumbra periisquémicas, esta estrategia conseguiría un mayor efecto precisamente en la zona cerebral de mayor potencial de rescate<sup>27</sup>. La otra alternativa proviene de resultados como el de nuestro grupo, demostrando un papel destacado de los receptores CB2 en el efecto neuroprotector del WIN55212 en el modelo *ex vivo* de EHIN; el empleo de agonistas selectivos CB2 eliminaría todo el potencial efecto psicoactivo del tratamiento, ya que este se desarrolla exclusivamente a través de los receptores CB1<sup>7</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

- Mechoulam R, Lichtman AH. Stout guards of the central nervous system. *Science*. 2003;302:65-6.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*. 2003;83:1017-66.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. 2004;47:345-58.
- Duran M, Laporte JR, Capellà D. Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del Cannabis y el sistema cannabinoide. *Med Clin (Barc)*. 2004;122:390-8.
- Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*. 1964;86:1646-7.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346:561-4.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas G, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54:161-202.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365:61-5.
- Stella N. Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*. 2004;48:267-77.
- Devane WA, Axelrod J. Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:6698-701.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215:89-97.
- Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Ming Mo F, et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharm Ther*. 2005;106:133-45.
- Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I. Cannabinoids and cell fate. *Pharm Ther*. 2002;95:175-84.
- Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature Rev*. 2005;5:400-11.
- Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signalling in the brain. *Science*. 2002;296:678-82.
- Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, et al. N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem Phys Lipids*. 2002;121:211-27.
- Paria BC, Wang H, Dey SK. Endocannabinoid signaling in synchronizing embryo development and uterine receptivity for implantation. *Chem Phys Lipids*. 2002;121:201-10.
- Maccarrone M, Bisogno T, Valensise H, Lazzarin N, Fezza F, Manna C, et al. Low fatty acid amide hydrolase and high anandamide levels are associated with failure to achieve an ongoing pregnancy after IVF and embryo transfer. *Mol Hum Reprod*. 2002;8:188-95.
- Dennedy MC, Friel AM, Houlihan DD, Broderick VM, Smith T, Morrison JJ. Cannabinoids and the human uterus during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190:2-9.
- Fride E. The endocannabinoid-CB1 receptor system in pre- and postnatal life. *Eur J Pharmacol*. 2004; 500:289-97.
- Fride E, Bregman T, Kirkham TC. Endocannabinoids and food intake: Newborn suckling and appetite regulation in adulthood. *Exp Biol Med*. 2005;230:225-34.
- Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz JJ. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse*. 1999;33:181-91.
- Fernández-Ruiz J, Gómez M, Hernández M, De Miguel R, Ramos JA. Cannabinoids and Gene Expression During Brain Development. *Neurotox Res*. 2004;6:1-14.
- Romero J, García-Palmero E, Berrendero F, García-Gil L, Hernández ML, Ramos JA, et al. Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. *Synapse*. 1997;26:317-23.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, et al. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt signaling. *J Neurosci*. 2002;22:9742-53.
- Mechoulam R, Panikashvili D, Shohami E. Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol Med*. 2002;8:58-61.
- Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurology*. 2003;2:291-8.
- Martín Ancel A, Martínez Orgado J. Asfixia perinatal en el recién nacido a término. *Pediatría Integral*. 2000;5:391-406.
- Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Casanova I, Bonet B, Leza JC, Lorenzo P, et al. Newborn brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neurosci Meth*. 2005;145:205-12.
- Martínez-Orgado J, Fernández-Frutos B, González R, Romero E, Urigüen L, Romero J, et al. Neuroprotection by the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vivo newborn rat model of acute severe asphyxia. *Mol Brain Res*. 2003;114:132-9.
- Van der Stelt M, Veldhuis WB, Van Haften GW, Fezza F, Bisogno T, Bär PR, et al. Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. *J Neurosci*. 2001; 21:8765-71.
- Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, et al. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci*. 1999; 19:2987-95.
- Hansen HH, Schmid PC, Bittigau P, Pastres-Becker I, Berrendero F, Manzanares J, et al. Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem*. 2000;78:1415-27.