



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLÓGIA
E INMUNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

TITULO

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS
DE CANNABINOIDES NO PSICOTRÓPICOS PARA EL TRATAMIENTO
DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biomedicina por

Carmen del Río Mercado

Directores

Eduardo Muñoz Blanco e Irene Cantarero Carmona

Córdoba, 2017

TITULO: *DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE CANNABINOIDES NO PSICOTRÓPICOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS*

AUTOR: *Carmen del Río Mercado*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE CANNABINOIDES NO PSICOTRÓPICOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS.

DOCTORANDO/A: Carmen Del Río Mercado

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda Carmen del Río ha realizado un importante trabajo de investigación durante el periodo de tiempo de desarrollo de su Tesis Doctoral. Su trabajo ha estado centrado en el estudio del mecanismo de acción de cannabinoides naturales y sintéticos y se eficacia en modelos murinos de dos enfermedades raras como la Esclerodermia y la Enfermedad de Huntington que cursan con procesos inflamatorios. Su trabajo se ha publicado en dos artículos científicos en la revista Scientific Reports (Q1), siendo primera autora en uno de ellos. También es primera autora de otro artículo en la revista British Journal of Pharmacology (D1) que se encuentra en segunda revisión. Un último artículo de sus Tesis está en fase escritura.

Durante este periodo también ha asistido a dos congresos internacionales y varios nacionales donde ha presentado resultados como primera autora. Su trabajo ha sido premiado en eventos organizados por la UCO y el IMIBIC.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 15 de Mayo de 2017

Firma del/de los director/es

Fdo.: _____

Fdo.: _____



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLÓGÍA
E INMUNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

TÍTULO

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS
DE CANNABINOIDES NO PSICOTRÓPICOS PARA EL TRATAMIENTO
DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biomedicina por

Carmen del Río Mercado

Directores

Eduardo Muñoz Blanco e Irene Cantarero Carmona

Córdoba, 2017

D. Eduardo Muñoz Blanco, Catedrático del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, y **D^a Irene Cantareo Carmona**, Doctora en Medicina

CERTIFICAN

Que **D^a Carmen del Río Mercado** ha realizado en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología bajo su dirección el trabajo titulado “Desarrollo y caracterización de nuevos derivados de cannabinoides no psicotrópicos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias” y que a nuestro juicio reúne los requisitos necesarios para optar al grado de doctor.

Y para que conste, firmamos el presente, en Córdoba a 15 de Mayo de 2017.

AGRADECIMIENTOS

Nunca pensé trabajar en investigación hasta llegar a Córdoba y mucho menos, terminar una tesis doctoral. Evidentemente, todo este trabajo no hubiese sido posible ni tan llevadero sin mis directores de tesis, Eduardo e Irene.

Gracias Eduardo por tu confianza desde el principio, a pesar de que no sabía ni coger una pipeta cuando aterricé en tu laboratorio. Desde el comienzo este proyecto supuso para mí un gran reto dada mi inexperiencia en la investigación. Sin embargo, has sabido sacar lo mejor de mí durante este tiempo gracias a tus críticas constructivas, tus consejos y tu apoyo. Nunca pensé que podría aprender tanto.

A Irene, que aunque la tarea era complicada has sabido muy bien equilibrar tu papel entre directora de tesis y amiga. Enseñar es dejar huella en la vida de una persona, y así lo has hecho. Gracias por toda tu dedicación y por tanto como me has enseñado durante este tiempo, desde mis primeras inmunos que al final acabaron saliendo hasta tu ojo láser mientras revisabas la tesis, sin olvidar los bocadillos de lomo. Queda pendiente nuestro libro de frases célebres, un día de estos que tengamos tiempo.

Mi más sincero agradecimiento a todos los compañeros que han pasado por el grupo Inflamación y Cáncer durante estos años porque de todos he podido aprender algo. Desde aquellos que ya no forman parte del grupo como Rafa, Paula y Nieves hasta todos los que lo conforman ahora.

A Marco, gracias por todas tus recomendaciones. Aún te recuerdo midiendo al milímetro mis figuras del artículo para que todas quedaran por igual. Espero que tu labor quede aquí también reflejada.

A Rosario, gracias por tu amabilidad, por tener siempre una sonrisa para todos y por facilitarnos el trabajo arreglando el caos que generamos a veces con tanto papeleo.

A las nuevas incorporaciones del laboratorio, Rosario y Juan, aunque ya no tan novatos. Gracias por el día a día, espero seguir compartiendo momentos con vosotros.

A Paloma, por la positividad y la alegría que generas, por tus locuras y tus preguntas que hacen pensar. Aunque ya te lo he dicho alguna vez, te has hecho querer desde el principio.

A Carla, carácter y corazón a partes iguales. Estos años no hubieran sido tan divertidos sin ti y tus comentarios. Gracias por tantas veces como te has acordado de mí y te has preocupado por cómo estaba, y por supuesto, por todo lo que hemos compartido.

A Belén, gracias por tus bromas, tus chismes y tu alegría. Nunca un congreso podrá ser tan divertido como contigo. Ha sido estupendo compartir más tiempo juntas ultimamente, nunca olvidaré nuestro mes en el gimnasio.

A Estrella, mi maravillosa compi de tareas a la que no puedo agradecer aquí todo lo que quisiera porque se pone colorada. Gracias por escucharme tantas veces, por tus consejos cada vez que los he necesitado y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A Juan Antonio, gracias por todo lo que me has enseñado y por no dejar de considerarme “esta gente nueva” a pesar de los años, me ha ayudado a seguir esforzándome. Ni que decir tiene lo buena gente que has sido cada vez que se me olvidaba apuntar alguna referencia en el cuaderno de pedidos, tanto que tenía que quedar reflejado en mis tesis.

A Víctor, mi compi desde los inicios hasta la escritura de tesis. Gracias por tus bromas, incluso con las que casi me caigo, por las risas que nos hemos echado y por nuestros espectáculos musicales cada vez que coincidimos en la sala de cultivos.

A Carmen, la culpable de que durante estos años haya pasado a llamarme CRM. Gracias por todo lo que he aprendido de ti, que ha sido mucho, por tu paciencia conmigo durante los primeros meses y por estar todavía dispuesta a responder a mis constantes preguntas. Gracias también por la parte no laboral, han sido muchos ratos compartidos, muchas charlas y, sobre todo, muchas risas.

A Maribel, la persona con la que más tiempo he compartido durante mis años de tesis. Ya no sé muy bien si eres compañera, amiga o familia, quizás todo a la vez. Mi oráculo de los Western Blots en el laboratorio y mi gran amiga de lunes a domingo. Gracias por tanto como me has escuchado, por tus visitas, por nuestras cenas y por todo lo que nos queda por delante. Vas a llegar muy lejos.

Indudablemente, tengo que agradecer también a los compañeros de Vivacell por darme la oportunidad de colaborar con ellos para llevar a cabo esta tesis. A M. Luz, Ana, Cristina, Nuria y Maru por el apoyo y la disposición durante estos años.

A Phytoplant, porque ha sido muy fácil colaborar con vosotros. Gracias a Stefan, Xavi, Carlos, Carolina y a todos los demás.

Tampoco me olvido del grupo de la Dra. Carmen Guaza, especialmente de Fran Carrillo, gracias por tu disposición y por no dudar en venir hasta Córdoba para echarnos una mano.

Al grupo del Dr. Javier Fernández Ruiz, gracias por ayudarnos en este proyecto con los ensayos de afinidad por los receptores cannabinoides.

Agradezco también al grupo del Dr. Ismael Galve-Roperh por su esfuerzo y colaboración en el estudio de nuevos derivados cannabinoides para la enfermedad de Huntington.

Gracias a la Dra. Rosario López Pedrera y su grupo de trabajo, especialmente a Carlos, por proporcionarnos las muestras de pacientes y por estar siempre dispuestos a ayudarnos y darnos consejos que han permitido mejorar nuestro trabajo.

A todos mis compañeros de IMIBIC, desde nuestros antiguos vecinos de Fisiología hasta mis compañeros de sala con los que he compartido tanto tiempo Mari, Alejandro y Andrés. Gracias a mi compañera de máster Rosa y a todos los alumnos de técnico de laboratorio que han pasado por el grupo, Miguel, Carmen, Jessica y, en especial, a Curro.

También me gustaría agradecer de manera especial a Pepe, Antonio e Ignacio del departamento de Histología por el cariño con el que me han tratado siempre y por estar continuamente dispuestos a dedicarme su tiempo y enseñarme con tanto entusiasmo.

Cómo no, dar las gracias a aquellos de los que me encanta presumir, mis amigos. A Borja, gracias por tanto, dicen que quien tiene un amigo tiene un tesoro, el mío eres tú. A mis dos amores, Carmen y Elena, imprescindibles en mi vida. A Chema, amigo incondicional y por supuesto a Manu, Paco, Rocío, Cano y Grego, grandes apoyos durante mi tesis y mejores personas.

A Luis, necesitaría otra tesis entera para agradecerte tanto como te mereces. Gracias por estar siempre en mis malos ratos y por ser el responsable mis mejores momentos. Por tu paciencia, tu cariño y por repetirme todos los días lo orgulloso que estás de mí. Simplemente, gracias por existir.

A mi familia, los que granito a granito han ido construyendo la persona que soy hoy. Gracias a mis tíos, por consentirme como lo han hecho, y a cada uno de mis innumerables primos, porque no recuerdo mejores ratos que los compartidos con vosotros. A mi hermana, Rocío, a quién más me gusta hacer rabiar pero también a quien más he echado de menos durante mis años en Córdoba. Y por supuesto a mis padres, Carmen y Antonio, a los que tengo que agradecerles todo en mi vida. Gracias a los tupperts de mi madre y los “ten cuidaito” de mi padre cada domingo durante estos años. Esta tesis es más vuestra que mía.

RESUMEN

Los fitocannabinoides son sustancias liposolubles presentes en la planta *Cannabis sativa* y entre sus dianas se encuentran los receptores cannabinoides y el receptor nuclear PPAR γ . Los cannabinoides han mostrado ejercer potentes efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores *in vivo* e *in vitro* a través de estos mecanismos, por lo que se consideran de especial interés para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la esclerosis sistémica (SSc) o la enfermedad de Huntington (EH).

Entre los fitocannabinoides destacan el cannabidiol y el cannabigerol debido a la falta de psicoactividad, las numerosas propiedades terapéuticas y su baja toxicidad. Con el fin de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, se han introducido modificaciones químicas para generar derivados cannabinoides más potentes y con un perfil farmacológico seguro.

Nuestros resultados muestran que VCE-004.3 es un agonista dual PPAR γ /CB₂ y antagonista de CB₁ y VCE-004.8 es un agonista dual PPAR γ /CB₂. Ambos han mostrado inhibir los mecanismos fibróticos inducidos por TGF β *in vitro*. Además, VCE-004.3 y VCE-004.8 han resultado efectivos como tratamientos sistémicos y también tópicos en modelos animales de SSc. La combinación de estas actividades (PPAR γ /CB₁/CB₂) representa un avance importante en el desarrollo de nuevas terapias en enfermedades inflamatorias y fibróticas ya que todas estas dianas son críticas y complementarias.

Por su parte, VCE-003.2 es un agonista de PPAR γ con actividad neuroprotectora *in vitro*. Además hemos demostrado que los fitocannabinoides ácidos Δ^9 -THCA, CBDA y CBGA, presentan una mayor afinidad a PPAR γ que sus correspondientes formas neutras. Entre ellos, Δ^9 -THCA es un agonista potente de PPAR γ con actividad neuroprotectora *in vitro*. Es más, VCE-003.2 y Δ^9 -THCA previenen la neurodegeneración y la activación de las células de la glía en el modelo animal de EH. Estos datos nos llevan a considerar que VCE-003.2 y Δ^9 -THCA tienen un alto potencial para el tratamiento de la EH y otras enfermedades neurodegenerativas con rasgos neuroinflamatorios.

ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoil glicerol
3NP	Ácido 3-Nitropropiónico
AEA	Araquidonoil etanolamida o anandamida
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
BLM	Bleomicina
CBC	Cannabicromeno
CBD	Cannabidiol
CBDA	Ácido cannabidiólico
CBG	Cannabigerol
CBGA	Ácido cannabigerólico
CTGF	Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DBD	Dominio de Unión al ADN
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EH	Enfermedad de Huntington
FAAH	Amida Hidrolasa de Ácidos Grasos
GPR55	Receptor huérfano acoplado a proteínas G
GSH	Glutación reducido
Htt	Huntingtina
IFN γ	Interferón gamma

Ig	Inmunoglobulina
IL1 β	Interleuquina 1 beta
IL2	Interleuquina 2
IL4	Interleuquina 4
IL6	Interleuquina 6
IL13	Interleuquina 13
MA	Medio Adipogénico
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos
MO	Medio Osteoblastogénico
MSCs	Células madre mesenquimales humanas
ODA	Orphan Drug Act
ORO	Oil Red O
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PGC1 α	Proteína 1 α co-activadora del receptor PPAR
PPAR γ	Receptor nuclear activado por el proliferador del peroxisoma gamma
RGZ	Rosiglitazona
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SE	Sistema Endocannabinoide
SOD	Superóxido Dismutasa
SSc	Esclerosis Sistémica o esclerodermia

STAT3	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante beta
Th1	Linfocitos T colaboradores tipo 1
Th2	Linfocitos T colaboradores tipo 2
THC	Tetrahidrocannabinol
THCA	Ácido tetrahidrocannabinólico
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alpha
TRP	Receptor de Potencial Transitorio
TZDs	Tiazolidinedionas
UHDRS	Pruebas de la escala unificada

INDICE

Agradecimientos.....	5
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
I.Introducción.....	23
1. Las enfermedades raras.....	25
1.1. Conceptos generales y de prevalencia.....	25
1.2. Esclerodermia. Definición, fisiopatología, tratamiento actual y pronóstico.....	26
1.3. Enfermedad de Huntington. Fisiopatología, tratamiento actual y pronóstico.....	31
2. Sistema endocannabinoide y enfermedad.....	34
2.1 Sistema endocannabinoide.....	34
2.2. Sistema endocannabinoide en Esclerodermia.....	36
2.3. Sistema endocannabinoide en Huntington.....	39
3. Receptores nucleares.....	42
3.1. Definición.....	42
3.2. PPAR γ como diana terapéutica en SSc y EH.....	43
4. Cannabinoides.....	48
4.1. Fitocannabinoides naturales.....	48
4.2. Desarrollo de fármacos basados en cannabinoides.....	51
4.3. Cannabinoides sintéticos.....	53

II. Objetivos.....	57
III. Materiales y métodos.....	63
1. Reactivos.....	65
2. Cannabinoides.....	65
3. Líneas celulares.....	65
4. Determinación de especies reactivas de oxígeno.....	66
5. Determinación del potencial de membrana mitocondrial.....	66
6. Ensayo de afinidad por los receptores cannabinoides.....	66
7. Ensayo de afinidad por el receptor PPAR γ	67
8. Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa.....	67
8.1. Activación de la ruta de Nrf2.....	67
8.2. Actividad transcripcional de PPAR γ	67
8.3. Ensayos de activación de los receptores cannabinoides.....	68
8.4. Actividad transcripcional del gen <i>COL1A2</i>	68
8.5. Actividad transcripcional de las SMADs.....	68
9. Deposición de colágeno por Sirius Red.....	68
10. Liberación de colágeno.....	69
11. Ensayo de viabilidad celular por MTT.....	69
12. Ensayo de migración celular.....	69
13. Diferenciación hacia miofibroblastos.....	70
14. Diferenciación de células madre mesenquimales humanas (MSCs).....	70

15. Determinación de la biogénesis mitocondrial.....	71
16. Obtención de suero de pacientes con SSc y aislamiento de IgG.....	71
17. Western Blot.....	71
18. Modelos experimentales de SSc.....	71
18.1. Modelo inflamatorio inducido por bleomicina.....	72
18.2. Modelo crónico inducido por bleomicina.....	73
19. Modelo de EH inducido por ácido 3 nitropropiónico (3NP).....	74
20. Análisis histológico.....	76
20.1. Procesamiento del tejido.....	76
20.2. Tinción tricrómica de Masson.....	76
20.3. Tinción con azul de toluidina.....	77
20.4. Tinción de Nissl.....	77
20.5. Inmunohistoquímica.....	77
20.6. Inmunofluorescencia.....	78
21. Medición de parámetros de estrés oxidativo.....	78
21.1. Actividad catalasa.....	79
21.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD).....	79
21.3. Niveles de glutatión reducido (GSH).....	79
22. Estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa.....	79
22.1. Extracción del ARNm.....	79
22.2. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.....	80

22. Análisis estadístico.....	81
IV. Resultados.....	85
1. Estudio del potencial terapéutico de los nuevos derivados VCE-004.3 y VCE-004.8 en SSc.....	87
1.1. Los nuevos cannabinoides VCE-004.3 y VCE-004.8 son derivados quinol de CBD con agonismo selectivo sobre PPAR γ	89
1.2. Interacción de VCE-004.3 y VCE-004.8 con los receptores cannabinoides.....	93
1.3. VCE-004.3 y VCE-004.8 reducen la transcripción y la síntesis de colágeno por los fibroblastos.....	95
1.4. VCE-004.3 y VCE-004.8 inhiben la migración de fibroblastos y previenen la diferenciación a miofibroblastos <i>in vitro</i>	98
1.5. VCE-004.3 previene el desarrollo de fibrosis <i>in vivo</i> asociada a la inflamación provocada por la administración de BLM.....	101
1.6. VCE-004.3 reduce la fibrosis preestablecida en el modelo murino de SSc crónica.....	107
1.7. El tratamiento con VCE-004.8 reduce la fibrosis crónica experimental a través de PPAR γ y CB $_2$	109
1.8. La aplicación tópica de VCE-004.3 y VCE-004.8 reduce la fibrosis preestablecida en el modelo murino de SSc crónica.....	116
1.9. Efecto de VCE-004.3 sobre la activación de ERK 1/2 inducida por PDGF y por IgG plasmática de pacientes.....	118
2. Estudio del potencial terapéutico de VCE-003.2 y Δ^9 -THCA en EH.....	121
2.1. El nuevo compuesto VCE-003.2 es un derivado no electrofílico de CBG.....	123

2.2. Efecto neuroprotector de VCE-003.2 <i>in vitro</i>	125
2.3. Efecto neuroprotector de VCE-003.2 en el modelo animal de EH.....	126
2.4. Los cannabinoides ácidos se unen y activan PPAR γ	131
2.5. Efecto de Δ^9 -THC y Δ^9 -THCA sobre la diferenciación hacia adipocitos y osteoblastos.....	133
2.6. Efecto de Δ^9 -THCA sobre la biogénesis mitocondrial y la expresión de PGC-1 α	136
2.7. Δ^9 -THCA es neuroprotector frente a Htt mutada <i>in vitro</i>	137
2.8. El tratamiento con Δ^9 -THCA protege de la neurodegeneración estriatal en el modelo animal de EH.....	138
V. Discusión.....	143
1. Efecto terapéutico de VCE-004.3 y VCE-004.8 en SSc.....	146
2. Efecto terapéutico de VCE-003.2 y Δ^9 -THCA en EH.....	152
VI. Conclusiones.....	159
VII. Referencias.....	165
VIII. Anexos.....	185
Anexo I.....	187
Anexo II.....	203
Anexo III.....	221

I. Introducción

1. Las enfermedades raras.

1.1. Conceptos generales y de prevalencia.

Una enfermedad es considerada rara en Europa cuando afecta a menos de 5 de cada 10.000 personas, mientras que en Estados Unidos se define como aquella que afecta a menos de 200.000 individuos en ese país. Existen entre 5.000 y 8.000 enfermedades y desórdenes raros distintos y aunque de forma individual algunas de estas enfermedades solo las sufren una docena de personas, colectivamente las enfermedades raras afectan al 6-8 % de la población mundial, suponiendo alrededor de 30 millones de personas en toda Europa (Gulbakan y cols., 2016; Official Journal of the European Union (2009/C 151/2)).

Las enfermedades raras se caracterizan conjuntamente por ser una multitud de enfermedades y síndromes diferentes de los que hay una falta de conciencia generalizada, dificultad para el diagnóstico y, para la mayoría de ellas, falta de terapias efectivas. Se trata de enfermedades graves y, normalmente, de carácter crónico y progresivo. Además, la mayoría de ellas son enfermedades incapacitantes, puesto que la calidad de vida de los pacientes se ve mermada por la falta de autonomía. Más del 80 % de estas enfermedades raras son de origen genético por lo que las mejoras en los conocimientos en este campo contribuyen al éxito en el desarrollo de nuevos tratamientos. En cambio, otras enfermedades raras son consecuencia de una infección, de procesos alérgicos o causadas por factores ambientales (Taruscio y cols., 2014) (<https://globalgenes.org/rare-diseases-facts-statistics/>)

Alrededor del 95 % de las enfermedades raras no tienen ningún tratamiento aprobado por la Food and Drug Administration (FDA). De hecho, durante los primeros 25 años de la Orphan Drug Act (ODA) solo fueron aprobados 326 nuevos medicamentos. Por ello son necesarias nuevas estrategias que aumenten las opciones terapéuticas de las enfermedades raras con el fin de prevenir la morbilidad y la mortalidad prematura, y de mejorar la calidad de vida y el potencial socioeconómico de las personas afectadas. Esto incluye también el incremento de la financiación para el desarrollo de nuevas terapias, y estrategias para aumentar el impacto de esos fondos. Desde 1983 la ODA y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) promueven la financiación específica de nuevas fármacos o productos biológicos para el tratamiento de enfermedades raras, los conocidos como medicamentos huérfanos

(<https://globalgenes.org/rare-diseases-facts-statistics/>; Swinney y Xia, 2014). Para designar un medicamento como huérfano en la Unión Europea, éste debe estar destinado al tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad que ponga en peligro la vida o sea crónicamente debilitante y además debe ser improbable que la comercialización del medicamento genere retornos suficientes para justificar la inversión necesaria para su desarrollo (Giannuzzi y cols., 2017).

1.2. Esclerodermia. Definición, fisiopatología, tratamiento actual y pronóstico.

La esclerodermia o esclerosis sistémica (SSc) es una enfermedad compleja del tejido conectivo, cuya etiología es desconocida, y que conlleva afectación multiorgánica y manifestaciones clínicas muy heterogéneas asociadas a una elevada mortalidad. Según su prevalencia, la SSc es una enfermedad rara que afecta a entre 150 y 300 personas por millón y, aunque está presente en todo el mundo, su prevalencia es menor en el Norte de Europa y Japón (<150 casos por millón) que en las zonas del Sur de Europa, América del Norte y Australia (276-443 casos por millón). Como sucede con otras enfermedades autoinmunes es más frecuente en mujeres que en hombres (ratio 4:1) y la etnicidad influye sobre las manifestaciones de la enfermedad y la mortalidad (Fuschiotti, 2016).

Los criterios de clasificación de la SSc fueron establecidos en 1980 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR). Estos criterios no consideraban marcadores serológicos ni tenían en cuenta algunos rasgos leves de la enfermedad, por lo que pacientes con SSc temprana no quedaban incluidos (Massi y cols., 1980). En 2013 fueron actualizados de forma conjunta por el ACR y la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) con el objetivo de incluir un mayor espectro de pacientes con SSc al tener en cuenta las características vasculares, fibróticas e inmunológicas de la enfermedad. Esta nueva clasificación es también de especial relevancia no solo para un diagnóstico más preciso sino también para el diseño y aplicación de terapias más personalizadas. Estos nuevos criterios de clasificación incluyen el engrosamiento de la piel de los dedos de ambas manos hasta las articulaciones metacarpofalángicas y además, tienen en cuenta otros factores como las úlceras digitales, la telangiectasia, el fenómeno de Raynaud o la presencia de ciertos autoanticuerpos (van den Hoogen y cols., 2013).

En función de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y el grado de afectación se establecen dos formas de presentación: limitada cutánea (lcSSc) y difusa (dSSc). La primera se caracteriza por la afectación principalmente de la piel. En ella predominan las complicaciones vasculares sobre la fibrosis y suelen afectarse las zonas distales de las extremidades y también la cara, el cuello y el pecho. El daño a los órganos internos se produce más tarde y es menos grave. Por otro lado, la dSSc es la presentación más severa de la enfermedad y tiene una progresión más acelerada. En ella la fibrosis de la piel es más extensa y se acompaña de la afectación de órganos internos como pulmones, riñones o esófago, entre otros (Pattanaik y cols., 2015).

Aunque la etiología de la SSc no se conoce completamente, se ha descrito que podría resultar de una interacción entre factores ambientales tales como la exposición a solventes orgánicos, ciertas drogas o infecciones víricas, y la predisposición genética (De Martinis y cols., 2016). La SSc es el resultado de tres procesos patológicos principales: la respuesta inmune innata y adaptativa que conlleva la producción de autoanticuerpos, el daño de las células endoteliales de la microvasculatura y la disfunción de los fibroblastos dando lugar a la acumulación excesiva de colágeno y otros elementos de la matriz extracelular, siendo finalmente la fibrosis la característica principal en la SSc (Figura 1) (Pattanaik y cols., 2015).

La lesión temprana está acompañada de inflamación perivascular e infiltrados inflamatorios compuestos mayoritariamente por linfocitos T y macrófagos, y en menor medida por células B. Este fenómeno inflamatorio juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad. Inicialmente, la fibrosis es más destacada en la dermis reticular, pero conforme progresa, la capa de tejido adiposo se ve también afectada. La sustitución progresiva de la arquitectura del tejido por elementos de la matriz extracelular ricos en colágeno conlleva el deterioro funcional de los órganos afectados (Varga y Abraham, 2007).

La activación de la producción de colágeno puede ser regulada por diferentes citoquinas liberadas por las células inmunes infiltradas en el tejido o por los propios fibroblastos. Se ha descrito que el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), la interleuquina 4 (IL4), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF α) regulan la proliferación de los fibroblastos y la deposición de matriz extracelular (Jinnin, 2010). La sobreproducción de TGF β ,

entre otras citoquinas profibróticas, es característica en la SSc y conduce a la activación de los fibroblastos, su resistencia a la apoptosis, y el aumento de la diferenciación hacia miofibroblastos, los cuales son los principales responsables de la síntesis excesiva de colágeno (Jelaska y Korn, 2000).

Otro de los principales factores en el desarrollo de la SSc y, posiblemente, uno de los primeros eventos de la enfermedad es la afectación vascular. El daño endotelial se observa incluso antes que la fibrosis a nivel histopatológico y el fenómeno de Raynaud o las úlceras digitales preceden a otras manifestaciones clínicas de la enfermedad (Varga y Abraham, 2007). Los daños estructurales de la vasculatura en la SSc están causados por la constante remodelación vascular y se clasifican en dos categorías. Por un lado, la vasculopatía obliterante proliferativa provoca el estrechamiento del lumen vascular mientras que, por otro lado, la vasculopatía destructiva causada por la apoptosis de las células endoteliales da lugar a la pérdida de capilares. Todo este proceso deriva en la pérdida de flujo sanguíneo que da lugar a hipoxia tisular en los pacientes con SSc en estadios avanzados (Asano y Sato, 2015).

El tercer factor implicado en la fisiopatología de la enfermedad es la autoinmunidad. La presencia de autoanticuerpos contra antígenos intracelulares es una característica que está presente en el 95 % de los pacientes y que es considerada como un biomarcador importante para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Algunos autoanticuerpos se consideran muy específicos de la enfermedad, como los anticuerpos anti-centrómero, que están ligados a la forma lcSSc, o los anticuerpos anti-topoisomerasa I o anti RNA-polimerasa, que se han asociado a la dSSc. Más recientemente se ha descrito la presencia de autoanticuerpos contra antígenos no nucleares que ejercen funciones celulares como la activación de fibroblastos. Entre estos se incluyen anticuerpos contra las células endoteliales, los fibroblastos o el receptor de PDGF (Kayser y Fritzler, 2015).

Aunque en los últimos años se han realizado importantes avances en el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad aún no existe un tratamiento efectivo. Además, al tratarse de una enfermedad sistémica con un amplio espectro de características clínicas las opciones terapéuticas son difíciles. Actualmente, los tratamientos se centran principalmente en controlar la fase inflamatoria y van dirigidos a controlar el daño vascular, el proceso fibrótico y la inflamación (Lee y Pope, 2016).

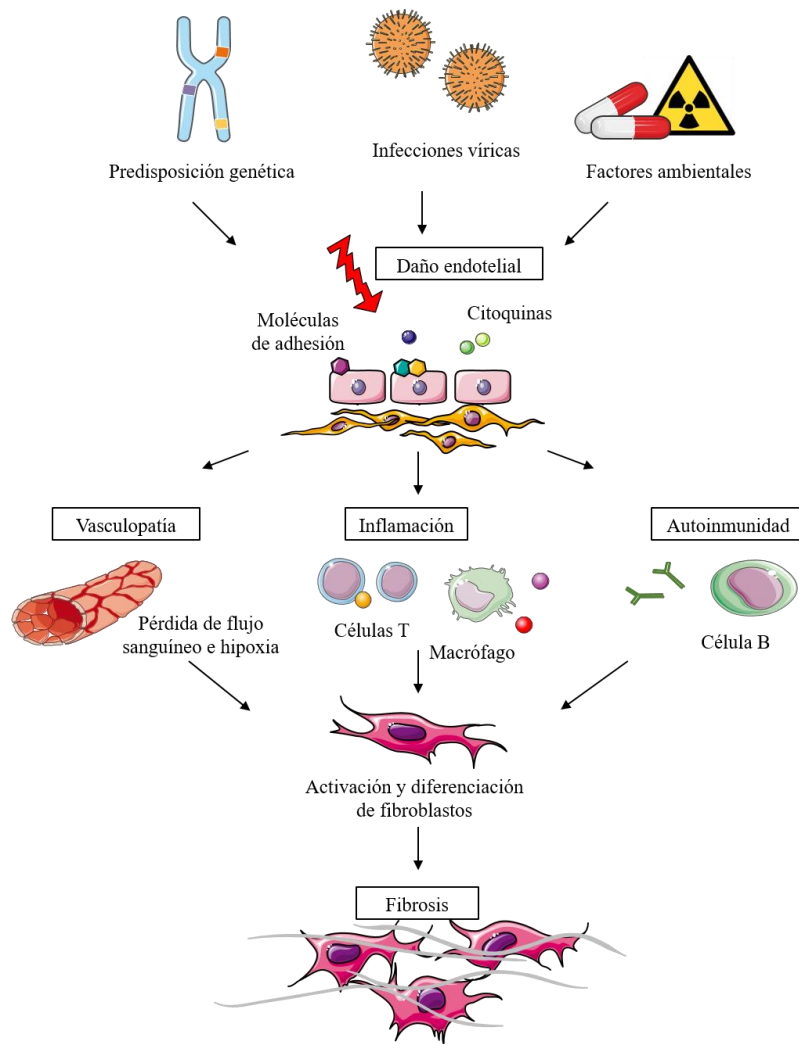


Figura 1. Etiopatogenia de la SSc. Las células endoteliales dañadas liberan factores de crecimiento y citoquinas que promueven la infiltración inflamatoria y la autoinmunidad. Además la pérdida progresiva del flujo sanguíneo debido al daño vascular conduce a la hipoxia tisular. Todos estos eventos son clave en la activación y diferenciación de los fibroblastos que da lugar a la síntesis excesiva de elementos de la matriz extracelular que conducen a la fibrosis.

En la actualidad, los principales tratamientos antifibróticos en la SSc son agentes inmunosupresores, tales como la Ciclofosfamida (sola o seguida por el tratamiento con Micofenolato mofetilo), el Metotrexato o los corticoesteroides. Sin embargo, las mejoras son modestas y los efectos desaparecen rápidamente tras el cese de los tratamientos (Yanaba, 2016). En esta línea, aunque se ha sugerido que el bloqueo de TGF β mediante anticuerpos podría ser efectivo como terapia antifibrótica, no se han encontrado beneficios en los primeros ensayos clínicos realizados (Del Papa y Zaccara, 2015).

En el ámbito del daño vascular, la primera línea terapéutica recomendada por la EULAR consiste en bloqueadores de los canales de calcio para controlar la característica más frecuente de la enfermedad, el fenómeno de Raynaud. Adicionalmente, diferentes antagonistas del receptor de la endotelina 1 han resultado ser eficaces en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar, aunque entre ellos solo Bosentan resulta efectivo también para la prevención de las úlceras digitales. Por otro lado, los vasodilatadores como Iloprost o los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 han demostrado cierta mejora sobre la cicatrización de las úlceras cutáneas (Aringer y Erler, 2017).

Una de las aproximaciones terapéuticas que se está siendo investigada en la actualidad es bloqueo del receptor de interleuquina 6 (IL6) con Tocilizumab. La IL6 está sobre expresada en la piel de los pacientes con SSc, y se ha descrito que Tocilizumab tiende a mejorar la afectación dérmica y pulmonar de la enfermedad. Por otro lado, hay un ensayo clínico en marcha para evaluar el efecto de Nintedanib, un triple inhibidor de la angiocinasa que actúa sobre las rutas de señalización activadas por receptores de citoquinas profibróticas (Aringer y Erler, 2017).

Las células B también juegan un papel importante en el desarrollo de la SSc por lo que su inhibición se postula como otra posibilidad terapéutica. De hecho, hay evidencias de que Rituximab, un anticuerpo dirigido contra las células B CD20⁺ disminuye la fibrosis dérmica en pacientes con SSc (Yanaba, 2016). Durante las últimas décadas se han llevado a cabo también estudios piloto sobre el uso del trasplante de células madre hematopoyéticas como opción terapéutica para la SSc de rápida evolución. Sin embargo, aunque los resultados son esperanzadores, se ha encontrado una elevada mortalidad asociada al tratamiento durante el primer año (Del Papa y Zaccara, 2015).

Además, la polarización hacia linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1) también supone una diana atractiva para el desarrollo de nuevos tratamientos, puesto que en la SSc predominan las citoquinas producidas por linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2) tales como IL4, IL6 o la interleuquina 13 (IL13). Finalmente, futuros tratamientos podrían considerar la utilización de bloqueantes más eficaces de la señalización por TGFβ, o el uso de terapias combinadas (Yanaba, 2016, Aringer y Erler, 2017).

1.3. Enfermedad de Huntington. Fisiopatología, tratamiento actual y pronóstico.

La enfermedad de Huntington (EH) o corea de Huntington descrita por George Huntington en 1872, es un desorden neurodegenerativo de carácter autosómico dominante causado por una expansión de la repetición del triplete CAG en la región que codifica para la proteína Huntingtina (Htt) (MacDonald y cols., 1993). Se trata de una enfermedad grave y rara, cuya prevalencia es de 4-10 casos por cada 100.000 en países occidentales (Ross y Tabrizi, 2011; Zuccato y cols., 2010).

A nivel clínico, la EH se caracteriza por la combinación de tres síndromes: desorden motor en el que se distingue la corea en las primeras fases y bradiquinesia conforme progresa la enfermedad, problemas cognitivos y trastornos psiquiátricos como depresión e irritabilidad. Se trata de una enfermedad de inicio sutil, que normalmente aparece alrededor de los 40 años, y que empeora gradualmente en los 10-20 años siguientes (Mestre y Sampaio, 2017). Los pacientes suelen fallecer por problemas derivados de los trastornos cognitivos y motores graves, tales como complicaciones de caídas, inanición, disfagia o aspiración (Walker, 2007).

La Htt está codificada por el gen *IT15* que se sitúa en el brazo corto del cromosoma 4 y se trata de una proteína ubicua, tanto en humanos como en roedores, cuya función celular no se conoce completamente. La mutación que causa la enfermedad consiste en la expansión del número de tripletes CAG, lo que va a determinar si la penetrancia de la EH es incompleta (36-40 repeticiones) o completa (>41 repeticiones). Además existe una relación inversa entre la edad de inicio de la enfermedad y el número de repeticiones CAG (Walker, 2007). De hecho, un 10 % de los enfermos presenta un número de repeticiones del triplete extremadamente alto (>60 repeticiones) que se asocia con la aparición de EH juvenil antes de los 20 años de edad (Zuccato y cols., 2010).

El aumento en el número de tripletes da lugar a una proteína mutada que presenta una cola de poliglutamina. Esta Htt mutada forma agregados nucleares y citoplasmáticos que perturban el normal funcionamiento celular a través de la unión a proteínas u orgánulos (Orr y cols., 2008). Entre los procesos patológicos de la EH se han descrito desregulación transcripcional, inhibición del catabolismo de proteínas, alteración del citoesqueleto, cambios en la función mitocondrial y alteración de la excitotoxicidad y la homeostasis del calcio (Orr y cols., 2008; Lim y cols., 2008; Shin y

cols., 2005; Cui y cols.; 2006, Kumar y cols., 2014). Como consecuencia, se desencadena la muerte neuronal y la activación de las células de la glía que liberan quimiocinas y citoquinas proinflamatorias (Nayak y cols., 2011).

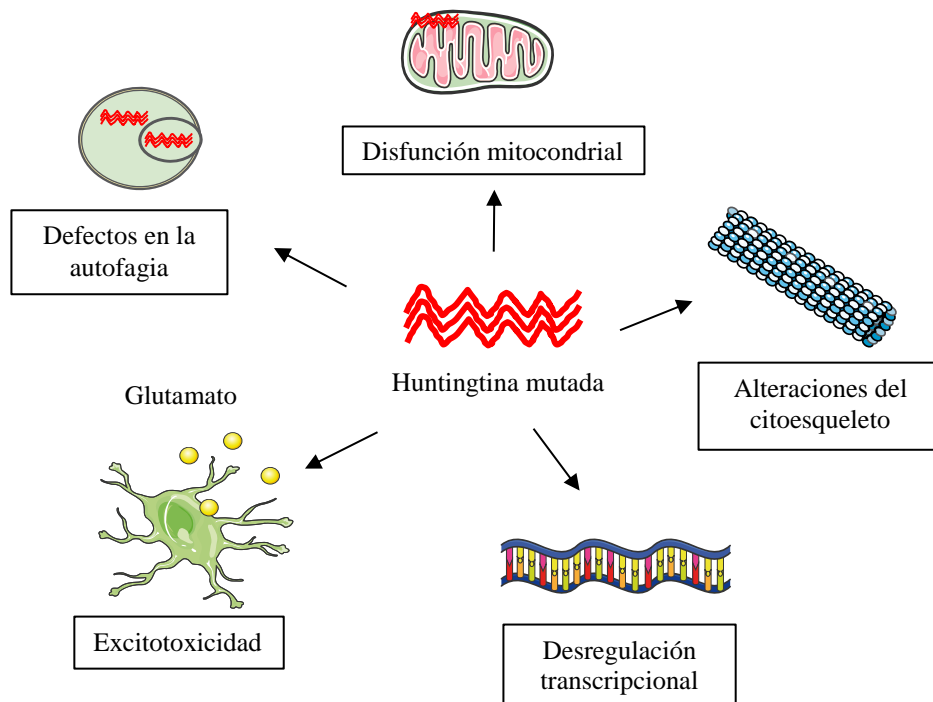


Figura 2. Mecanismos celulares implicados en la EH. La mutación en el gen de la Htt da lugar a agregados de Htt y poliglutamina que no pueden ser degradados por defectos en la autofagia. Estos agregados se acumulan en las células interactuando con diferentes proteínas causando la disfunción de la mitocondria, así como cambios en la homeostasis del calcio y excitotoxicidad. En el núcleo, estos fragmentos alteran la expresión génica. Además, se ve afectado también el transporte de vesículas.

En la EH existe un déficit bioenergético y una disfunción mitocondrial que se manifiesta en un mayor consumo de lactato en el ganglio basal y la corteza cerebral, acompañado también de una menor actividad de los complejos II y III mitocondriales y de la alteración de la ultraestructuras mitocondriales (Benchoua y cols., 2006; Fukui y Moraes, 2007; Damiano y cols., 2010). En este sentido, estudios en personas con EH confirman un menor número y tamaño de mitocondria y una alteración de la dinámica mitocondrial y de la despolarización de la membrana (Johri y cols., 2013).

La característica neuropatológica de la enfermedad es la degeneración del cuerpo estriado, aunque conforme ésta avanza también se observa una pérdida significativa de neuronas en la corteza cerebral. En el estriado, a nivel celular la enfermedad se caracteriza por la pérdida preferencial de las neuronas espinosas medias que representan el 95 % de la población neuronal (Albin y cols., 1992; Kemp y Powell, 1971). Estas neuronas están reguladas por *inputs* dopaminérgicos y glutamatérgicos provenientes de la sustancia negra y de la corteza cerebral y el tálamo respectivamente que, junto a la mayor susceptibilidad por la reducción de los niveles de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), podrían resultar en la mayor vulnerabilidad neuronal (Gil y Rego, 2008; Ehrlich, 2012).

La evaluación clínica de los pacientes con EH se lleva a cabo mediante las pruebas de la escala unificada (UHDRS). Esta escala tiene en cuenta cuatro aspectos de la enfermedad: función motora, función cognitiva, anomalías del comportamiento y capacidad funcional (Huntington Study Group, 1996). Hoy en día no existe ningún tratamiento farmacológico que pueda parar el avance de la EH y, como sucede con otras enfermedades raras, el tratamiento actual consiste en la reducción de la sintomatología asociada. Así, el único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la corea en la EH es la Tetrabenazina, un reductor reversible de la dopamina que ha mostrado disminuir la severidad de la corea aunque no la puntuación motora total. Sin embargo, este fármaco tiene bastantes efectos secundarios que limitan los beneficios clínicos. El uso de antagonistas del receptor de la dopamina, como la Triaprida, la Pridopidina o la Olanzapina, o los fármacos anti-glutamatérgicos también han mostrado algunos beneficios en el tratamiento de la corea (Coppen y Roos, 2017).

En los últimos años, el desarrollo de nuevas terapias se centra en estrategias para disminuir la carga de Htt en los estadios tempranos de la EH. Esto puede conseguirse inhibiendo la transcripción de la proteína utilizando proteínas de dedos de Zinc o actuando a nivel de ARN aumentando la degradación o reprimiendo su traducción. De hecho, hay en marcha un ensayo clínico con oligonucleótidos anti-sentido (IONIS-HTTx), para estudiar su seguridad y tolerabilidad en humanos (Mestre y Sampaio, 2017).

2. Sistema endocannabinoide y enfermedad.

2.1 Sistema endocannabinoide.

El sistema endocannabinoide (SE) se compone de los receptores cannabinoides, los cannabinoides sintetizados de forma endógena por el organismo y las enzimas responsables de la síntesis y degradación de dichos endocannabinoides. Este sistema está involucrado en múltiples funciones biológicas, como el aprendizaje y la memoria, la ingesta, la percepción del dolor, la neuroprotección o la respuesta inmune, entre otras. (Di Marzo y cols., 2004).

El inicio de la identificación del SE tuvo lugar con el aislamiento del principio psicoactivo del *Cannabis sativa*, el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), por el Prof. Raphael Mechoulam en los años 60 (Mechoulam y Gaoni, 1965). Aunque inicialmente se creía que los cannabinoides, dada la naturaleza lipídica, ejercían sus efectos interactuando con lípidos de membrana, más tarde se clonaron e identificaron los principales receptores cannabinoides de membrana que fueron denominados CB₁ y CB₂ (Matsuda y cols., 1990; Munro y cols., 1993). Estos receptores tienen siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G y su compleja señalización incluye la modulación de la adenilato ciclasa, la regulación de los canales iónicos y la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) entre otras señales (Pertwee y Ross, 2002).

Aunque los receptores cannabinoides están presentes en todo el organismo la distribución difiere entre ambos. El receptor CB₁ se localiza principalmente en el sistema nervioso central (SNC), encontrándose los niveles más altos en el ganglio basal, el cerebelo, el hipocampo y la corteza cerebral. Pero también se localiza en otros tejidos como el hígado, el músculo, el endotelio o el tejido adiposo (Liu y cols., 2000; Mackie, 2008). Por el contrario, el receptor CB₂ se expresa mayoritariamente a nivel periférico en las células del sistema inmune, pero también en la piel, el tejido adiposo, el hígado o el páncreas. A nivel del SNC el receptor CB₂ se localiza principalmente en las células de la glía (McPartland, 2008; Pacher y cols., 2006).

Tras la confirmación de la existencia del receptor CB₁, la investigación se dirigió hacia la búsqueda de agonistas endógenos y en 1992, Devane y sus colaboradores aislaron del cerebro porcino un ácido graso derivado del ácido araquidónico que actuaba como ligando endógeno de CB₁, la araquidonoil etanolamida o anandamida (AEA)

(Devane y cols., 1992). Unos años más tarde, se consiguió identificar el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) como un segundo endocannabinoide para CB₁ y CB₂, el cual se encuentra en el cerebro en cantidades superiores a AEA y se considera el principal agonista endógeno de CB₁ (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995). Posteriormente se han descrito además otros endocannabinoides: 2-araquidonilglicerol éter (noladín éter) (Hanus y cols., 2001), o-araquidonil etanolamina (virodamina)(Porter y cols., 2002), N-araquidonoildopamina (NADA) (Bisogno y cols., 2000; Huang y cols., 2002), N-araquidonil-L-serina (ARA-S) (Milman y cols., 2006) y N-oleoildopamina (Pertwee, 2008).

Los endocannabinoides son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga sintetizados a demanda a partir de fosfolípidos como el ácido araquidónico presentes en la membrana celular y se liberan de forma inmediata para unirse a los receptores cannabinoides (Miller y Devi, 2011). La principal vía de síntesis de la AEA tiene lugar a partir de la hidrólisis del N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina (NAPE) mediada por la fosfolipasa D. Su vida media es muy corta y una vez en la célula, se metaboliza por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) para dar lugar a ácido araquidónico y etanolamina. El 2-AG se sintetiza mediante la acción de la diacilglicerol lipasa (DAGL) a partir del diacilglicerol y en su degradación parecen estar implicadas tanto la FAAH como la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Di Marzo, 2008).

Los endocannabinoides regulan diferentes procesos biológicos, sin embargo, todos estos efectos no pueden ser explicados por la interacción con los receptores CB₁ y CB₂. Así, se han descrito otros receptores implicados en la señalización cannabinoide, entre los que se encuentran los receptores ionotrópicos TRPs como el TRPV-1, los receptores de serotonina (5-HT), el receptor huérfano acoplado a proteínas G (GPR55) o los receptores nucleares activados por el proliferador del peroxisoma (PPAR) (Pertwee y cols., 2010).

La expresión de los receptores cannabinoides se ha visto alterada en diversos procesos patológicos, aunque no se conoce exactamente a través de qué mecanismos se producen estos cambios. Entre las posibles causas se han descrito variaciones en los niveles de proteína de los receptores, cambios transcripcionales a nivel de promotores génicos, interacción con otros factores o la autorregulación mediante la interacción de los receptores cannabinoides con sus ligandos. Por lo tanto, la alteración del sistema endocannabinoide en diversas patologías señala su potencial terapéutico, y el

conocimiento de los mecanismos de regulación del SE es de especial importancia a la hora de desarrollar nuevas terapias basadas en cannabinoides (Miller y Devi, 2011).

2.2. Sistema endocannabinoide en Esclerodermia.

El SE afecta a diversos procesos biológicos implicados en el desarrollo de la SSc, tales como la angiogénesis, la diferenciación y apoptosis celular, el metabolismo y la función inmune. El principal órgano afectado por la SSc es la piel donde se han identificado los diferentes componentes del SE. Los receptores CB₁ y CB₂ se expresan en numerosas células de la piel tanto en humanos como en ratones y los endocannabinoides AEA y 2-AG, así como las enzimas responsables de su metabolismo, también se han identificado en este tejido (Biro y cols., 2009).

En general los cannabinoides ejercen un efecto inmunosupresor y antiinflamatorio sobre el sistema inmune. Entre las funciones de los cannabinoides se encuentran la inhibición de la proliferación y de la activación de las células T, el aumento de la apoptosis de las mismas, así como la reducción de la producción de citoquinas y quimioquinas. Aunque ambos receptores intervienen en este proceso, la mayor parte de los estudios indican que el receptor CB₂ está vinculado a la mayoría de las funciones inmunológicas del SE (Katchan y cols., 2016). Se ha descrito que los agonistas de CB₂ disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias tanto *in vivo* como *in vitro*, entre las que se incluyen TNF α , el interferón gamma (IFN γ), la interlequina 2 (IL2) y la interleuquina 1 β (IL1 β), que propagan el fenómeno inflamatorio y regulan la expresión de moléculas de adhesión. Los agonistas de CB₂ han mostrado que también inhiben la polarización hacia Th1 y Th17 tanto *in vitro* como *in vivo* (Pattanaik y cols., 2015). Algunos cannabinoides afectan también a las células B, principalmente a través de CB₂, lo cual no es extraño dado que éstas presentan los niveles más altos de expresión del receptor entre las células del sistema inmune. Así, ligandos de CB₂ regulan la activación y diferenciación de las células B y también la producción de inmunoglobulinas (Ig) (Cabral y Griffin-Thomas, 2009). El hecho de que la activación de CB₂ desencadene la apoptosis en las células del sistema inmune sugiere un nuevo enfoque para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes que no implica efectos psicoactivos (Rieder y cols., 2010).

El sistema endocannabinoide regula también el funcionamiento del endotelio vascular. Los agonistas de CB₂ modulan la activación de las células endoteliales y

disminuyen la sobreexpresión de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) (McPartland, 2008). Por otro lado, los antagonistas de CB₁ reducen la proliferación y la migración de células endoteliales en respuesta a PDGF (Rajesh y cols., 2008b). Además algunos endocannabinoides como la AEA o la virodamina actúan como vasodilatadores por mecanismos independientes de los receptores cannabinoides (Pattanaik y cols., 2015).

La eficacia de algunos cannabinoides en la prevención y el tratamiento de la fibrosis puede atribuirse a diferentes vías de señalización, dependientes o independientes de los receptores cannabinoides. En esta línea, el cannabidiol (CBD) promueve la apoptosis de las células estrelladas hepáticas activadas, que son las principales responsables de la fibrogénesis en el hígado. Este efecto, provocado por un aumento del estrés en el retículo endoplásmico, es independiente de la activación de los receptores cannabinoides (Lim y cols., 2011). Altas concentraciones de AEA también han mostrado inducir la apoptosis en este tipo celular (Siegmond y cols., 2005). La resistencia a la apoptosis de los fibroblastos es también uno de los signos distintivos de la SSc. El tratamiento con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 ha demostrado aumentar la apoptosis en fibroblastos de pacientes con SSc pero no en fibroblastos sanos y además de una manera independiente de la activación de CB₁ o CB₂ (Garcia-Gonzalez y cols., 2009).

Es interesante destacar que ambos receptores cannabinoides están sobreexpresados en los fibroblastos de pacientes con SSc y han mostrado ejercer efectos opuestos en el desarrollo de la fibrosis (Garcia-Gonzalez y cols., 2009). Además, la actividad de algunos cannabinoides sobre PPAR γ y TRPV1 también podría explicar parcialmente este efecto antifibrótico (Okada y cols., 2011; Wu y cols., 2009)

La inactivación genética de CB₁ reduce la fibrosis en modelos experimentales de SSc de forma indirecta a través de la inhibición de la infiltración de leucocitos en el tejido dañado. Estos infiltrados liberan citoquinas como IL4 e IL13 que promueven la síntesis de colágeno por los fibroblastos. Por lo tanto, el bloqueo de CB₁ sería beneficioso en las etapas tempranas de la SSc donde predomina el fenómeno inflamatorio, ya que este efecto no resulta protector en modelos animales en los que la fibrosis se produce por mecanismos independientes de la inflamación. En concordancia con estos datos la activación de CB₁ exacerba la fibrosis experimental inducida por bleomicina (BLM) (Marquart y cols., 2010). En este sentido, ratones knockout para la

enzima FAAH, que presentan mayores niveles de endocannabinoides, son más sensibles al desarrollo de fibrosis inducida por BLM a través de la activación de CB₁. Es más, se ha demostrado una reducción de los niveles de expresión de la enzima FAAH en los fibroblastos de pacientes con SSc (Palumbo-Zerr y cols., 2012).

Por el contrario, la activación de CB₂ protege frente a la fibrosis y reduce los infiltrados inflamatorios en modelos experimentales de SSc. El tratamiento con WIN 55,212-2, un agonista dual de CB₁/CB₂, ha mostrado reducir la inflamación, la activación de fibroblastos y la señalización profibrótica por TGFβ y PDGF y cols., 2011). En concordancia, la administración de ácido ajulémico, un cannabinoide sintético no psicoactivo derivado del Δ⁹-THC, que se comporta como agonista dual de PPARγ/CB₂, previene el desarrollo de fibrosis y mejora ligeramente su progresión (Gonzalez y cols., 2012); y la activación de CB₂ mediante el agonista JWH-133 reduce la proliferación de los fibroblastos y la reacción inmune provocada por la administración de ácido hipocloroso (Servettaz y cols., 2010). En cambio, la inhibición genética y farmacológica del CB₂ aumenta la susceptibilidad a desarrollar fibrosis *in vivo* (Akhmetshina y cols., 2009).

En conjunto, el SE regula un gran número de funciones por mecanismos tanto dependientes como independientes de los receptores CB₁ y CB₂. Entre ellos se encuentran la inflamación, la respuesta inmune innata y adaptativa, la función vascular y la fibrogénesis por lo que se postula como una opción de terapia muy atractiva para la SSc.

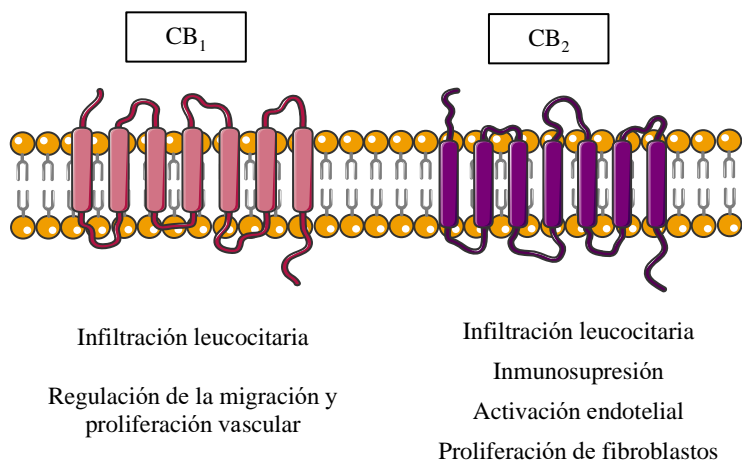


Figura 3. Principales efectos de los receptores cannabinoides sobre los procesos patológicos implicados en el desarrollo de SSc

2.3. Sistema endocannabinoide en Huntington.

Se sabe que el SE juega un papel importante en las enfermedades neurodegenerativas. Entre los mecanismos implicados se encuentran la regulación de la transmisión glutamatérgica a través de los receptores CB₁ presinápticos; la modulación de la respuesta inmune y la liberación de mediadores inflamatorios por vías dependientes e independientes de los receptores cannabinoides; la activación de vías de señalización citoprotectoras o factores neurotróficos; la modulación de la excitabilidad y la homeostasis del calcio; los mecanismos antioxidantes de algunos cannabinoides; y la hipotermia mediada por CB₁ que reduce el ratio metabólico y la demanda de oxígeno (Pacher y cols., 2006).

El SE tiene un gran potencial terapéutico en la EH debido a la gran abundancia de sus elementos en el ganglio basal y a las alteraciones que se producen en el mismo durante el transcurso de la enfermedad. La pérdida de los receptores CB₁ en las terminales GABAérgicas aferentes y la desensibilización de estos receptores es uno de los primeros signos de disfunción celular en la EH y se observa incluso en la fase asintomática (Fernandez-Ruiz y cols., 2011). Entre los mecanismos implicados en este proceso se ha señalado la interferencia de la Htt mutada con la transcripción del gen CNR1 (Blazquez y cols., 2011; Horne y cols., 2013). A medida que avanza la enfermedad hay una pérdida masiva de receptores CB₁ asociada a la muerte de las neuronas espinosas medias del estriado, lo cual es a su vez concordante con la sintomatología hiperquinética de los pacientes (Fernandez-Ruiz y cols., 2011).

Otros elementos del SE también se encuentran alterados en la EH. Así, se ha descrito una reducción de la actividad de la enzima FAAH en linfocitos y en el cerebro de los pacientes con EH, dando lugar a unos niveles de AEA hasta seis veces mayores que en personas sanas (Battista y cols., 2007). Todo ello sugiere una señalización hipofuncional del SE en ganglios basales que contribuiría a la hiperquinesia y que pone de manifiesto el potencial de los cannabinoides para mitigar la disfunción motora (Pacher y cols., 2006). En este contexto, los agonistas de CB₁ podrían servir como tratamiento sintomático de la hiperquinesia. De hecho, en el modelo genético R6/2 de EH se ha observado que la ablación de CB₁ empeora la sintomatología y el daño neurológico y, por el contrario, la activación de CB₁ mediante la administración de Δ^9 -THC o Sativex®, un spray sublingual con cantidades equimolares de CBD y Δ^9 -THC,

mejora la patología de la enfermedad cuando se inicia el tratamiento antes de la fase sintomática (Blazquez y cols., 2011; Valdeolivas y cols., 2017). Dada la pérdida progresiva de los receptores CB₁ y el desarrollo de acinesia en lugar de hiperquinesia como síntoma principal en los estadios más avanzados, el efecto de estos compuestos estaría limitado al tratamiento de las fases iniciales e intermedias de la enfermedad (Pazos y cols., 2008a). Es más, un ensayo clínico piloto con Nabilona (Cesamet®), un análogo sintético del Δ^9 -THC, no mostró mejoras en la puntuación UHDRS de las funciones motoras ni cognitivas (Curtis y cols., 2009) y la administración de Sativex® durante 12 semanas no mejoró la actividad motora, cognitiva o comportamental de los pacientes (Lopez-Sendon Moreno y cols., 2016). A pesar de que no se observaron mejoras clínicas, estos ensayos con cannabinoides ponen de manifiesto la seguridad y tolerabilidad para su uso terapéutico. Por tanto, la activación farmacológica de CB₁ o estrategias para prevenir la pérdida de dichos receptores deberían abordarse en etapas más tempranas revisando la dosis y el periodo de administración de los cannabinoides.

En otros estudios preclínicos con determinados cannabinoides que actúan sobre el TRPV-1 se ha observado una reducción de la hiperquinesia asociada a EH. La activación de este receptor vanilloide cuyos niveles, a diferencia de los receptores CB₁, no se ven reducidos durante el transcurso de la EH también podría suponer una buena opción terapéutica (Pazos y cols., 2008a).

El efecto de los cannabinoides no se limita a la mejoría sintomática de la EH, sino que podrían ayudar también a retrasar o detener la progresión de la enfermedad. En este sentido, la activación de los receptores CB₁ confiere neuroprotección reduciendo la liberación de glutamato y la excitotoxicidad y provocando la activación de vías de señalización relacionadas con la supervivencia celular (Pazos y cols., 2008b). Por otro lado, se ha demostrado un aumento de la expresión de CB₂ en el estriado de enfermos de EH asociado al incremento de la gliosis en la zona. La expresión de CB₂ en el cerebro sano es muy baja y se limita principalmente a subpoblaciones de astrocitos y a la microglía. Durante la EH, la Htt mutada inicia una cascada citotóxica que conlleva la activación de las células de la glía (Crotti y cols., 2014). La microglía reactiva libera diferentes factores, como óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno (ROS) o citoquinas proinflamatorias que deterioran la homeostasis neuronal. Diferentes cannabinoides han mostrado ejercer importantes efectos neuroprotectores modulando el fenómeno inflamatorio a través de la activación de CB₂, por lo que este receptor parece

ser una diana terapéutica clave para controlar los efectos mediados por las células de la glía (Fernandez-Ruiz y cols., 2011).

Durante la EH, al igual que sucede en otras enfermedades neurodegenerativas, existe un desequilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos endógenos de defensa antioxidantes. Así, ciertos cannabinoides han mostrado restaurar este balance y mejorar la supervivencia neuronal (Fernandez-Ruiz y cols., 2011). Estos efectos independientes de los receptores son particularmente evidentes en el modelo inducido por ácido 3-nitropropiónico (3NP), un inhibidor del complejo II mitocondrial, donde prevalece el daño oxidativo. La administración de cannabinoides con propiedades antioxidantes como Δ^9 -THC, CBD o Cannabigerol (CBG) han mostrado ser neuroprotectores en este modelo (Lastres-Becker y cols., 2004; Sagredo y cols., 2007; Valdeolivas y cols., 2015).

Algunos estudios han señalado también la capacidad regenerativa de los cannabinoides. Se ha identificado una población de progenitores neuronales en la zona subventricular que está presente tanto en el cerebro sano como en pacientes con EH. Estos progenitores, que expresan el receptor CB_1 , podrían suponer una fuente para la sustitución endógena de células perdidas debido a la enfermedad neurodegenerativa (Curtis y cols., 2006). De esta manera, la activación de estas estructuras mediante cannabinoides podría activar la proliferación, migración y diferenciación de estos progenitores suponiendo una terapia neuroregenerativa (Compagnucci y cols., 2013).

En definitiva, los cannabinoides activadores de CB_1 reducirían la excitotoxicidad y servirían como tratamiento sintomático. Sin embargo, teniendo en cuenta que los agonistas de CB_1 no ejercen efectos en las fases tardías, la activación de CB_2 y los efectos antioxidantes independientes de receptores que muestran algunos cannabinoides se postulan como las dianas clave para el tratamiento de la neurodegeneración a largo plazo (Fernandez-Ruiz y cols., 2011).

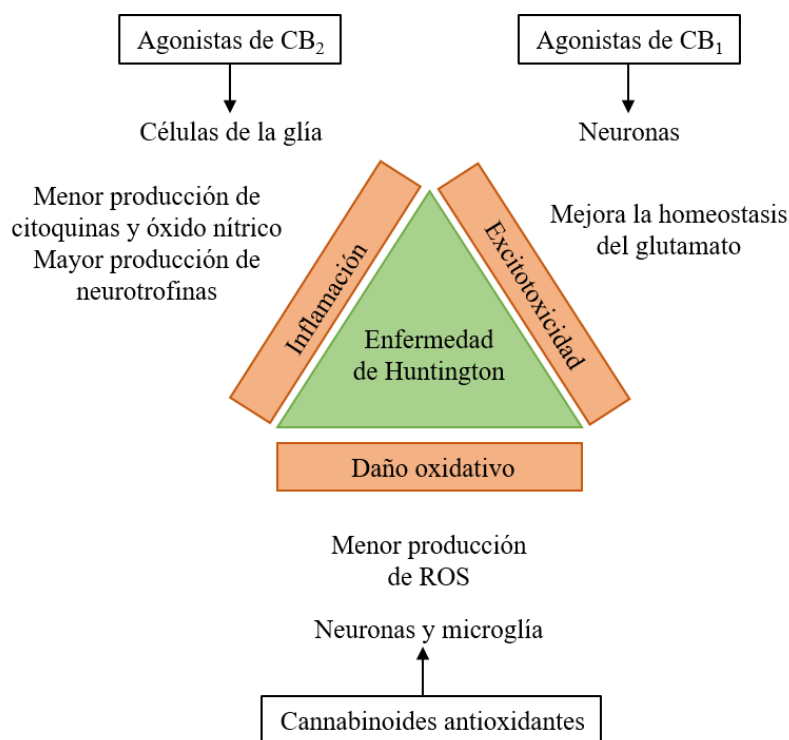


Figura 4. Mecanismos sugeridos para la protección ejercida por los cannabinoides contra el daño de las neuronas de proyección estriatal en la EH. Adaptado de (Pazos y cols., 2008a)

3. Receptores nucleares.

3.1. Definición.

Los receptores nucleares son una familia de factores de transcripción activados por ligandos que regulan la expresión de genes implicados en funciones biológicas diversas, tales como el desarrollo y el metabolismo. A partir del descubrimiento y el clonaje del primer receptor nuclear en los años 80, el receptor de esteroides, se han identificado un gran número de receptores nucleares. Actualmente, se conocen 48 receptores nucleares codificados por el genoma humano. La estructura de todos los receptores nucleares es muy similar y se componen de un primer dominio aminoterminal que contiene diferentes regiones de transactivación independientes de ligandos (AF-1); una región de unión al ADN con dos dedos de Zinc que dirigen el receptor a secuencias del ADN conocidas como elementos de respuesta a hormonas (DBD); una región “bisagra” que permite los cambios conformacionales del receptor para su dimerización y la unión al DNA; y una región carboxiterminal compuesta por el dominio de unión a ligando (LBD) y un dominio de transactivación dependiente de ligandos (AF-2) (Aranda y Pascual, 2001).

Los ligandos endógenos de los receptores nucleares son de naturaleza lipídica, por lo que pueden atravesar directamente la membrana plasmática y unirse a ellos dentro de la célula. Entre estos ligandos se encuentran las hormonas esteroideas y otros mediadores lipídicos como el ácido retinoico, los oxiesteroles o las hormonas tiroideas. Sin embargo, en muchos de los casos no se han identificado ligandos para algunos receptores nucleares, los cuales se conocen como receptores huérfanos (Sever y Glass, 2013).

Los receptores nucleares se agrupan en cuatro clases dependiendo de su mecanismo de acción. Los receptores de tipo I, como los receptores de andrógenos o de progesterona, se encuentran anclados al citoplasma por proteínas chaperonas y, en respuesta a ligandos, son liberados permitiendo su homodimerización, la entrada al núcleo y la asociación a co-activadores transcripcionales. El segundo tipo de receptores, entre los que se encuentran el receptor X retinoide (RXR) o los receptores PPAR, se localizan en el núcleo unidos a complejos co-represores, y tras la unión del ligando, se unen a complejos co-activadores para regular la transcripción génica. Los receptores de tipo III y IV son funcionalmente similares a los de tipo I pero se unen a secuencias directas o como monómeros, respectivamente (Sever y Glass, 2013).

Todos estos receptores son importantes en el mantenimiento de numerosas funciones fisiológicas y se ha descrito que su desregulación está asociada a problemas en la reproducción, el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y la obesidad, entre otros procesos (Rastinejad y cols., 2013).

3.2. PPAR γ como diana terapéutica en SSc y EH.

Los receptores PPARs son un subgrupo de la familia de los receptores nucleares. Existen tres receptores PPARs, denominados α , δ y γ , que están codificados por genes diferentes y se caracterizan por tener distinta distribución tisular y expresión desigual a lo largo del desarrollo. Todos ellos son factores de transcripción activados por ligandos que, tras la heterodimerización con el RXR, se unen a los promotores de sus genes diana reconociendo las secuencias de ADN conocidas como elementos de respuesta a PPAR (PPRE). Además, los PPARs pueden interactuar con otros factores de transcripción de forma independiente de su unión al ADN para regular la transcripción génica. Por ejemplo PPAR γ interactúa con la Proteína Activadora 1 (AP-1), el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y el factor nuclear potenciador de las cadenas

ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Chinetti y cols., 2000). Este último juega un papel central en la inmunidad y la inflamación y es la diana principal de PPAR γ para suprimir la respuesta inflamatoria (Duan y cols., 2008).

Existen dos isoformas de PPAR γ denominadas PPAR γ 1 y PPAR γ 2, las cuales se diferencian únicamente en 30 aminoácidos en la región aminoterminal. Mientras que PPAR γ 2 en condiciones fisiológicas solo se encuentra en el tejido adiposo, PPAR γ 1 está ampliamente distribuido por el organismo (Ahmadian y cols., 2013). Aunque los niveles de PPAR γ son relativamente bajos en el cerebro adulto, se ha observado su expresión en el ganglio basal, el tálamo y la corteza piriforme. A nivel celular esta expresión se localiza mayormente en los astrocitos y la microglía, los cuales juegan un papel muy importante en la respuesta inflamatoria en el SNC (Kapadia y cols., 2008). A nivel periférico, PPAR γ se localiza en el sistema inmune expresado en monocitos, macrófagos y en las células T y B; y también en las células epiteliales del colon, las células endoteliales y las células vasculares de músculo liso (Kapadia y cols., 2008; Dantas y cols., 2015).

Se han descrito una gran variedad de ligandos naturales de PPAR γ entre los que se incluyen los ácidos grasos y eicosanoides, componentes de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, alquil fosfolípidos, el ácido nitrolinoleico y la 15-desoxi- Δ 12,14-Prostaglandina J2 (Lehrke y Lazar, 2005). Los agonistas sintéticos más conocidos de este receptor son las tiazolidinedionas (TZDs), como la rosiglitazona (RGZ), la pioglitazona o la troglitazona, las cuales se han utilizado en la práctica clínica para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Además, diversos cannabinoides, como la AEA, el Δ^9 -THC o el ácido ajulémico también han mostrado activar PPAR γ y ejercer diversos efectos biológicos a través de este receptor (O'Sullivan, 2007).

La activación de PPAR γ en el tejido adiposo regula el metabolismo lipídico y de la glucosa y promueve el depósito de grasas y la diferenciación de los adipocitos. Además, aumenta la expresión de genes implicados en la captación de glucosa mejorando la sensibilidad a la insulina. Como se ha comentado anteriormente, la regulación de la activación de PPAR γ afecta también a otros procesos, como la inmunidad, la inflamación, así como la proliferación y la apoptosis celular (Wang y cols., 2014).

PPAR γ juega un papel importante en la coordinación de señales que regulan el balance entre la inflamación y la restauración del tejido. Se ha descrito que los macrófagos activados presentan niveles de expresión muy elevados de PPAR γ . En este tipo celular, la activación de PPAR γ disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL6, TNF α o IL1 β (Szeles y cols., 2007). Además, PPAR γ regula la polarización de los macrófagos al fenotipo M1, que se caracteriza por niveles elevados de citoquinas proinflamatorias y ROS, y favorece la diferenciación el fenotipo M2 que está implicado en la eliminación de patógenos, la cicatrización y la fagocitosis de células apoptóticas (Jiang y cols., 1998; Ricote y cols. 1998; Welch y cols., 2003; Chawla y cols., 2001). La perturbación del equilibrio entre ambos tipos de macrófagos se relaciona con diferentes desórdenes entre los que se incluye la fibrosis. Los agonistas de PPAR γ inhiben la activación de los macrófagos *in vitro* y reducen los niveles de citoquinas proinflamatorias asociadas a M1. Por otro lado, aunque se ha sugerido que PPAR γ aumenta la polarización a M2, parece que los agonistas de PPAR γ regulan un subconjunto de genes relacionados con M2 en lugar de inclinar la balanza hacia una polarización completa a M2 (Duan y cols., 2008). Por su parte, los mastocitos sobreexpresan PPAR γ tras la estimulación con antígenos, y el tratamiento con RGZ ha mostrado disminuir la liberación de histamina (Szeles y cols., 2007).

En cuanto al sistema inmune adaptativo, PPAR γ está implicado en mediar la respuesta inmune de las células T y B. Diversos ligandos de PPAR γ incluyendo algunos cannabinoideos han mostrado inhibir la proliferación de las células T en respuesta a antígenos regulando negativamente la actividad del factor nuclear de células T activadas (NFAT) (Yang y cols., 2000). PPAR γ se encuentra muy expresado en las células T CD4⁺ y regula la diferenciación de las mismas. De esta forma, la depleción de PPAR γ aumenta la diferenciación hacia Th17 mientras que su activación mediante ligandos impide dicha diferenciación (Klotz y cols., 2009). Por otra parte, PPAR γ reprime la actividad transcripcional de STAT3, un mediador crítico en la señalización de la IL-6 y en la diferenciación hacia Th17 (Wang y cols., 2004), y al mismo tiempo promueve la diferenciación de las células T reguladoras (Treg) lo que es de especial relevancia en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes (Park y Pan, 2015). Por último, los ligandos de PPAR γ inducen también la apoptosis de las células B y en este sentido las células B de ratones PPAR γ ^{+/-} se activan de forma espontánea, siendo estos animales más sensibles frente a la exposición a antígenos (Szeles y cols., 2007).

La activación de PPAR γ ha mostrado ejercer efectos positivos en diferentes modelos celulares y animales de enfermedades del SNC donde la inflamación es el componente mayoritario de la patología neurológica. El tratamiento con TZDs reduce significativamente la sintomatología motora de la enfermedad de Parkinson en ratones, así como la activación de células T, macrófagos y microglía en modelos de Esclerosis Múltiple (MS) (Kapadia y cols., 2008). De hecho el compuesto VCE-003, un derivado quinona de CBG agonista de PPAR γ , mostró eficacia sobre la actividad motora y disminuyó la respuesta neuroinflamatoria en diferentes modelos murinos de MS (Granja y cols., 2012; Carrillo-Salinas y cols., 2014).

La inflamación tiene una función esencial en la patogénesis de una gran variedad de desórdenes neurológicos. Entre otras citoquinas, el TNF α presenta unos niveles elevados en varias enfermedades neurodegenerativas lo que promueve la muerte celular. Se ha descrito que el TNF α inhibe la proliferación de los progenitores neuronales del estriado y regula negativamente PPAR γ durante la activación de las células de la glía (Ben-Hur y cols., 2003). En este sentido, la activación de PPAR γ mediante RGZ en progenitores neuronales recupera la muerte celular provocada por el TNF α , además de normalizar el estrés oxidativo y la función mitocondrial (Chiang y cols., 2013).

En los últimos años, la reducción de la expresión de la proteína 1 α co-activadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α) se ha sugerido como mecanismo subyacente a la disfunción mitocondrial en la EH (Cui y cols., 2006). PGC1 α es un co-activador transcripcional que interacciona con diversos factores implicados en la biogénesis mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la defensa antioxidante (Puigserver y Spiegelman, 2003). Diferentes ligandos de PPAR γ han mostrado restaurar los niveles de PGC1 α y sus genes diana provocando un aumento de la biogénesis mitocondrial y reduciendo el estrés oxidativo en diferentes líneas neuronales (Jin y cols., 2013; Quintanilla y cols., 2008; Ghosh y cols., 2007). Además, la activación de PPAR γ protege de la muerte inducida por Htt mutada, reduce la formación de agregados y recupera la patología motora *in vivo* (Chiang y cols., 2010). Por lo tanto, la administración de agonistas de PPAR γ podría mejorar la disfunción mitocondrial y prevenir la neurodegeneración en la EH.

PPAR γ también está implicado en la función vascular y su activación se relaciona con un efecto general antiinflamatorio y antihipertensivo. Las células

endoteliales pueden ser activadas por diferentes mecanismos tales como citotoxicidad inducida por fármacos, estrés mecánico o mecanismos inmunes. Las células endoteliales activadas amplifican la respuesta inflamatoria a través de la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) y diferentes citoquinas y quimioquinas que activan a los neutrófilos promoviendo la inflamación endotelial (Teshamariam y DeFelice, 2007; Sumagin y cols., 2008). Estos estímulos inflamatorios contribuyen a la proliferación y migración de las células vasculares de músculo liso y la activación de los macrófagos (Rajesh y cols., 2008a). Se ha descrito que la activación de PPAR γ suprime la expresión de genes pro-inflamatorios por las células endoteliales, inhibe la proliferación y migración de las células vasculares y reduce la activación de macrófagos mejorando la función endotelial (Duan y cols., 2008). En este sentido, la administración de agonistas de PPAR γ podría proteger frente al daño vascular presente en la SSc (Duan y cols., 2008) y mejorar la disfunción de la barrera hematoencefálica relacionada con la progresión de diferentes enfermedades neurodegenerativas (Zolezzi y Inestrosa, 2013).

Además de los efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores mencionados anteriormente, la activación de PPAR γ está implicada también en el proceso fibrótico. Los ligandos de PPAR γ regulan negativamente la síntesis de colágeno y la fibrogénesis en una amplia variedad de órganos. En la SSc, los fibroblastos presentan un fenotipo activado similar al que se produce tras la estimulación con TGF β que se caracteriza por la sobreproducción de colágeno, citoquinas y quimioquinas. Estos fibroblastos presentan una menor expresión de PPAR γ , guardando una relación inversa con la señalización del TGF β . Sin embargo, a pesar su baja expresión, los ligandos de PPAR γ son capaces de aumentar los niveles endógenos de este receptor, atenuando la activación y la diferenciación de los fibroblastos (Dantas y cols., 2015). El mecanismo a través del cual la activación de PPAR γ consigue abolir la señalización pro-fibrótica del TGF β es dependiente de la respuesta transcripcional de las SMADs pero no de su activación. De esta forma, PPAR γ compete por el reclutamiento del co-activador p300 con SMADs, lo que impide la transcripción del colágeno inducida por TGF β (Ghosh y cols., 2009).

Diferentes agonistas de PPAR γ han sido estudiados en modelos animales de SSc. La administración de RGZ redujo la inflamación cutánea temprana inducida por la administración de BLM, pero también previno la fibrosis dérmica reduciendo la deposición de colágeno, la acumulación de miofibroblastos en la piel y la pérdida de tejido graso subcutáneo (Wu y cols., 2009). Otro agonista de PPAR γ , el ácido 2-ciano-

3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oico (CDDO) también resultó efectivo en dos modelos complementarios de fibrosis experimental en ratones (Wei y cols., 2014). Por su parte, el cannabinoide ácido ajulémico previno la progresión de fibrosis *in vivo* y la síntesis de colágeno en fibroblastos procedentes de pacientes con SSc a través de la activación de PPAR γ (Gonzalez y cols., 2012).

La importancia de PPAR γ en enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas es evidente. Sin embargo, a pesar de los numerosos efectos beneficiosos provocados por la activación de PPAR γ , los agonistas completos como la pioglitazona y la RGZ han mostrado importantes efectos secundarios que limitan su uso terapéutico. Entre las consecuencias de la administración de las TZDs se incluyen el aumento de peso, la retención de líquidos y la osteoporosis, así como un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio y enfermedades cardiovasculares (Ahmadian y cols., 2013). Diferentes estudios sugieren que una activación moderada de PPAR γ podría desacoplar la actividad de sensibilización a la insulina de los efectos secundarios (Doshi y cols., 2010). Por lo tanto, el descubrimiento y desarrollo de moduladores selectivos de PPAR γ suponen alternativas más seguras que los agonistas completos de PPAR γ para el tratamiento de este tipo de enfermedades.

4. Cannabinoides.

4.1. Fitocannabinoides naturales.

La planta *Cannabis sativa* contiene cientos de entidades químicas entre las que se incluyen cannabinoides, terpenos y compuestos fenólicos, cada uno de ellos con diferentes propiedades biológicas (Andre y cols., 2016). Los cannabinoides naturales o fitocannabinoides son sustancias liposolubles presentes en la planta *Cannabis sativa* que suelen tener una estructura carbocíclica de 21 ó 22 átomos de carbonos y están formados generalmente por tres anillos: ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. Los fitocannabinoides más abundantes en la planta fueron caracterizados en los años 60 y 70 e inicialmente sus formas neutras se consideraron los productos naturales de la planta. Sin embargo, otras investigaciones permitieron conocer rápidamente que los constituyentes mayoritarios eran las formas ácidas o formas carboxiladas de estos cannabinoides (Hanus y cols., 2016).

En el proceso de biosíntesis de los cannabinoides (Figura 5), el pirofosfato de geranilo se puede combinar con el ácido olivetólico o el ácido divarínico dando lugar a la formación de los fitocannabinoides intermedios, el ácido cannabigerólico (CBGA) y el ácido cannabigevarólico (CBGVA), respectivamente. Ambos dan lugar al resto de cannabinoides ácidos a través de una serie de enzimas, como son la ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) sintasa, la ácido cannabidiólico (CBDA) sintasa y la CGBA sintasa (Fellermeier y Zenk, 1998; Andre y cols., 2016). Los cannabinoides neutros son generados a partir de su forma carboxilada correspondiente mediante un proceso de descarboxilación no enzimática catalizada por calor, autooxidación y luz, aunque puede tener lugar también a temperatura ambiente tras un almacenamiento prolongado (Wang y cols., 2016). Curiosamente, la descarboxilación no tiene lugar en un grado apreciable después de la absorción.

Hasta la fecha se han identificado más de 100 fitocannabinoides y la concentración de estos compuestos depende de la parte de la planta analizada, la edad, la variedad y las condiciones de crecimiento, recolección y almacenamiento de la misma (Andre y cols., 2016). La manipulación genética de la planta puede alterar también la proporción de los cannabinoides. De estos los mejor caracterizados son Δ^9 -THC, CBD, cannabino (CBN) y tetrahidrocannabivarina (THCV) (De Petrocellis y cols., 2011), pero existen otros cannabinoides mayoritarios menos estudiados como cannabicromeno (CBC), cannabiciol (CBL) o CBG. Además, todas las investigaciones se han centrado en el uso de cannabinoides neutros sin prestar demasiada atención a sus formas ácidas.

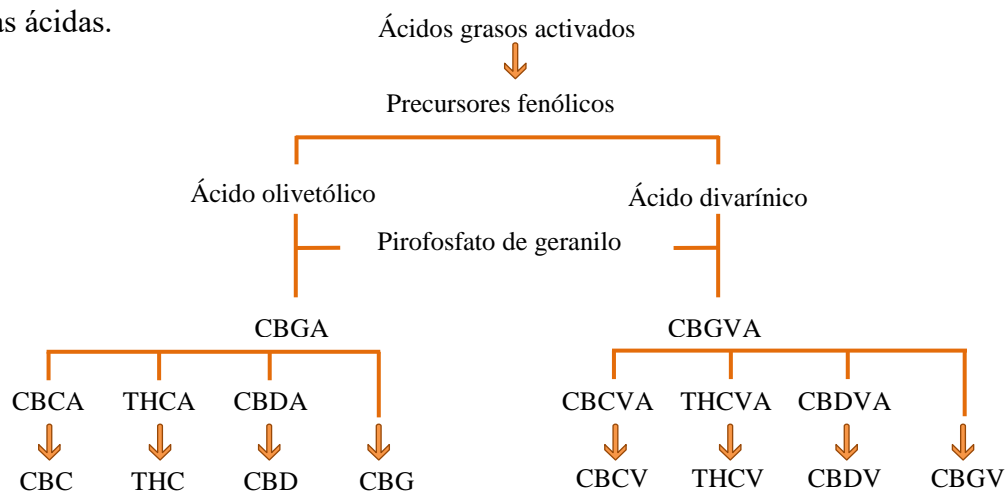


Figura 5. Biosíntesis de los principales fitocannabinoides.

El Δ^9 -THC es el fitocannabinoide con actividad psicoactiva y su estructura fue descrita en los años 60 (Mechoulam y Gaoni, 1965). Presenta una gran afinidad y se comporta como agonista parcial de ambos receptores cannabinoides. Entre sus efectos más conocidos se encuentran hipoactividad, hipotermia y deterioro de la memoria verbal y espacial a corto plazo. A pesar de su agonismo sobre CB₁ y CB₂ a concentraciones nanomolares, el Δ^9 -THC ejerce diversos efectos farmacológicos a través de otras dianas, como TRPV-1, el receptor de potencial transitorio A1 (TRPA1) o PPAR γ . Es el cannabinoide más estudiado y sus efectos biológicos son muy diversos. Entre sus usos terapéuticos se incluyen enfermedades metabólicas, neurodegenerativas e inflamatorias, desórdenes gastrointestinales y complicaciones vasculares. Además, diferentes estudios han descrito su actividad antitumoral debido a diversos mecanismos que implican la inducción de la apoptosis y propiedades antiproliferativas, antimetastásicas y antiangiogénicas (Ligresti y cols., 2016).

El Δ^9 -THCA es el precursor ácido del Δ^9 -THC y aunque no muestra actividad psicoactiva, su unión a CB₁ es discutible (Ahmed y cols., 2008; Rosenthaler y cols., 2014). El Δ^9 -THCA es un agonista débil de TRPA1 y un buen antagonista del receptor de potencial transitorio M8 (TRPM8) (Ligresti y cols., 2016). Estudios in vitro sugieren que este cannabinoide presenta un perfil antiinflamatorio, inmunomodulador, neuroprotector y antineoplásico (Moreno-Sanz y cols., 2016).

El CBN también ha mostrado propiedades psicoactivas, aunque son bastante menores que las de Δ^9 -THC, y se ha descrito su efecto antiinflamatorio en modelos animales de edema agudo. Es agonista de ambos receptores cannabinoides, sin embargo su afinidad por CB₂ es mayor (Condie y cols., 1996). Además, este cannabinoide se comporta como agonista de TRPA1 y antagonista de TRPM8 (De Petrocellis y cols, 2011).

Por su parte, el CBD es el componente no psicotrópico mayoritario del *Cannabis sativa* y ha suscitado mucho interés debido a su gran potencial terapéutico. Se han descrito propiedades ansiolíticas, antidepresivas, antipsicóticas, anticonvulsivas, antioxidantes, anti-inflamatorias, antiartríticas y antineoplásicas. El CBD presenta muy baja afinidad por los receptores CB₁ y su actividad funcional sobre este receptor es prácticamente indetectable. Además, se comporta como un agonista inverso débil de CB₂. En el SNC, el uso del CBD ha resultado protector en modelos animales de

epilepsia, ansiedad y en enfermedades del ganglio basal, como la EH. El CBD muestra actividad funcional moderada sobre diferentes dianas moleculares, como los canales iónicos TRPV1 y TRPV2 o los receptores PPAR γ y 5-HT, lo que explica su uso en diferentes condiciones patológicas (Ligresti y cols., 2016; Mechoulam y cols., 2007).

El CBG es uno de los cannabinoides menos estudiados. Se detectó por primera vez en preparaciones de Cannabis en 1964 y posteriormente se constató que no inducía efectos psicoactivos *in vivo* (Ligresti y cols., 2016). El CBG es un potente antagonista de TRPM8 y activa TRPV1 y TRPA1. Sin embargo, no muestra afinidad por CB₁ y CB₂. Además, el CBG se comporta como agonista del receptor adrenérgico α 2 y PPAR γ y como antagonista del receptor 5-HT (Cascio y cols., 2010; Granja y cols., 2012). Entre sus efectos, se han descrito propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales (Valdeolivas y cols., 2015; Borrelli y cols., 2013; Izzo y cols., 2009; Ligresti y cols., 2016).

4.2. Desarrollo de fármacos basados en cannabinoides.

El Cannabis ha sido utilizado con fines medicinales desde hace miles de años. Sin embargo, las investigaciones sobre su potencial terapéutico empezaron en los años 70 tras el descubrimiento del sistema endocannabinoide y el aislamiento de los principios activos de la planta. Los cannabinoides han mostrado ejercer potentes efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores *in vivo* e *in vitro*. Diferentes modelos preclínicos de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, EH, enfermedad de Parkinson, SSc y diabetes evidenciaron mejoras clínicas, así como cambios bioquímicos o histológicos tras el tratamiento con cannabinoides (Katchan y cols., 2016; Valdeolivas y cols., 2015; Lastres-Becker y cols., 2004; Sagredo y cols., 2007). Sin embargo, los estudios en humanos son todavía escasos.

En la actualidad, existen tres medicamentos basados en cannabinoides aprobados por diferentes organismos:

- Dronabinol. Se trata de Δ^9 -THC sintético aprobado para el tratamiento de la anorexia y la pérdida de peso en pacientes con VIH, así como para las náuseas y el vómito asociados a la quimioterapia en aquellos pacientes en los que ha fallado la terapia estándar (Borgelt y cols., 2013). La FDA ha aprobado dos formulaciones de este principio activo: Marinol® (cápsulas orales) y Syndros® (formulación líquida).

- Nabilona. Comercializada bajo el nombre de Cesamet®, estas cápsulas contienen como principio activo un análogo sintético de Δ^9 -THC. Están indicadas para el tratamiento de las náuseas y vómitos asociados a la quimioterapia en pacientes que no responden adecuadamente a los tratamientos antieméticos convencionales (Schrot y Hubbard, 2016).
- Nabiximol (Sativex®). Se trata de una mezcla 1:1 de los cannabinoides CBD y Δ^9 -THC administrado como spray sublingual. Este medicamento está aprobado en Canadá y Europa como terapia adyuvante para el tratamiento del dolor y la espasticidad (Schrot y Hubbard, 2016). Se ha descrito que el CBD potencia algunos de los efectos terapéuticos del Δ^9 -THC y a su vez contrarresta su actividad psicotrópica lo que permite el uso de dosis mayores y más eficaces de Δ^9 -THC (Karniol y cols., 1974).

Además y dadas las evidencias científicas que apoyan el uso de CBD, hay varios ensayos clínicos en marcha con Epidiolex (NCT02695537 y NCT02397863), una solución oral de CBD. El desarrollo de Epidiolex se centra en diferentes síndromes que cursan con epilepsia grave resistente a tratamiento, entre los que se incluyen el síndrome de Dravet, el síndrome de Lennox-Gastaut, la esclerosis tuberosa compleja y espasmos infantiles.

Los cannabinoides pueden ser inhalados o administrados por vía oral, sublingual o de forma tópica (Whiting y cols, 2015). Existen cuatro categorías dentro del uso terapéutico de los cannabinoides: los fitocannabinoides (incluyendo el Cannabis medicinal), los cannabinoides sintéticos (dronabinol, nabilona), los cannabinoides purificados (Nabiximol, CBD) y los fármacos que modulan el SE (Schrot y Hubbard, 2016).

Las estrategias terapéuticas para la manipulación del sistema endocannabinoide se centran principalmente en fármacos que actúen como agonistas o antagonistas de los receptores cannabinoides. Rimonabant, un antagonista de CB₁, fue aprobado por la Unión Europea para el tratamiento de la obesidad. Sin embargo, fue retirado en 2009 debido a sus efectos secundarios y dos antagonistas similares, Surinabant y Taranabant, están siendo examinados en la actualidad (Schrot y Hubbard, 2016). Además, el ácido ajulémico (Resunab®) se encuentra en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de la SSc (CORBUS NCT02465437). Por otra parte un preparado botánico conteniendo

concentraciones bien definidas de THCV y CBD se está probando para el tratamiento de la diabetes y el síndrome metabólico (Jadoon y cols., 2016). Actualmente, también se están desarrollando fármacos inhibidores de las enzimas responsables de la degradación de los endocannabinoides con el objetivo de aumentar los niveles endógenos de los mismos. No obstante los ensayos clínicos de Fase II no han demostrado eficacia e incluso ha habido un desgraciado caso de muertes en un ensayo de Fase I con un inhibidor de la FAAH, aunque en este caso se supone que ha sido un efecto “off-target” (Kaur y cols., 2016).

En resumen, el tratamiento con cannabinoides ha mostrado beneficios en diferentes situaciones patológicas, sin embargo la farmacología y la farmacocinética de los cannabinoides difiere ampliamente dependiendo del paciente, las características de la droga y el método de administración.

4.3. Cannabinoides sintéticos.

Durante los últimos años, una de las metas tanto en los laboratorios de investigación públicos como en la industria farmacéutica ha sido diseñar fármacos derivado de cannabinoides que mostraran potencial biomédico sin ser psicoactivos. Estas investigaciones vienen apoyadas en gran medida por la larga historia del uso del *Cannabis* y sus preparados para el tratamiento del dolor, la inflamación y otra serie de desórdenes médicos. Aunque se han sintetizado y ensayado cientos de compuestos, solo unos pocos de ellos han llegado a ser estudiados en humanos. Desafortunadamente también se han desarrollado cannabinoides sintéticos, como el HU-210, sin valor terapéutico ninguno y con una potencia psicotrópica 100 veces más activa que el Δ^9 -THC. Estos cannabinoides se están introduciendo actualmente en el mercado negro con el consecuente riesgo para la salud.

A diferencia del Δ^9 -THC, otros fitocannabinoides no ejercen efectos psicoactivos debido a su baja afinidad por CB₁. Entre ellos, destacan el CBD y el CBG por las propiedades biológicas descritas anteriormente. Debido a la baja afinidad por CB₁ y CB₂ ambos cannabinoides ejercen muchos de sus efectos a través de otras dianas, como TRPV1, TRPA1 o PPAR γ (Granja y cols., 2012). Dadas las numerosas propiedades terapéuticas de estas moléculas, la falta de psicoactividad y su baja toxicidad hay un interés considerable en el desarrollo de derivados de ambos cannabinoides para evaluar sus actividades clínicas y su perfil farmacológico.

Previamente, se ha demostrado que la oxidación de CBD y CBG a sus quinonas correspondientes (HU-331 y VCE-003 respectivamente) aumenta la afinidad de unión por PPAR γ (Granja y cols., 2012).

HU-331 y VCE-003 son moléculas electrofílicas que pueden actuar como pro-oxidantes y juegan un papel clave como fármacos bioreductivos, potenciadores de estrés oxidativo y como catalizadores redox. Estas propiedades los hacen potentes antitumorales o inmunosupresores por inducir la apoptosis de células transformadas y células autoinmunes activadas. HU-331 ejerce una potente actividad antitumoral mediante la inhibición de la topoisomerasa II (Kogan y cols., 2007) mientras que VCE-003 se comporta como un inmunosupresor y ejerce una acción protectora en dos modelos animales diferentes de esclerosis múltiple a través de PPAR γ (Carrillo-Salinas y cols., 2014, Granja y cols., 2012)

Sin embargo, estas características también complican su desarrollo para tratamientos crónicos. Por ello, con el objetivo de mejorar el perfil farmacológico y la eficacia de CBG y CBD, se han introducido diferentes modificaciones químicas a estas quinonas para generar nuevos derivados cannabinoídes considerablemente más potentes que sus templados originales y con un perfil farmacológico más seguro para el tratamiento de enfermedades crónicas y neurodegenerativas.

Entre la batería de compuestos originados a partir de estas modificaciones, se han seleccionado dos análogos estructurales de la serie VCE-004 para estudiar su mecanismo de acción y su eficacia en modelos de SSc y un análogo de la serie VCE-003 para evaluar su efecto neuroprotector en la EH.

I. Objetivos

El uso de Cannabis Medicinal está documentado desde hace miles de años y en tiempos recientes la identificación del Sistema Endocannabinoide está permitiendo el desarrollo farmacológico no solo de preparados botánicos bien estandarizados sino también el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diferentes patologías incluyendo algunas enfermedades raras como la Esclerodermia y la Enfermedad de Huntington. Ya que existen importantes evidencias científicas de que los receptores PPAR γ y CB₂ son potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de estas dos enfermedades los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1- Caracterización de los derivados de CBD, VCE-004.3 y VCE-004.8, y estudio de mecanismos de acción y de eficacia en modelos murinos de Esclerodermia

- 2- Caracterización del derivado de CBG VCE-003.2 y estudio de su mecanismo de acción y de su eficacia en modelos murinos de enfermedad de Huntington

- 3- Identificación del mecanismo de acción del Δ^9 -THCA sobre PPAR γ y estudio de su eficacia en modelos murinos de enfermedad de Huntington

I. Materiales y métodos

1. Reactivos

Los compuestos rosiglitazona (RGZ), AM630, T0070907 y WIN55,212-2 se obtuvieron de Cayman Chemical (Michigan, USA). El TGF β 1 se obtuvo de Immunotools GmbH (Friesoythe, Alemania). La IgG humana no inmunizada fue de Jackson ImmunoResearch (PA, USA). El resto de reactivos, si no se indica lo contrario, se obtuvieron en Sigma-Aldrich (MO, USA).

2. Cannabinoides

Los nuevos derivados cannabinoides fueron cedidos por Vivacell Biotechnology S.L. El VCE-003.2 es un derivado del CBG, mientras que los compuestos VCE-004.3 y VCE-004.8 son derivados de CBD. Los cannabinoides naturales Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA, CBD, CBDA, CBG y CBGA fueron proporcionados por Phytoplant Research S.L.. El HU-331 fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Todos los cannabinoides tenían una pureza > 95%.

3. Líneas celulares

Las líneas celulares HEK-293T, MEF (fibroblastos embrionarios de ratón), HaCaT, NIH-3T3 y los fibroblastos humanos primarios se cultivaron en crecimiento exponencial en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células Jurkat fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS y 1% penicilina/estreptomicina. La línea de neuroblastoma N2a se mantuvo en medio DMEM: Ham's F12 complementado con FBS y antibióticos. Todas las líneas celulares descritas anteriormente crecieron a 37 °C en un ambiente humidificado conteniendo un 5% de CO₂. Las líneas celulares estriatales STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111} fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ a una temperatura de a 33 °C.

4. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Las células Jurkat fueron sembradas en placas de 24 pocillos (10^6 células/pocillo) y tratadas con los compuestos o con tert-Butyl hidroperóxido (TBHP) como control positivo durante 6 horas. En ese momento, las células se tiñeron con $1 \mu\text{M}$ de CM-H₂DCFDA (ThermoFisher Scientific, CA, USA) durante 20 minutos a 37°C . Tras dos lavados con PBS frío, se procedió al análisis mediante citometría de flujo utilizando el citómetro BD FACSCanto™ (BD Bioscience, CA, USA).

Las células N2a se sembraron en placas de 96 pocillos ($2,5 \times 10^3$ células /pocillo) y teñidas con CM-H₂DCFDA ($0,25 \mu\text{M}$) durante 20 minutos a 37°C . Pasado este tiempo, las células se trataron con VCE-003, VCE-003.2 o TBHP como control positivo durante 2 horas. La oxidación de la CM-H₂DCFDA se midió utilizando el sistema de imagen Incucyte FLR Imaging System (Essen BioScience Hertfordshire, Reino Unido).

5. Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Las células Jurkat sembradas en placas de 24 pocillos (10^6 células/pocillo) fueron tratadas con los compuestos o TBHP como control positivo durante 2 horas y, tras dos lavados con PBS frío fueron teñidas con MitoTracker® Red CMXRos (40 nM ; ThermoFisher Scientific) durante 20 minutos a 37°C en oscuridad. La caída del potencial de membrana mitocondrial se analizó por citometría de flujo.

6. Ensayo de afinidad por los receptores cannabinoides

La afinidad de los compuestos por los receptores CB₁ y CB₂ fue determinada mediante estudios de competición utilizando el radioligando [³H]CP55940 y membranas comerciales que contenían células HEK-293 EBNA que expresaban de forma estable cada uno de los receptores (Perkin-Elmer Life y Analytical Sciences, MA, USA). Los compuestos fueron estudiados a la concentración de $40 \mu\text{M}$ y solo en aquellos casos en los que se encontró una inhibición de la unión del radioligando superior al 70% se analizaron un rango mayor de concentraciones para calcular los valores de la constante de inhibición (K_i). Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism® version 5.01 (GraphPad Software Inc., CA, USA.).

7. Ensayo de afinidad por el receptor PPAR γ

La afinidad de los compuestos por el receptor PPAR γ se estudió utilizando el Kit PolarScreenTM PPAR Competitor Assay (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los compuestos fueron disueltos en el buffer indicado a las concentraciones objeto de estudio e incubados durante 2 horas en una solución en presencia del receptor nuclear (34 nM) y su ligando específico (9 nM). El cambio en el valor de polarización en presencia de compuestos agonistas de PPAR γ se utilizó para determinar la afinidad relativa de los compuestos por el receptor nuclear. La polarización se midió utilizando el lector de placas TECAN Pro (Tecan Trading AG, Männedorf, Suiza). El valor del índice de inhibición (IC₅₀) se calculó como la inhibición del 50% en el porcentaje de polarización.

8. Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa

Para cuantificar la actividad luciferasa, las diferentes líneas celulares fueron recogidas, lavadas con PBS y lisadas en tampón de luciferasa (25 mM Tris - fosfato pH 7,8, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% Tritón X-100 y 7% de glicerol) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La actividad luciferasa en el lisado se determinó siguiendo las instrucciones del sistema Dual-Luciferase Assay (Promega, WI, USA) utilizando el luminómetro Autolumat LB 953 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania) o el lector de placas TriStar LB 941.

8.1. Activación de la ruta de Nrf2.

Las células HaCaT que expresaban establemente el plásmido ARE-Luc se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos (5 x 10³ células/pocillo). Los tratamientos con los compuestos o con tert-Butyl hidroquinona (TBHQ) como control positivo fueron de 24 horas.

8.2. Actividad transcripcional de PPAR γ

Para estudiar el efecto de los compuestos sobre la actividad transcripcional de PPAR γ se utilizaron las líneas celulares HEK-293T o NIH-3T3. Las células fueron sembradas a la densidad de 5 x 10⁴ células/pocillo en placas de 24 pocillos y, tras 24 horas, co-transfectadas con el vector de expresión hGAL4-PPAR γ (0,2 μ g/pocillo) y el

reportero de luciferasa GAL4-Luc (0,8 µg/pocillo) utilizando Roti-Fect® (Carl Roth, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron estimuladas con los compuestos durante 6 horas y lisadas para medir la actividad luciferasa. Para corregir la eficiencia de la transfección, las células se contranfectaron también con 100 ng *Renilla* luciferase (pRL-CMV, Promega).

8.3. Ensayos de activación de los receptores cannabinoides

Las células HEK-293T-CB₁ y HEK-293T-CB₂ fueron transfectadas con el plásmido pCRE-Luc (0,5 µg/pocillo) utilizando Roti-Fect®. Al día siguiente, fueron pre-incubadas durante 30 minutos con los compuestos y estimuladas con Forskolina (FSK; 10 µM; agonismo CB₂) o WIN-55,212-2 (1 µM; antagonismo CB₁) durante 6 horas.

8.4. Actividad transcripcional del gen *COL1A2*

Las células NIH-3T3 que expresaban de forma estable el reportero COL1A2-Luc fueron sembradas en placas de 24 pocillos (5 x 10⁴ células/pocillo), pre-incubadas durante 1 hora con los compuestos y estimuladas con TGFβ1 (10 ng/ml) durante las 24 horas siguientes.

8.5. Actividad transcripcional de las SMADs

Las células NIH-3T3, sembradas en placas de 24 pocillos (5 x 10⁴ células/pocillo) fueron transfectadas de manera transitoria con el reportero CAGA-Luc (0,5 µg/pocillo) utilizando Roti-Fect® siguiendo las instrucciones del fabricante. Al día siguiente, las células fueron pre-incubadas con los compuestos durante 1 hora y estimuladas con TGFβ1 (5 ng/ml) durante las 6 horas siguientes.

9. Deposición de colágeno por Sirius Red

Para determinar la deposición de colágeno, se sembraron fibroblastos humanos primarios en placas de 24 pocillos (5 x 10⁴ células/pocillo). Las células fueron pre-incubadas con los compuestos durante 1 hora y estimuladas con TGFβ1 durante 24 o 48 horas. Las células se extrajeron con ácido acético 0,5 M y se tiñeron durante 30 minutos (0,1% Sirius Red y 0,1% Fast Green disuelto en ácido pícrico saturado). La deposición de colágeno se midió a 540 nm y 605 nm en un espectrofotómetro Genesis 10 UV (Thermo Fisher Scientific).

10. Liberación de colágeno

Los fibroblastos humanos primarios fueron sembrados en placas de 24 pocillos a la densidad de 6×10^4 células/pocillo y privados de FBS (1%) durante 24 horas. Pasado este tiempo, fueron pre-incubados con los compuestos durante 1 hora y estimulados con TGF β 1 (10 ng/ ml) durante 48 horas. El sobrenadante se recogió en tubos Eppendorf® LoBind (Sigma-Aldrich) y el colágeno fue teñido utilizando el ensayo Sircol Soluble Collagen (Biocolor, County Antrim, Reino Unido) y cuantificado mediante espectrofotometría a 550 nm. En otra serie de experimentos, se recogieron los sobrenadantes para estudiar la secreción de colágeno utilizando el kit Procollagen Type I C-Peptide (PIP) EIA (Takara, Shiga, Japón) siguiendo las recomendaciones de fabricante.

11. Ensayo de viabilidad celular por MTT

Para los ensayos de citotoxicidad se sembraron las células NIH-3T3 o N2a a la densidad de 10^3 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, las células fueron tratadas por triplicado con concentraciones crecientes de los compuestos durante 24 horas. Para los ensayos de neuroprotección, las células N2a fueron pre-incubadas durante 1 hora con los compuestos y tratadas con glutamato (15 mM) durante 24 horas. Por otro lado, las células estriatales STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111} fueron sembradas (10^3 células/ pocillo), privadas de suero (0,5% FBS) durante 4 horas y los compuestos fueron añadidos al medio de cultivo solos o en presencia del antagonista de PPAR γ (GW9662; 5 μ M) durante 48 horas. La viabilidad celular se estudió mediante ensayo de MTT añadiendo al medio 50 μ l por pocillo de una mezcla de MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] (5 mg/ml) y DMEM en relación 1:2 durante 4 horas a 37 °C en oscuridad. Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante, se añadieron 100 μ l de DMSO y se agitaron las placas durante 10 minutos. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 550 nm usando el lector de placas TriStar LB 941. La absorbancia de las células control se consideró como el 100% de viabilidad.

12. Ensayo de migración celular

El efecto de los compuestos sobre la migración de fibroblastos se llevó a cabo mediante un ensayo de cicatrización de heridas. Brevemente, los fibroblastos humanos primarios se sembraron en placas Essen ImageLock de 96 pocillos (Essen BioScience) y

se dejaron crecer hasta llegar a la confluencia. Tras 24 horas, se hizo la herida utilizando el 96-pin WoundMaker (Essen BioScience), y seguidamente las células se incubaron en medio conteniendo mitomicina C (10 ng/ml) para bloquear la proliferación celular. Se añadieron en paralelo los compuestos y las citoquinas inductoras del cierre de la herida [TGFβ1 (10 ng/ml) o IL4 (20 ng/ml)] y se tomaron imágenes de forma periódica. Los datos se analizaron midiendo la densidad relativa de la herida utilizando el sistema de análisis de imagen IncuCyte HD.

13. Diferenciación hacia miofibroblastos

Para inducir la diferenciación hacia miofibroblastos de las líneas celulares NIH-3T3 o MEF, las células fueron sembradas en cubreobjetos de cristal y, tras 24 horas de privación de suero (1%), pre-incubadas durante 1 hora con los compuestos y estimuladas con TGFβ1 (10 ng/ml) durante 24 horas. Los cubreobjetos se recogieron, lavaron con PBS y fijaron con formaldehído al 4% en PBS.

14. Diferenciación de células madre mesenquimales humanas (MSCs)

El estudio con células humanas fue aprobado por el Hospital Universitario Reina Sofía y los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a las directrices del comité ético del Hospital Reina Sofía y la declaración de Helsinki. Los donantes de médula ósea fueron reclutados por el servicio de hematología y todos ellos dieron su consentimiento informado para que las alícuotas de médula ósea extraídas con fines clínicos pudieran utilizarse también para la investigación. Las MSCs fueron mantenidas en medio α-MEM suplementado con 15% de suero fetal de ternero (FCS), 2 mM UltraGlutamina, 1 ng/ml bFGF y antibióticos. Las células se sembraron a la densidad de 500 células/cm² en placas de 6 o 12 pocillos en el mismo medio de cultivo suplementado con 10% de FBS. Cuando las células están en semiconfluencia se inició la diferenciación mediante la incubación en medios de diferenciación. Ambos medios inductores de la diferenciación consistían en α-MEM suplementado con 15% de suero sin bFGF. El medio osteoblastogénico (MO) contenía 10⁻⁸ M de dexametasona, 10 mM de β-glicerofosfato y 0.2 mM de ácido ascórbico. El medio adipogénico (MA) se suplementó con 5×10⁻⁷ M de dexametasona, 0.5 mM de isobutilmetilxantina y 50 μM indometacina. El tratamiento con los compuestos se inició en el mismo momento que la diferenciación. Las células diferenciadas fueron recogidas tras 14 días para la extracción

del ARN y el análisis de la expresión génica de los diferentes marcadores. Para confirmar la adipogénesis, las células fueron fijadas tras 21 días de diferenciación con 3,7% de formaldehído y teñidas con una solución de Oil Red O (ORO) durante 20 minutos.

15. Determinación de la biogénesis mitocondrial

Para estudiar la biogénesis mitocondrial, las células N2a fueron sembradas en placas de 96 pocillos y, tras 24 horas, estimuladas en cuadruplicado con Δ^9 -THC o Δ^9 -THCA a las concentraciones indicadas durante 72 horas. Se usó RGZ (10 μ M) como control positivo. A continuación, las células se tiñeron con MitoTacker Green FM (100 mM, ThermoFisher Scientific) durante 30 minutos. Las células se lavaron con PBS y se añadió medio de cultivo fresco. Se tomaron imágenes y se midió la fluorescencia usando el sistema de imagen InCuCyte HD.

16. Obtención de suero de pacientes con SSc y aislamiento de IgG.

Las muestras de pacientes fueron proporcionadas por la Dra. Rosario López Pedrera. Brevemente, se extrajo el suero de los pacientes a partir de muestras de sangre venosa periférica. A continuación, se purificaron las IgG a partir de un pool de suero de 6 pacientes con lcSSc o dSSc mediante cromatografía de alta afinidad de proteína G-Sefarosa (kit MAbTrap, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

17. Western Blot

Las células fueron lavadas con PBS y se extrajeron las proteínas en 50 μ l de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol y 1% NP-40) suplementado con 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 μ g/ml de leupeptina, 1 μ g/ml de pepstatina y aprotinina, y 1 μ l/ml de PMSF. La concentración de proteínas se calculó utilizando el método de Bradford (Bio-Rad, CA, USA) y se cargaron 30 μ g de proteínas hervidas a 95 °C durante 3 minutos en buffer de Laemmli. La electroforesis se realizó en geles de SDS/PAGE al 8-10% y las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF (24 V durante 40 min) utilizando el trans-Blot SD semi-dry transfer (Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas en una solución de TBS-Tween20 al 0,1% que contenía leche en polvo desnatada o albúmina de suero bovino (BSA) disueltas al 5%

durante 1 hora a temperatura ambiente. La inmunodetección de proteínas específicas se llevó a cabo mediante incubación con anticuerpos primarios contra α -SMA (1:500; sc-32251, Santa Cruz Biotechnology), pSMAD2 (1:500; AB3849, Merck Millipore), SMAD2 (1:1000; 5339, Cell Signaling, MA, USA.), p-ERK 1/2 (1:500; sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), ERK 1/2 (1:20.000; M-5670, Sigma-Aldrich) o PPAR γ (1:500; 2435, Cell Signaling) diluidos en solución de bloqueo durante la noche a 4°C. Después de 3 lavados con TTBS, el anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich) fue añadido durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección de la señal se realizó mediante quimioluminiscencia (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Las membranas fueron incubadas con anticuerpo contra α -tubulina o β -actina (1:10.000; DM-1A y AC-74 respectivamente, Sigma-Aldrich) como control de carga y dichas señales se utilizaron para normalizar las señales de las proteínas de interés. El análisis densitométrico se realizó utilizando Image J (NIH, MD, USA).

18. Modelos experimentales de SSc

Para los modelos animales de esclerodermia se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad (Envigo, Barcelona, España). Los animales fueron estabulados en las instalaciones de la Universidad de Córdoba bajo condiciones controladas de luz y temperatura (ciclos de 12 h de luz/oscuridad; temperatura 20 °C (\pm 2 °C) y 40-50% de humedad relativa) con acceso a comida y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las directrices de la Unión Europea y fueron previamente aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba (2014PI/016).

18.1. Modelo inflamatorio inducido por bleomicina

El modelo inflamatorio de fibrosis experimental se utilizó para estudiar el efecto del compuesto como tratamiento preventivo de la enfermedad. La fibrosis fue inducida mediante inyecciones subcutáneas de BLM (50 μ g/ratón/día en 100 μ l; Mylan, Barcelona, España) durante 3 semanas en la espalda afeitada de los animales. Los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal en paralelo a la inducción del modelo y consistieron en 100 μ l de VCE-004.3 (20 mg/kg/día), RGZ (5 mg/kg/día) o vehículo (4% DMSO, 6,2% Tween20 en salino al 0,9%). El grupo control recibió inyecciones subcutáneas de salino.

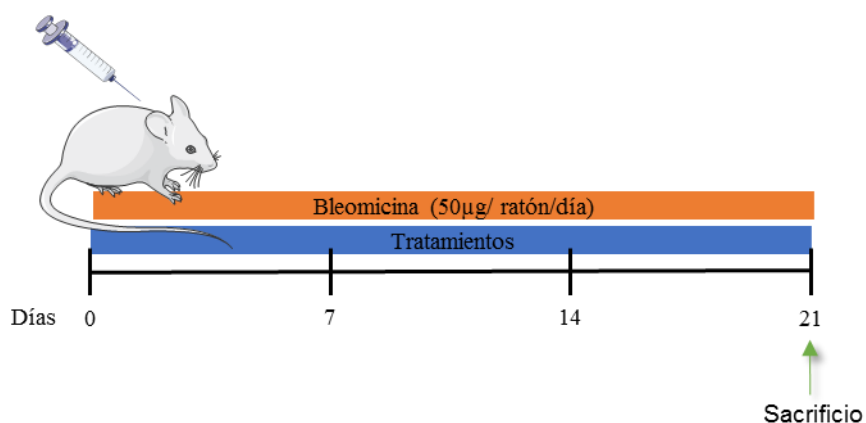


Figura 6. Diseño experimental del modelo inflamatorio de SSc inducido por BLM.

18.2. Modelo crónico inducido por bleomicina

Para evaluar el efecto curativo de los compuestos sobre mecanismos menos dependientes del proceso inflamatorio, se utilizó una variante del modelo inducido por BLM en el que los tratamientos se aplicaban sobre fibrosis previamente establecida. En este modelo, la fibrosis experimental se indujo a través de inyecciones subcutáneas de BLM (20 µg/ratón/día) durante 6 semanas. Tras 3 semanas de administración de BLM, los tratamientos se aplicaron en paralelo durante las 3 semanas restantes. Un primer bloque experimental recibió inyecciones intraperitoneales (i.p.) de VCE-004.3 (20 mg/kg/día), RGZ (5 mg/kg/ día) o vehículo (4% DMSO, 6,2% Tween20 en salino al 0,9%) en un volumen final de 100 µl.

Por otro lado, un segundo bloque de animales recibió durante las 3 últimas semanas de administración de BLM inyecciones i.p. (100 µl) de RGZ (5 mg/kg/día) o VCE-004.8 (10 y 20 mg/kg/día). Otros grupos experimentales fueron tratados con la combinación de VCE-004.8 (20 mg/kg/día) y AM630 (antagonista CB₂; 2.5 mg/kg/día), o el antagonista del receptor PPAR_γ T0070907 (5 mg/kg/ día), 15 minutos antes del tratamiento con VCE-004.8. Los grupos control y VCE-004.8 recibieron salino vía subcutánea e inyecciones i.p. de vehículo o VCE-004.8 (20 mg/kg/día) respectivamente.

Por último, para estudiar el efecto de la aplicación tópica de ambos compuestos en este modelo, los ratones fueron tratados con 100 µl de VCE-004.3 (250 mM), VCE-

004.8 (250 mM), RGZ (50 mM) o vehículo (7:3 Polipropilenglicol: Etanol) durante las 3 semanas restantes.

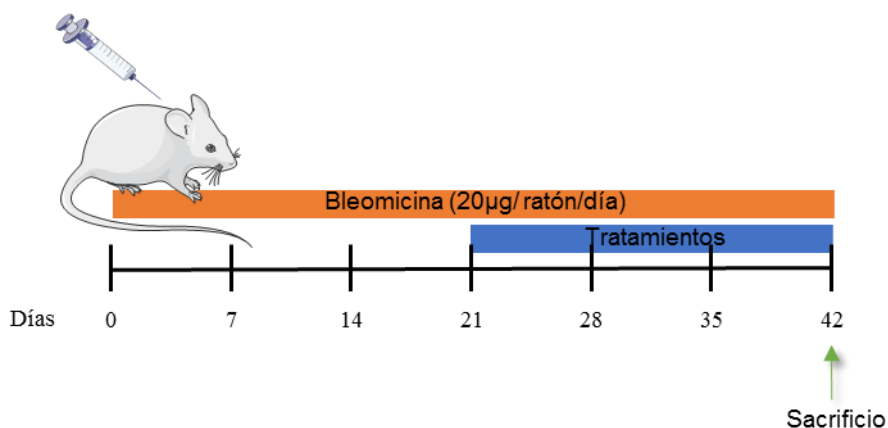


Figura 7. Diseño experimental del modelo de SSc crónica inducido por BLM.

19. Modelo de EH inducido por ácido 3 nitropropiónico (3NP)

El modelo de neurodegeneración estriatal para recrear la enfermedad de Huntington se llevó a cabo en ratones macho C57BL/6 de 16 semanas de edad (Envigo). Todos los experimentos se realizaron siguiendo las directrices de la Unión Europea y fueron previamente aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba (2014PI/017). El 3NP fue disuelto en PBS a una concentración final de 50 mg/kg y la solución fue filtrada (Millipore 0.22 µm) antes de su administración. La inducción de la lesión se llevó a cabo a través de 7 inyecciones i.p. de 3NP (una inyección cada 12 horas). El grupo control fue inyectado con PBS.

Los tratamientos consistieron en una inyección i.p. cada 24 horas durante 4 días, iniciándose la primera inyección 30 min antes de la primera administración de 3NP. En un primer bloque experimental, los ratones recibieron VCE-003.2 (20 mg/kg/día), la combinación de VCE-003.2 y T0070907 (antagonista PPAR γ ; 5 mg/kg/día) o vehículo (4% DMSO, 6,2% Tween20 en salino). Un segundo bloque experimental fue tratado con Δ^9 -THCA (20 mg/kg/día) o vehículo (1:1:18 Etanol: Cremophor: Salino). El volumen administrado para todos los compuestos fue de 100 µl.

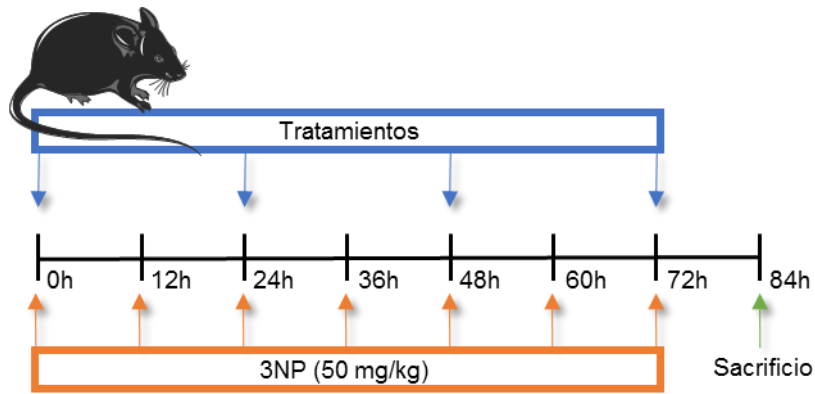


Figura 8. Diseño experimental del modelo de EH inducido por 3NP.

La evaluación de la actividad comportamental de los animales se llevó a cabo a través de una escala semicuantitativa previamente descrita (Fernagut y cols., 2002). Para ello se tuvieron en cuenta cuatro pruebas que comprenden los diferentes síntomas motores observados en el modelo de enfermedad de EH: retracción de extremidades posteriores, distonía de las extremidades posteriores, curvatura de la columna vertebral en la región dorsal o cifosis y actividad locomotora general. Tras 12 horas de la última administración de 3NP, los ratones fueron evaluados y valorados como 0, 1 ó 2 para cada prueba, donde 0 se corresponde con un comportamiento normal y 2 con el valor máximo de desorden motor.

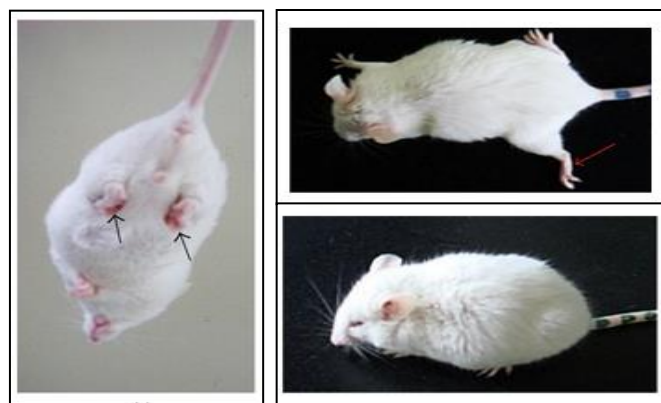


Figura 9. Actividad comportamental en la EH. Imágenes que representan la retracción (izquierda), y distonía (derecha arriba) de las extremidades posteriores y la cifosis (derecha abajo).

20. Análisis histológico

20.1. Procesamiento del tejido

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y a continuación, se realizó una biopsia de la piel o se extrajeron los pulmones o cerebros. El estriado se delimitó del tejido cerebral utilizando una matriz acrílica específica para cerebro de ratón. Los tejidos fueron fijados con formaldehído (4% en PBS) durante 48 horas y procesados mediante inmersiones secuenciales en soluciones de fijación, deshidratación, compensación y cera de parafina a intervalos temporizados. Tras la inclusión en bloques de parafina, las muestras fueron cortadas en secciones de 5 μ m, desparafinadas mediante la inmersión en xilol y rehidratadas en una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96° y 80°) para su posterior análisis.

20.2. Tinción tricrómica de Masson

Esta tinción histológica permite visualizar los haces de fibras de colágeno tipo I. Las secciones fueron teñidas en hematoxilina de Harris durante 5 minutos y diferenciadas en alcohol clorhídrico al 1% durante 10 segundos. A continuación, las muestras fueron teñidas con fucsina ácida (0,5 % en una solución 0,5% ácido acético en agua) durante 5 minutos, tratadas con ácido fosfomolibdico (1% en agua) y, finalmente, teñidas con azul de metileno y tratadas con ácido acético al 1% durante 10 segundos. Las secciones fueron deshidratadas en una serie de alcoholes crecientes hasta xilol y montadas utilizando Eukitt (Sigma-Aldrich).

El grosor dérmico se determinó tomando mediciones aleatorias de cada sección desde la parte inferior de la epidermis hasta la unión de la dermis y la grasa subcutánea. Para determinar el grado de fibrosis pulmonar se utilizó la escala de Ashcrof modificada, una escala numérica de 0 a 8 que define con precisión el grado de fibrosis en muestras de pulmón. Los criterios de calificación fueron los siguientes: grado 0, pulmón normal; grado 1, engrosamiento fibroso mínimo de paredes alveolares o bronquiolares; grado 3, paredes fibróticas sin daños evidentes a la arquitectura pulmonar; grado 5, aumento de la fibrosis con un daño estructura pulmonar y la formación de masas fibrosas; grado 7, distorsión severa de la estructura y grandes áreas fibrosas; y grado 8, la fibrosis total, obliteración de los campos. Los grados 2, 4, y 6

fueron utilizados como valores intermedios a los criterios antes mencionados (Hubner y cols., 2008).

20.3. Tinción con azul de toluidina

Este colorante básico se utiliza en histología para la identificación de mastocitos, puesto que permite visualizar sus gránulos de color rojizo debido a su contenido en heparina. Los cortes histológicos fueron teñidos con azul de toluidina (0,3% en una solución 10% etanol al 70% en salino) durante 5 minutos y, a continuación, deshidratadas con alcoholes crecientes y montadas usando Eukitt.

20.4. Tinción de Nissl

Esta tinción histológica se utiliza generalmente para analizar el tejido nervioso puesto que permite resaltar las características estructurales de las neuronas. Las secciones de cerebro fueron teñidas con violeta de cresilo (1% en agua) durante 5 minutos, diferenciadas con ácido clorhídrico al 0,5%, deshidratadas y montadas con Eukitt.

20.5. Inmunohistoquímica

Las secciones histológicas, previamente desparafinadas, fueron tratadas con buffer citrato 10 mM a pH 6 durante 30 minutos para llevar a cabo el desenmascaramiento antigénico. Después de dos lavados con 0,1% PBS-Tween20, se bloqueó la peroxidasa endógena durante 30 minutos mediante una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 al 3% en metanol) y se lavaron con agua destilada seguido por dos lavados con 0,1% PBS-Tween20. Se bloquearon las uniones inespecíficas mediante el tratamiento con solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las secciones fueron incubadas en una cámara húmeda con el anticuerpo primario a las diluciones indicadas (Tabla 1) durante toda la noche a 4 °C, lavadas dos veces con 0,1% PBS-Tween20 e incubadas con el anticuerpo secundario apropiado (cabra anti-conejo 21537; cabra anti-ratón 21538; cabra anti-rata 21543, Merck Millipore) durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras dicha incubación, las muestras fueron lavadas con 0,1% PBS-Tween20, tratadas con estreptavidina (20774, Merck Millipore) durante 45 minutos a temperatura ambiente y reveladas mediante diaminobencidina (71897 + 71898, Merck Millipore). Tras dos lavados con agua destilada y 30 segundos de tinción

con hematoxilina de Harris, las muestras fueron deshidratadas mediante una serie de alcoholes crecientes y montadas utilizando Eukitt. Las imágenes fueron tomadas utilizando el microscopio Leica DM2500 y la cámara Leica DFC420c.

Anticuerpo	Referencia	Distribuidor	Dilución
F4/80	MCA497	Bio-Rad	1:50
CD3	sc-20047	Santa Cruz Biotechnology	1:100
p-ERK	sc-7383	Santa Cruz Biotechnology	1:100
p-SMAD2	AB3849	Merck Millipore	1:500
NeuN	MAB377	Merck Millipore	1:100
Iba-1	MABN92	Merck Millipore	1:50
GFAP	sc-33673	Santa Cruz Biotechnology	1:50

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica.

20.6. Inmunofluorescencia

Tras el desenmascaramiento antigénico, se bloqueó la unión no específica añadiendo la solución de bloqueo durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario α -SMA (1:50, sc-32251, Santa Cruz). Después, las muestras se lavaron 3 veces con 0.1% PBS-Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario rata anti cabra Alexa 488 (A-11008; Life Technologies). Finalmente, los cubreobjetos se montaron utilizando el medio de montaje VectaShield Mounting Medium con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (P36931; Thermo Fisher Scientific) y se analizaron utilizando el microscopio Leica DM2500 y la cámara Leica DFC420c.

21. Medición de parámetros de estrés oxidativo

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre diferentes parámetros relacionados con el estrés oxidativo y los sistemas de defensa antioxidante, la zona del estriado del hemisferio derecho de los ratones fue homogenizada en una solución 0,1 M

de buffer fosfato (pH 7,4) con la ayuda del instrumento de dispersión Ultra-Turrax durante 30 segundos con las muestras en frío. El homogenado resultante fue centrifugado a 12.000 rpm durante 30 segundos a 4 °C y el sobrenadante se recogió para cuantificar el contenido de proteínas mediante el método de Bradford.

21.1. Actividad catalasa

La actividad catalasa se midió por el método anteriormente descrito por Luck (Luck H., 1971). Para ello se añadieron 100 µg de proteína a 450 µl de una solución 12,5 mM H₂O₂ en buffer fosfato 50 mM pH 7 y se midió la absorbancia a 240 nm. La actividad enzimática se calculó utilizando el coeficiente de extinción milimolar del H₂O₂ (0,07).

21.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD se estudió siguiendo el método descrito por Kono (Kono, 1978) en el que la reducción del nitroazul de tetrazolio (NTB) se ve inhibida por la acción de la enzima SOD y puede cuantificarse por absorbancia a 560 nm. La reacción se inició con la adición de 332,5 µl de una solución de 20 mM de clorhidrato de hidroxilamina a la mezcla de 50 µg de proteína del lisado tisular con 1 mM de NTB.

21.3. Niveles de glutatión reducido (GSH)

Los niveles de GSH se calcularon utilizando el método descrito por Ellman (Ellman, 1959). El lisado tisular (150 µg de proteína) fue tratado con 100 µl de ácido tricloroacético al 10% en agua durante 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugado a 2.500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante de la centrifugación fue tratado con DTNB 6 mM, el cual reacciona con el GSH para dar lugar a GSSG, que se determinó por absorbancia a 412 nm y se utilizó como indicador de la concentración de GSH.

22. Estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa

22.1. Extracción del ARNm

Los tejidos animales fueron extraídos y conservados en RNAlater a -80 °C. Para extraer ARN del cerebro de ratón, se delimitó la zona del estriado y se aisló el ARN mediante el RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La piel de los ratones fue disgregada utilizando Quiazol

(Qiagen) y el ARN fue aislado utilizando el RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen). Para extraer el ARN de los cultivos celulares las células fueron recogidas y lavadas con PBS y el ARN total fue extraído usando el High Pure RNA Isolation Kit (Roche diagnostics, Basilea, Suiza). El ARN fue cuantificado por espectrofotometría utilizando NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) y la integridad del mismo se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

22.2. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR)

Un microgramo de ARN de cada muestra fue retrotranscrito utilizando el cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) y el ADNc se analizó mediante RT-PCR utilizando el iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad). La PCR a tiempo real se realizó por triplicado para cada muestra en placas de 96 pocillos (Bio-Rad) usando el sistema de detección CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad). Las condiciones de los ciclos de la RT-PCR consistieron en un primer paso de 3 minutos de desnaturalización a 95 °C seguido de 39 ciclos consistentes en 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos de alineamiento a la temperatura adecuada para cada cebador y 30 segundos de elongación a 72 °C. La secuencia de los cebadores utilizados está indicada en la tabla 2. El gen constitutivo GAPDH se utilizó para normalizar los niveles de expresión de ARN en cada muestra. Los niveles de expresión se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008).

Gen	Sentido (5´-3´)	Antisentido (5´-3´)
Il6	GTATGAACAACGATGATGCACTTG	ATGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
Il4	GGTCTCAACCCCCAGCTAGT	GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
Ccl2	GGGCCTGCTGTTACAGTT	CCAGCCTACTCATTGGGAT
Il1 β	CTCCACCTCAATGGACAGAA	GCCGCTTTTATTACACAGG
Tgf β	TACAGCAAGGTCTTGCCT	GCAGCACGGTGACGCC
Il13	CCTGGCTCTTGCTTGCCTT	GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
Cox2	TGAGCAACTATTCCAAACCAGC	GCACGTAGTCTTCGATCACTATC
Tnf α	CTACTCCCAGGTTCTTCAA	GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC

Inos	AACGGAGAACGTTGGATTTG	CAGCACAAGGGGTTTTCTTC
Pgc1 α	AGCCGTGACCACTGACAACGAG	GCTGCATGGTTCTGAGTGCTAAG
Gapdh	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG
PPAR γ 2	GCGATTCCTTCACTGATACTG	GAGTGGGAGTGGTCTTCCATTAC
LPL	GGCGTACCTTGAGATAGAGTTCTG	TGTTTTCTACAGGGTGCTTTAGATGAC
FABP	CCAGGAATTTGACGAAGT	TCTCTTATGGTGTTGATT
CEBPA	CCTTGTGCCTTGAAATGCAAAC	CTGCTCCCCTCCTTCTCTCA
ADIPOQ	CATGACCAGGAAACCACGACTC	CCGATGTCTCCCTTAGGACCA
RUNX2	TGGTTAATCTCCGCAGGTCAC	ACTGTGCTGAAGAGGCTGTTG
SP7	AGCCAGAAGCTGTGAAACCTC	AGCTGCAAGCTCTCCATAACC
IBSP	AGGGCAGTAGTGACTCATCCG	CGTCCTCTCCATAGCCCAGTGTTG
ALP	CCAACGTGGCTAAGAATGTCATC	TGGGCATTGGTGTTGTACGTC

Tabla 2. Secuencia de cebadores para RT-PCR.

En una serie de experimentos, la expresión génica se estudió utilizando el RT2 ProfilerTM PCR Array Mouse Fibrosis (PAMM-120Z, Qiagen). Este array contiene 84 genes clave implicados en el desarrollo de la fibrosis. Los datos fueron analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y la expresión génica se normalizó utilizando los 5 genes constitutivos incluidos en el array.

23. Análisis estadístico

Los resultados *in vitro* se muestran como media \pm SD mientras que los datos de resultados *in vivo* se representan como media \pm SEM. Los datos se sometieron a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y las diferencias se analizaron mediante el test ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. En aquellos casos en los que los datos no estaban distribuidos de forma normal, las diferencias se estudiaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns. Se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizaron GraphPad Prism [®] versión 5.01. y SPSS versión 19. Las imágenes fueron analizadas utilizando Image J.

IV. Resultados

1. Estudio del potencial terapéutico de los nuevos derivados VCE-004.3 y VCE-004.8 en SSc.

1.1. Los nuevos cannabinoides VCE-004.3 y VCE-004.8 son derivados quinol de CBD con agonismo selectivo sobre PPAR γ .

Previamente se ha descrito que la oxidación de CBG y CBD a sus quinonas (o quinol) correspondientes (VCE-003 y HU-331, respectivamente) aumenta la capacidad de unión a PPAR γ de dichos cannabinoides naturales. Sin embargo, VCE-003 y HU-331 son moléculas electrofílicas y prooxidantes (Kogan y cols., 2007; Carrillo-Salinas y cols., 2014; Granja y cols., 2012). Como parte de la búsqueda de nuevos derivados quinona de CBD se seleccionaron los compuestos VCE-004.3 y VCE-004.8 (Figura 10). A diferencia de HU-331, vimos cómo estos nuevos derivados no inducían la producción de ROS ni la caída del potencial de membrana mitocondrial en las células Jurkat (Figura 11a y 11b, respectivamente). Es más, el tratamiento con VCE-004.3 o VCE-004.8 tampoco activaba la ruta de defensa antioxidante Nrf2 (Figura 11c).

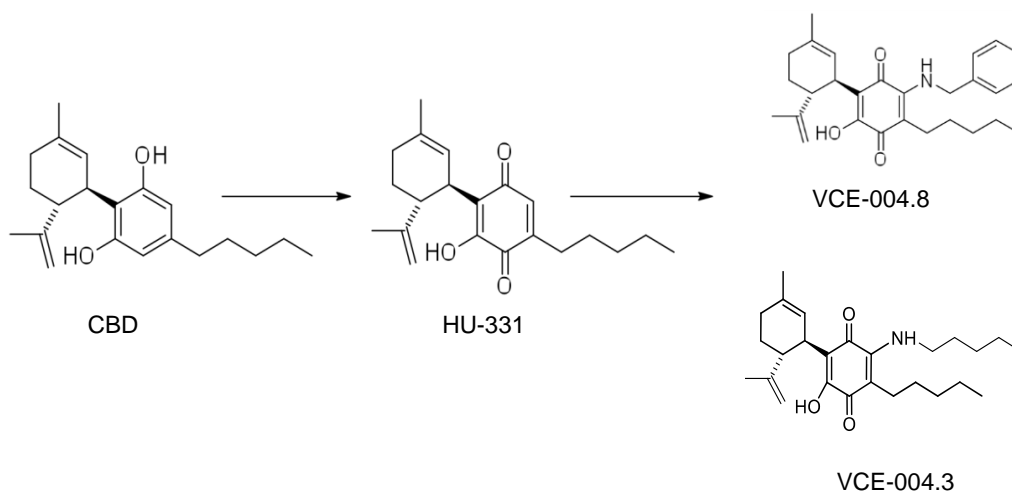


Figura 10 . Representación esquemática de la síntesis de VCE-004.3 y VCE-004.8

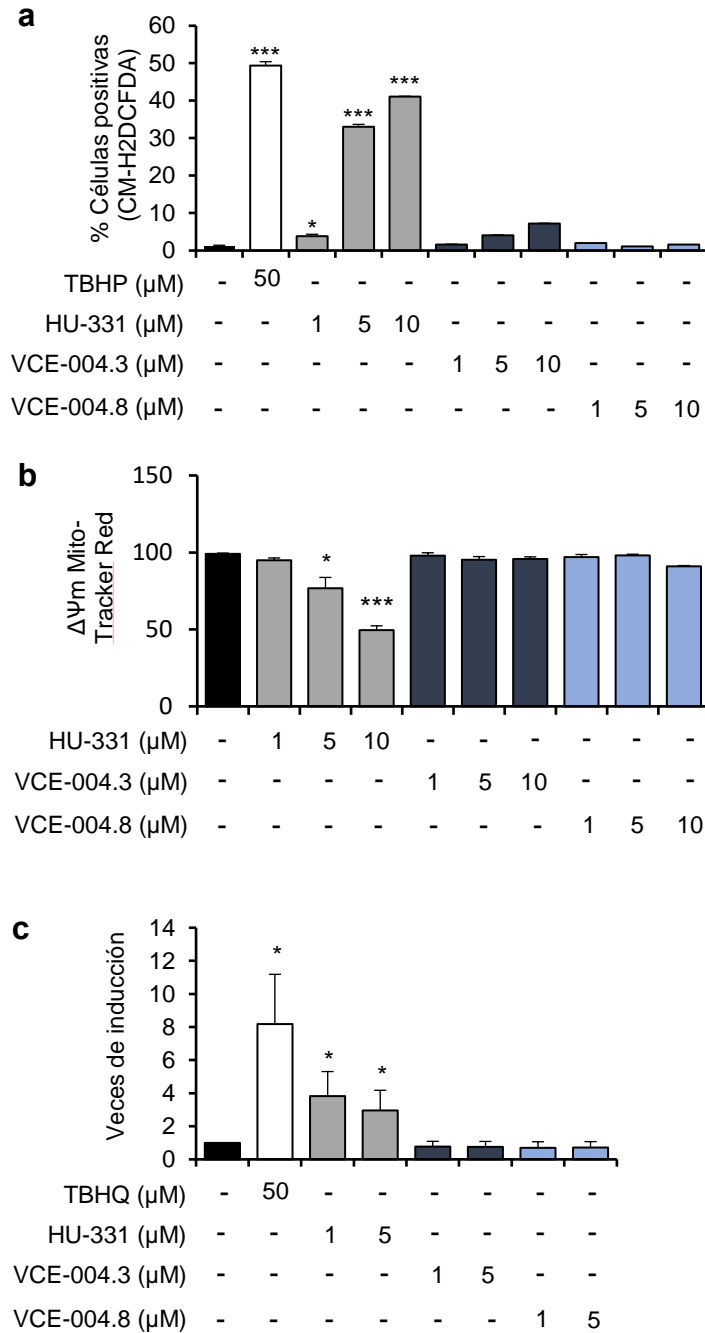


Figura 11. Los nuevos derivados VCE-004.3 y VCE-004.8 son compuestos no electrofílicos. A. Ensayo de producción de ROS. Las células Jurkat fueron tratadas con VCE-004.3, VCE-004.8 o HU-331 durante 6 horas y, tras este tiempo, teñidas con CM-H₂DCFDA para determinar la producción de ROS mediante citometría de flujo. **B.** Alteración del potencial de membrana mitocondrial. Las células Jurkat fueron tratadas con VCE-004.3, VCE-004.8 o HU-331 durante 2 horas, teñidas con MitoTracker® Red CMXRos y medidas por citometría de flujo. **C.** Efecto sobre la activación de Nrf2. Las células HaCat ARE-luc fueron tratadas durante 6 horas con los compuestos y lisadas para medir la actividad luciferasa. Los resultados están expresados como media \pm SD * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ versus células control.

Para identificar el mecanismo de acción de ambos derivados de CBD en primer lugar, estudiamos la capacidad de unión a PPAR γ de estos compuestos y comparamos los resultados con la actividad de la RGZ. Mediante un ensayo de unión competitivo, vimos como VCE-004.3 y VCE-004.8 se unen a PPAR γ con un valor IC₅₀ de 3,5 y 1,7 μ M respectivamente (Figura 12a y 12b), suponiendo una mayor actividad que la descrita previamente para su precursor HU-331 (5 μ M) (Granja y cols., 2012). Para estudiar además la capacidad de activar transcripcionalmente a PPAR γ de ambos compuestos, se cotransfectaron células NIH-3T3 con GAL4-PPAR γ y GAL4-luc. Los resultados muestran cómo la activación de PPAR γ inducida por HU-331 se produce de manera bifásica y se ve disminuida con las concentraciones más altas del compuesto. Por el contrario, VCE-004.3 y VCE-004.8 aumentan la actividad transcripcional de PPAR γ de forma dosis dependiente (Figura 12c).

Dado que estos resultados obtenidos con HU-331 podrían ser consecuencia de su actividad citotóxica, tratamos las células NIH-3T3 con concentraciones crecientes de HU-331, VCE-004.3 o VCE-004.8 durante 24 horas. El tratamiento con HU-331, pero no con los nuevos derivados, refleja una clara actividad citotóxica desde concentraciones relativamente bajas (Figura 13). De forma conjunta, estos resultados indican que las modificaciones químicas introducidas en las estructuras de VCE-004.3 y VCE-004.8 no afectan a la actividad sobre PPAR γ pero eliminan la actividad electrofílica y citotóxica de HU-331.

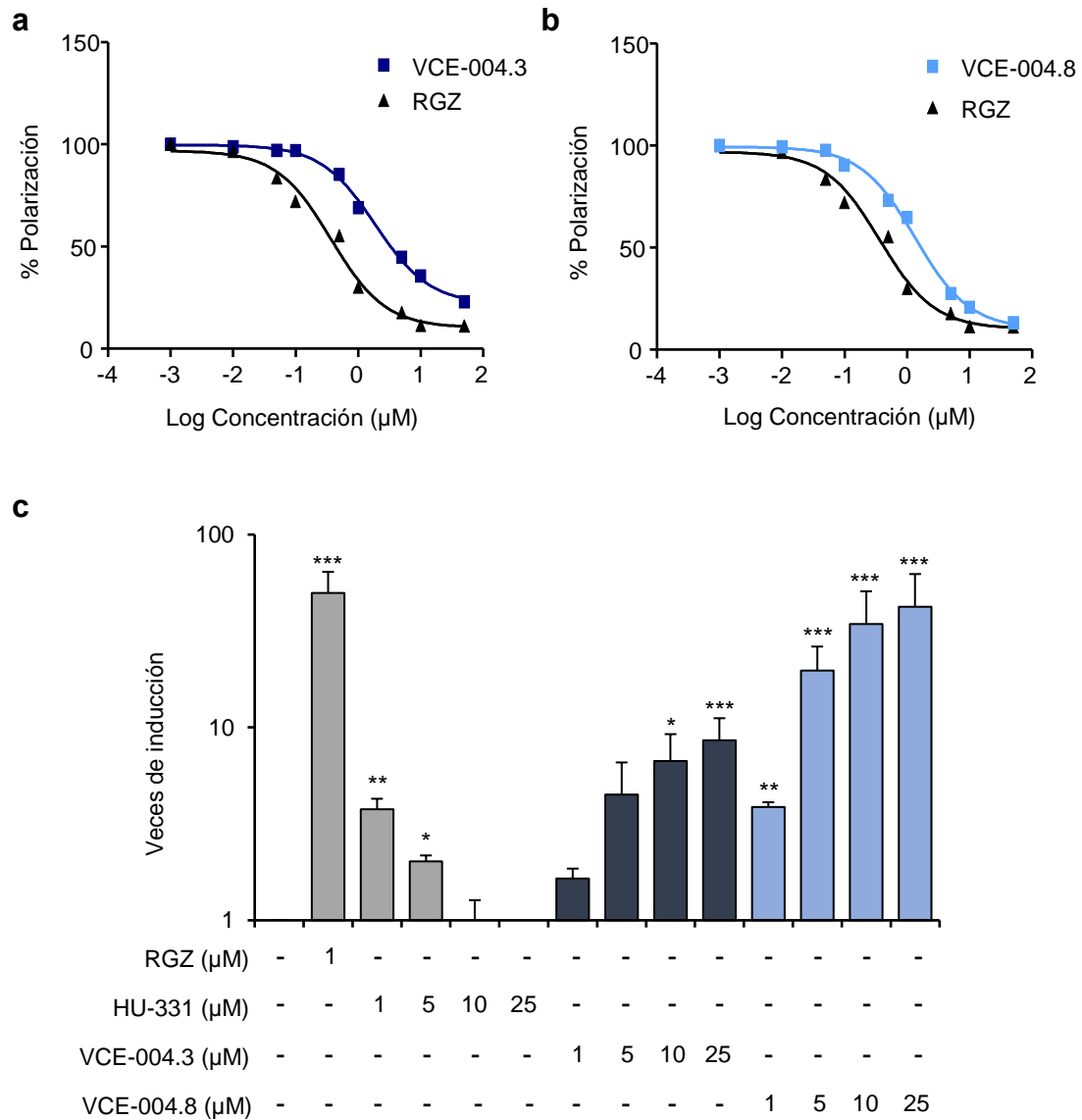


Figura 12. VCE-004.3 y VCE-004.8 son agonistas de PPAR γ y aumentan su actividad transcripcional. A-B. Ensayo de unión a PPAR γ . Se estudiaron las concentraciones indicadas de los compuestos y se representaron los resultados para obtener la tendencia polinómica en un intervalo logarítmico. **B.** Las células NIH-3T3 fueron co-transfectadas con los plásmidos GAL4-PPAR γ y GAL4-luc y estimuladas con VCE-004.3, VCE-004.8 o RGZ como control positivo durante 6 horas para medir la actividad luciferasa. Los resultados están expresados como media \pm SD * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ versus control.

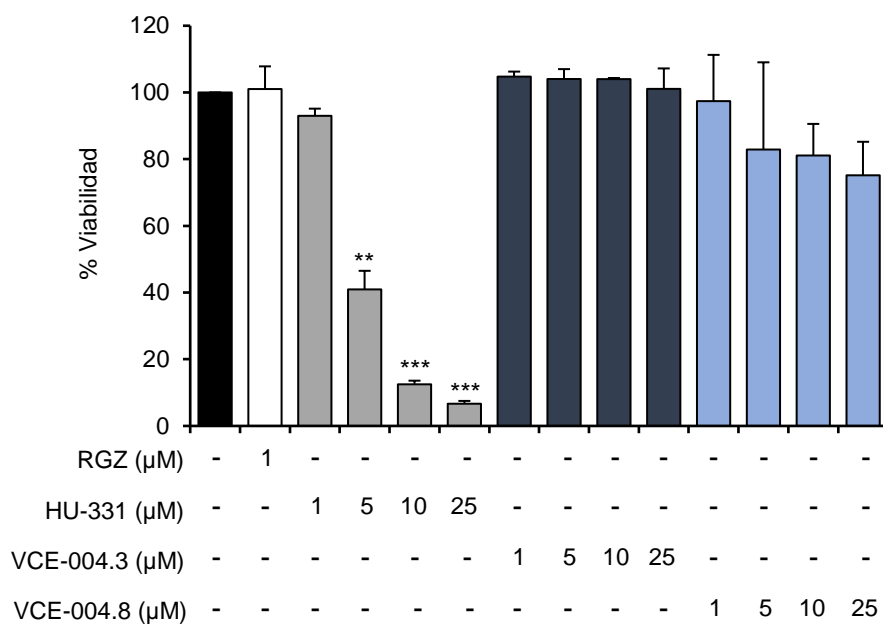


Figura 13. Ensayo de citotoxicidad. Las células NIH-3T3 fueron tratadas con VCE-004.3, VCE-004.8 o HU-331 durante 24 horas y la viabilidad celular determinó mediante el ensayo de MTT. Las células no tratadas se consideraron como el 100% de viabilidad. Los resultados están expresados como porcentaje medio \pm SD ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ versus control.

1.2. Interacción de VCE-004.3 y VCE-004.8 con los receptores cannabinoides.

Es conocido que el CBD presenta muy baja afinidad por CB_1 y CB_2 y que su actividad funcional es prácticamente indetectable (Ligresti y cols., 2016). Por lo tanto, quisimos estudiar la posible interacción de los compuestos VCE-004.3 y VCE-004.8 con los receptores cannabinoides. En primer lugar, examinamos las afinidades de ambos compuestos por CB_1 y comprobamos que, mientras que VCE-004.3 era capaz de unirse a CB_1 con un valor K_i de 2250 ± 811.2 nM, la unión de VCE-004.8 a CB_1 era prácticamente despreciable (>40 μM) (Figura 14a). De hecho, VCE-004.3 se comporta como antagonista funcional de CB_1 reduciendo la actividad del agonista dual de CB_1/CB_2 WIN 55,212 en células HEK-293T- CB_1 transfectadas con el plásmido pCRE-luc (Figura 14b).

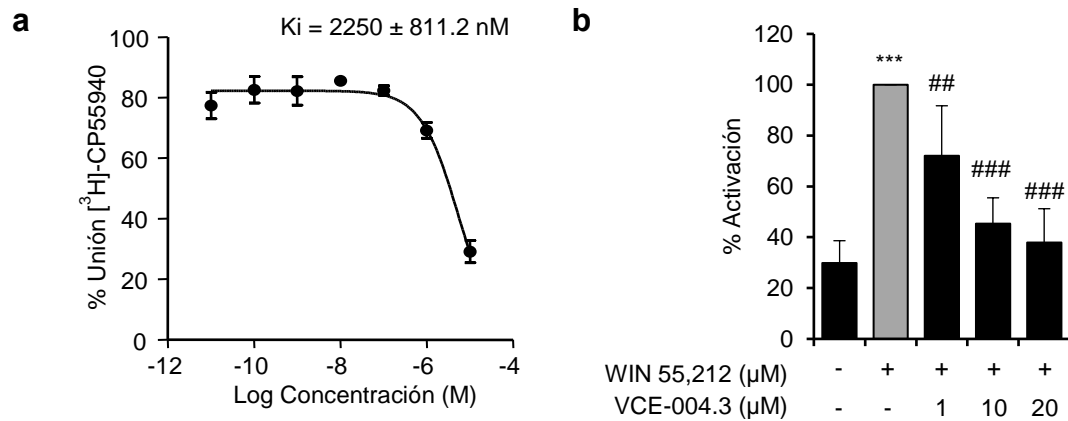


Figura 14. VCE-004.3 es antagonista del receptor CB₁. A. VCE-004.3 tiene afinidad por CB₁. Ensayo de unión a CB₁ de VCE-004.3 mediante estudios de competición utilizando el radioligando [³H]CP55940. B. VCE-004.3 es un antagonista funcional de CB₁. Las células HEK-293T-CB₁ fueron transfectadas con el plásmido pCRE-luc, preincubadas durante 30 minutos con VCE-004.3 y estimuladas con WIN 55,212 (1 μM) durante 6 horas. Las células fueron lisadas para medir la actividad luciferasa. Los resultados están expresados como porcentaje medio ± SD *** p<0,001 versus control; # p<0,01 ### p<0,001 versus WIN 55,212 o FSK.

Por otro lado, VCE-004.3 y VCE-004.8 son capaces de desplazar la unión del radioligando [³H]CP55940 a las membranas comerciales que contenían HEK-293T-CB₂ con unos valores Ki de 213.8 ± 5 nM y 170 ± 50 nM respectivamente (Figura 15a y 15b). Además, ambos derivados se comportan como agonistas de CB₂ puesto que inhiben la actividad luciferasa inducida por FSK en células HEK-293T-CB₂ transfectadas con el plásmido pCRE-luc (Figura 16). En resumen, los nuevos derivados VCE-004.3 y VCE-004.8 son agonistas de CB₂ comportándose además VCE-004.3 como antagonista de CB₁.

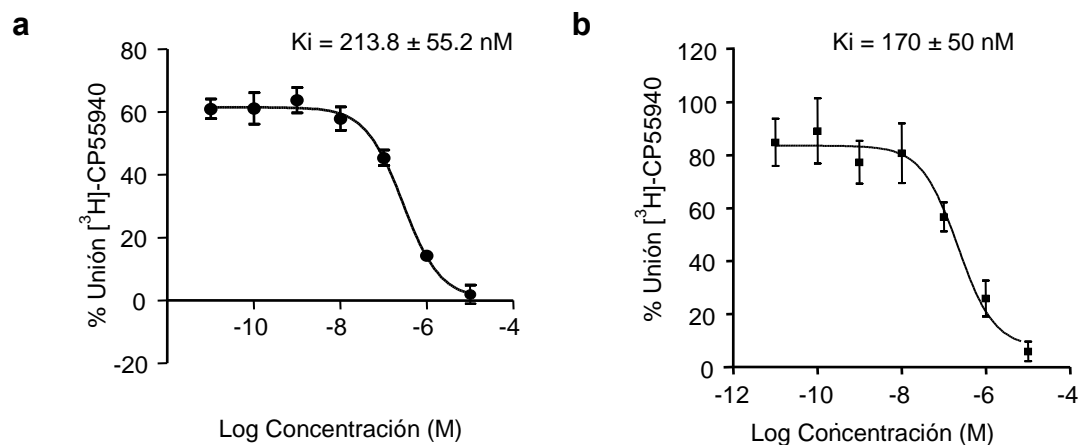


Figura 15. VCE-004.3 y VCE-004.8 se unen al receptor CB₂. Ensayo de unión a CB₂ mediante estudios de competición utilizando el radioligando [³H]CP55940.

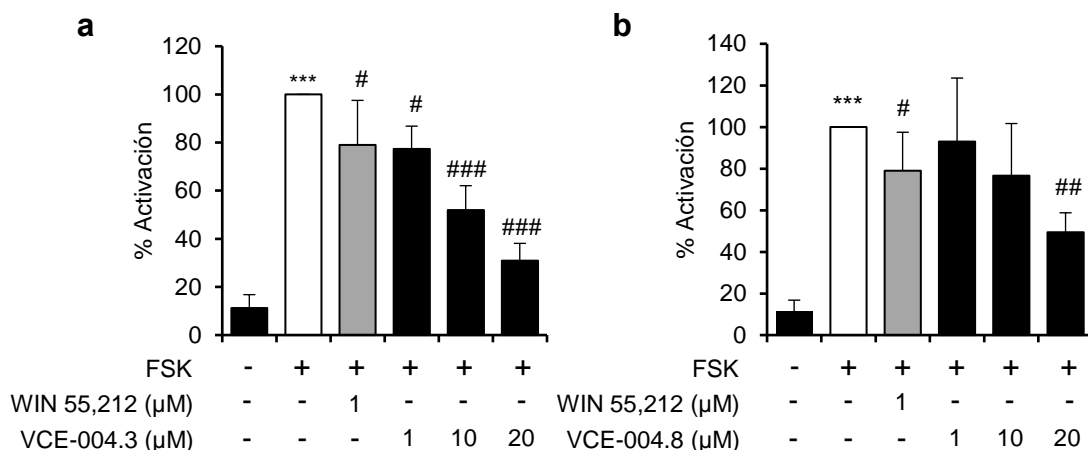


Figura 16. VCE-004.3 y VCE-004.8 son agonistas funcionales de CB₂ Las células HEK-293T-CB₂ transfectadas con pCRE-luc y preincubadas durante 30 minutos con VCE-004.3 o VCE-004.8 fueron estimuladas con FSK (10 mM) durante 6 horas y lisadas para medir la actividad luciferasa. Los resultados están expresados como porcentaje medio \pm SD *** p<0,001 versus control; # p<0,05 ## p<0,01 ### p<0,001 versus WIN 55,212 o FSK.

1.3. VCE-004.3 y VCE-004.8 reducen la transcripción y la síntesis de colágeno por los fibroblastos.

Los agonistas de PPAR γ inhiben la transcripción de gen colágeno inducida por TGF β compitiendo por el reclutamiento del coactivador p300 al complejo transcripcional formado por los factores SMADs (Ghosh y cols., 2009). Por ello, estudiamos el efecto de ambos derivados en la regulación de la transcripción de colágeno en células NIH-3T3 que expresan establemente COL1A2-luc, un plásmido que codifica el promotor del gen componente de la cadena pro-alfa2 de colágeno tipo I dirigiendo la síntesis de luciferasa. Al igual que sucede con la RGZ, el pretratamiento con VCE-004.3 o VCE-004.8 redujo significativamente la transcripción de Colla2 inducida por TGF β de manera dosis dependiente (Figura 17a). La unión de TGF β a su receptor conlleva la activación de SMAD2/SMAD3 mediante fosforilación y la inducción de su actividad transcripcional. Las células NIH-3T3 transfectadas con el plásmido CAGA-luc, reportero de la actividad transcripcional de las SMADs, fueron preincubadas con VCE-004.3 o VCE-004.8 y estimuladas con TGF β . Ambos compuestos fueron capaces de reducir de manera significativa la actividad transcripcional de las SMADs (Figura 17b).

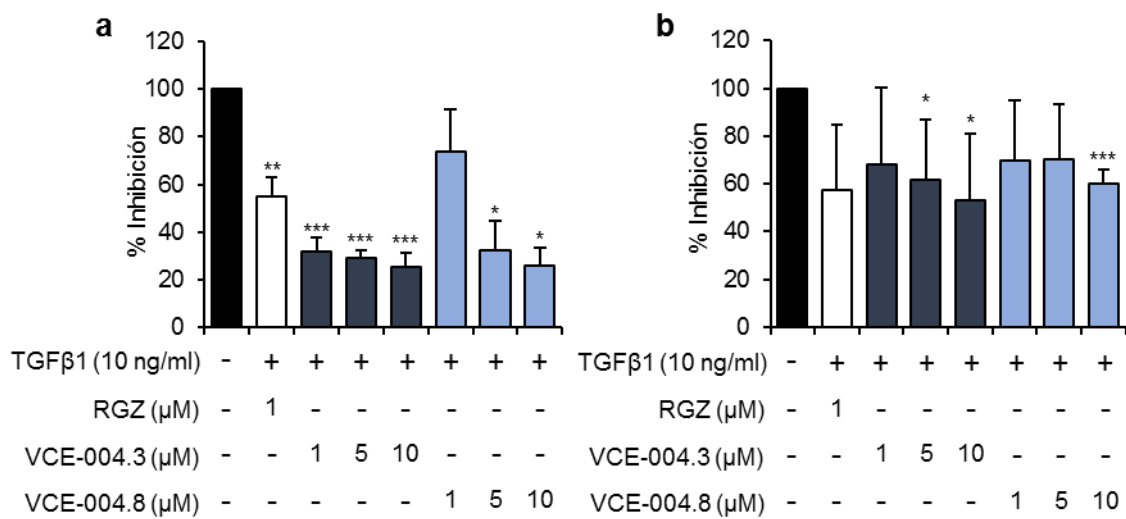


Figura 17. VCE-004.3 y VCE-004.8 inhiben la transcripción del gen Col1a2 y la actividad transcripcional de las SMADs tras la inducción con TGFβ. **A.** Las células NIH-3T3-Col1a2 fueron preincubadas con los compuestos durante 1 hora y estimuladas con TGFβ1 (10 ng/ml) durante 24 horas. **B.** Las células NIH-3T3 fueron transfectadas con el plásmido CAGA-luc, preincubadas con los compuestos durante 1 hora y estimuladas con TGFβ1 (10 ng/ml) durante 6 horas. Se cuantificó la actividad luciferasa en el lisado celular. Los resultados están representados como porcentaje de inhibición ± SD * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 versus TGFβ1.

Sin embargo, este efecto es independiente de la activación de las SMADs dado que el pretratamiento con RGZ, VCE-004.3 o VCE-004.8 no afecta a la fosforilación SMAD2 provocada por TGFβ. Para investigar más a fondo el efecto de los compuestos sobre la vía de señalización de TGFβ, estudiamos también la ruta no canónica del TGFβ que señala via ERK 1/2. Tanto VCE-004.3 como VCE-004.8 inhibieron la fosforilación de ERK 1/2 en células NIH-3T3 estimuladas con TGFβ (Figura 18a y 18b).

Para estudiar el efecto antifibrótico de los compuestos mediado por la inhibición de la señalización por TGFβ cuantificamos la deposición y liberación de colágeno en fibroblastos humanos. Éstos fueron preincubados con concentraciones crecientes de VCE-004.3 o VCE-004.8 y estimulados con TGFβ durante 48 horas. Ambos compuestos redujeron de forma significativa la deposición (Figura 19a) y la liberación de colágeno al medio de cultivo (Figura 19b) inducidas por el tratamiento con TGFβ.

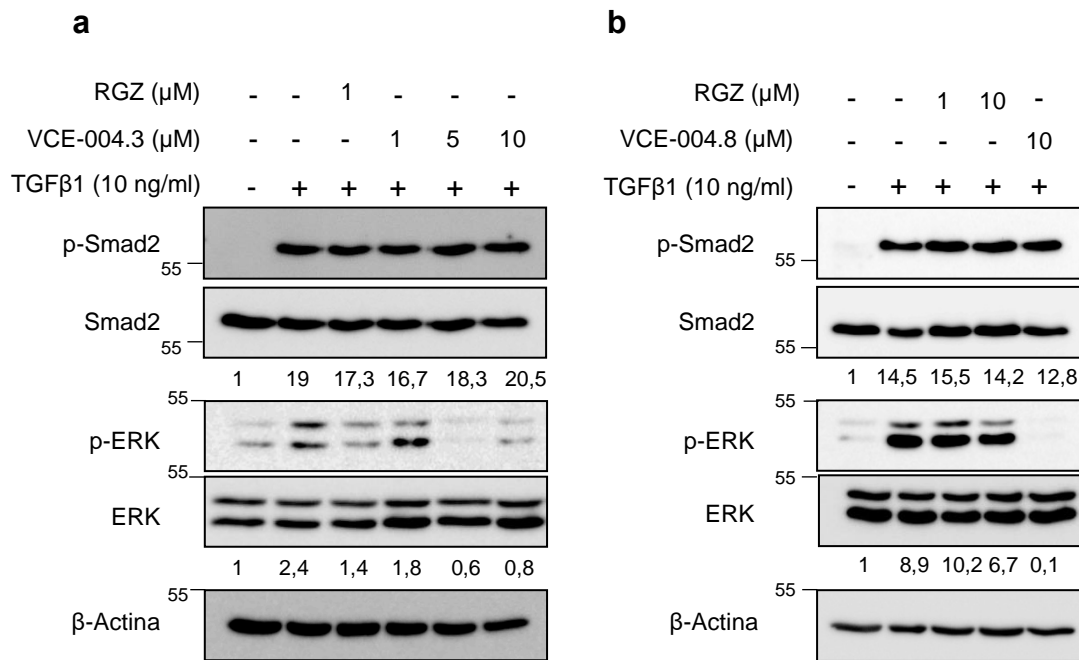


Figura 18. El tratamiento con los compuestos VCE-004.8 y VCE-004.3 no afecta a la señalización canónica de TGFβ pero reduce la activación de la ruta no canónica de ERK. Las células NIH-3T3 deprivadas de suero (1% FBS) durante 24 horas fueron preincubadas con VCE-004.3 (A) o VCE-004.8 (B) durante 1 hora y estimuladas con TGFβ1 (10 ng/ml) durante 2 horas. La expresión de proteína se determinó por Western blot. Los valores indicados bajo los geles representan la intensidad de señal tras la normalización con β-actina.

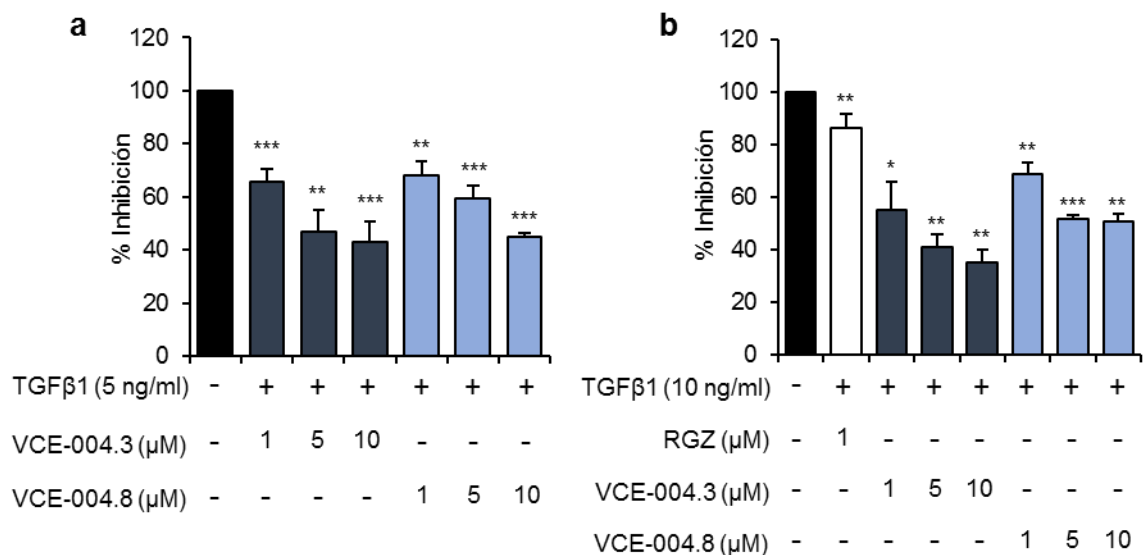


Figura 19. VCE-004.3 y VCE-004.8 reducen la deposición de colágeno inducida por TGFβ. Los fibroblastos humanos primarios deprivados de suero (1% FBS) durante 24 horas fueron preincubados durante 1 hora con VCE-004.3 o VCE-004.8 a las concentraciones indicadas y estimulados con TGFβ1 durante las 48 horas siguientes. A. Las células fueron recogidas y la deposición de colágeno se determinó utilizando el método Sirius Red-Fast Green. B. Los sobrenadantes celulares fueron recogidos para medir la liberación de colágeno soluble utilizando el ensayo de Sircol. Los resultados se representan como veces de inducción frente a las células tratadas con TGFβ1. * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 versus TGFβ1.

1.4.VCE-004.3 y VCE-004.8 inhiben la migración de fibroblastos y previenen la diferenciación a miofibroblastos *in vitro*.

La migración de fibroblastos juega un papel fundamental tanto en la cicatrización normal de las heridas como durante la patogénesis de la SSc (Gilbane y cols., 2013). Para analizar este aspecto, monocapas de fibroblastos humanos en las que se realizaron heridas fueron tratadas con VCE-004.3 o VCE-004.8 en presencia de citoquinas inductoras del cierre de la herida. Los tratamientos con VCE-004.3 (Figura 20) o VCE-004.8 (Figura 21) redujeron la cicatrización promovida por TGFβ o IL4 de forma dependiente de concentración.

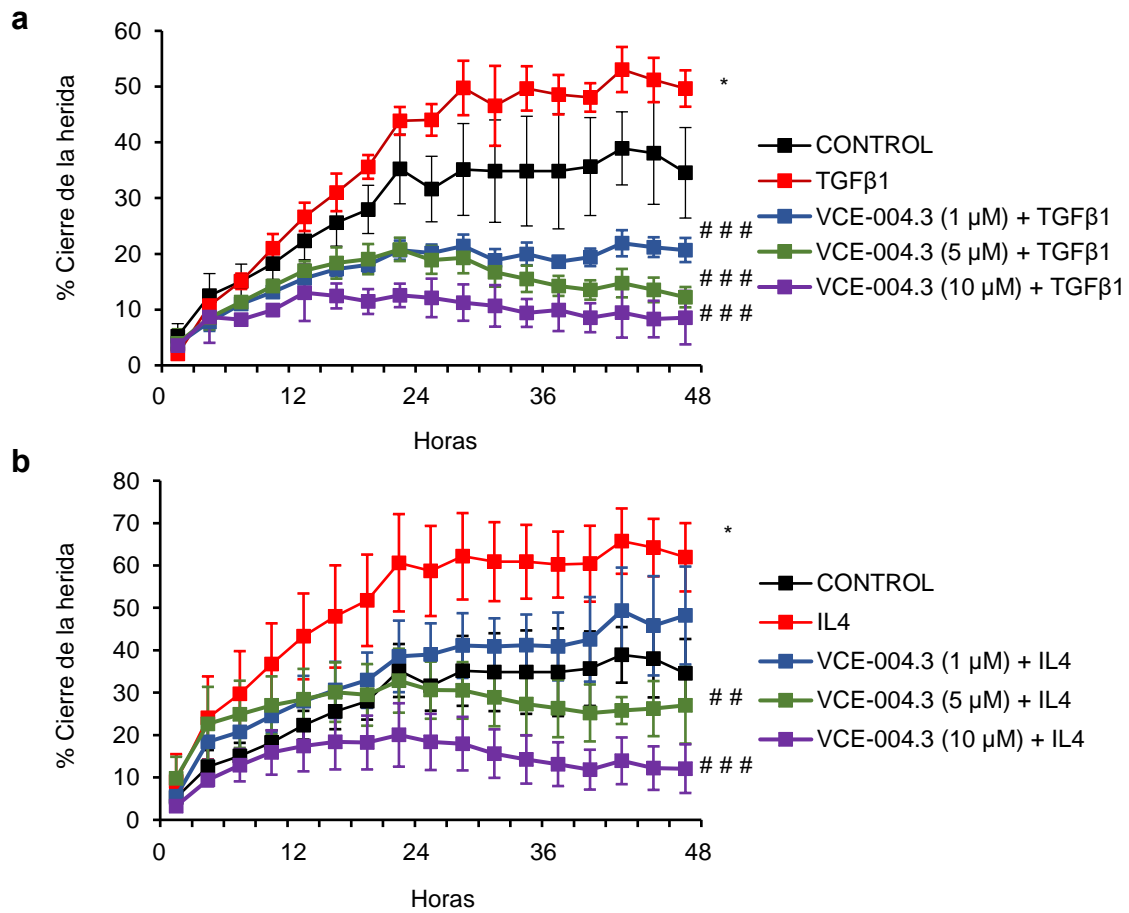


Figura 20. VCE-004.3 reduce la migración de fibroblastos inducida por citoquinas profibróticas. Los fibroblastos humanos primarios fueron sembrados en monocapas y, tras realizar la herida, tratados con VCE-004.3 en presencia de TGFβ1 (A) o IL4 (B). Los resultados se representan como porcentaje del cierre de la herida ± SD * p<0,05 ** p<0,01 versus control; ## p<0,01 TGFβ1 o IL4.

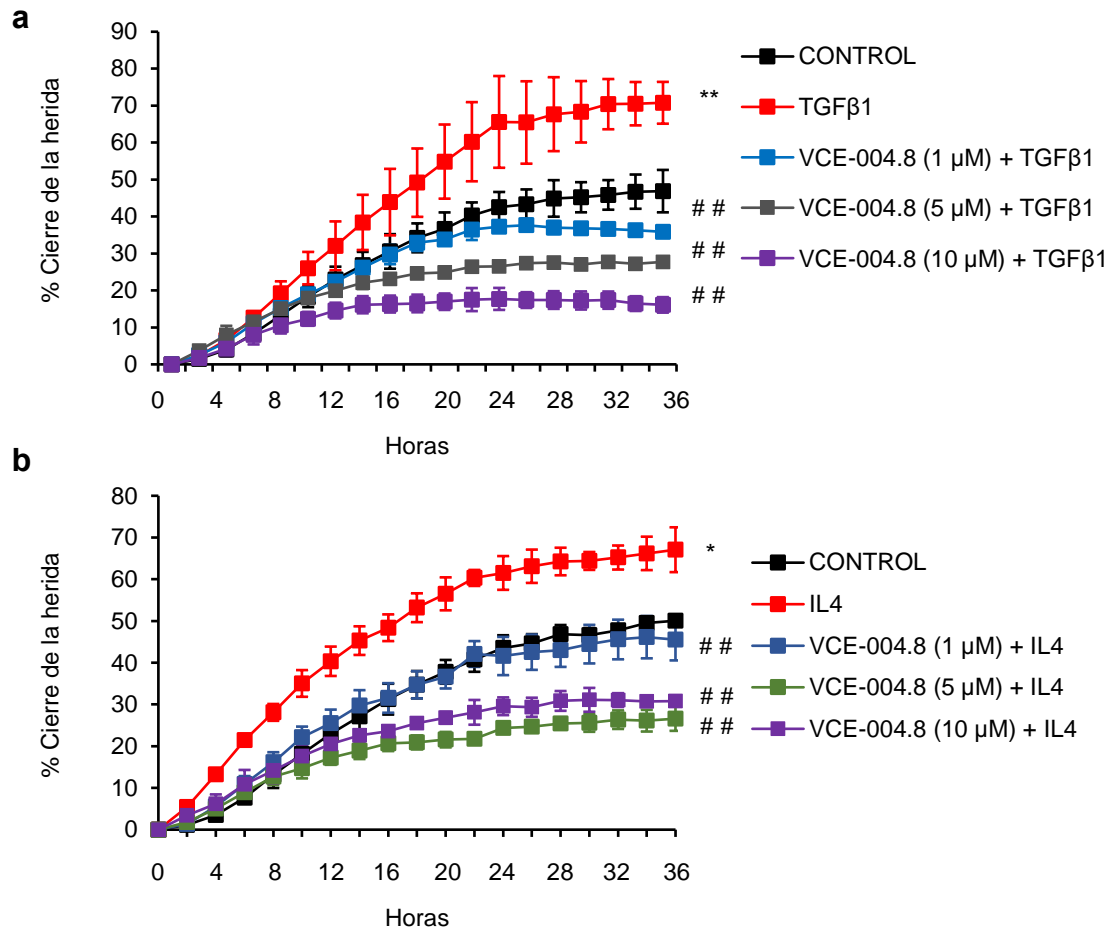


Figura 21. VCE-004.8 reduce la migración de fibroblastos inducida por citoquinas profibróticas. Los fibroblastos humanos primarios fueron sembrados en monocapas y, tras realizar la herida, tratados con VCE-004.8 en presencia de TGFβ1 (A) o IL4 (B). Los resultados se representan como porcentaje del cierre de la herida ± SD * p<0,05 versus control; ## p<0,01 ### p<0,001 TGFβ1 o IL4.

El TGFβ promueve también la conversión de los fibroblastos hacia un fenotipo de miofibroblastos, los cuales presentan fibras de estrés características y propiedades contráctiles (Desmouliere y cols., 1993). Por lo tanto, estudiamos el efecto de los nuevos derivados sobre la diferenciación *in vitro* hacia miofibroblastos inducida por TGFβ. El tratamiento con VCE-004.3 o RGZ redujo el marcaje con α-actina de músculo liso (α-SMA) como marcador específico de miofibroblastos y los niveles de expresión de α-SMA en células NIH-3T3 (Figura 22). De la misma forma, la estimulación de las células MEFs con TGFβ dio lugar a cambios morfológicos de hipertrofia celular y formación de fibras de actina características de la diferenciación a miofibroblastos. Por el contrario, las células pretratadas con VCE-004.8 o RGZ presentaban una morfología similar a las

células control, lo cual se confirma cuando estudiamos los niveles de proteína de α -SMA (Figura 23). Estos resultados confirman que los agonistas de PPAR γ afectan a la función de los fibroblastos como contribuidores clave en el desarrollo de la fibrosis reduciendo la migración y la diferenciación a miofibroblastos.

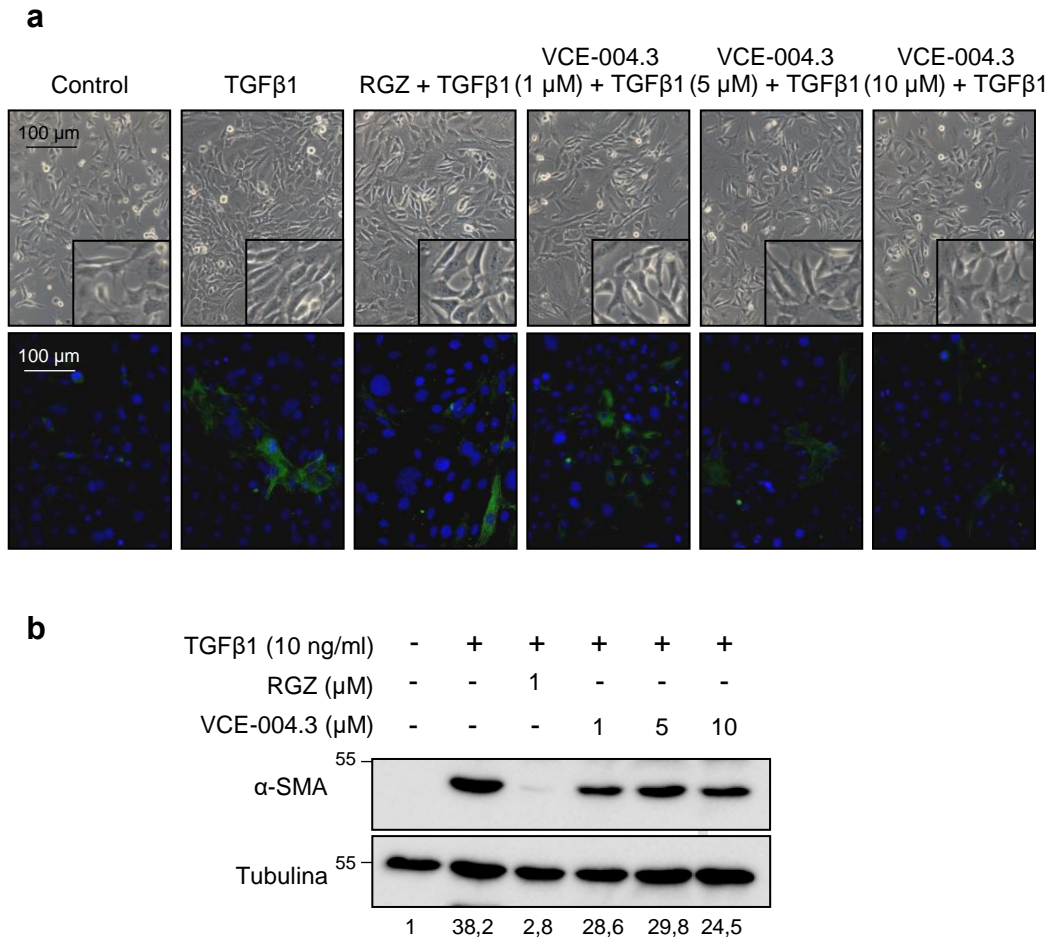


Figura 22. VCE-004.3 previene la diferenciación a miofibroblastos *in vitro*. Tras 24 horas de privación de suero (1% FBS), las células NIH-3T3 fueron preincubadas durante 1 hora con los compuestos y estimuladas con TGF β 1 (10 ng/ml) durante 24 horas. **A.** Imágenes representativas de la diferenciación a miofibroblastos en campo claro (panel superior) y la inmunodetección de miofibroblastos mediante el marcaje con α -SMA (panel inferior). Los insertos muestran los detalles de la morfología celular. **B.** Los niveles de α -SMA se estudiaron por Western blot. Los valores indicados bajo los geles representan la intensidad de señal tras la normalización con tubulina.

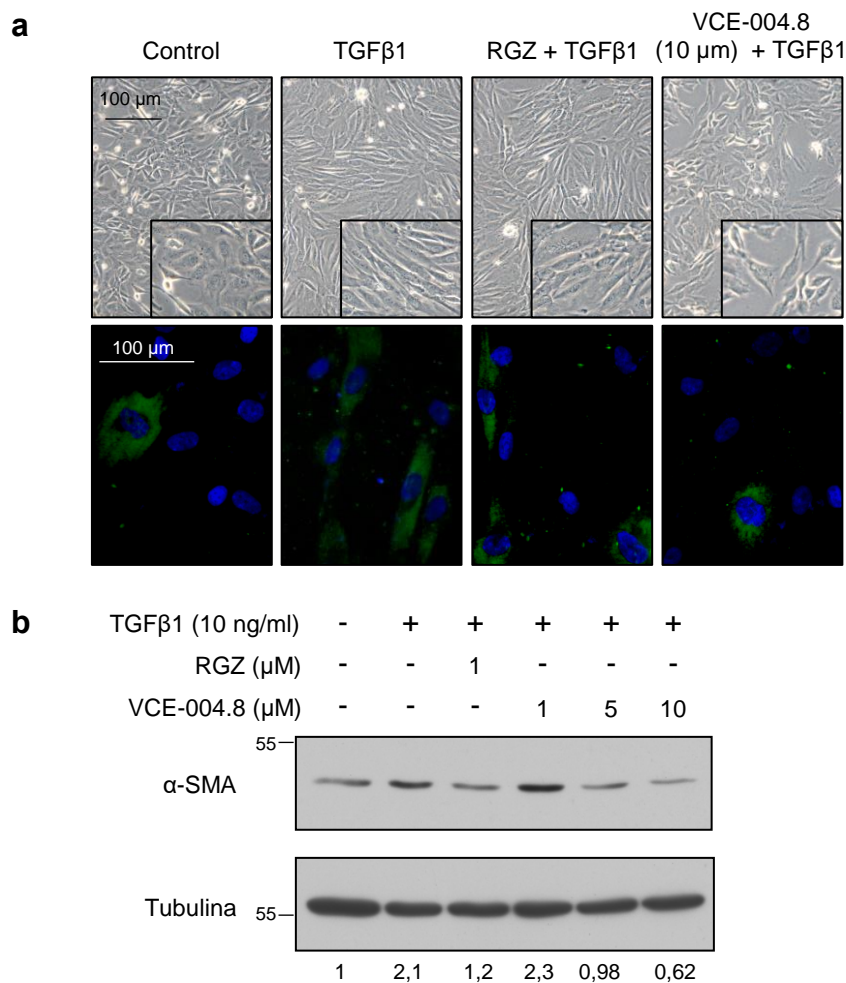


Figura 23. VCE-004.8 reduce la diferenciación a miofibroblastos *in vitro*. **A.** Imágenes representativas de la diferenciación a miofibroblastos en campo claro (panel superior) y la inmunodetección de miofibroblastos mediante el marcaje con α -SMA (panel inferior). Los insertos muestran los detalles de la morfología celular. Tras 24 horas de privación de suero (1% FBS), las células MEFs fueron preincubadas durante 1 hora con los compuestos y estimuladas con TGFβ1 (10 ng/ml) durante 24 horas. **B.** Las células NIH-3T3 privadas de suero (1% FBS) fueron preincubadas durante 1 hora con los compuestos y estimuladas con TGFβ1 (10 ng/ml) durante 24 horas. Los niveles de α -SMA se estudiaron por Western blot. Los valores indicados bajo los geles representan la intensidad de señal tras la normalización con tubulina.

1.5. VCE-004.3 previene el desarrollo de fibrosis *in vivo* asociada a la inflamación provocada por la administración de BLM.

El modelo animal de SSc inducido por la administración subcutánea de BLM se utiliza comúnmente para el estudio de nuevas terapias antiinflamatorias y antifibróticas. Durante las primeras semanas de inyección subcutánea de BLM se produce un fenómeno inflamatorio caracterizado por un aumento de citoquinas y factores de crecimiento que

progresivamente dan lugar a la fibrosis (Yamamoto y cols., 1999a; Avouac y cols., 2013). En este modelo, la esclerosi s dérmica se indujo mediante inyecciones subcutáneas de BLM durante 4 semanas y el tratamiento con RGZ (5 mg/kg; i.p.) o VCE-004.3 (20 mg/kg; i.p.) se llevó a cabo en paralelo de forma diaria. El análisis histopatológico muestra que tras 4 semanas, el grupo lesionado con BLM presentaba esclerosi s de la piel caracterizada por el engrosamiento dérmico y la reducci3n de la capa adiposa subcutánea asociados una mayor deposici3n de colágeno. En los animales tratados con RGZ o VCE-004.3 el engrosamiento de la dermis era significativamente más leve, aunque ninguno de los tratamientos pudo recuperar la p3rdida de tejido adiposo subcutáneo (Figura 24).

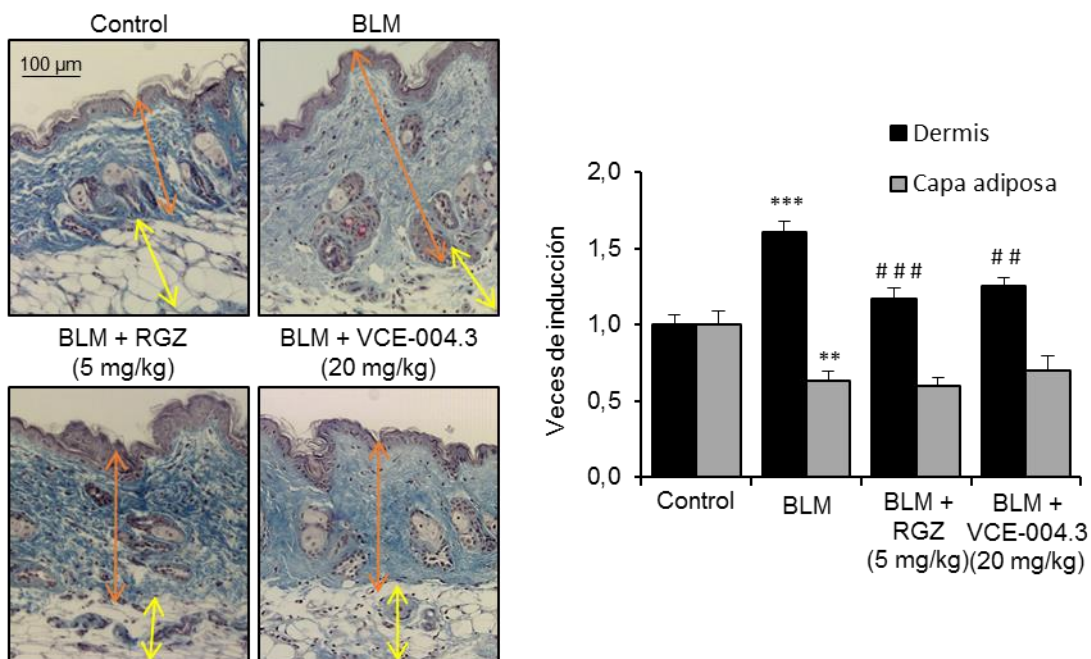


Figura 24. VCE-004.3 previene el establecimiento de fibrosis dérmica provocada por el modelo inflamatorio de SSc inducido por BLM. Imágenes representativas de la tinci3n tricr3mica de Masson y su respectiva cuantificaci3n del grosor de la dermis y la capa adiposa subcutánea. Las flechas rojas y amarillas representan el grosor de la dermis y el tejido adiposo subcutáneo, respectivamente. Los resultados se representan como media \pm SEM referido al grupo control (n = 9 animales por grupo). ** p<0,01 *** p<0,001 versus grupo control; ## p<0,01 ### p<0,001 versus BLM.

A continuaci3n, estudiamos la expresi3n de citoquinas relacionadas con el proceso inflamatorio y la fibrosis en la piel de los animales. Como se esperaba, los ratones sometidos a la administraci3n de BLM presentaban niveles de expresi3n mayores de los diferentes marcadores comparados con el grupo control. Esta sobreexpresi3n de *Il6*, *Il4*, *Il1 β* y *Tgf β* se redujo de manera significativa cuando los animales eran tratados con RGZ o VCE-004.3 (Figura 25).

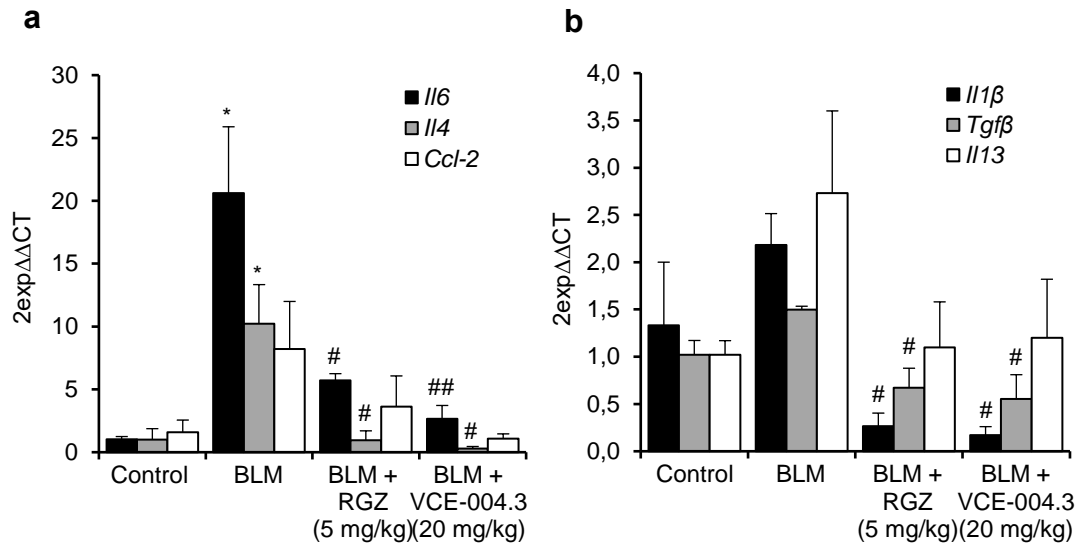


Figura 25. El tratamiento con VCE-004.3 reduce la expresión de genes profibróticos y proinflamatorios inducida por la exposición a BLM. Expresión génica en la piel de *Il4*, *Il6* y *Ccl2* (A) e *Il1β*, *Tgfβ* e *Il13* (B) representada como media \pm SEM referida al grupo control (n = 9 animales por grupo). *p<0,05 versus grupo control; # p<0,05 ## p<0,01 versus BLM.

Durante las etapas iniciales, la inflamación se refleja a nivel histológico en un aumento en el número de mastocitos y una degranulación marcada de los mismos acompañada de la liberación de histamina y otros mediadores que activan la producción de colágeno por los fibroblastos (Yamamoto y cols., 1999a). Así, la tinción de las secciones de piel con azul de toluidina mostraron una degranulación acentuada en el grupo BLM. Aunque no se observaron cambios con el tratamiento con RGZ, en los ratones tratados con VCE-004.3 se observó una reducción significativa de la degranulación de mastocitos hasta niveles comparables al grupo control (Figura 26).

En este modelo de SSc el infiltrado de células inflamatorias en la piel se compone también de macrófagos, células T y células B (Yamamoto y cols., 1999a). El marcaje mediante inmunohistoquímica de los macrófagos F4/80⁺ presentes en la piel muestra un aumento de la infiltración celular que se previene cuando los animales son tratados con RGZ o VCE-004.3 (Figura 27). De la misma forma, el aumento de la infiltración de células T CD3⁺ provocado por la administración subcutánea de BLM se ve también atenuado de manera significativa por el tratamiento con RGZ y VCE-004.3 (Figura 28).

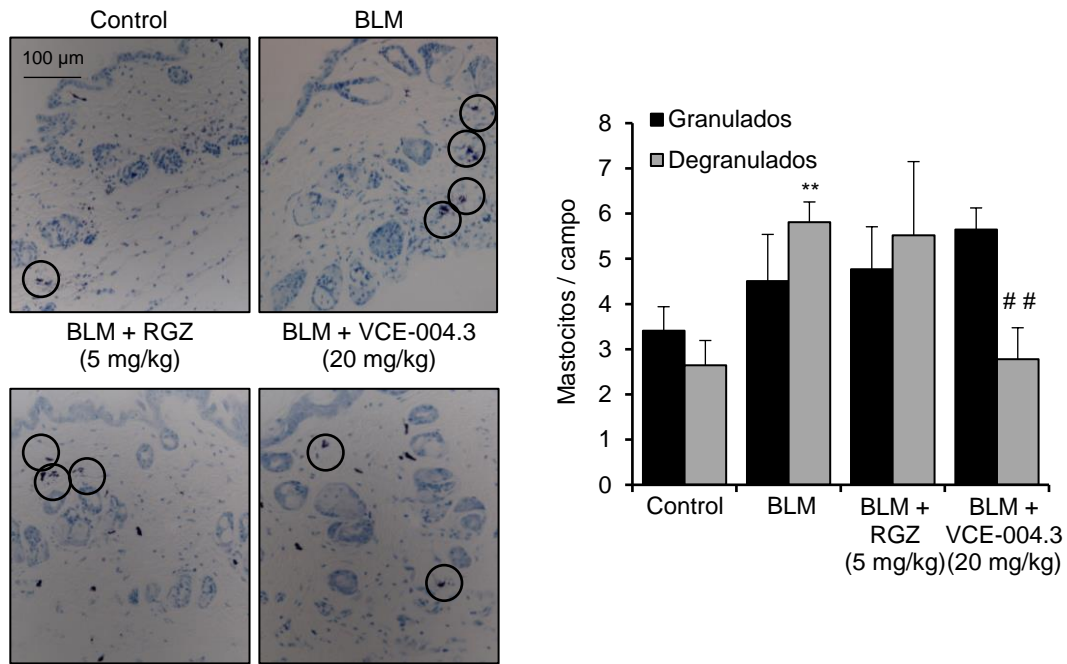


Figura 26. VCE-004.3 previene la degranulación de mastocitos en la piel. Imágenes representativas de secciones de piel teñidas con azul de toluidina y la cuantificación de mastocitos granulados y degranulados de los diferentes grupos experimentales. Los círculos indican la presencia de mastocitos degranulados. Los resultados están representados como media \pm SEM referidos al grupo control (n = 9 animales por grupo). ** p<0,01 versus grupo control; ## p<0,01 versus BLM.

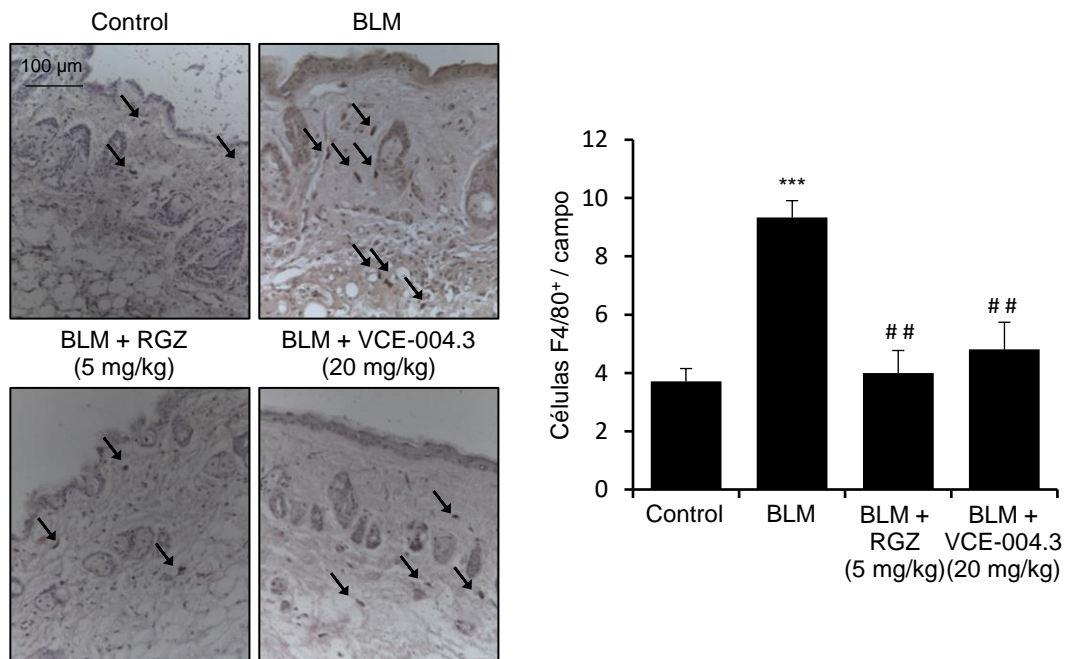


Figura 27. VCE-004.3 disminuye la infiltración de macrófagos provocada por la administración de BLM. Imágenes representativas de secciones de piel tras el marcaje con anti-F4/80 mediante inmunohistoquímica y su respectiva cuantificación. Las flechas indican la presencia de células marcadas. Los resultados están representados como media \pm SEM referidos al grupo control (n = 9 animales por grupo). *** p<0,001 versus grupo control; ## p<0,01 versus BLM.

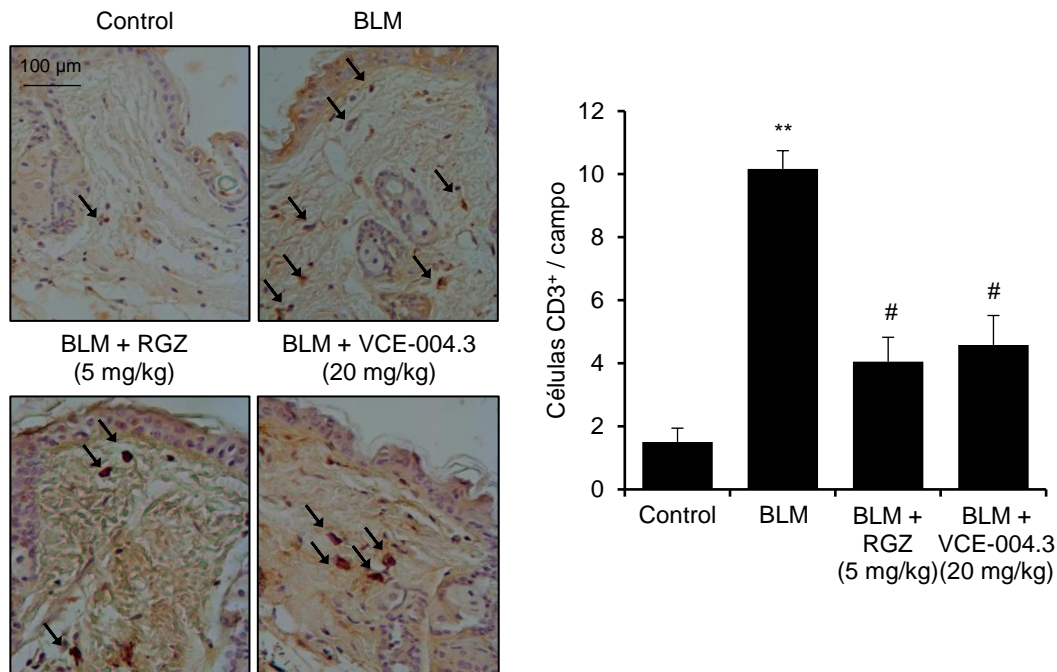


Figura 28. El tratamiento con VCE-004.3 reduce la infiltración de células T en la piel. Imágenes representativas de secciones de piel tras el marcaje con anti-CD3 mediante inmunohistoquímica y su respectiva cuantificación. Las flechas indican la presencia de células marcadas. Los resultados están representados como media \pm SEM referidos al grupo control (n = 9 animales por grupo). ** p<0,01 versus grupo control; # p<0,05 versus BLM.

En la SSc y en respuesta al daño tisular se produce una acumulación de miofibroblastos persistente en la piel lesionada, los cuales son los principales responsables de la producción exagerada de elementos de la matriz extracelular durante la progresión de la enfermedad tanto en humanos como en el modelo animal de BLM (Sappino y cols., 1990). El análisis inmunohistoquímico de la piel mediante el marcaje con α -SMA puso de manifiesto que tanto la RGZ como el VCE-004.3 previnieron la acumulación de miofibroblastos inducida por BLM (Figura 29).

Diferentes estudios han mostrado que las MAPK se activan en respuesta a agentes fibrogénicos y contribuyen a la función y la formación de miofibroblastos (Leask, 2012). De hecho, la inhibición específica de MEK suprime la progresión de fibrosis pulmonar *in vivo* (Madala y cols., 2012). Por lo tanto, examinamos la fosforilación de ERK1/2 en la piel de los ratones tras la administración de BLM. Los animales sujetos a inyecciones de BLM mostraron un aumento significativo de la fosforilación de ERK 1/2 mientras que el tratamiento con RGZ así como con VCE-004.3 redujeron significativamente el marcaje con p-ERK 1/2 (Figura 30).

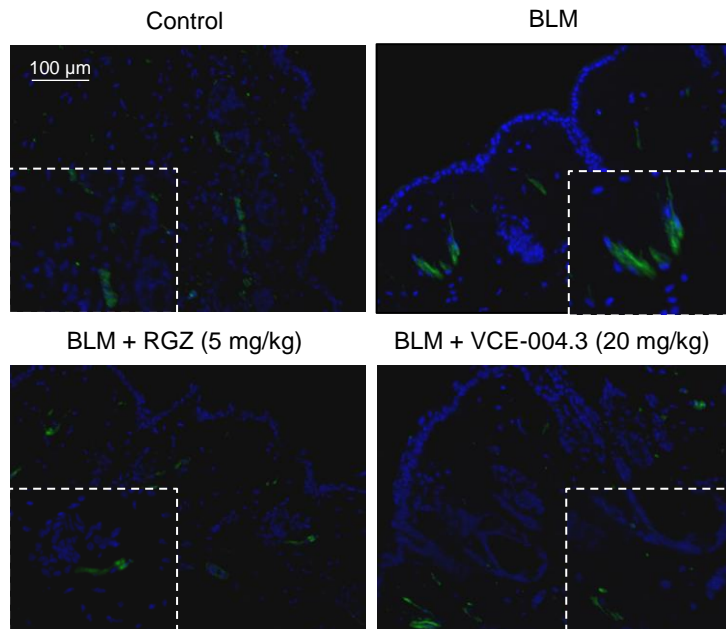


Figura 29. VCE-004.3 previene la diferenciación a miofibroblastos in vivo. Imágenes representativas de secciones de piel marcadas con anti- α -SMA (verde) y teñidas con DAPI (azul) mediante inmunofluorescencia (n = 9 animales por grupo). Los insertos muestran los detalles de la morfología celular.

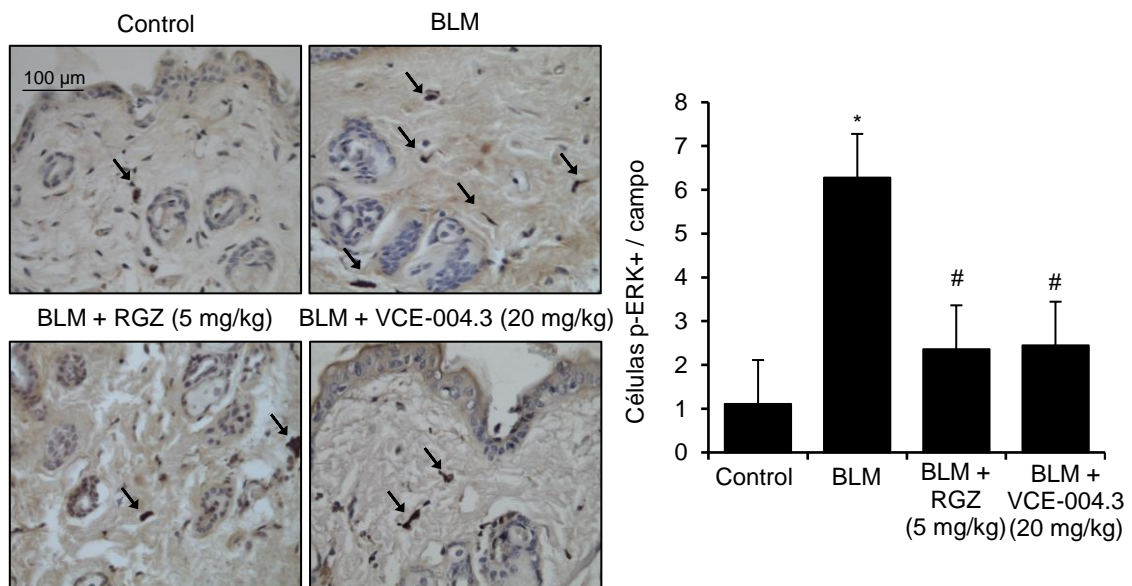


Figura 30. VCE-004.3 reduce la activación de la ruta de ERK en la piel esclerótica de ratones tras la administración de BLM. Imágenes representativas de cortes histológicos de piel marcados con anti-pERK mediante inmunohistoquímica y su cuantificación correspondiente. Las flechas indican la presencia de células marcadas. Los resultados están representados como media \pm SEM referidos al grupo control (n = 9 animales por grupo). * $p < 0.05$ versus grupo control; # $p < 0,05$ versus BLM.

1.6. VCE-004.3 reduce la fibrosis preestablecida en el modelo murino de SSc crónica.

Para evaluar la eficacia de VCE-004.3 en un modelo de fibrosis pre-establecida, los animales fueron inyectados con BLM durante 6 semanas y tratados diariamente con RGZ (5 mg/kg; i.p.) o VCE-004.3 (20 mg/kg; i.p.) durante las últimas 3 semanas de inducción del modelo. De acuerdo con estudios anteriores, el espesor dérmico aumentó hasta 2 veces después de 6 semanas de aplicación de BLM. Igualmente, se observó en paralelo una gran pérdida de tejido adiposo subcutáneo. El tratamiento durante 3 semanas con VCE-004.3 (20 mg/kg; i.p.) en ausencia de BLM no provocó cambios en la estructura de la piel. Sin embargo, la administración sistémica de RGZ o VCE-004.3 tras el establecimiento de la fibrosis revirtió significativamente el engrosamiento de la dermis y recuperó parcialmente la capa adiposa subcutánea (Figura 31).

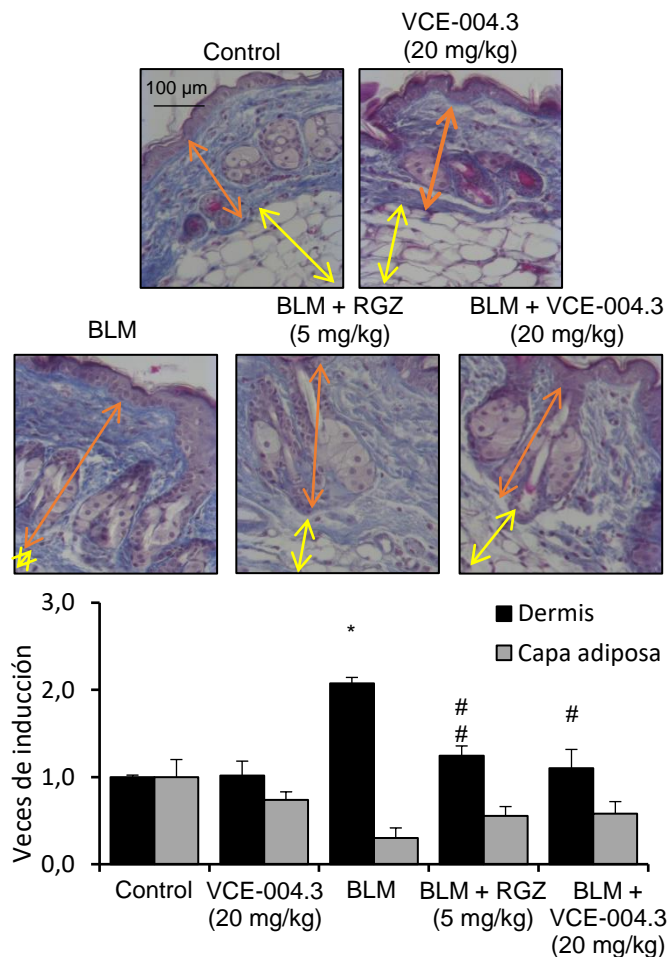


Figura 31. La administración sistémica de VCE-004.3 revierte la fibrosis preestablecida en el modelo de SSc crónica inducida por BLM. Imágenes representativas de la piel tras la tinción tricrómica de Masson y cuantificación correspondiente del grosor de la dermis y la capa adiposa subcutánea. Las flechas rojas y amarillas representan el grosor de la dermis y el tejido adiposo subcutáneo, respectivamente. Los resultados se representan como media \pm SEM referidos al grupo control (n = 6 animales por grupo). * $p < 0,05$ versus grupo control; # $p < 0,05$ ### $p < 0,01$ versus BLM.

En este modelo también se estudiaron los niveles de ARNm de las citoquinas profibróticas *I14*, *I16* y *Tgfβ* en la piel de los ratones. A diferencia del modelo inflamatorio, la expresión de *Tgfβ* se encuentra fuertemente inducida en este modelo mientras que los niveles de *I14* solo presentan una ligera tendencia al aumento. Aunque en menor medida que en el modelo inflamatorio, el ARNm de *I16* se encuentra también sobre-expresado. En todo caso, los niveles de expresión de estos marcadores de fibrosis e inflamación se normalizaron en los grupos tratados con RGZ y VCE-004.3 (Figura 32).

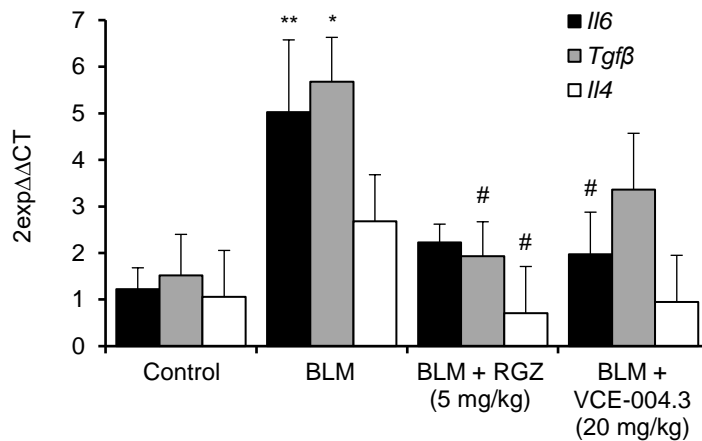


Figura 32. VCE-004.3 disminuye la expresión de genes profibróticos en la piel tras el desarrollo de SSc crónica inducida por BLM. Expresión génica en la piel de los animales representada como media \pm SEM referida al grupo control (n = 6 animales por grupo). * p<0,05 ** p<0,01 versus grupo control; # p<0,05 versus BLM.

La inyección subcutánea de BLM no solo produce fibrosis en la piel, sino también en el pulmón (Yamamoto y Nishioka, 2002; Yamamoto y cols., 1999a). El análisis histológico del pulmón mediante la tinción tricrómica de Masson muestra un incremento significativo de la fibrosis en el grupo BLM cuantificada mediante la escala de Ashcroft. Los grupos animales a los que se les administró RGZ o VCE-004.3 presentan una puntuación más baja en la escala de Ashcroft, aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas (Figura 33).

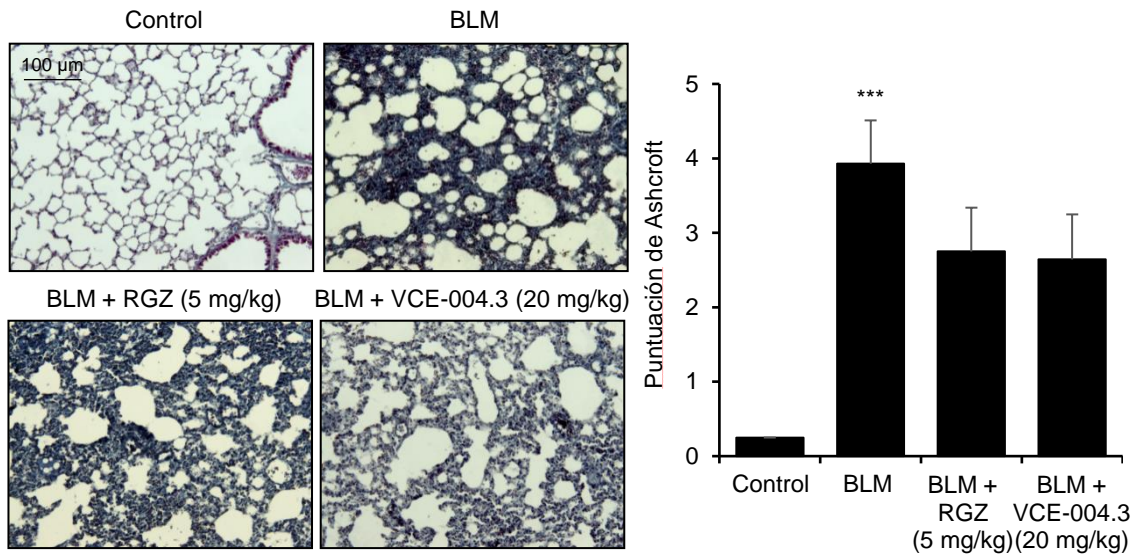


Figura 33. El tratamiento con VCE-004.3 mejora levemente la fibrosis pulmonar debida al desarrollo de SSc crónica inducida por BLM. Imágenes representativas de secciones histológicas de pulmón tras la tinción tricrómica de Masson y su respectiva cuantificación utilizando la escala modificada de Ashcroft. Los resultados se representan como media \pm SEM referidos al grupo control (n = 6 animales por grupo). *** p<0,001 versus grupo control

1.7. El tratamiento con VCE-004.8 reduce la fibrosis crónica experimental a través de PPAR γ y CB $_2$.

Al igual que con VCE-004.3, para estudiar la actividad antifibrótica del VCE-004.8 *in vivo* utilizamos el modelo de SSc crónica. Como se ha comentado antes, este modelo se indujo mediante la administración subcutánea de BLM durante 6 semanas y el tratamiento se suministró de forma i.p. durante las últimas 3 semanas. Estos tratamientos consistieron en inyecciones diarias de VCE-004.8 sólo o en combinación con el antagonista de PPAR γ (T0070907; 5 mg/kg; i.p) o el antagonista de CB $_2$ (AM630; 2,5 mg/kg; i.p). Los grupos control y VCE-004.8 recibieron salino vía subcutánea e inyecciones i.p. de vehículo o VCE-004.8 (20 mg/kg) respectivamente. La inyección subcutánea de BLM durante 6 semanas provocó el engrosamiento de la dermis acompañado de la pérdida de tejido adiposo subcutáneo. El tratamiento con VCE-004.8 (10 mg/kg y 20 mg/kg) mitigó la fibrosis de la piel y redujo el engrosamiento de la dermis. Más aún, el VCE-004.8 a la dosis más alta fue capaz de recuperar la pérdida de la capa adiposa. Por el contrario, los tratamientos con el antagonista de PPAR γ o el antagonista de CB $_2$ eliminaron parcialmente estos efectos antifibróticos indicando que el mecanismo

de acción de VCE-004.8, y probablemente de esta clase de compuestos, es dependiente de su actividad dual sobre PPAR γ y CB $_2$ (Figura 34).

Las inyecciones repetidas de BLM durante 6 semanas conllevan también un engrosamiento de la pared vascular, que refleja en cierta medida uno de los cambios patológicos a nivel vascular de la SSc humana. Como se puede observar en las secciones de piel tras la tinción tricrómica de Masson, la acumulación de colágeno alrededor de los vasos sanguíneos provocada por la BLM se previno con el tratamiento con RGZ y VCE-004.8. De nuevo, el pre-tratamiento con T0070907 o AM630 bloqueó parcialmente el efecto antifibrótico del compuesto (Figura 35).

Como se ha descrito en estudios anteriores, la fibrosis inducida por BLM se asocia con cambios en la degranulación de los mastocitos e infiltración de macrófagos en la piel lesionada. En el análisis histológico de muestras de piel teñidas con azul de toluidina volvimos a encontrar un aumento significativo del número de mastocitos degranulados en el grupo al que se le administró BLM. En cambio, el tratamiento con RGZ o VCE-004.8 a ambas dosis revirtió esta degranulación hasta niveles similares al grupo control. Es más, la administración del antagonista de PPAR γ o el antagonista de CB $_2$ abolió el efecto terapéutico del VCE-004.8 (Figura 36). A continuación, evaluamos el reclutamiento de células inflamatorias en la piel mediante la cuantificación de la infiltración de macrófagos F4/80 $^+$. En relación al grupo control, las muestras de piel de ratones a los que se les administró BLM presentaban un incremento significativo de macrófagos infiltrados. Sin embargo, esto no se observaba en los animales tratados con RGZ o VCE-004.8 (20 mg/kg). Es más, los animales pre-tratados con el antagonista de PPAR γ o CB $_2$ presentaban una tendencia a mayor infiltración de células F4/80 $^+$ comparadas con el grupo tratado con VCE-004.8 (20 mg/kg) (Figura 37).

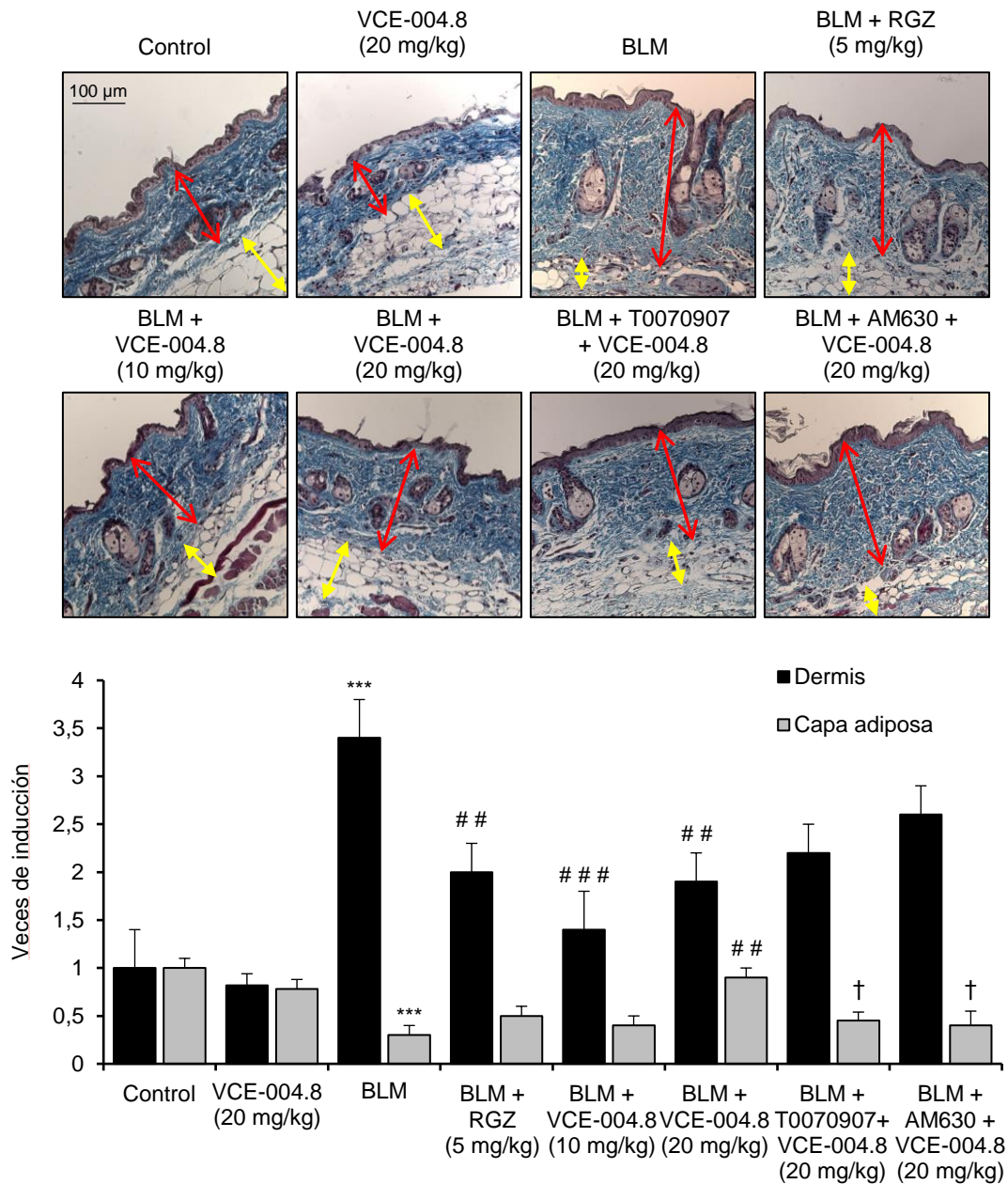


Figura 34. VCE-004.8 previene el engrosamiento dérmico inducido por la administración de BLM en el modelo de SSc crónica. Las imágenes muestran la tinción tricrómica de Masson y su respectiva cuantificación de la piel de ratones tratados con BLM. Las flechas rojas y amarillas representan el grosor de la dermis y el tejido adiposo subcutáneo, respectivamente. Los valores se expresan como media \pm SEM (n = 8 animales por grupo). *** $p < 0,001$ versus control; ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ versus BLM; † $p < 0,05$ versus BLM + VCE-004.8 (20 mg/kg).

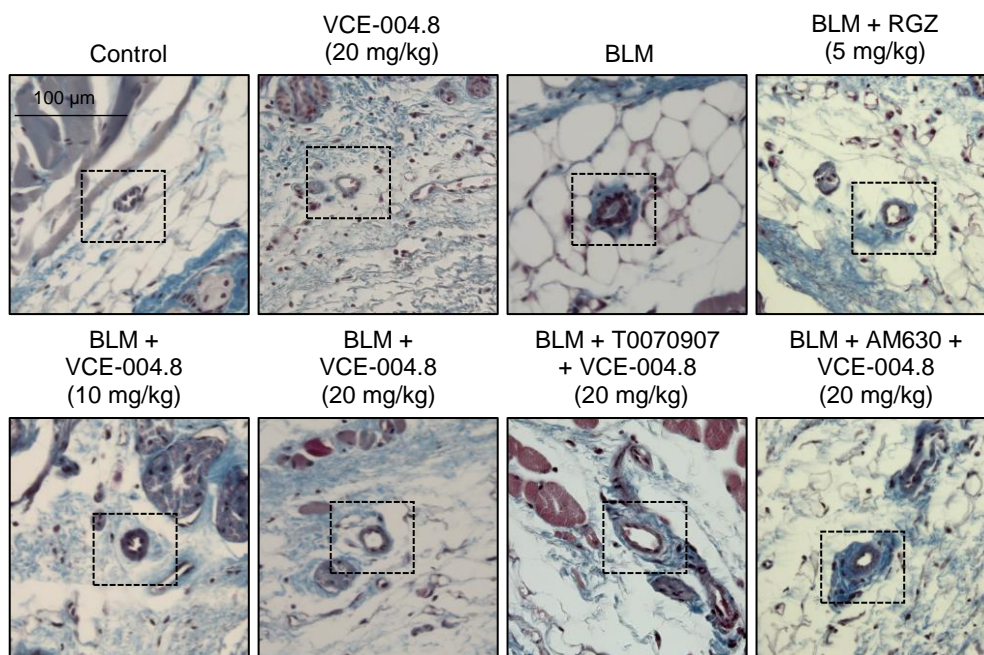


Figura 35. VCE-004.8 evita la acumulación de colágeno alrededor de los vasos sanguíneos provocada por la SSc. Imágenes representativas de las secciones de piel teñidas mediante tricrómico de Masson que muestran la deposición de colágeno sobre los vasos sanguíneos. Los recuadros marcan los vasos examinados (n = 8 animales por grupo).

Con el fin de comprender mejor los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos terapéuticos de VCE-004.8 en la fibrosis cutánea crónica inducida por BLM, se aisló el ARNm de la piel de los animales y se analizó mediante RT-PCR utilizando un array de 84 genes implicados en la fisiopatología de la fibrosis. Los resultados más significativos se obtuvieron cuando se analizó la expresión de *Col3a1*, *Colla2*, *Il1β* e *Il13*. Estos genes se indujeron claramente tras la administración de BLM y su expresión se redujo por el tratamiento con VCE-004.8 (20 mg/kg). Por otro lado, el compuesto no pudo contrarrestar la inducción de la expresión de *Tgfb1* provocada por la BLM (Figura 38). Igualmente, el tratamiento con el VCE-004.8 no redujo la fosforilación de SMAD2 en la piel (Figura 39). Estos resultados sugieren que la actividad de VCE-004.8 está relacionada con la interacción en la señalización de TGFβ1 de forma independiente de la fosforilación de SMAD2 (inhibición de la transcripción de *Colla2* y *Colla3*) y gracias a mecanismos anti-inflamatorios (inhibición de *Il1β* e *Il13*).

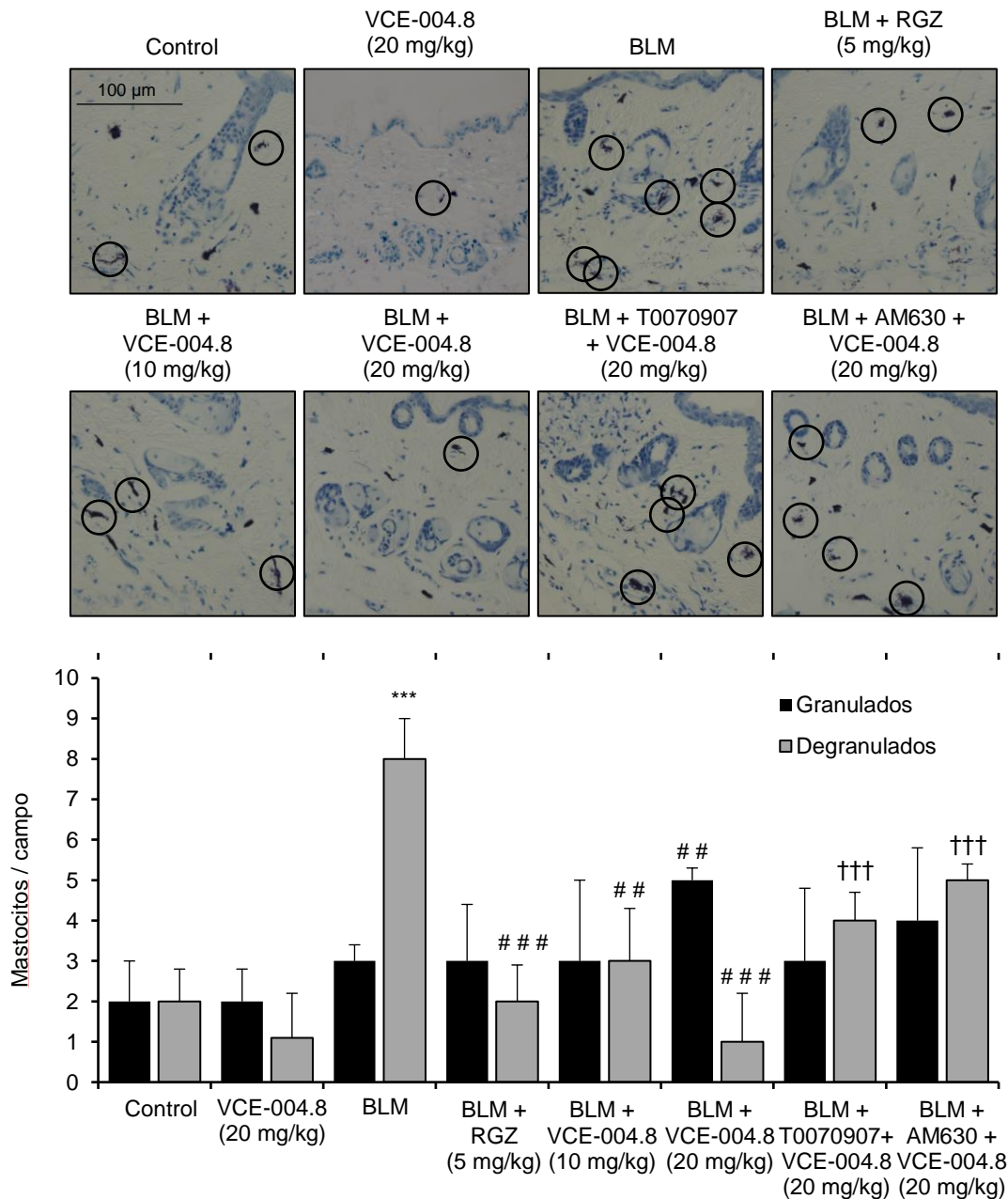


Figura 36. VCE-004.8 reduce la desgranulación de los mastocitos inducida por BLM. Imágenes representativas de la tinción con azul de toluidina de secciones de piel que muestran la infiltración de mastocitos y la cuantificación correspondiente de mastocitos granulados y desgranulados. Los círculos indican la presencia de mastocitos desgranulados. Los valores están expresados como media \pm SEM (n = 8 animales por grupo). *** p<0,001 versus control; ## p<0,01 ### p<0,001 versus BLM; ††† p<0,001 versus BLM + VCE-004.8 (20 mg/kg).

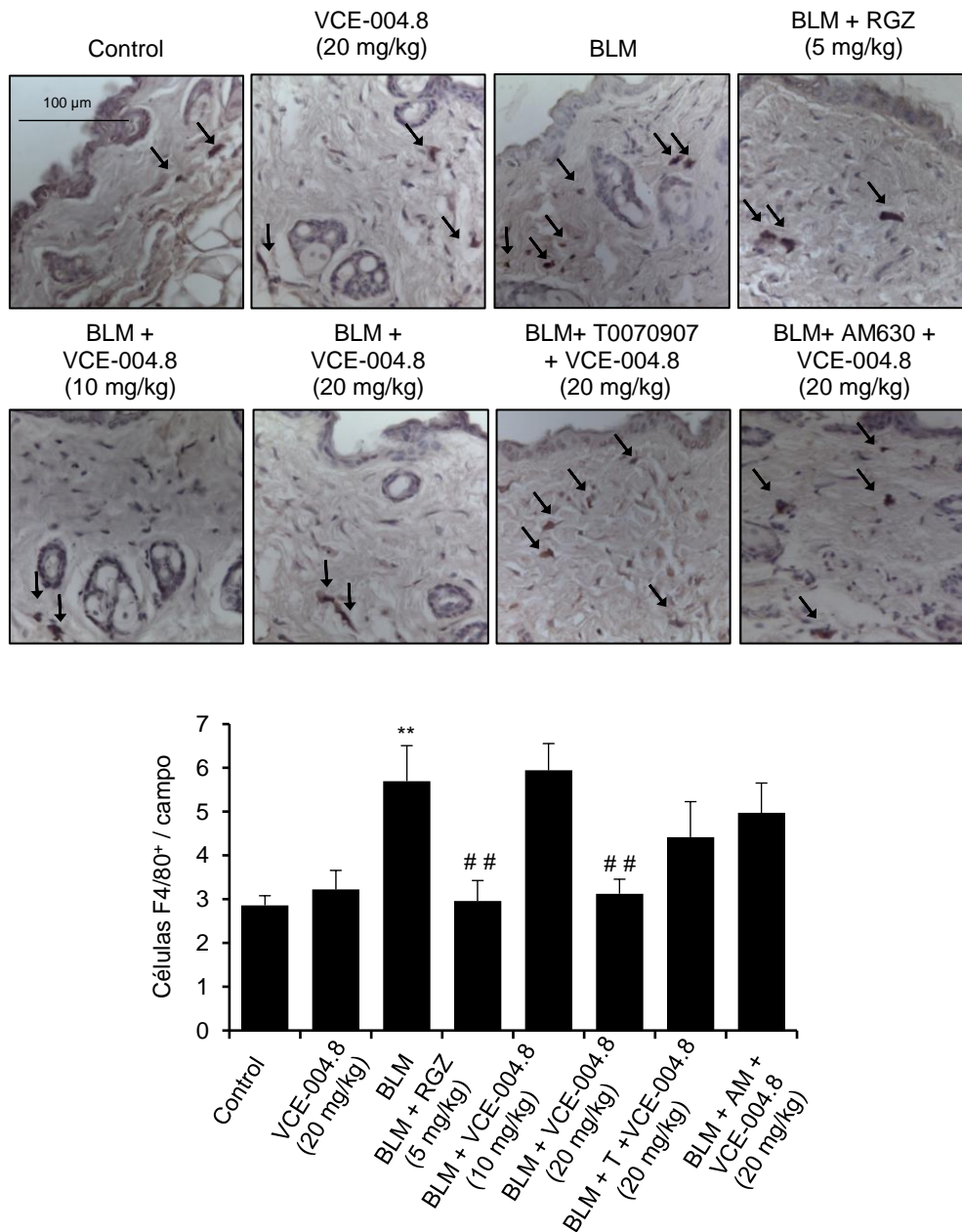


Figura 37. El tratamiento con VCE-004.8 reduce la infiltración de macrófagos en la piel. Las imágenes muestran la inmunodetección de macrófagos F4/80⁺ en secciones de piel de los diferentes grupos y su respectiva cuantificación. Las flechas indican la presencia de células marcadas. Los valores se expresan como media \pm SEM (n = 8 animales por grupo). ** p<0,01 versus control; ## p<0,01 versus BLM.

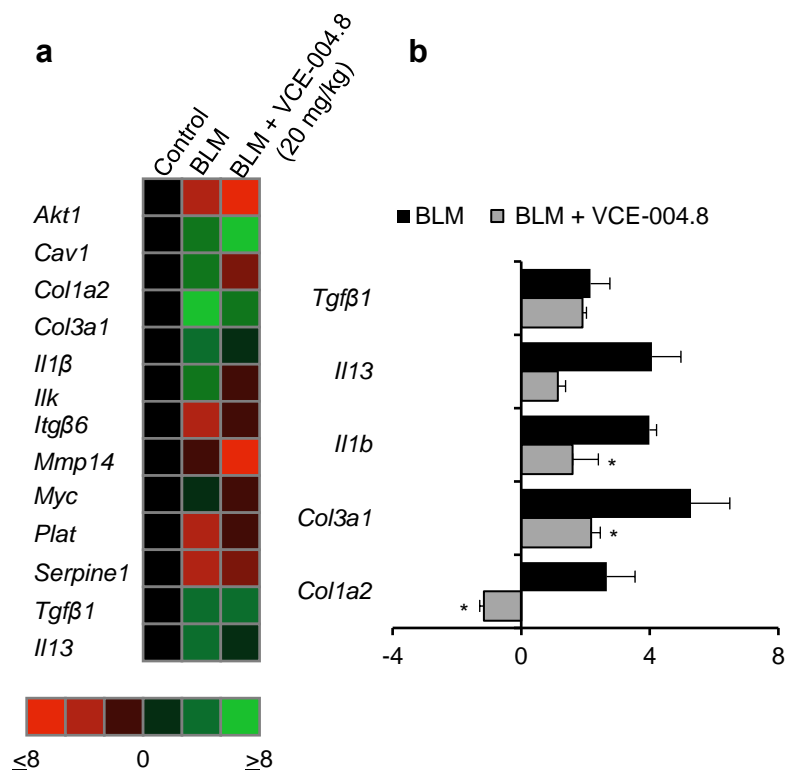
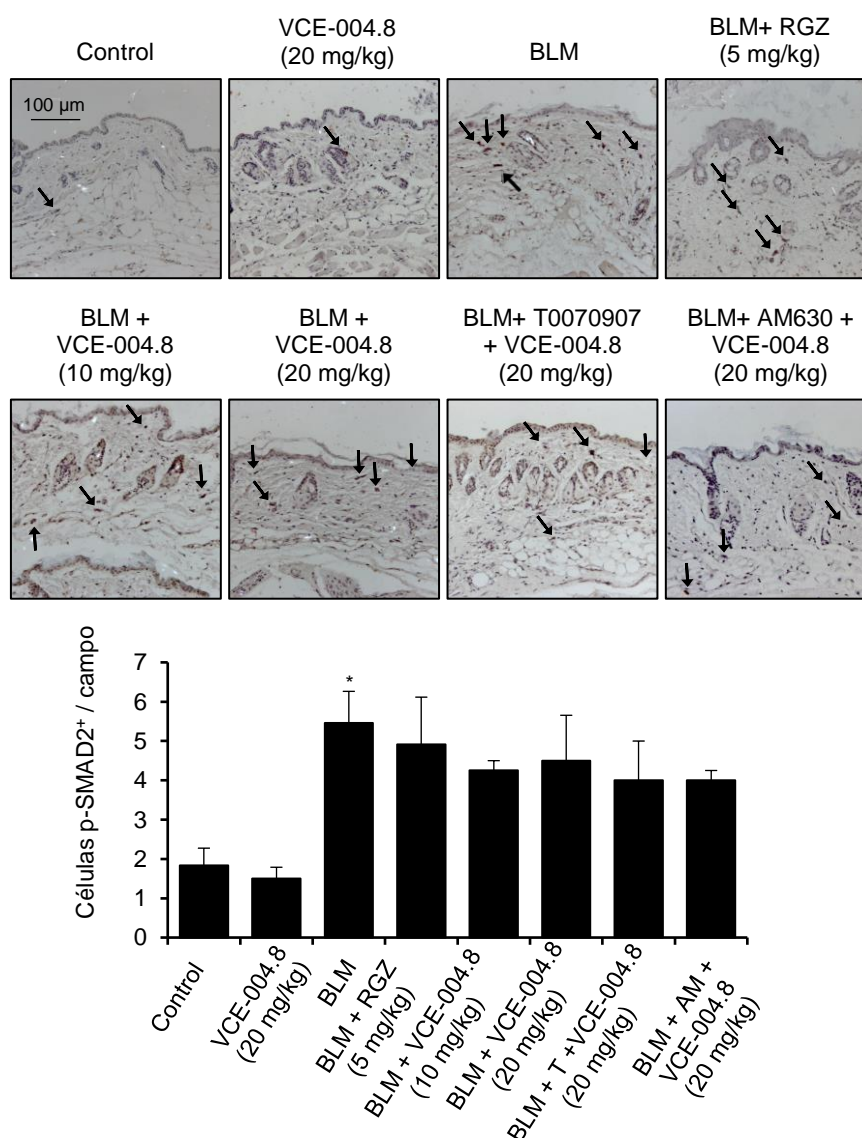


Figura 38. VCE-004.8 modula la expresión génica en la piel tras la administración de BLM. Se extrajo el ARN de la piel de los animales y se analizó la expresión génica mediante PCR a tiempo real utilizando un Array con 84 genes implicados en el desarrollo de la fibrosis. **A.** Los mapas de colores representan los genes significativamente sobre-expresados (verde) o inhibidos (rojo) comparados con el grupo control. **B.** Niveles de expresión de los genes que muestran cambios relevantes durante el tratamiento con VCE-004.8. * $p < 0,05$ versus BLM.

Figura 39. VCE-004.8 no afecta a la fosforilación de SMAD2 en la piel. Imágenes representativas de secciones de piel tras el marcaje con anti-pSMAD2 mediante inmunohistoquímica y su respectiva cuantificación. Las flechas indican la presencia de células marcadas. Los valores se expresan como media \pm SEM (n = 8 animales por grupo). * $p < 0,05$ versus control.



1.8. La aplicación tópica de VCE-004.3 y VCE-004.8 reduce la fibrosis preestablecida en el modelo murino de SSc crónica.

La penetración transdérmica de los cannabinoides ha sido confirmada previamente en diferentes estudios (Valiveti y cols., 2004; Lodzki y cols., 2003). Por lo tanto, quisimos estudiar si los efectos antifibróticos obtenidos por la administración sistémica de ambos compuestos se observaban también tras la aplicación tópica de VCE-004.3 y VCE-004.8. De nuevo se utilizó el modelo animal de SSc crónica en el cual se administró BLM subcutáneamente durante 6 semanas para aplicar los diferentes tratamientos durante las 3 últimas semanas de inducción. En esta ocasión, los tratamientos consistieron en aplicaciones tópicas de forma diaria de RGZ, VCE-004.3 o VCE-004.8. Los resultados demostraron que ambos compuestos así como la RGZ mitigaron el engrosamiento de la dermis provocado por la BLM, aunque solo el tratamiento con RGZ restauró la estructura de la hipodermis (Figura 40). A continuación, también analizamos la expresión de genes profibróticos en la piel de estos animales. Como era previsible, la administración de BLM durante 6 semanas elevó la expresión de *Tgfb*, *Il6* e *Il4* y el tratamiento tópico con ambos compuestos redujo de manera significativa la expresión de *Tgfb* e *Il6* y atenuó también los niveles de *Il4* en la piel de los animales (Figura 41).

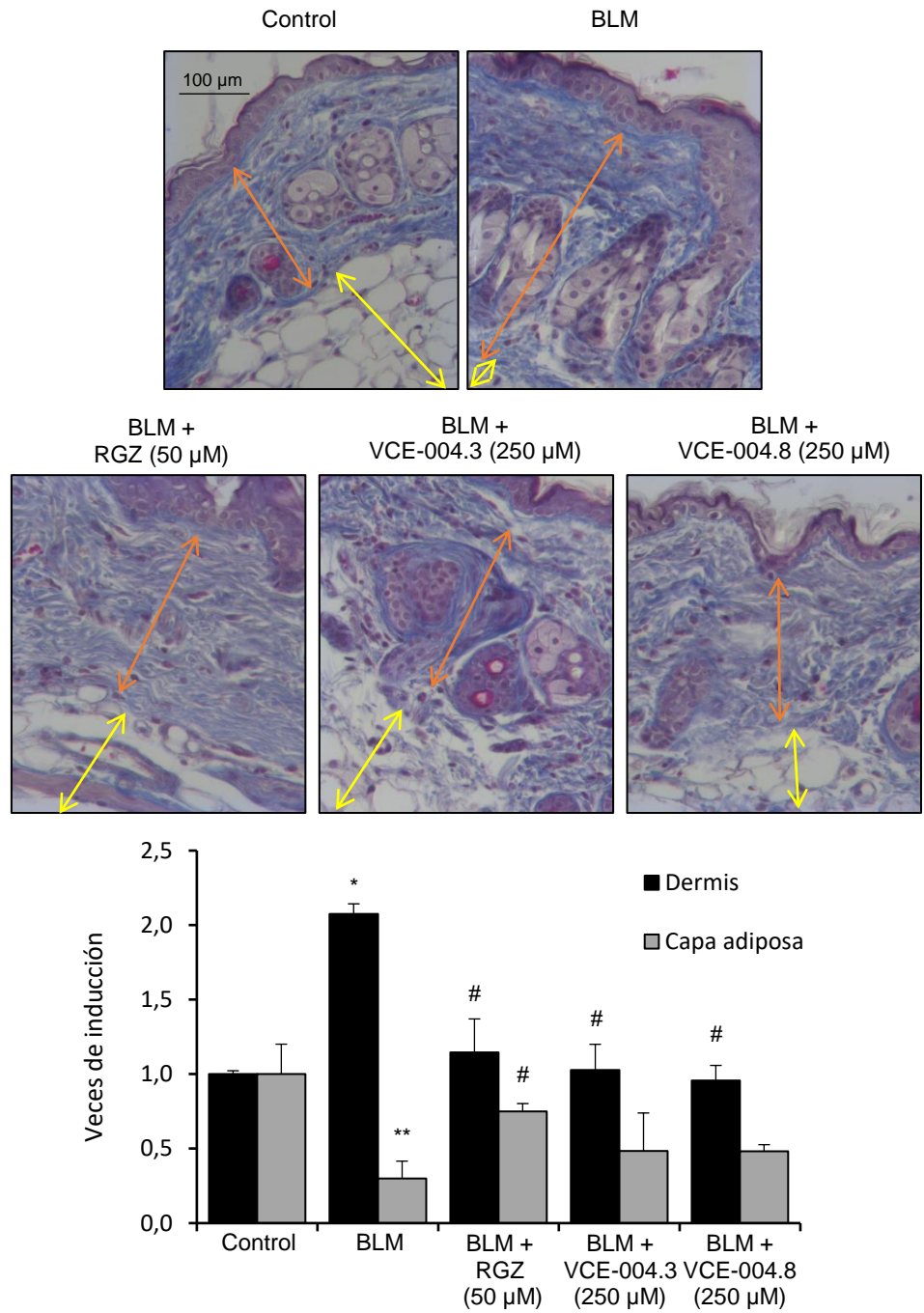


Figura 40. La aplicación tópica de VCE-004.3 y VCE-004.8 reduce el engrosamiento de la dermis provocado por la administración de BLM en el modelo animal de SSc crónica. Las imágenes muestran la tinción tricrómica de Masson y su respectiva cuantificación del grosor de la dermis y la capa adiposa subcutánea. Las flechas rojas y amarillas representan el grosor de la dermis y el tejido adiposo subcutáneo, respectivamente. Los valores se expresan como media \pm SEM (n = 8 animales por grupo). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ versus control; # $p < 0,05$ versus BLM.

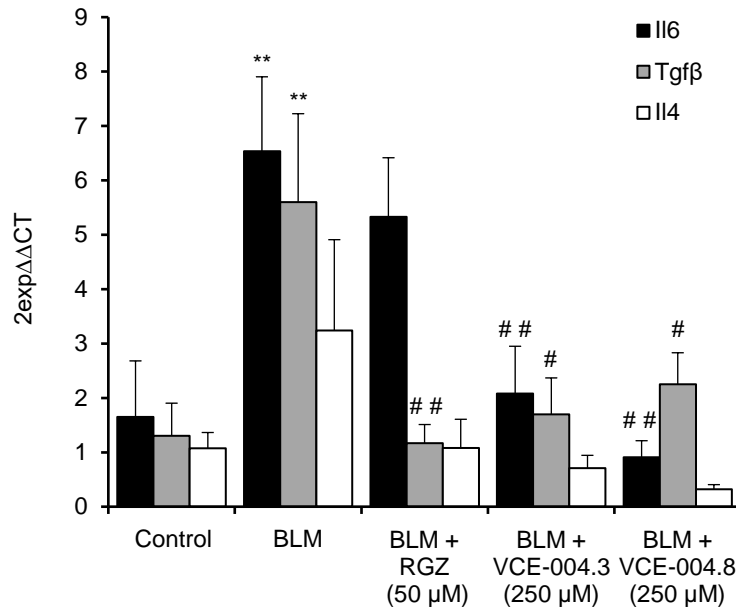


Figura 41. La aplicación tópica de VCE-004.3 y VCE-004.8 mitiga la sobreexpresión de genes profibróticos y proinflamatorios en el modelo de SSc crónica inducido por BLM. Expresión génica en la piel de los animales representada como media \pm SEM referida al grupo control (n = 6 animales por grupo). ** p<0,01 versus control; # p<0,05 ## p<0,01 versus BLM.

1.9.Efecto de VCE-004.3 sobre la activación de ERK 1/2 inducida por PDGF y por IgG plasmática de pacientes.

Se conoce que la producción de autoanticuerpos juega un papel fundamental en el desarrollo de la SSc. Entre ellos, los anticuerpos contra las células endoteliales, los fibroblastos o el receptor de PDGF pueden estimular y activar a los fibroblastos (Kayser y Fritzler, 2015; Renaudineau y cols., 1999; Baroni y cols., 2006). Así, los anticuerpos contra el receptor de PDGF reconocen y activan el receptor, induciendo la producción de ROS y la fosforilación de ERK 1/2 (Baroni y cols., 2006). Diferentes estudios han demostrado que las MAPK se activan en respuesta a agentes fibrogénicos y contribuyen a la formación y función de miofibroblastos (Leask, 2012). Para estudiar el efecto de VCE-004.3 sobre la fosforilación de ERK 1/2 provocada por IgG de pacientes con SSc, los fibroblastos humanos fueron pre-incubados con el compuesto y estimulados con IgG humana no autoinmune o con IgG purificada del suero de pacientes con lcSSc o dSSc. El tratamiento con VCE-004.3 a diferentes concentraciones redujo los niveles de fosforilación de ERK 1/2 provocados por las IgG de ambas formas de SSc (Figuras 42a y 42b). Ya los niveles de PDGF se encuentran aumentados en el plasma de pacientes con

SSc (Trojanowska, 2008) procedimos a estudiar si la ruta de activación de ERK1+2 activada por PDGF se encontraba afectada por la acción del VCE-004.3 y efectivamente pudimos comprobar que la estimulación de fibroblastos NIH-3T3 con PDGF provocó un aumento de la fosforilación de ERK 1/2 que se atenuó significativamente en presencia de VCE-004.3 (Figura 42c).

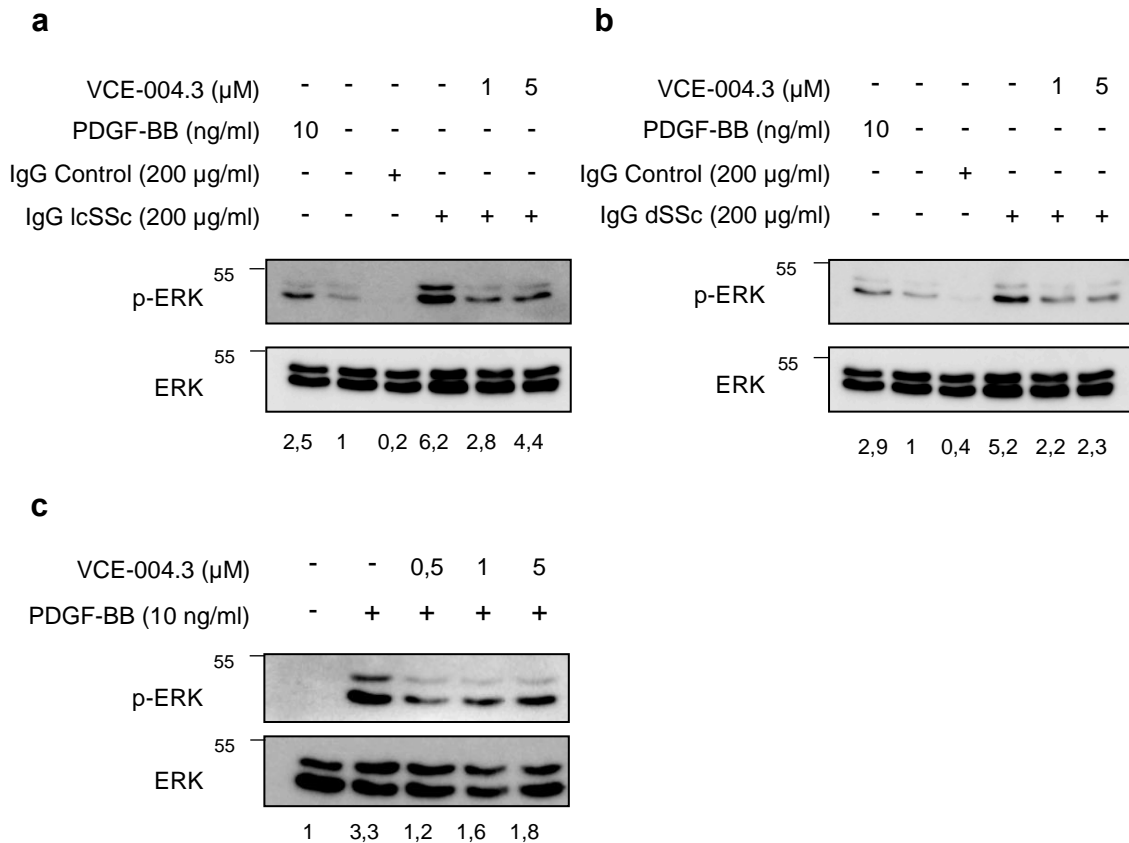


Figura 42. VCE-004.3 reduce la señalización de ERK inducida por PDGF. Los fibroblastos humanos primarios fueron deprivados de suero (1% FBS) durante 24 horas. Entonces, fueron preincubados con VCE-004.3 durante 1 hora y estimulados con IgG no inmune o IgG de pacientes con lcSSc (A) o dSSc (B) durante 15 minutos. C. Las células NIH-3T3 deprivadas de suero (1% FBS) durante 24 horas fueron preincubadas durante 15 minutos con VCE-004.3 y estimuladas con PDGF-BB durante 5 minutos. Los niveles de proteínas se estudiaron por Western blot.

2. Estudio del potencial terapéutico de VCE-003.2 y Δ^9 -THCA en EH.

2.1. El nuevo compuesto VCE-003.2 es un derivado no electrofílico de CBG.

Para desarrollar compuestos quinoles derivados de CBG se ha aplicado la misma estrategia que para los derivados de CBD antes descritos. Es decir a partir del CBG de origen natural se procede a la generación del intermediario quinol (quinona) y posteriormente a la producción de análogos modificados en la posición C2 de la molécula. De esta serie de moléculas se seleccionó el VCE-003.2 para su desarrollo preclínico (Figura 43). El VCE-003 es una molécula electrofílica agonista de PPAR γ que tiene una importante actividad inmunosupresora (Granja y cols., 2012; Carrillo-Salinas y cols., 2014). Sin embargo el VCE-003 induce la generación de ROS y la activación de la ruta de Nrf2 y la introducción de un grupo amino dio lugar al derivado VCE-003.2 que, a diferencia del VCE-003, no induce ni producción de ROS ni activación de la ruta de Nrf2 (Figura 44).

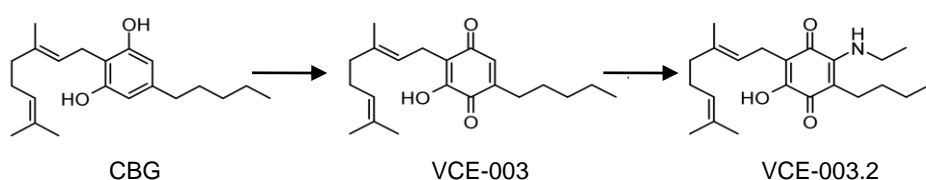


Figura 43. Representación esquemática de la síntesis de VCE-003.2.

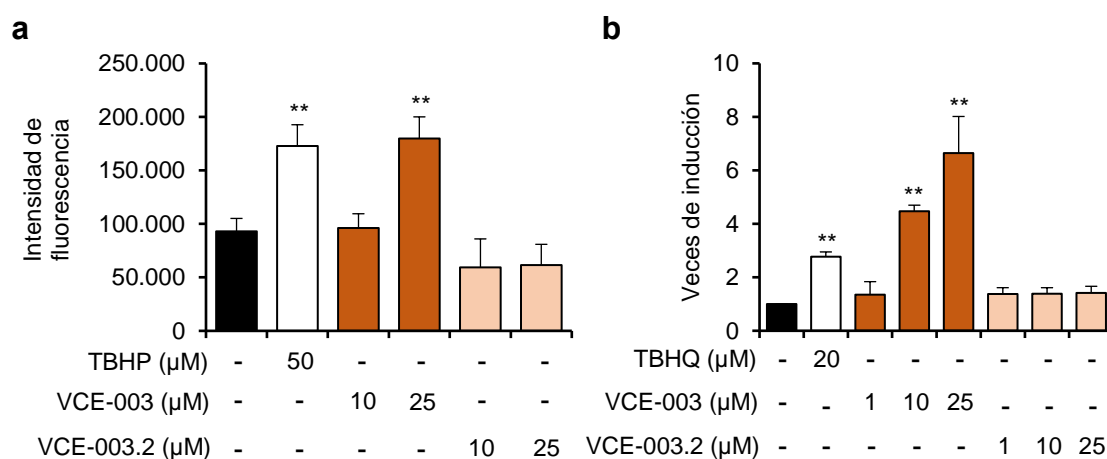


Figura 44. VCE-003.2 es un compuesto no electrofílico. **A.** VCE-003.2 no induce la producción de ROS. Las células N2a fueron tratadas con VCE-003 o VCE-003.2 durante 6 horas y, tras este tiempo, teñidas con CM-H₂DCFDA para determinar la intensidad de fluorescencia mediante análisis de imagen. **B.** Efecto sobre la activación de Nrf2. Las células HaCat ARE-luc fueron tratadas durante 6 horas con los compuestos y lisadas para medir la actividad luciferasa. Los resultados están expresados como media \pm S.D. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ versus células control.

A continuación, investigamos la capacidad de unión del nuevo derivado VCE-003.2 a PPAR γ y comparamos su actividad con la de la RGZ utilizando un ensayo de unión competitivo al receptor nuclear. Los resultados muestran cómo VCE-003.2 se une a PPAR γ con un valor IC₅₀ de 1,2 μ M, el cual está dentro del rango de afinidad de VCE-003 (2,2 μ M) (Figura 45a). Además, para comparar la capacidad de ambos compuestos sobre la actividad transcripcional del receptor, las células HEK-293T fueron transfectadas con el vector de expresión GAL4-PPAR γ y el plásmido reportero GAL4-luc. Como se muestra en la gráfica, el compuesto VCE-003 activa PPAR γ de forma bifásica y esta actividad se pierde a las dosis más altas. Por el contrario, la activación provocada por VCE-003.2 ocurre de manera dependiente de concentración (Figura 45b).

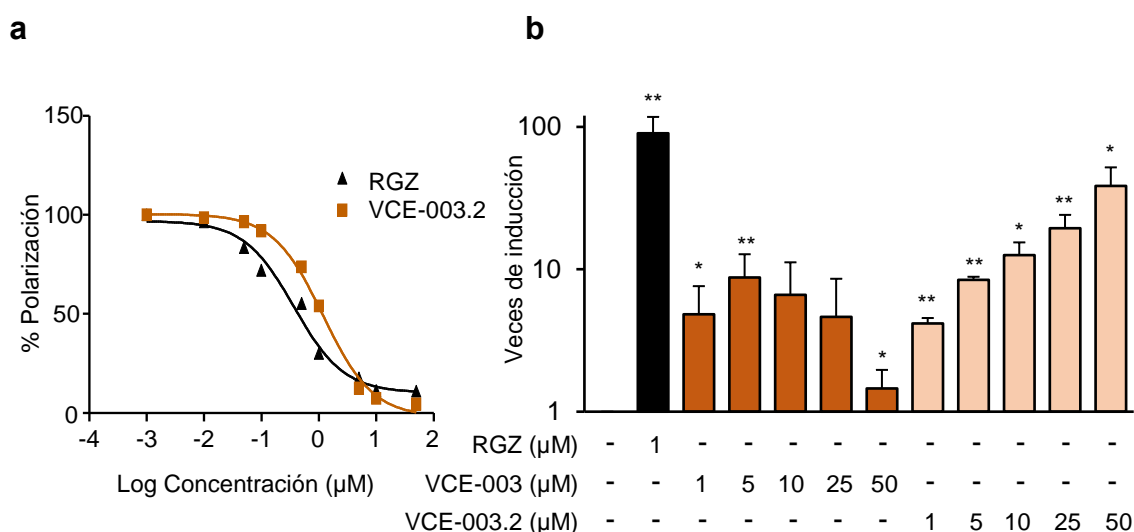


Figura 45. VCE-003.2 se une a PPAR γ e induce su actividad transcripcional. **A.** Ensayo de unión a PPAR γ . Se estudiaron las concentraciones indicadas y se representaron los resultados para obtener la tendencia polinómica en un intervalo logarítmico. **B.** Las células HEK-293T fueron co-transfectadas con los plásmidos GAL4-PPAR γ y GAL4-luc y estimuladas con VCE-003, VCE-003.2 o RGZ como control positivo durante 6 horas para medir la actividad luciferasa. Los resultados están expresados como media \pm S.D. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ versus control.

Estos resultados podrían reflejar una actividad citotóxica por parte de VCE-003 por lo que estudiamos el efecto de concentraciones crecientes de ambos compuestos sobre la viabilidad celular en la línea neuronal N2a. El tratamiento con VCE-003, pero no con VCE-003.2, provocó la muerte celular de forma evidente a las concentraciones más altas (Figura 46). Estos experimentos demuestran que la modificación química introducida

para dar lugar a la molécula VCE-003.2 no afecta a la actividad del compuesto sobre PPAR γ pero elimina la propiedad electrofílica y la actividad citotóxica.

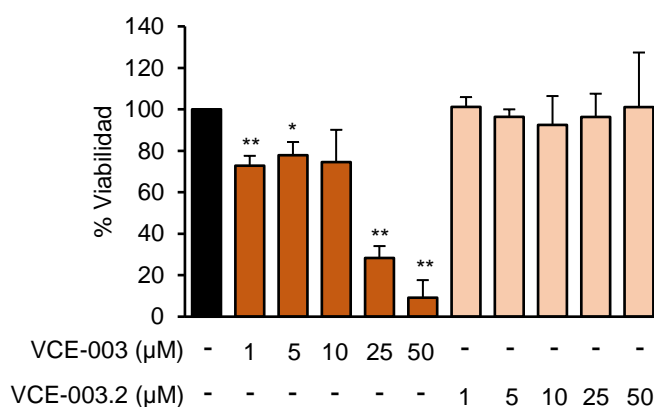


Figura 42. VCE-003.2 no induce citotoxicidad *in vitro*. A. Las células N2a se incubaron con VCE-003 o VCE-003.2 durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de la viabilidad celular frente al control \pm S.D. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ versus control

Además, estudiamos la interacción de este nuevo cannabinoide con los receptores CB₁ y CB₂ y, mediante estudios de competición utilizando el radioligando [³H]CP55940, determinamos que VCE-003.2 muestra muy baja afinidad por ambos receptores ($K_i > 40 \mu\text{M}$).

2.2.Efecto neuroprotector de VCE-003.2 *in vitro*.

La activación de PPAR γ por diferentes ligandos ha demostrado mitigar la inflamación asociada a daños neurológicos agudos y crónicos (Kapadia y cols., 2008). En este sentido, estudios previos han puesto de manifiesto que el tratamiento con VCE-003.2 provoca un aumento de la supervivencia de progenitores neuronales dependiente de la activación de PPAR γ . Además, este compuesto fue capaz de prevenir también la muerte neuronal inducida por ácido quinolínico y por la proteína Huntingtina mutada *in vitro* (Diaz-Alonso y cols., 2016). Teniendo en cuenta estos resultados y dado que la excitotoxicidad es una característica de las enfermedades neurodegenerativas, analizamos el efecto de VCE-003 y VCE-003.2 sobre la toxicidad inducida por glutamato. Como se puede observar, el tratamiento con VCE-003.2 previene la muerte neuronal provocada por glutamato de manera concentración dependiente (Figura 47).

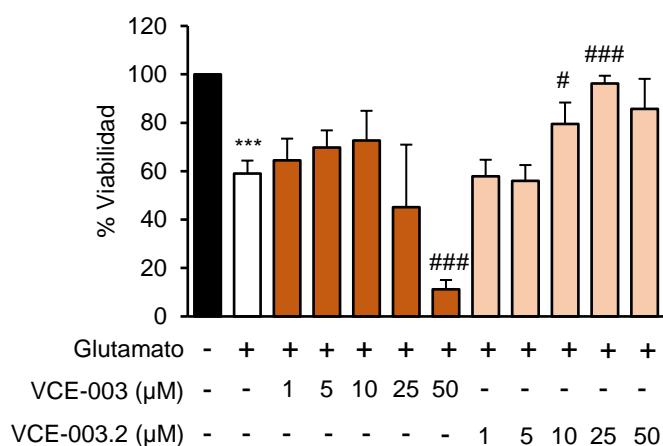


Figura 47. VCE-003.2 previene la muerte neuronal inducida por glutamato. Se pretrataron células N2a con los compuestos durante 30 minutos y se incubaron durante 24 horas con glutamato (15 mM). La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de la viabilidad celular frente al control \pm S.D. *** $p < 0,001$ versus control; # $p < 0,05$ ### $p < 0,001$ versus glutamato.

2.3.Efecto neuroprotector de VCE-003.2 en el modelo animal de EH.

El modelo animal de EH inducido por 3NP se utiliza comúnmente dado que replica la disfunción mitocondrial, uno de los procesos implicados en la muerte celular durante la enfermedad. La intoxicación de ratones con 3NP da lugar a una serie de efectos neurológicos, bioquímicos e histológicos que están presentes en la patología de la EH (Ramaswamy y cols., 2007). El modelo murino de EH se indujo mediante la administración sistémica de 3NP y los ratones fueron tratados en paralelo con VCE-003.2 (20 mg/kg/24h) sólo o en combinación con el antagonista de PPAR γ (T0070907; 5 mg/kg/24h). Los animales tratados con 3NP presentaban mayor puntuación en la escala clínica, que se reflejaba en menor actividad locomotora y un aumento de la retracción y distonía de las extremidades traseras y cifosis comparados con el grupo control. El tratamiento con VCE-003.2 redujo el déficit motor mejorando significativamente la retracción y distonía de las extremidades traseras y la cifosis. Además, se observó una tendencia a la mejora de la actividad locomotora general de los animales. Por el contrario, cuando éstos eran tratados en paralelo con el antagonista de PPAR γ se eliminaba el efecto terapéutico del VCE-003.2 (Figura 48).

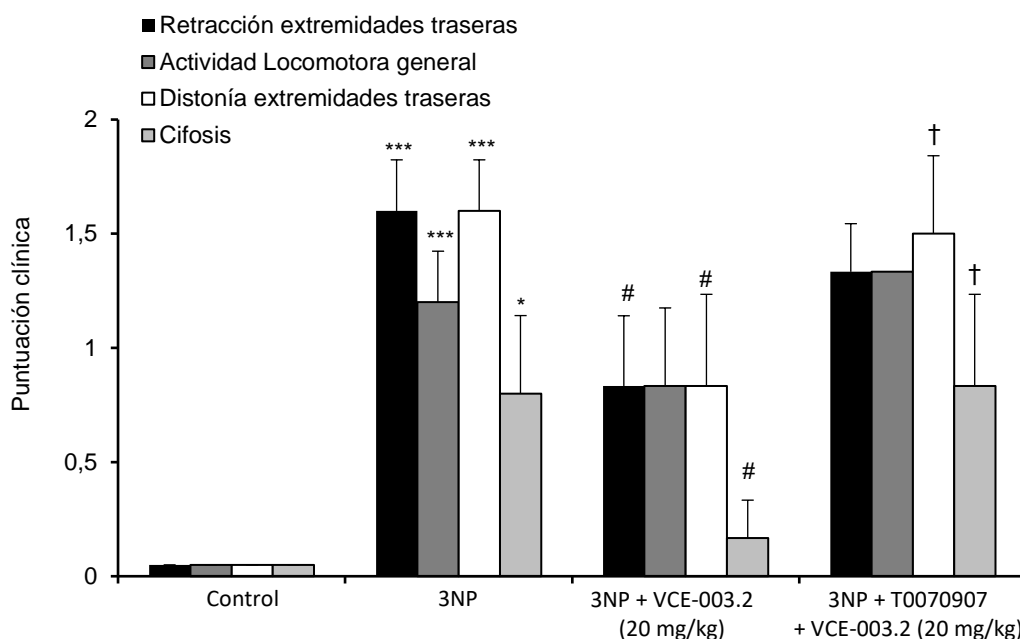


Figura 48. VCE-003.2 reduce el daño motor provocado por la intoxicación con 3NP. La puntuación conductual se determinó 12 horas después de última administración de 3NP mediante una escala de 0 a 2 según la gravedad de la afectación motora. Los valores están expresados como media \pm SEM. (n = 6 animales por grupo). * p<0,05 *** p<0,001 versus control; # p<0,05 versus 3NP; † p<0,05 versus 3NP + VCE-003.2 (20 mg/kg).

Se conoce que el 3NP induce toxicidad en el estriado provocando la degeneración de las neuronas espinosas medias con un patrón similar al que se produce en la enfermedad humana (Ramaswamy y cols., 2007). El parénquima estriatal de los animales tratados con 3NP mostró una reducción significativa de células teñidas con Nissl, lo que indica un grado importante de muerte neuronal causada por 3NP. La muerte celular se confirmó mediante inmunohistoquímica con NeuN, que demostró una reducción de aproximadamente un 60% en el marcaje neuronal en el estriado de ratones lesionados con 3NP. Sin embargo, la neurodegeneración se redujo claramente por el tratamiento con VCE-003.2 mediante un efecto dependiente de la activación de PPAR γ , dado que la preservación neuronal no se observó cuando co-administramos el antagonista de este receptor nuclear (Figura 49). Además, VCE-003.2 ejerció un efecto antiinflamatorio al contrarrestar la microgliosis y la astrogliosis inducida por 3NP, que se determinó mediante el marcaje con Iba-1 y GFAP, respectivamente (Figura 50 y Figura 51, respectivamente).

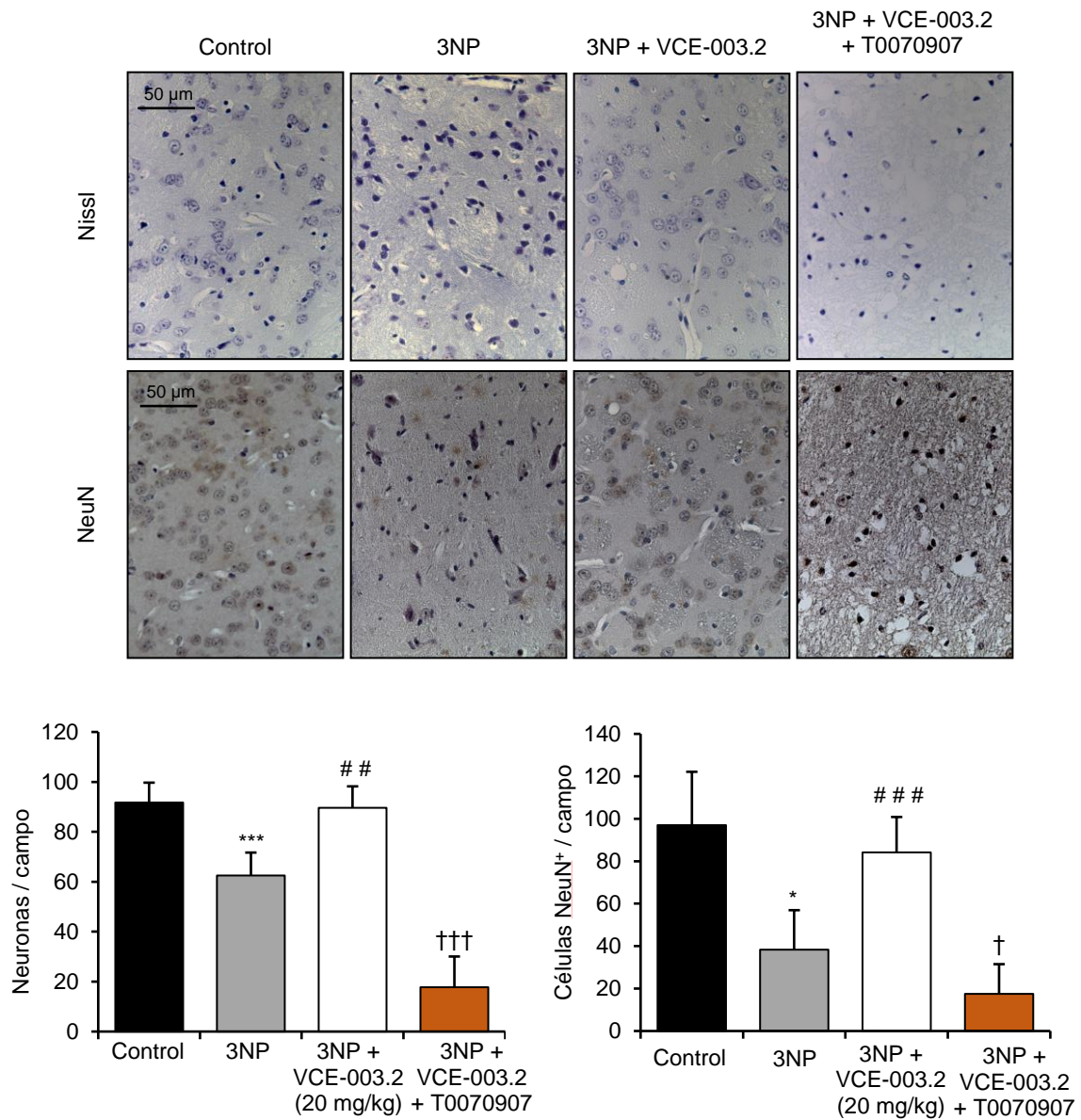


Figura 49. VCE-003.2 previene la muerte neuronal en el estriado provocada por la intoxicación con 3NP. Imágenes representativas de secciones coronales de cerebro tras la tinción de Nissl y la inmunodetección de neuronas NeuN⁺ y su correspondiente cuantificación. Los valores están expresados como media ± SEM (n = 6 animales por grupo). *p<0.05 ***p<0.001 versus control; ##p<0,01 ###p<0,001 versus 3NP; †p<0,05 †††p<0,001 versus 3NP + VCE-003.2 (20 mg/kg).

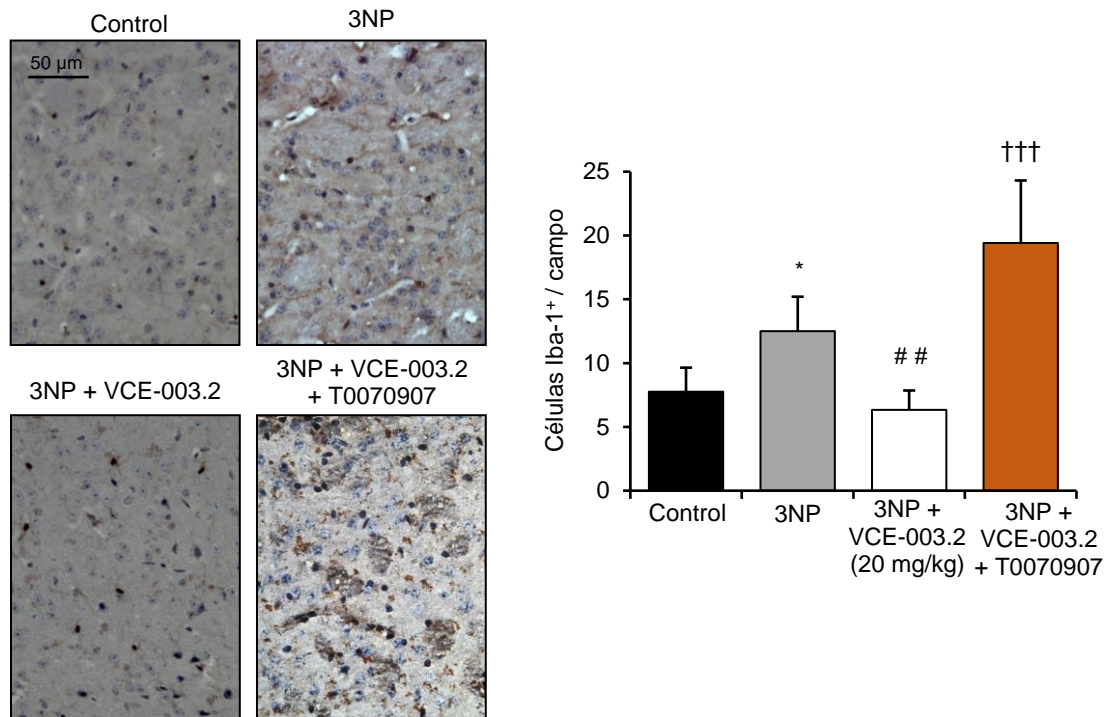


Figura 50. VCE-003.2 reduce la activación microglial tras la administración de 3NP. Imágenes representativas de secciones coronales del estriado cerebral tras el marcaje con anti-Iba1 mediante inmunohistoquímica y su respectiva cuantificación. Los valores están representados como media \pm SEM (n = 6 animales por grupo). * p<0,05 versus control; ## p<0,01 versus 3NP; †††p<0,001 versus 3NP + VCE-003.2 (20 mg/kg).

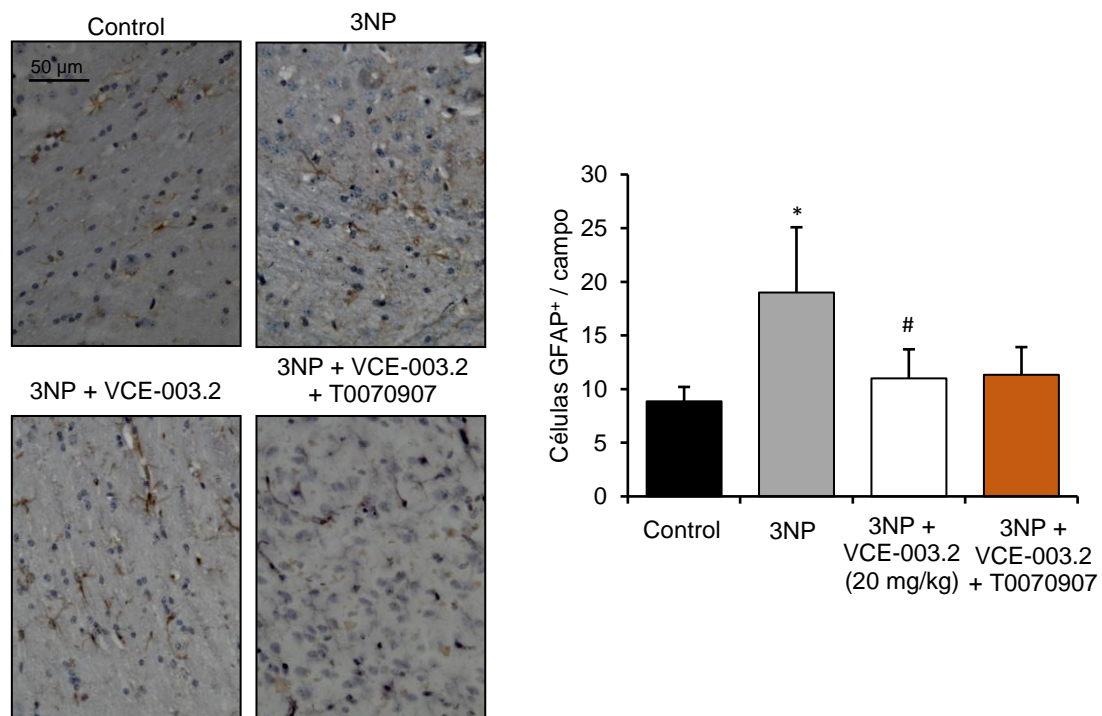


Figura 51. VCE-003.2 reduce la astrogliosis tras la administración de 3NP. Imágenes representativas de secciones coronales del estriado cerebral tras el marcaje con anti-GFAP mediante inmunohistoquímica y su respectiva cuantificación. Los valores están representados como media \pm SEM (n = 6 animales por grupo). * p<0,05 versus control; # p<0,05.

Finalmente, analizamos la expresión de marcadores proinflamatorios específicos en el estriado de los diferentes grupos experimentales. Los animales tratados con 3NP mostraron un aumento en los niveles de ARNm de la enzima inflamatoria ciclooxigenasa 2 (*Cox2*) y de las citoquinas proinflamatorias *Tnfa* e *Il6*. El tratamiento con VCE-003.2 redujo la expresión de todos los marcadores estudiados y este efecto antiinflamatorio fue abolido en presencia del antagonista de PPAR γ (Figura 52a). Por otro lado, el estudio de marcadores bioquímicos en el estriado relacionados con estrés oxidativo [actividad catalasa y superóxido dismutasa (SOD) y niveles de glutatión reducido (GSH)] revelan una pérdida de los sistemas de defensa antioxidantes en los animales lesionados con 3NP. El tratamiento con VCE-003.2 recuperó la actividad de las enzimas antioxidantes, así como los niveles de GSH independientemente de la activación de PPAR γ (Figura 52b).

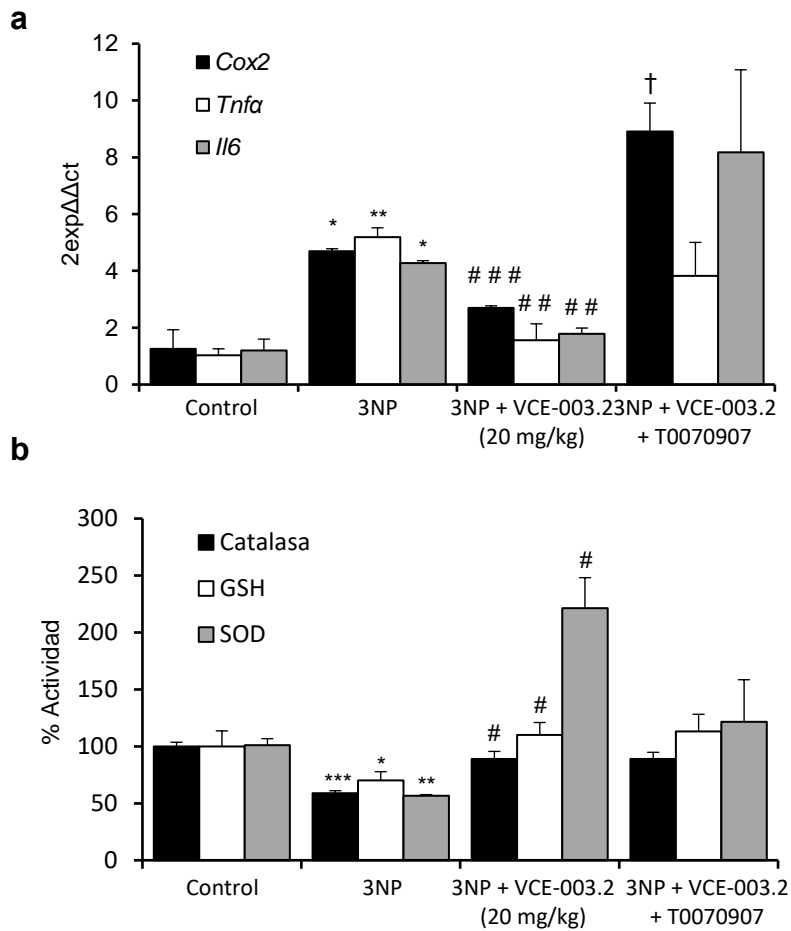


Figura 52. El tratamiento con VCE-003.2 reduce la expresión de marcadores inflamatorios y mejora los parámetros de estrés oxidativo en el estriado. A. Se aisló el estriado de los animales y se estudió la expresión génica de *Cox2*, *Tnfa* e *Il6*. **B.** Se extrajo la proteína de la zona del estriado y se analizaron la actividad catalasa y SOD y los niveles de GSH. Los resultados están representados como media \pm SEM referido al grupo control (n = 6 animales por grupo). * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 versus control; # p<0,05 ### p<0,01 ### p<0,001 versus 3NP; †p<0,05 versus 3NP + VCE-003.2 (20 mg/kg).

2.4. Los cannabinoides ácidos se unen y activan PPAR γ .

Los fitocannabinoides se presentan mayoritariamente en la planta en sus formas ácidas, entre las que se incluyen Δ^9 -THCA, CBDA y CBGA, que tras un proceso de descarboxilación dan lugar a sus formas neutras Δ^9 -THC, CBD y CBG, respectivamente (Fellermeier y Zenk, 1998; Andre y cols., 2016). Previamente se ha descrito a PPAR γ como una de las dianas de diferentes cannabinoides naturales y sintéticos (O'Sullivan, 2007), por lo que quisimos estudiar en primer lugar la capacidad de unión a PPAR γ de algunos cannabinoides ácidos. Para ello, utilizamos ensayos de unión competitiva por el receptor y comparamos los resultados obtenidos con la actividad estudiada para la RGZ. Sorprendentemente, las formas ácidas de los diferentes cannabinoides presentaban una capacidad de unión a PPAR γ mayor que sus formas neutras correspondientes (Figura 53).

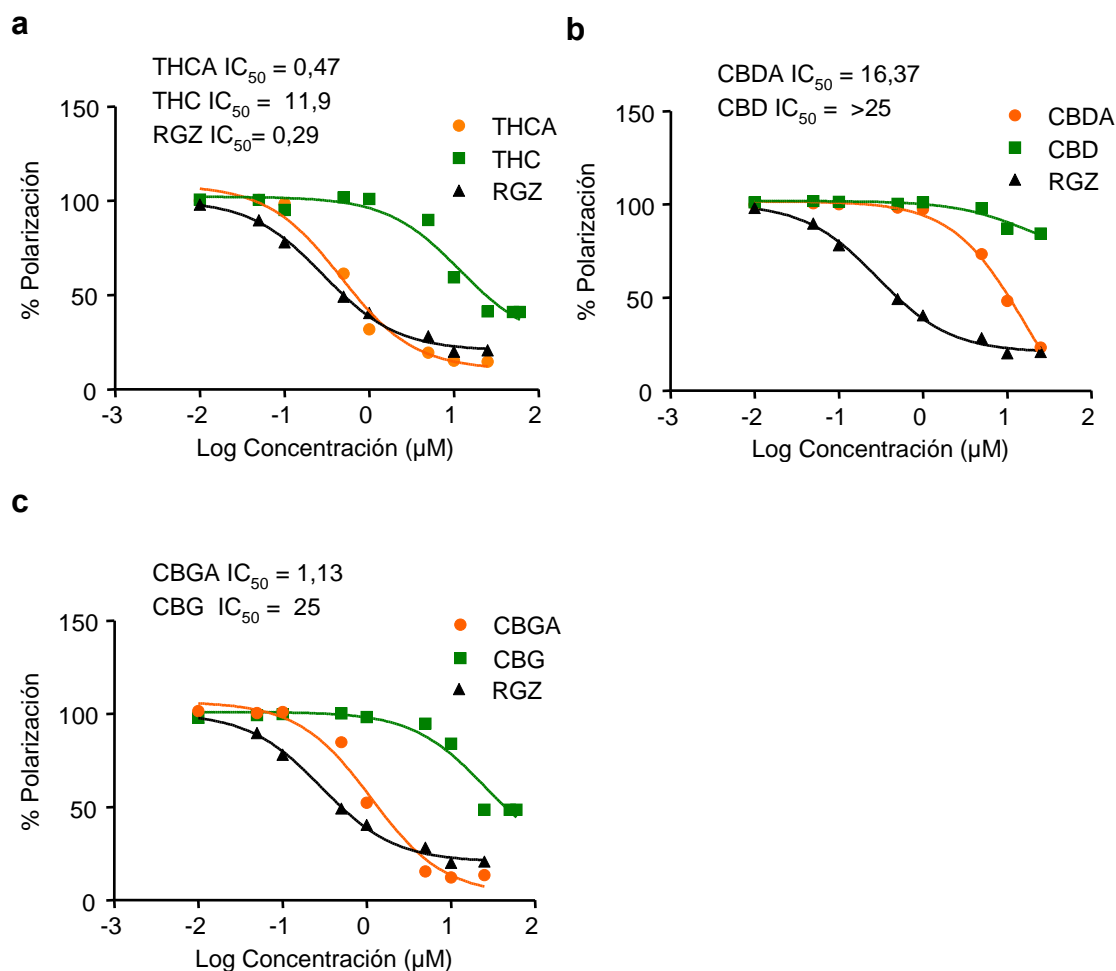


Figura 53. El grupo ácido de los cannabinoides es crítico para la unión a PPAR γ . Las afinidades de los diferentes cannabinoides por la unión a PPAR γ se estudiaron a las concentraciones indicadas y se compararon con la de la RGZ. Los datos se transformaron en una función logarítmica y los valores de IC_{50} se indican dentro del gráfico.

Para analizar el efecto de los diferentes cannabinoides sobre la activación transcripcional de PPAR γ , las células HEK-293T fueron cotransfectadas con los plásmidos GAL4-PPAR γ y GAL4-luc y estimuladas con concentraciones crecientes de cada cannabinoide durante 6 horas. La activación de PPAR γ fue mayor para Δ^9 -THCA y CBDA que para sus formas neutras correspondientes. Sin embargo, CBGA y CBG muestran una potencia similar en la activación de PPAR γ , lo que sugiere que no siempre existe una relación directa entre la capacidad de unión y la actividad transcripcional del receptor (Figura 54a-c). Diferentes estudios han mostrado que PPAR γ se ubiquitina y degrada por el proteosoma siendo este un mecanismo de autorregulación en respuesta a ligandos (Hauser y cols., 2000; Kim y cols, 2015). En este contexto, el tratamiento con Δ^9 -THCA, pero no con Δ^9 -THC, provocó la degradación de PPAR γ en las células estriatales *STHdh*, lo que confirma que los cannabinoides ácidos también ejercen efecto sobre PPAR γ endógeno (Figura 54d).

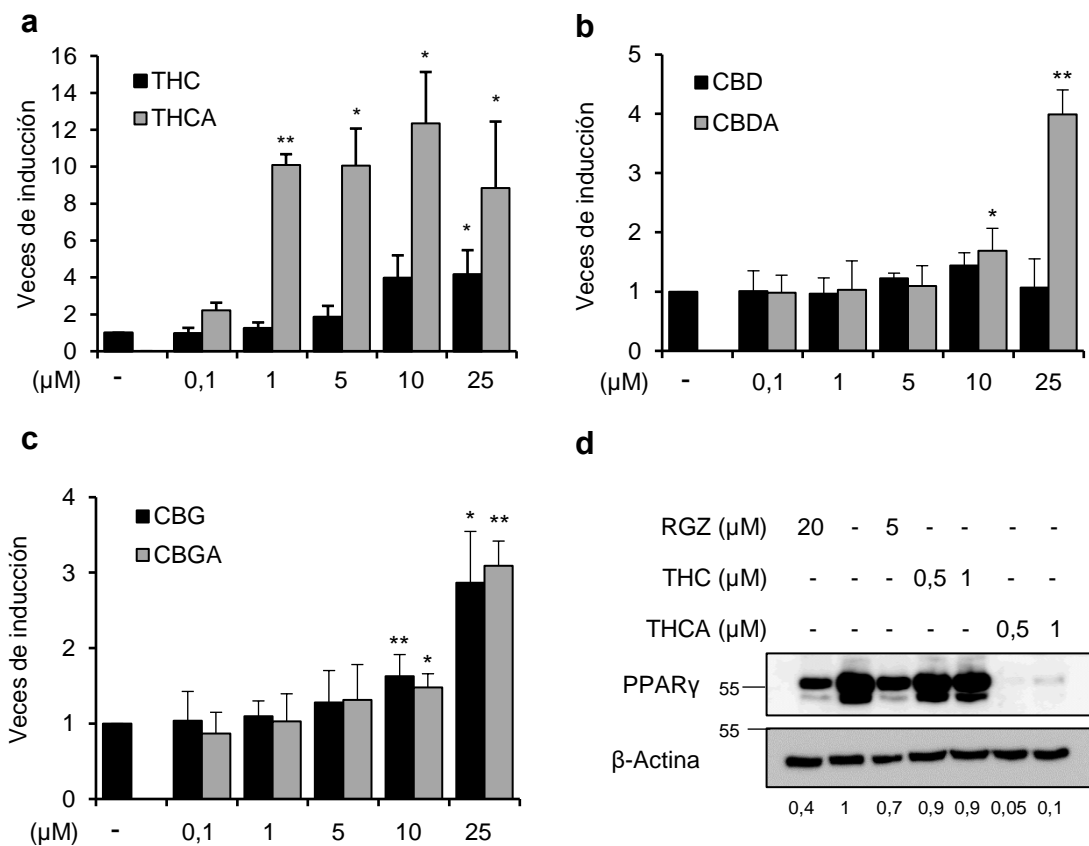


Figura 54. Los cannabinoides ácidos inducen la actividad transcripcional y la degradación de PPAR γ . A-C. Las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con PPAR γ -GAL4 y GAL4-luc y se incubaron con concentraciones crecientes de los cannabinoides indicados durante 6 horas. D. Las células *STHdh*^{Q7/Q7} fueron tratadas con THC, THCA o RGZ durante 6 horas. Se estudiaron los niveles endógenos de PPAR γ mediante Western blot. Los valores indicados bajo los geles representan la intensidad de señal tras la normalización con β -actina.

2.5. Efecto de Δ^9 -THC y Δ^9 -THCA sobre la diferenciación hacia adipocitos y osteoblastos.

PPAR γ es un regulador clave de la adipogénesis y la osteoblastogénesis (Lecka-Czernik y cols., 2002). Por ello, estudiamos la capacidad de Δ^9 -THC y Δ^9 -THCA de influenciar la diferenciación de las MSCs hacia adipocitos y osteoblastos. Las MSCs fueron cultivadas en medio adipogénico (MA) o medio osteoblastogénico (MO) durante 21 días). El efecto de ambos cannabinoides sobre la diferenciación hacia adipocitos se estudió a las dosis de 1, 5 y 10 μ M y los efectos se compararon con los de RGZ (1 μ M). Como se puede observar, Δ^9 -THC y Δ^9 -THCA promovieron la diferenciación adipogénica sin alcanzar los niveles de células Oil Red⁺ inducidas por la RGZ (Figura 55a-b). Del mismo modo, la expresión de marcadores claves de la diferenciación adipogénica tales como *PPAR γ 2*, *LPL*, *FABP4*, *CEBPA* y *ADIPOQ* fue considerablemente menor en las células tratadas con Δ^9 -THC o Δ^9 -THCA que en aquellas en las que se indujo la diferenciación en presencia de RGZ (Figura 55c). Curiosamente, el tratamiento con Δ^9 -THCA a la dosis de 1 μ M tiene poco efecto sobre la adipogénesis pero es suficiente para inducir la actividad transcripcional de PPAR γ (Figura 54a) y la expresión de genes dependientes de PPAR γ (Figura 55c). Se ha descrito que las glitazonas, como la RGZ, suprimen la osteoblastogénesis mediante la activación de PPAR γ (Lecka-Czernik y cols., 2002; Benvenuti y cols., 2007). Sorprendentemente, el tratamiento con Δ^9 -THCA indujo claramente la mineralización de los osteoblastos de manera dosis dependiente (Figura 56a-b) y provocó también un aumento moderado de la expresión de los marcadores de la diferenciación a osteoblastos *RUNX2*, *SP7*, *IBSP* y *ALP* (Figura 56c).

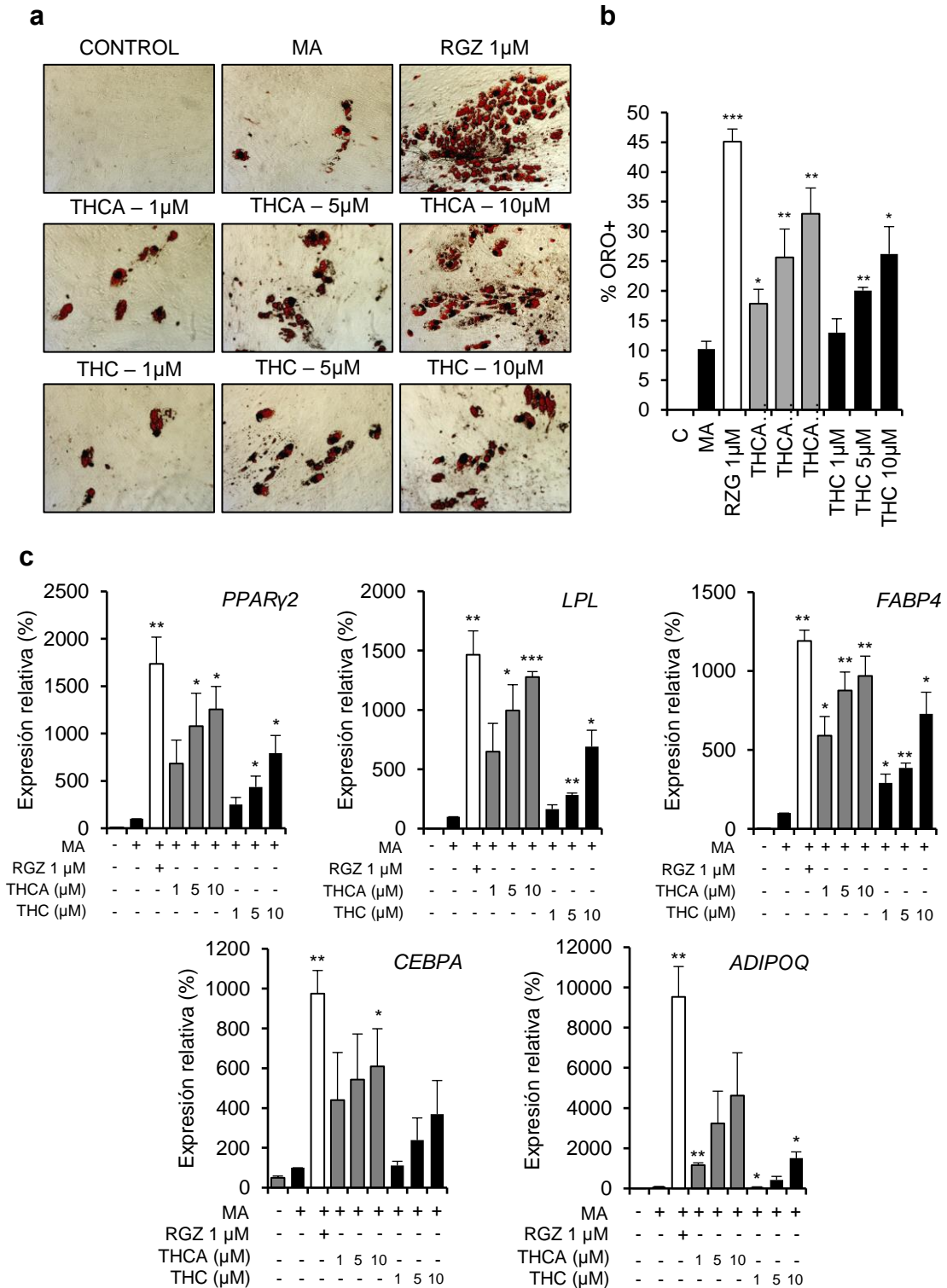


Figura 55. Δ^9 -THCA promueve la diferenciación a adipocitos de las MSCs. Las células fueron diferenciadas en MA en presencia de RGZ, Δ^9 -THCA o Δ^9 -THC. **A.** Imágenes representativas de la acumulación de gotas lipídicas observadas mediante la tinción con OilRed O **B.** Cuantificación de las células ORO+ tras 21 días de diferenciación. **C.** Expresión génica de los marcadores adipogénicos *PPAR γ 2*, *LPL*, *FABP4*, *CEBPA* y *ADIPOQ* tras 14 días de diferenciación. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus control.

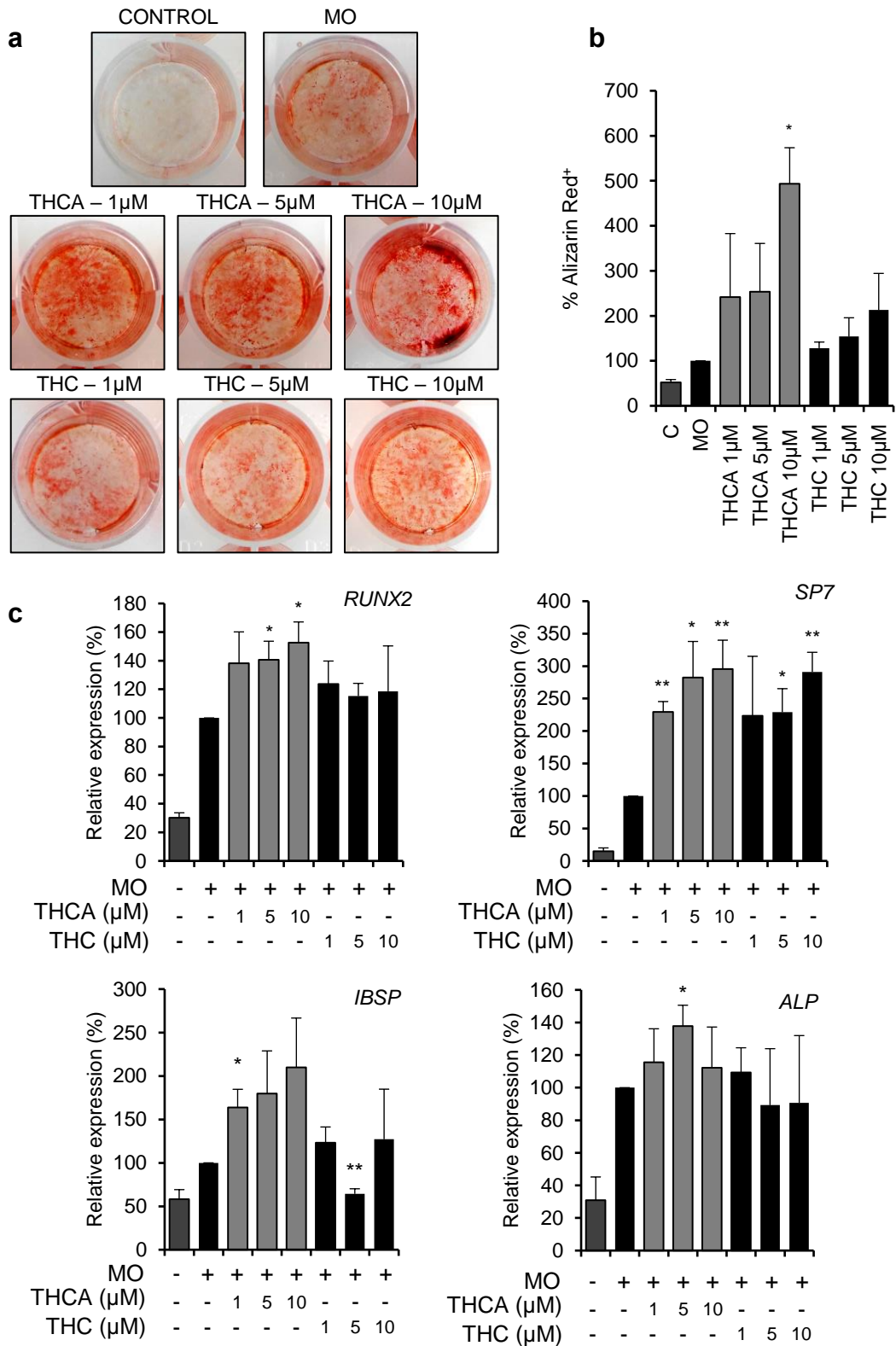


Figura 56. Δ^9 -THCA potencia la diferenciación a osteoblastos de las MSCs. Las células fueron diferenciadas en MO en presencia de RGZ, Δ^9 -THCA o Δ^9 -THC. **A.** Imágenes representativas de la mineralización observada mediante la tinción con Alizarin Red. **B.** Cuantificación de los depósitos de calcio tras 21 días de diferenciación. **C.** Expresión génica de los marcadores osteoblastogénicos *RUNX2*, *SP7*, *IBSP* y *ALP* tras 14 días de diferenciación * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ versus control.

2.6. Efecto de Δ^9 -THCA sobre la biogénesis mitocondrial y la expresión de PGC-1 α .

Se ha descrito que diferentes ligandos de PPAR γ , como la RGZ, atenúan la disfunción mitocondrial provocada por la Htt mutada y aumentan la biogénesis mitocondrial en diferentes líneas neuronales (Chiang y cols., 2015; Quintanilla y cols., 2008). Por ello, llevamos a cabo experimentos para determinar cómo pueden afectar Δ^9 -THC y Δ^9 -THCA a la biogénesis mitocondrial. Con este objetivo, las células N2a fueron tratadas con RGZ, Δ^9 -THC o Δ^9 -THCA durante 72 horas y teñidas MitoTracker Green, un marcador fluorescente verde que localiza las mitocondrias con independencia del potencial de la membrana mitocondrial. Los cambios en la intensidad de fluorescencia reflejaron que el tratamiento con Δ^9 -THCA aumentó de forma significativa la masa mitocondrial (Figura 57a-b). Además, a diferencia de Δ^9 -THC, el Δ^9 -THCA indujo la sobreexpresión de los niveles de PGC1 α (Figura 57c), el principal regulador de la biogénesis mitocondrial (Fernandez-Marcos y Auwerx, 2011)

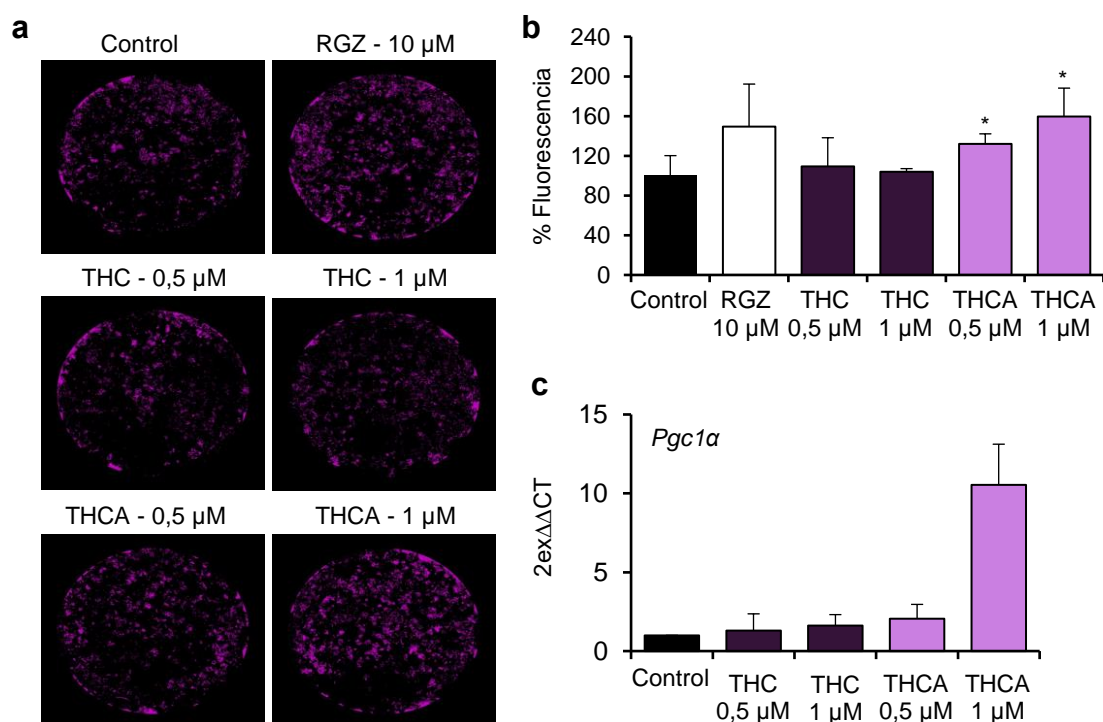


Figura 57. El tratamiento con Δ^9 -THCA aumenta la biogénesis mitocondrial. **A.** Imágenes representativas de células N2a tratadas con THC, THCA o RGZ durante 72 horas y teñidas con MitoTracker Green. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia, tomando como 100 % las células no tratadas. **C.** THCA induce la expresión de *Pgc1 α* . Las células N2a fueron estimuladas con THC o THCA y se analizaron los niveles de *Pgc1 α* por PCR a tiempo real. Los resultados se expresan como media \pm S.D. * $p < 0,05$ versus control.

2.7. Δ^9 -THCA es neuroprotector frente a la Htt mutada *in vitro*.

El aumento del número de repeticiones CAG da lugar a un tracto de glutamina más alargado que provoca la degeneración de las neuronas estriatales en la EH (Trettel y cols., 2000). Las células *STHdh*^{Q111/1111} presentan 111 repeticiones de glutamina en su dominio aminoterminal, lo que da lugar a citotoxicidad dependiendo de las condiciones del cultivo. Como se puede observar, la privación de suero provocó la muerte celular en la línea *STHdh*^{Q111/1111}, mientras que la correspondiente línea control (*STHdh*^{Q7/Q7}) no se vio afectada (Figura 58a). Seguidamente analizamos el efecto del tratamiento con Δ^9 -THC y Δ^9 -THCA sobre la viabilidad celular en la línea *STHdh*^{Q111/1111}. Los resultados muestran como el tratamiento con Δ^9 -THCA previene la muerte neuronal de manera dependiente de la activación de PPAR γ , ya que esta actividad no se observa en presencia del antagonista de PPAR γ (Figura 58b).

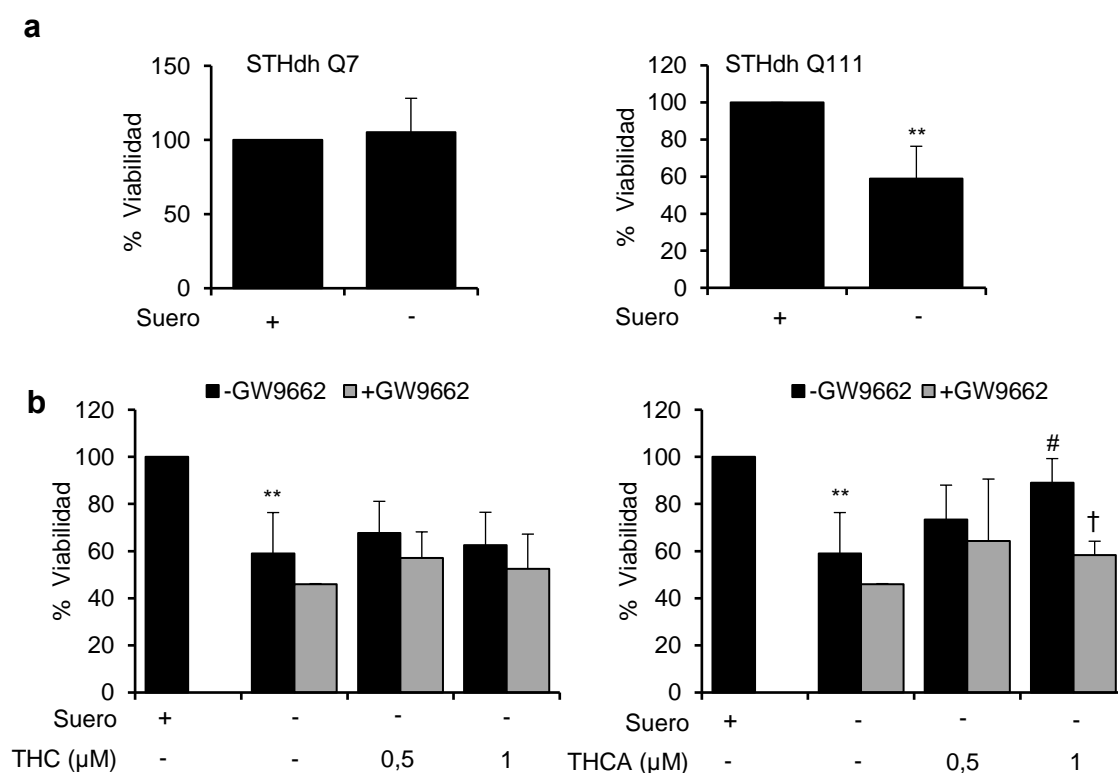


Figura 58. Δ^9 -THCA previene la citotoxicidad inducida por la Htt mutada de manera dependiente de la activación de PPAR γ . **A.** La privación de suero induce la muerte neuronal en las células *STHdh*^{Q111/Q111} pero no en las células *STHdh*^{Q7/Q7}. **B.** THCA previene la muerte celular inducida por la privación de suero. Las células *STHdh*^{Q111/Q111} fueron privadas de suero durante 4 horas y tratadas con THC o THCA solos o en combinación con el antagonista de PPAR γ GW9662 (5 μ M) durante otras 48 horas. La viabilidad celular se estudió por MTT y los resultados se representan como porcentaje medio de viabilidad frente al control. ** p<0,01 versus control; # p<0,05 versus privación de suero; †p<0,05 versus THCA.

2.8. El tratamiento con Δ^9 -THCA protege de la neurodegeneración estriatal en el modelo animal de EH.

Para estudiar la eficacia in vivo del Δ^9 -THCA usamos el mismo modelo experimental con el que investigamos la eficacia del VCE-003.2. Así, el modelo se indujo mediante la administración sistémica de 3NP y los ratones fueron tratados en paralelo con Δ^9 -THCA (20 mg/kg/24h). Un grupo de animales a los que no se les administró 3NP recibió tratamiento con Δ^9 -THCA (20 mg/kg/24h). No se observaron cambios comportamentales entre el grupo control y el grupo tratado con Δ^9 -THCA. La intoxicación con 3NP resultó en un déficit motor, evaluado mediante una escala clínica en la que se cuantificó el deterioro de la actividad locomotora y el aumento de la retracción y distonía de las extremidades traseras y la presencia de cifosis. Por el contrario, los animales lesionados con 3NP y tratados en paralelo con Δ^9 -THCA mostraron una mejora significativa de la actividad motora (actividad locomotora, distonía de las extremidades traseras y cifosis) (Figura 59).

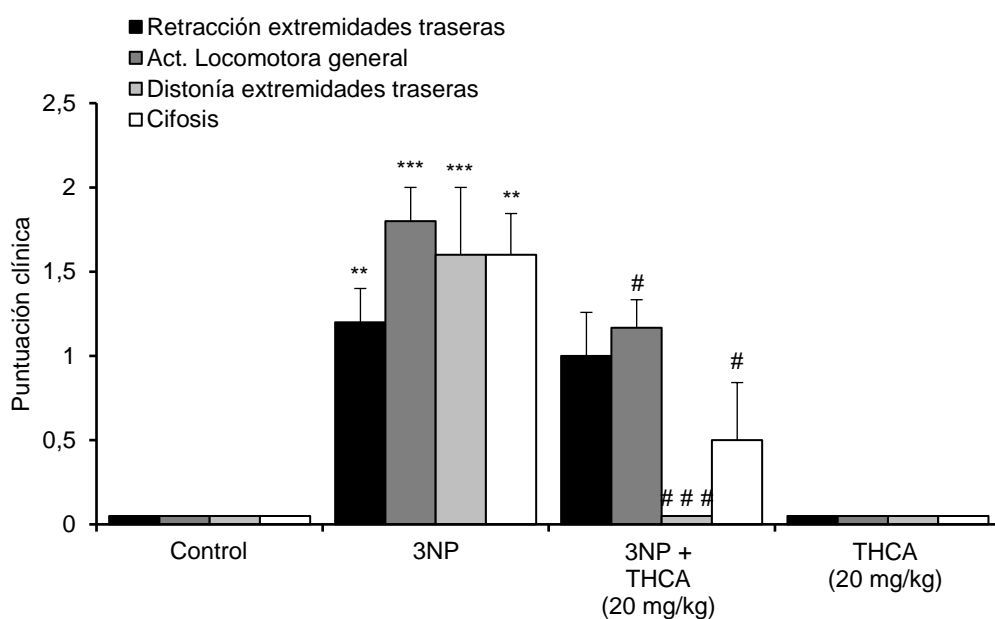


Figura 59. El tratamiento con Δ^9 -THCA reduce el daño motor provocado por la intoxicación con 3NP. La puntuación conductual se determinó 12 horas después de la última administración de 3NP mediante una escala de 0 a 2 según la gravedad de la afectación motora. Los valores están expresados como media \pm SEM (n = 6 animales por grupo). ** p<0,01 *** p<0,001 versus control; # p<0,05 ### p<0,001 versus 3NP.

En los ensayos histológicos observamos que el grupo lesionado con 3NP presentó una pérdida neuronal marcada en el estriado tal y como se observa usando la tinción de Nissl (Figura 60). No obstante, el tratamiento con Δ^9 -THCA previno claramente la

neurodegeneración provocada por 3NP. Además, los animales tratados con Δ^9 -THCA presentaron una reducción significativa de la microgliosis (Figura 61) y astrogliosis (Figura 62) inducida por la intoxicación con 3NP.

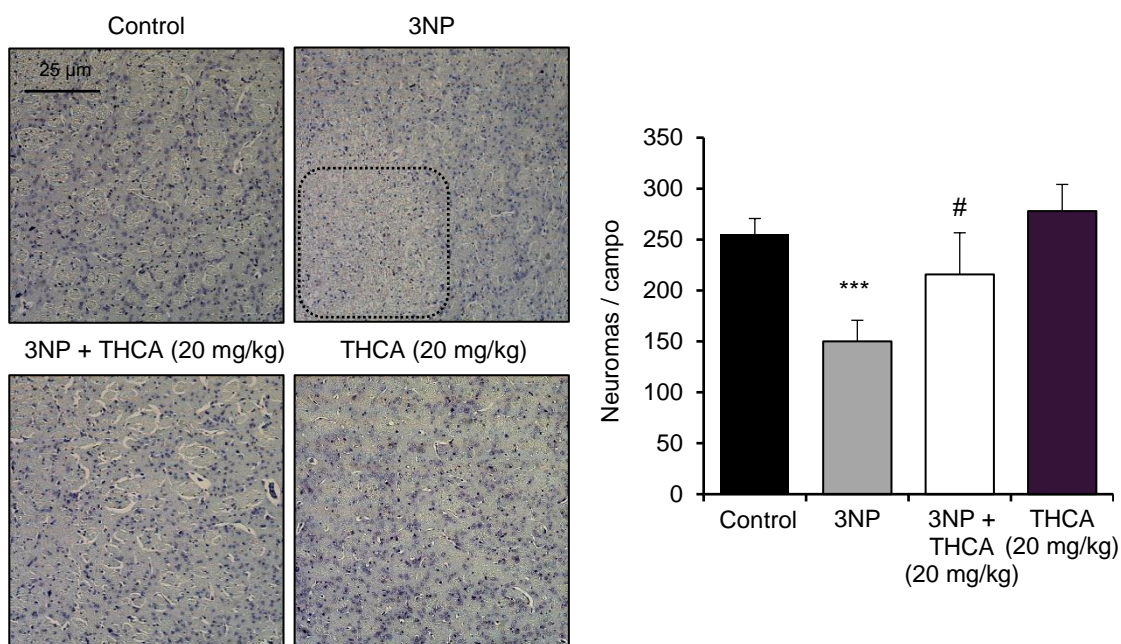


Figura 60. El tratamiento con THCA previene la muerte neuronal en el estriado provocada por la intoxicación con 3NP. Imágenes representativas de secciones coronales de cerebro tras la tinción de Nissl y su correspondiente cuantificación. Los valores están expresados como media \pm SEM. (n = 6 animales por grupo). *** p<0,001 versus control; # p<0,05 versus 3NP.

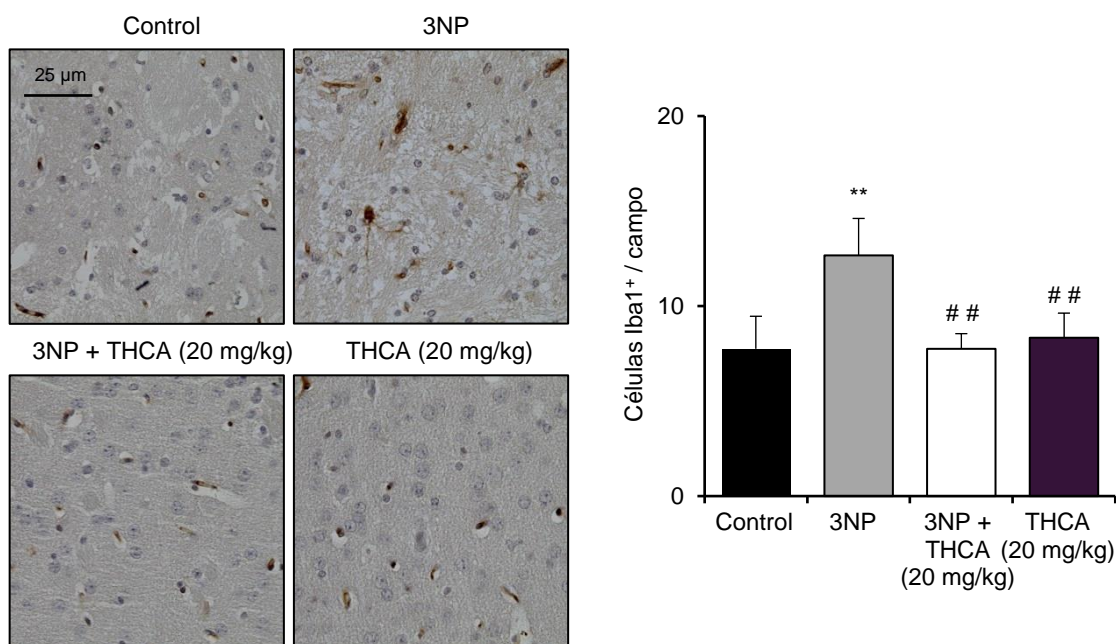


Figura 61. Δ^9 -THCA reduce la activación microglial tras la administración de 3NP. Imágenes representativas de secciones coronales del estriado cerebral tras el marcaje con anti-Iba1 mediante inmunohistoquímica y su respectiva cuantificación. Los valores están representados como media \pm SEM (n = 6 animales por grupo). ** p<0,01 versus control; ## p<0,01 versus 3NP.

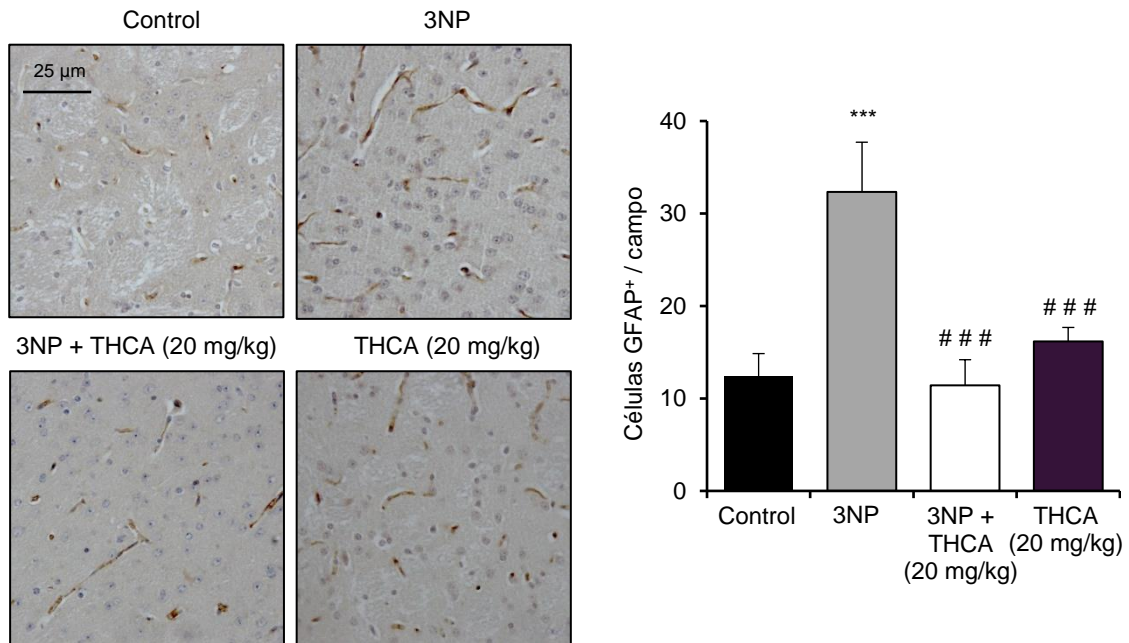


Figura 62. La administración de Δ^9 -THCA disminuye la astrogliosis inducida la intoxicación con 3NP. Imágenes representativas de la zona del estriado tras el marcaje con anti-GFAP mediante inmunohistoquímica y su respectiva cuantificación. Los valores están representados como media \pm SEM (n = 6 animales por grupo). *** p<0,001 versus control; ### p<0,001 versus 3NP.

Finalmente, estudiamos el efecto del tratamiento con Δ^9 -THCA sobre la expresión de genes inflamatorios en el estriado. Los animales lesionados con 3NP presentaron niveles significativamente más altos de *Il6* e *Inos* y un leve aumento de *Cox2* y el tratamiento con Δ^9 -THCA redujo estos parámetros hasta niveles comparables al grupo control (Figura 63).

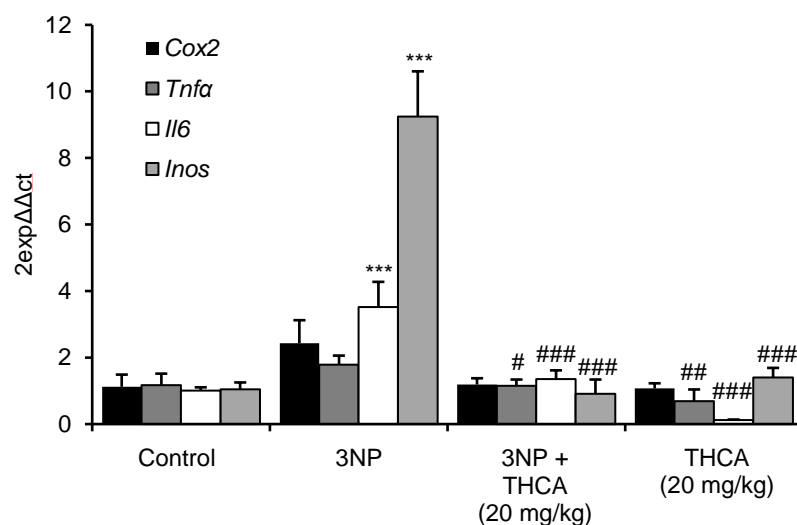


Figura 63. El tratamiento con Δ^9 -THCA reduce la expresión de marcadores inflamatorios en el estriado. Se aisló el estriado de los animales y se estudió la expresión génica de *Cox2*, *Tnfa*, *Il6* e *Inos*. Los resultados están representados como media \pm SEM referido al grupo de control (n = 6 animales por grupo). *** p<0,001 versus control; # p<0,05 ## p<0,01 ### p<0,001 versus 3NP.

V. Discusión

Los efectos medicinales de la planta *Cannabis sativa* se conocen desde el tercer milenio antes de cristo, cuando diferentes textos chinos describieron su utilización para aliviar el dolor reumático y los calambres. Además, en la antigua India, el efecto analgésico del Cannabis se había registrado hace más de 3000 años (Pacher y cols., 2006). Esta larga historia del uso del *Cannabis* ha dado como resultado la investigación y el desarrollo de fármacos basados en cannabinoides, tales como Dronabinol, Nabilona o Sativex, que son prescritos en la actualidad como antieméticos para pacientes con cáncer o SIDA y como tratamientos para la espasticidad de la MS (Borgelt y cols., 2013; Schrot y Hubbard, 2016).

Como se ha comentado, la mayoría de los tratamientos actuales para la SSc tienen como diana el sistema inmune. En este contexto, el perfil antiinflamatorio de los cannabinoides podría resultar altamente beneficioso para el tratamiento de esta enfermedad. Así, los estudios pre-clínicos en SSc con aproximaciones genéticas o farmacológicas actuando sobre el sistema endocannabinoide han ido en aumento en los últimos años (Palumbo-Zerr y cols., 2012; Marquart y cols., 2010; Akhmetshina y cols., 2009). En este sentido, diferentes estudios han demostrado que el sistema endocannabinoide está implicado en el control de la fibrosis y la autoinmunidad y, consecuentemente, los fármacos cannabinoides representan un posible abordaje terapéutico de la SSc (Servettaz y cols., 2010; Balistreri y cols., 2011; Garcia-Gonzalez y cols., 2009; Gonzalez y cols., 2012).

Por otra parte, el sistema endocannabinoide tiene un gran potencial terapéutico en la EH debido a la gran abundancia de sus diferentes elementos en el ganglio basal y a las alteraciones que se producen en el mismo durante el transcurso de la enfermedad (pérdida de los receptores CB₁ y aumento de la expresión de CB₂ y reducción de la actividad de la enzima FAAH) (Fernandez-Ruiz y cols., 2011). De hecho, diferentes cannabinoides como el Δ^9 -THC (Lastres-Becker cols., 2004), el CBD (Sagredoy cols., 2007) o el CBG (Valdeolivas y cols., 2015) han mostrado efectos beneficiosos en modelos animales de EH al reducir la sintomatología asociada.

1. Efecto terapéutico de VCE-004.3 y VCE-004.8 en SSc.

Los resultados mostrados previamente describen por primera vez que las modificaciones químicas introducidas en la estructura de CBD para dar lugar a los nuevos derivados VCE-004.3 y VCE-004.8 mejoran la actividad de este cannabinoide natural sobre potenciales dianas para el tratamiento de la SSc. Estas dianas incluyen PPAR γ y los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂. Por ello, se ha evaluado la actividad antiinflamatoria y antifibrogénica de ambos derivados en modelos experimentales de SSc.

Los fármacos basados en quinonas que ejercen efectos antibióticos y antineoplásicos se usan comúnmente en la práctica clínica, pero su utilización para tratamientos crónicos no es ideal en algunos casos debido a su reactividad y toxicidad. Así, el desarrollo de derivados quinol o quinona de compuestos cannabinoides que muestren actividad antiinflamatoria más específica y sean menos tóxicos representa un objetivo científico importante. En este contexto, HU-311 exhibe una actividad de unión a PPAR γ aumentada en comparación con su precursor CBD. Sin embargo, HU-331 es también un aceptor de grupos tiol que aumenta la producción de ROS, perturba el potencial de membrana mitocondrial e induce citotoxicidad en células primarias y transformadas *in vitro*. Por el contrario, nuestros resultados muestran que VCE-004.3 y VCE-004.8 son compuestos no reactivos sin actividad citotóxica y que no provocan la producción de ROS, la alteración del potencial mitocondrial ni la activación de la ruta de respuesta a estrés oxidativo Nrf2.

Por otro lado, las TZDs son agonistas potentes de PPAR γ que se han utilizado ampliamente en la clínica como antidiabéticos orales. Sin embargo, este tipo de compuestos causan numerosos efectos secundarios tales como la retención de líquido, el aumento de peso y un mayor riesgo de fallo cardíaco (Ahmadian y cols., 2013). De hecho, RGZ (Avandia) fue retirada del mercado en Europa en 2010 debido a la aparición de nuevos estudios que cuestionaron la seguridad cardiovascular de este medicamento (Rizos y cols., 2016). Las glitazonas se consideran hoy como “full-agonists” de PPAR γ (PPAR γ -fa) ya que pueden activar rutas que inducen tanto efectos terapéuticos como efectos secundarios. No obstante, PPAR γ sigue siendo una diana relevante para desarrollar nuevos agonistas que reduzcan o eliminen los efectos adversos de los fármacos clasificados como PPAR γ -fa para el tratamiento de diferentes

enfermedades, entre las que se incluye la SSc. Por ello, existe una intensa actividad investigadora para desarrollar moduladores selectivos de PPAR γ (PPAR γ -m) como alternativas más seguras a los fármacos tipo PPAR γ -fa. De hecho, RGZ es hasta 20 veces más potente que los nuevos derivados de CBD. En este sentido, los moduladores de PPAR γ solo activan un subconjunto de funciones inducidas por los ligandos del receptor o actúan selectivamente dependiendo del tipo celular (Doshi y cols., 2010) por lo que VCE-004.3 y VCE-004.8 pueden considerarse moduladores de PPAR γ .

Diferentes estudios han demostrado que PPAR γ juega un papel importante en la inhibición de la respuesta fibrogénica reduciendo la señalización por TGF β . La activación de PPAR γ no afecta a la activación de las SMADs sin embargo, PPAR γ compite con las mismas por el reclutamiento del coactivador p300 para la formación del complejo SMADs/p300 necesario para la transcripción de colágeno (Ghosh y cols., 2009). Los agonistas de PPAR γ reprimen la expresión de los genes profibróticos COL1A1 y COL1A2 y reducen la diferenciación a miofibroblastos (Wu y cols., 2009). Además, la RGZ ha mostrado también inhibir la migración de fibroblastos inducida por TGF β (Wu y cols., 2009). En concordancia, nuestros estudios *in vitro* reflejan una reducción de la actividad transcripcional de las SMADs así como la inhibición de la transcripción y la síntesis de colágeno inducidas por TGF β cuando las células eran tratadas con VCE-004.3 y VCE-004.8. Sin embargo, al igual que sucede con RGZ, el tratamiento no afecta a los niveles de fosforilación de las SMADs. Se sabe que la vía canónica de las SMADs es crítica para la fibrosis inducida por TGF β . A pesar de ello, se ha sugerido que otras vías de señalización dependientes de TGF β , como la cascada ras/MEK/ERK, también contribuyen a la patogénesis de la SSc (Leask, 2012). VCE.004.3 y VCE-004.8 regulan negativamente la señalización de ERK1/2 *in vitro* y VCE-004.3 ha mostrado ejercer también este efecto *in vivo*, el cual es una vía principal que controla el crecimiento celular, la proliferación, la migración, la apoptosis y la diferenciación de miofibroblastos (Sun Y. y cols., 2015). Es más, ambos derivados fueron capaces de reducir la migración y la diferenciación de los miofibroblastos *in vitro* tras la estimulación con TGF β . Por todo ello, es concebible que parte de los efectos antifibróticos mostrados por VCE-004.3 y VCE-004.8 se lleven a cabo a través de la activación de PPAR γ en paralelo a la inhibición de ERK1/2.

Uno de los eventos iniciales de la SSc es el daño vascular que conduce a la inflamación y la autoinmunidad. Aunque la patogénesis de la SSc no se conoce completamente, existe una interacción aberrante entre las células endoteliales, las células epiteliales y los fibroblastos, además de un aumento en la activación de linfocitos y producción de autoanticuerpos que resultan en la acumulación excesiva de elementos de la matriz extracelular (Varga y Abraham, 2007). En consecuencia, utilizamos un modelo de SSc caracterizado por la inflamación temprana inducido por la administración de BLM durante 3 semanas en el que el tratamiento se inicia de forma simultánea a las inyecciones de BLM (Gonzalez y cols 2012). Estudios previos han demostrado que los efectos inmunomoduladores de la activación de PPAR γ a través de agonistas tales como RGZ previenen la SSc en este modelo (Wu y cols., 2009). Nuestros datos demuestran que VCE-004.3 previene la infiltración de células inflamatorias (macrófagos y células T), la degranulación de los mastocitos y reduce la expresión de citocinas proinflamatorias y profibróticas en la piel. Estos efectos antiinflamatorios que presenta VCE-004.3 previenen la acumulación de miofibroblastos en la piel y el desarrollo de la enfermedad, reduciendo la fibrosis dérmica inducida por la administración de BLM.

La activación de los macrófagos, así como la proliferación de las células T, se regulan también a través de la activación de PPAR γ (Clark y cols., 2000; Harris y Phipps, 2001; Ricote y cols., 1998) mientras que la modulación del sistema cannabinoide limita la infiltración de leucocitos en la piel tras la administración de BLM (Akhmetshina y cols., 2009; Marquart y cols., 2010). Además, JHH-133 un agonista selectivo de CB₂ ha mostrado influir en la función y la degranulación de los mastocitos *in vivo* (Jonsson y cols., 2006). El papel del receptor CB₁ es muy importante durante las etapas tempranas de la SSc, durante la cual los infiltrados inflamatorios, que consisten principalmente en células T y macrófagos, liberan mediadores profibróticos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Wynn y Vannella, 2016; O'Reilly y cols., 2012). La inactivación genética del receptor CB₁ reduce la infiltración de células inflamatorias en la piel en respuesta a BLM, mientras que la estimulación de este receptor mediante un agonista (ACEA) exagera la respuesta inflamatoria en este modelo. De hecho, el efecto de la modulación de CB₁ sobre los leucocitos es esencial para la actividad antifibrótica mediada por el receptor (Marquart y cols., 2010). Por ello,

el efecto antiinflamatorio y antifibrótico del tratamiento con VCE-004.3 observado en este modelo podría explicarse por su actividad combinada sobre PPAR γ , CB₁ y CB₂.

La fibrosis progresiva de la piel y otros órganos internos provocada por la acumulación de colágeno y otros elementos de la matriz extracelular es uno de los tres procesos patológicos principales de la SSc (Pattanaik y cols., 2015). La pérdida de elasticidad cutánea seguida del engrosamiento y endurecimiento de la piel está presente en casi todos los pacientes y tiene un impacto importante en la calidad de vida. Además, la afectación de la piel es un marcador de la severidad y presenta correlación con el pronóstico de la enfermedad (Krieg y Takehara, 2009). La fibrosis experimental inducida por la administración de BLM es un modelo ampliamente utilizado para estudiar la SSc ya que la administración subcutánea de BLM induce una reacción inflamatoria temprana seguida de activación de fibroblastos y fibrosis progresiva similar a la enfermedad humana (Yamamoto y Nishioka, 2005). Aunque la prevención de la fibrosis sería un objetivo principal en el tratamiento de la SSc, el diagnóstico clínico se siempre se da en pacientes que ya presentan una fibrosis establecida. Por lo tanto, los fármacos antifibróticos potenciales para la SSc no sólo debería prevenir la evolución de la fibrosis en los pacientes recién diagnosticados, sino también inducir la regresión de la fibrosis preexistente en pacientes con la enfermedad mas avanzada. Por ello, también se ha utilizado un modelo modificado de fibrosis inducida por BLM en el que el tratamiento se inicia tres semanas después del comienzo de las inyecciones de BLM con el fin de confirmar el efecto antifibrótico de VCE-004.3 en un modelo experimental menos dependiente de la inflamación (Gonzalez y cols., 2012; Beyer y cols., 2010).

De acuerdo con estudios anteriores, el examen histológico de la piel después de la administración de BLM dio como resultado un engrosamiento dérmico significativo y la pérdida de la capa adiposa subcutánea (Yamamoto y Katayama, 2011). El tratamiento intraperitoneal con VCE-004.3 una vez la fibrosis estaba establecida redujo el engrosamiento de la piel y la expresión de citoquinas involucradas en la producción de colágeno. La fibrosis cutánea se ha asociado con la pérdida progresiva de la expresión de PPAR γ que parece ser prevenida o reducida por la administración de ligandos del receptor. En el modelo de fibrosis inducida por BLM, diferentes agonistas de PPAR γ (RGZ, CDDO) han mostrado prevenir la aparición de fibrosis cutánea y reducir la fibrosis establecida (Wei y cols., 2014; Wu y cols., 2009). Es más, los animales tratados con VCE-004.3 presentaban una leve mejora de la fibrosis pulmonar inducida por la

BLM. El daño pulmonar es frecuente en los pacientes con SSc y en la actualidad, las manifestaciones pulmonares son la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con SSc (Wells y cols., 2009). La actividad de VCE-004.3 estaría mediada también por la interacción del compuesto con los receptores cannabinoides. En este contexto, los receptores cannabinoides han mostrado ejercer efectos opuestos en modelos experimentales de fibrosis dérmica. Mientras que la inhibición de CB₁ conlleva efectos antifibróticos indirectos controlando el proceso inflamatorio, la activación de la señalización CB₂ protege de la fibrosis inducida por BLM (Akhmetshina y cols., 2009). Estos resultados justifican el uso de fármacos selectivos que inhiban CB₁ o activen CB₂.

Dado que la modulación del receptor CB₁ regula principalmente la inflamación y no previene la fibrosis en el modelo experimental TSK-1 en el que los infiltrados inflamatorios están ausentes (Marquart y cols., 2010), quisimos estudiar el efecto antifibrótico del derivado VCE-004.8 (agonista dual de PPAR γ y CB₂) en el modelo de SSc crónica. Aunque la activación de CB₂ también podría estar implicada en la actividad antiinflamatoria de VCE-004.8 actuando probablemente sobre los macrófagos para inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β , se sabe que la activación de CB₂ es beneficiosa en la inhibición de proceso fibrótico. Se ha descrito que la activación de CB₂ inhibe el crecimiento celular y promueve la apoptosis de los miofibroblastos en el hígado cirrótico (Julien y cols., 2005) y que el agonista JWH-133 disminuye el infiltrado inflamatorio y la fibrosis en ratas cirróticas (Munoz-Luque y cols., 2008). El tratamiento con VCE-004.8 durante las últimas tres semanas de inyecciones de BLM provocó una importante reducción de la progresión del engrosamiento dérmico y la deposición de colágeno perivascular. La infiltración de macrófagos y la degranulación de los mastocitos, que representan una importante fuente de TGF β durante el desarrollo de la fibrosis (Gruber, 2003; Wynn y Barron, 2010), también se redujo en los ratones que recibieron VCE-004.8. Es más, estos efectos se prevenían parcialmente en presencia de los antagonistas de PPAR γ o CB₂. Los niveles de expresión de TGF β no fueron inhibidos por tratamiento con VCE-004.8, pero es posible que la inhibición de la expresión de ARNm de IL-1 β y IL-13 observada refleje una reducción de la infiltración de macrófagos y de la degranulación de mastocitos. No obstante, aunque no hay una reducción de los niveles de TGF β nuestros derivados si se encontró una inhibición de su ruta de señalización no canónica. Los mastocitos pueden producir también IL-13, que junto con otras citoquinas inflamatorias como IL-1 β , puede

acelerar el desarrollo de la fibrosis (Yamamoto y cols., 1999b; Obara y cols., 2002). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que muestran que los agonistas de PPAR γ y CB₂ atenúan la infiltración de células inflamatorias en la fibrosis cutánea inducida por BLM (Wu y cols., 2009; Akhmetshina y cols., 2009).

En concordancia con la penetración transdérmica de los cannabinoides (Valiveti y cols., 2004; Lodzki y cols., 2003), nuestros resultados también demostraron que la aplicación tópica de VCE-004.3 y VCE-004.8 también es efectiva como terapia en el modelo de SSc crónica, inhibiendo el engrosamiento de la dermis y la expresión de genes profibróticos en la piel. Por lo tanto, la aplicación tópica de VCE-004.3 y VCE-004.8 podría ser considerada para el tratamiento de la lcSSc.

Es de especial relevancia recordar que las anomalías inmunológicas de la SSc incluyen la presencia de autoanticuerpos dirigidos a múltiples antígenos intracelulares. Entre otros, los autoanticuerpos contra el receptor de PDGF han mostrado cambiar el fenotipo de fibroblastos a través de cascadas Ha-Ras-ERK1/2 y la producción de ROS (Baroni y cols., 2006). En este sentido, se ha demostrado que reducir la activación de la ruta de las MAPK suprime el desarrollo de la fibrosis (Galuppo y cols., 2011). El tratamiento con VCE-004.3 impidió la activación de ERK en fibroblastos normales tras de la exposición a autoanticuerpos de pacientes con lcSSc y dcSSc indicando que los efectos antifibróticos causados por VCE-004.3 pueden estar mediados por ERK1/2. De hecho, VCE-004.3 ha mostrado reducir los niveles de p-ERK1/2 *in vivo*.

En conclusión, nuestros resultados reflejan que los nuevos derivados cannabinoides VCE-004.3 y VCE-004.8 tienen actividad moduladora sobre PPAR γ . Además VCE-004.3 presenta antagonismo sobre CB₁ y agonismo de CB₂ mientras que VCE-004.8 se comporta como antagonista de CB₂ sin mostrar afinidad sobre CB₁. La combinación de estas actividades (PPAR γ /CB₁/CB₂ o PPAR γ /CB₂) pueden representar un avance importante en el desarrollo de nuevas terapias en enfermedades inflamatorias y fibróticas ya que todas estas dianas son críticas y complementarias.

2. Efecto terapéutico de VCE-003.2 y Δ^9 -THCA en EH.

Los resultados muestran la caracterización del nuevo derivado de VCE-003.2 y su actividad sobre PPAR γ como diana para su eficacia como tratamiento neuroprotector. Además, se describe por primera vez el potencial farmacológico de los cannabinoides ácidos dado que superan a sus formas neutras en la capacidad de unión a PPAR γ , siendo Δ^9 -THCA el agonista más potente entre los fitocannabinoides estudiados. Por ello, se ha evaluado la actividad antiinflamatoria y neuroprotectora de VCE-003.2 y Δ^9 -THCA en el modelo animal de EH inducido por 3NP.

El desarrollo de cannabinoides quinona que muestren actividades neuroprotectoras y antiinflamatorias, sin actividad citotóxica y más específicos en sus acciones, es una meta terapéutica importante. Hemos identificado VCE-003.2 como una nueva molécula derivada de CBG-quinona (o CBG-quinol) con mejores propiedades farmacológicas que, actuando mediante la activación de PPAR γ , ejerce actividad neuroprotectora atenuando la muerte neuronal *in vitro* e *in vivo* y promoviendo la supervivencia de progenitores neuronales (Diaz-Alonso y cols., 2016). VCE-003.2 tiene una capacidad de unión y transactivación de PPAR γ que supera a CBG, sin llegar a ser un agonista completo como la RGZ. Por lo tanto, este nuevo compuesto puede calificarse como un modulador selectivo de PPAR γ con menor actividad adipogénica que las TZDs.

Como se ha comentado anteriormente, la utilidad de los compuestos electrofílicos como fármacos contra el cáncer es incuestionable, como sucede con diferentes compuestos aprobados por la FDA tales como la doxorrubicina, la mitomicina C y la mitoxantrona. Sin embargo, el uso de esta clase de fármacos para tratamientos crónicos no es viable debido a que las propiedades electrofílicas de los compuestos pueden inducir citotoxicidad por alquilación covalente de ADN (Bolzan y Bianchi, 2001; Ven-Sun L., 1996) o por inducción de ROS (Pelicano y cols., 2004; Lu y cols., 2005). Por ejemplo, la doxorrubicina, un compuesto que contiene un grupo quinona, produce citotoxicidad por agotamiento de GSH *in vitro* e *in vivo* (Joshi y cols., 2007). Sin embargo, algunos electrófilos del tipo orto- y para-quinonas, entre otros, pueden ser también neuroprotectores al inducir un contraataque electrofílico, un sistema que detoxifica los electrófilos y los elimina inmediatamente (Satoh y cols., 2014). El contraataque electrofílico por pro-oxidantes suaves que no son citotóxicos está mediado por la activación de las vías transcripcionales Keap1/ Nrf2 y HSP90/HSF-1, que

proporcionan una regulación redox eficaz mediante la activación de genes antioxidantes y el restablecimiento de los niveles de GSH celular (Hayes y cols., 2010; Morimoto, 2008). Nuestros datos demuestran que VCE-003.2 previene la citotoxicidad inducida por glutamato en células N2a y restaura los niveles de GSH *in vivo* disminuidos por la intoxicación con 3NP, lo que sugieren que este compuesto es una quinona no citotóxica que favorece el contraataque electrofílico aunque por una vía independiente de la activación de Nrf2.

Por otro lado, durante los últimos años el estudio del potencial terapéutico de los cannabinoides en enfermedades neurodegenerativas ha ido en aumento y se han llevado a cabo ensayos clínicos y preclínicos que han dado buenos resultados para diferentes desórdenes como la esclerosis múltiple y diversas formas de epilepsia (Devinsky y cols., 2016; Langford y cols., 2013). Sin embargo, todos estos estudios se han realizado con cannabinoides neutros, principalmente con THC y CBD, sin prestar atención a las formas ácidas de los cannabinoides. Nuestros resultados evidencian que las formas ácidas tienen un potencial farmacológico importante, siendo Δ^9 -THCA un potente agonista de PPAR γ con efecto neuroprotector en modelos *in vitro* e *in vivo* de la EH. Curiosamente, otros cannabinoides ácidos (CBDA y CBGA) también superan a sus correspondientes cannabinoides neutros en términos de unión a PPAR γ .

El efecto de los cannabinoides ácidos sobre PPAR γ no carece de precedentes. En el organismo, Δ^9 -THC se metaboliza para producir el principal metabolito no psicotrópico, el ácido THC-11-oico. El ácido ajulémico, un cannabinoide sintético inspirado en el ácido THC-11-óico, es un potente agonista de PPAR γ , lo que sugiere que el grupo COOH es crítico para la activación de PPAR γ (Ambrosio y cols., 2007). Además, la aparición de ácido THC-11-óico después del tratamiento con Δ^9 -THC podría explicar por qué algunos efectos biológicos de Δ^9 -THC *in vivo* están mediados a través de PPAR γ (Vara y cols., 2013; Fishbein-Kaminietsky y cols., 2014).

Δ^9 -THCA es un cannabinoide no psicotrópico pero su unión a CB₁ es controvertida. Mientras que algunos autores demostraron que se une a CB₁ con un valor K_i de 23,5 nM (Rosenthaler y cols., 2014), estudios previos no habían encontrado actividad sobre el receptor (Ahmed y cols., 2008). Además, se han descrito actividades antieméticas e inmunomoduladoras de Δ^9 -THCA a través de mecanismos dependientes e independientes de CB₁ respectivamente (Rock y cols., 2008; Verhoeckx y cols., 2006).

Dado que el efecto neuroprotector de Δ^9 -THCA en células STHdh^{Q111/Q111} se anula en presencia de GW9662 suponemos que PPAR γ es el principal responsable de la actividad neuroprotectora y anti-inflamatoria de Δ^9 -THCA.

Diferentes fitocannabinoides, así como la modulación de la activación de los receptores CB₁ y CB₂ han resultado neuroprotectores en distintos modelos de EH (Blazquez y cols., 2011; Palazuelos y cols., 2009; Valdeolivas y cols., 2017). La administración de Δ^9 -THC ejerce efecto neuroprotector en el modelo transgénico murino R6/2 y en modelos inducidos por toxinas a través de CB₁ (Blazquez y cols., 2011). Sin embargo, en otros modelos transgénicos como R6/1 en el que la neurodegeneración estriatal y los síntomas aparecen más tarde, el tratamiento durante 8 semanas con diferentes ligandos cannabinoides o compuestos endocannabinoides no produjo mejoras significativas (Dowie y cols., 2010). La progresión de la EH ocurre concomitantemente con una disminución temprana de los receptores CB₁ pre-sinápticos (McCaw y cols., 2004) y por lo tanto dirigirse a los receptores CB₁ puede ser una estrategia terapéutica plausible únicamente en las etapas iniciales de la EH. En estadios más avanzados el uso de fármacos con efectos antiinflamatorios podría ser más beneficioso. En este sentido, se ha demostrado que los fármacos dirigidos a CB₂ o PPAR γ son efectivos atenuando la inflamación de la microglía y modulando la respuesta inmune adaptativa periférica (Kim y cols., 2015).

Los ligandos de PPAR γ incluyen una amplia gama de moléculas naturales y sintéticas, entre las que se encuentran las glitazonas, cuyos efectos secundarios se han comentado anteriormente. Entre estos secundarios se encuentra la osteoporosis y el mayor riesgo de fracturas periféricas como el resultado de la inhibición de la osteoblastogénesis en la médula ósea (Grey y cols., 2007). PPAR γ controla la masa ósea regulando la diferenciación de las MSCs hacia osteoblastos y adipocitos. Se conoce que las TZDs suprimen la diferenciación a osteoblastos y promueven el desarrollo de adipocitos (Benvenuti y cols., 2007). Más recientemente, se ha descrito que RGZ estimula la diferenciación a osteoblastos de MSCs humanas, pero esta diferenciación se acompaña de estrés oxidativo y apoptosis, dando como resultado una pérdida neta de osteoblastos en la médula ósea (Brueedigam y cols., 2010). Nuestros resultados muestran que Δ^9 -THCA es significativamente menos adipogénico que la RGZ y es capaz de mejorar la osteoblastogénesis en MSCs. Aunque el mecanismo de acción exacto de Δ^9 -THCA sobre PPAR γ no se conoce, este cannabinoide se comporta como un ligando

PPAR γ que podría ser utilizado para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y también como base para desarrollar nuevos agonistas de PPAR γ .

En modelos animales de EH, la administración de agonistas de PPAR γ protege frente a la neurodegeneración estriatal inducida por Htt mutada, atenúa la neuroinflamación y disminuye el daño oxidativo (Chiang y cols., 2015; Jin y cols., 2013; Stergiopoulos y Politis, 2013). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento tanto con VCE-003.2 como con Δ^9 -THCA reduce la neurodegeneración estriatal y la sintomatología asociada inducidas por 3NP. En concordancia con estudios anteriores que han puesto en evidencia la capacidad de los agonistas de PPAR γ de prevenir la activación de la microglía y de promover la supervivencia neuronal y la eliminación de la microglía activada por apoptosis (Bernardo y Minghetti, 2006). VCE-003.2 y Δ^9 -THCA fueron capaces de prevenir la activación de las células de la glía en este modelo.

En los últimos años se ha sugerido que la alteración de PGC-1 α , un co-regulador transcripcional clave en la biogénesis mitocondrial y metabolismo celular, podría favorecer la disfunción mitocondrial en EH (Liang y cols., 2006). Estos estudios refuerzan la idea de que los agonistas de PPAR γ pueden favorecer la función mitocondrial, contribuyendo a prevenir la neurodegeneración en EH (Johri y cols., 2013). Nuestros resultados muestran como Δ^9 -THCA aumenta la masa mitocondrial en la línea neuronal N2a.

El potencial terapéutico del nuevo compuesto cannabinoide VCE-003.2 y el fitocannabinoide ácido Δ^9 -THCA podría superar algunos de los obstáculos terapéuticos de los fármacos basados en cannabinoides en enfermedades neurodegenerativas. Existen grandes expectativas en cuanto al uso de compuestos cannabinoides como tratamiento sintomático, como ya se ha demostrado y aprobado para el dolor neuropático y la espasticidad en la esclerosis múltiple (Di Marzo y cols., 2015). En general, el escenario emergente de las terapias basadas en cannabinoides para enfermedades del ganglio basal y otros trastornos neurodegenerativos sugiere que el uso de preparaciones de cannabinoides específicas con diferentes objetivos moleculares y la mejora química de sus propiedades farmacológicas podría lograr importantes beneficios que atenúen la progresión de la enfermedad y los síntomas.

VI. Conclusiones

1. El derivado de cannabidiol VCE-004.3 es un agonista dual PPAR γ /CB $_2$ con actividad antagonista de CB $_1$

2. El derivado de cannabidiol VCE-004.8 es un agonista dual PPAR γ /CB $_2$

3. VCE-004.8 y VCE-004.3 inhiben la activación de mecanismos profibróticos *in vitro*

4. VCE-004.8 y VCE-004.3 muestran un excelente perfil de eficacia por vía intraperitoneal y tópica en el modelo murino de Esclerodermia inducida por bleomicina.

5. El derivado de cannabigerol VCE-003.2 es un agonista de PPAR γ con actividad neuroprotectora *in vitro* e *in vivo*.

6. Los fitocannabinoides ácidos Δ^9 -THCA, CBDA y CBGA presentan una mayor afinidad a PPAR γ que los fitocannabinoides neutros Δ^9 -THC, CBD y CBG.

7. Δ^9 -THCA es un agonista de PPAR γ con actividad neuroprotectora *in vitro* e *in vivo*.

VI. Referencias

- AHMADIAN, M., SUH, J. M., HAH, N., LIDDLE, C., ATKINS, A. R., DOWNES, M. & EVANS, R. M. 2013. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*, 19, 557-66.
- AHMED, S. A., ROSS, S. A., SLADE, D., RADWAN, M. M., ZULFIQAR, F., MATSUMOTO, R. R., XU, Y. T., VIARD, E., SPETH, R. C., KARAMYAN, V. T. & ELSOHLY, M. A. 2008. Cannabinoid ester constituents from high-potency *Cannabis sativa*. *J Nat Prod*, 71, 536-42.
- AKHMETSHINA, A., DEES, C., BUSCH, N., BEER, J., SARTER, K., ZWERINA, J., ZIMMER, A., DISTLER, O., SCHETT, G. & DISTLER, J. H. 2009. The cannabinoid receptor CB2 exerts antifibrotic effects in experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum*, 60, 1129-36.
- ALBIN, R. L., REINER, A., ANDERSON, K. D., DURE, L. S. T., HANDELIN, B., BALFOUR, R., WHETSELL, W. O., JR., PENNEY, J. B. & YOUNG, A. B. 1992. Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol*, 31, 425-30.
- AMBROSIO, A. L., DIAS, S. M., POLIKARPOV, I., ZURIER, R. B., BURSTEIN, S. H. & GARRATT, R. C. 2007. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, 282, 18625-33.
- ANDRE, C. M., HAUSMAN, J. F. & GUERRIERO, G. 2016. *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci*, 7, 19.
- ARANDA, A. & PASCUAL, A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, 81, 1269-304.
- ARINGER, M. & ERLER, A. 2017. Recent advances in managing systemic sclerosis. *F1000Res*, 6, 88.
- ASANO, Y. & SATO, S. 2015. Vasculopathy in scleroderma. *Semin Immunopathol*, 37, 489-500.
- AVOUAC, J., ELHAI, M. & ALLANORE, Y. 2013. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine*, 80, 23-8.
- BALISTRERI, E., GARCIA-GONZALEZ, E., SELVI, E., AKHMETSHINA, A., PALUMBO, K., LORENZINI, S., MAGGIO, R., LUCATELLI, M., GALEAZZI, M. & DISTLER, J. W. 2011. The cannabinoid WIN55, 212-2 abrogates dermal fibrosis in scleroderma bleomycin model. *Ann Rheum Dis*, 70, 695-9.
- BARONI, S. S., SANTILLO, M., BEVILACQUA, F., LUCHETTI, M., SPADONI, T., MANCINI, M., FRATICELLI, P., SAMBO, P., FUNARO, A., KAZLAUSKAS, A., AVVEDIMENTO, E. V. & GABRIELLI, A. 2006. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med*, 354, 2667-76.
- BATTISTA, N., BARI, M., TARDITI, A., MARIOTTI, C., BACHOUD-LEVI, A. C., ZUCCATO, C., FINAZZI-AGRO, A., GENITRINI, S., PESCHANSKI, M., DI DONATO, S., CATTANEO, E. & MACCARRONE, M. 2007. Severe deficiency of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity segregates with the Huntington's disease mutation in peripheral lymphocytes. *Neurobiol Dis*, 27, 108-16.
- BEN-HUR, T., BEN-MENACHEM, O., FURER, V., EINSTEIN, O., MIZRACHI-KOL, R. & GRIGORIADIS, N. 2003. Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*, 24, 623-31.

- BENCHOUA, A., TRIOULIER, Y., ZALA, D., GAILLARD, M. C., LEFORT, N., DUFOUR, N., SAUDOU, F., ELALOUF, J. M., HIRSCH, E., HANTRAYE, P., DEGLON, N. & BROUILLET, E. 2006. Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Mol Biol Cell*, 17, 1652-63.
- BENVENUTI, S., CELLAI, I., LUCIANI, P., DELEDDA, C., BAGLIONI, S., GIULIANI, C., SACCARDI, R., MAZZANTI, B., DAL POZZO, S., MANNUCCI, E., PERI, A. & SERIO, M. 2007. Rosiglitazone stimulates adipogenesis and decreases osteoblastogenesis in human mesenchymal stem cells. *J Endocrinol Invest*, 30, RC26-30.
- BERNARDO, A. & MINGHETTI, L. 2006. PPAR-gamma agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation. *Curr Pharm Des*, 12, 93-109.
- BEYER, C., SCHETT, G., DISTLER, O. & DISTLER, J. H. 2010. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum*, 62, 2831-44.
- BIRO, T., TOTH, B. I., HASKO, G., PAUS, R. & PACHER, P. 2009. The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 411-20.
- BISOGNO, T., MELCK, D., BOBROV, M., GRETSKAYA, N. M., BEZUGLOV, V. V., DE PETROCELLIS, L. & DI MARZO, V. 2000. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J*, 351 Pt 3, 817-24.
- BLAZQUEZ, C., CHIARLONE, A., SAGREDO, O., AGUADO, T., PAZOS, M. R., RESEL, E., PALAZUELOS, J., JULIEN, B., SALAZAR, M., BORNER, C., BENITO, C., CARRASCO, C., DIEZ-ZAERA, M., PAOLETTI, P., DIAZ-HERNANDEZ, M., RUIZ, C., SENDTNER, M., LUCAS, J. J., DE YEBENES, J. G., MARSICANO, G., MONORY, K., LUTZ, B., ROMERO, J., ALBERCH, J., GINES, S., KRAUS, J., FERNANDEZ-RUIZ, J., GALVE-ROPERH, I. & GUZMAN, M. 2011. Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease. *Brain*, 134, 119-36.
- BOLZAN, A. D. & BIANCHI, M. S. 2001. Genotoxicity of streptonigrin: a review. *Mutat Res*, 488, 25-37.
- BORGELT, L. M., FRANSON, K. L., NUSSBAUM, A. M. & WANG, G. S. 2013. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherapy*, 33, 195-209.
- BORRELLI, F., FASOLINO, I., ROMANO, B., CAPASSO, R., MAIELLO, F., COPPOLA, D., ORLANDO, P., BATTISTA, G., PAGANO, E., DI MARZO, V. & IZZO, A. A. 2013. Beneficial effect of the non-psychotropic plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol*, 85, 1306-16.
- BRUEDIGAM, C., EIJKEN, M., KOEDAM, M., VAN DE PEPPEL, J., DRABEK, K., CHIBA, H. & VAN LEEUWEN, J. P. 2010. A new concept underlying stem cell lineage skewing that explains the detrimental effects of thiazolidinediones on bone. *Stem Cells*, 28, 916-27.
- CABRAL, G. A. & GRIFFIN-THOMAS, L. 2009. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med*, 11, e3.
- CARRILLO-SALINAS, F. J., NAVARRETE, C., MECHA, M., FELIU, A., COLLADO, J. A., CANTARERO, I., BELLIDO, M. L., MUNOZ, E. & GUAZA, C. 2014. A

- cannabigerol derivative suppresses immune responses and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*, 9, e94733.
- CASCIO, M. G., GAUSON, L. A., STEVENSON, L. A., ROSS, R. A. & PERTWEE, R. G. 2010. Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent alpha2-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT1A receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, 159, 129-41.
- CLARK, R. B., BISHOP-BAILEY, D., ESTRADA-HERNANDEZ, T., HLA, T., PUDDINGTON, L. & PADULA, S. J. 2000. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol*, 164, 1364-71.
- COMPAGNUCCI, C., DI SIENA, S., BUSTAMANTE, M. B., DI GIACOMO, D., DI TOMMASO, M., MACCARRONE, M., GRIMALDI, P. & SETTE, C. 2013. Type-1 (CB1) cannabinoid receptor promotes neuronal differentiation and maturation of neural stem cells. *PLoS One*, 8, e54271.
- CONDIE, R., HERRING, A., KOH, W. S., LEE, M. & KAMINSKI, N. E. 1996. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2. *J Biol Chem*, 271, 13175-83.
- COPPEN, E. M. & ROOS, R. A. 2017. Current Pharmacological Approaches to Reduce Chorea in Huntington's Disease. *Drugs*, 77, 29-46.
- CROTTI, A., BENNER, C., KERMAN, B. E., GOSSELIN, D., LAGIER-TOURENNE, C., ZUCCATO, C., CATTANEO, E., GAGE, F. H., CLEVELAND, D. W. & GLASS, C. K. 2014. Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. *Nat Neurosci*, 17, 513-21.
- CUI, L., JEONG, H., BOROVECKI, F., PARKHURST, C. N., TANESE, N. & KRAINIC, D. 2006. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, 127, 59-69.
- CURTIS, A., MITCHELL, I., PATEL, S., IVES, N. & RICKARDS, H. 2009. A pilot study using nabilone for symptomatic treatment in Huntington's disease. *Mov Disord*, 24, 2254-9.
- CURTIS, M. A., FAULL, R. L. & GLASS, M. 2006. A novel population of progenitor cells expressing cannabinoid receptors in the subependymal layer of the adult normal and Huntington's disease human brain. *J Chem Neuroanat*, 31, 210-5.
- CHAWLA, A., BARAK, Y., NAGY, L., LIAO, D., TONTONOZ, P. & EVANS, R. M. 2001. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med*, 7, 48-52.
- CHIANG, M. C., CHEN, C. M., LEE, M. R., CHEN, H. W., CHEN, H. M., WU, Y. S., HUNG, C. H., KANG, J. J., CHANG, C. P., CHANG, C., WU, Y. R., TSAI, Y. S. & CHERN, Y. 2010. Modulation of energy deficiency in Huntington's disease via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Hum Mol Genet*, 19, 4043-58.
- CHIANG, M. C., CHENG, Y. C., LIN, K. H. & YEN, C. H. 2013. PPARgamma regulates the mitochondrial dysfunction in human neural stem cells with tumor necrosis factor alpha. *Neuroscience*, 229, 118-29.
- CHIANG, M. C., CHENG, Y. C., NICOL, C. J., LIN, K. H., YEN, C. H., CHEN, S. J. & HUANG, R. N. 2015. Rosiglitazone activation of PPARgamma-dependent signaling is neuroprotective in mutant huntingtin expressing cells. *Exp Cell Res*, 338, 183-93.

- CHINETTI, G., FRUCHART, J. C. & STAELS, B. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*, 49, 497-505.
- DAMIANO, M., GALVAN, L., DEGLON, N. & BROUILLET, E. 2010. Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 52-61.
- DANTAS, A. T., PEREIRA, M. C., DE MELO REGO, M. J., DA ROCHA, L. F., JR., PITTA IDA, R., MARQUES, C. D., DUARTE, A. L. & PITTA, M. G. 2015. The Role of PPAR Gamma in Systemic Sclerosis. *PPAR Res*, 2015, 124624.
- DE MARTINIS, M., CICCARELLI, F., SIRUFO, M. M. & GINALDI, L. 2016. An overview of environmental risk factors in systemic sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol*, 12, 465-78.
- DE PETROCELLIS, L., LIGRESTI, A., MORIELLO, A. S., ALLARA, M., BISOGNO, T., PETROSINO, S., STOTT, C. G. & DI MARZO, V. 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*, 163, 1479-94.
- DEL PAPA, N. & ZACCARA, E. 2015. From mechanisms of action to therapeutic application: A review on current therapeutic approaches and future directions in systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 29, 756-69.
- DESMOULIERE, A., GEINOZ, A., GABBIANI, F. & GABBIANI, G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122, 103-11.
- DEVANE, W. A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R. G., STEVENSON, L. A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A. & MECHOULAM, R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-9.
- DEVINSKY, O., MARSH, E., FRIEDMAN, D., THIELE, E., LAUX, L., SULLIVAN, J., MILLER, I., FLAMINI, R., WILFONG, A., FILLOUX, F., WONG, M., TILTON, N., BRUNO, P., BLUVSTEIN, J., HEDLUND, J., KAMENS, R., MACLEAN, J., NANGIA, S., SINGHAL, N. S., WILSON, C. A., PATEL, A. & CILIO, M. R. 2016. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *Lancet Neurol*, 15, 270-8.
- DI MARZO, V. 2008. Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 160, 1-24.
- DI MARZO, V., BIFULCO, M. & DE PETROCELLIS, L. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 771-84.
- DI MARZO, V., STELLA, N. & ZIMMER, A. 2015. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat Rev Neurosci*, 16, 30-42.
- DIAZ-ALONSO, J., PARAISO-LUNA, J., NAVARRETE, C., DEL RIO, C., CANTARERO, I., PALOMARES, B., AGUARELES, J., FERNANDEZ-RUIZ, J., BELLIDO, M. L., POLLASTRO, F., APPENDINO, G., CALZADO, M. A., GALVE-ROPERH, I. & MUNOZ, E. 2016. VCE-003.2, a novel cannabigerol derivative, enhances neuronal progenitor cell survival and alleviates symptomatology in murine models of Huntington's disease. *Sci Rep*, 6, 29789.
- DOSHI, L. S., BRAHMA, M. K., BAHIRAT, U. A., DIXIT, A. V. & NEMMANI, K. V. 2010. Discovery and development of selective PPAR gamma modulators as safe and effective antidiabetic agents. *Expert Opin Investig Drugs*, 19, 489-512.
- DOWIE, M. J., HOWARD, M. L., NICHOLSON, L. F., FAULL, R. L., HANNAN, A. J. & GLASS, M. 2010. Behavioural and molecular consequences of chronic

- cannabinoid treatment in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience*, 170, 324-36.
- DUAN, S. Z., USHER, M. G. & MORTENSEN, R. M. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ Res*, 102, 283-94.
- EHRlich, M. E. 2012. Huntington's disease and the striatal medium spiny neuron: cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of disease. *Neurotherapeutics*, 9, 270-84.
- ELLMAN, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82, 70-7.
- FELLERMEIER, M. & ZENK, M. H. 1998. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett*, 427, 283-5.
- FERNAGUT, P. O., DIGUET, E., STEFANOVA, N., BIRAN, M., WENNING, G. K., CANIONI, P., BIOULAC, B. & TISON, F. 2002. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterization. *Neuroscience*, 114 (4), 1005-1017.
- FERNANDEZ-MARCOS, P. J. & AUWERX, J. 2011. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*, 93, 884S-90.
- FERNANDEZ-RUIZ, J., MORENO-MARTET, M., RODRIGUEZ-CUETO, C., PALOMO-GARO, C., GOMEZ-CANAS, M., VALDEOLIVAS, S., GUAZA, C., ROMERO, J., GUZMAN, M., MECHOULAM, R. & RAMOS, J. A. 2011. Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br J Pharmacol*, 163, 1365-78.
- FISHBEIN-KAMINIETSKY, M., GAFNI, M. & SARNE, Y. 2014. Ultralow doses of cannabinoid drugs protect the mouse brain from inflammation-induced cognitive damage. *J Neurosci Res*, 92, 1669-77.
- FUKUI, H. & MORAES, C. T. 2007. Extended polyglutamine repeats trigger a feedback loop involving the mitochondrial complex III, the proteasome and huntingtin aggregates. *Hum Mol Genet*, 16, 783-97.
- FUSCHIOTTI, P. 2016. Current perspectives on the immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Immunotargets Ther*, 5, 21-35.
- GALUPPO, M., ESPOSITO, E., MAZZON, E., DI PAOLA, R., PATERNITI, I., IMPELLIZZERI, D. & CUZZOCREA, S. 2011. MEK inhibition suppresses the development of lung fibrosis in the bleomycin model. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 384, 21-37.
- GARCIA-GONZALEZ, E., SELVI, E., BALISTRERI, E., LORENZINI, S., MAGGIO, R., NATALE, M. R., CAPECCHI, P. L., LAZZERINI, P. E., BARDELLI, M., LAGHI-PASINI, F. & GALEAZZI, M. 2009. Cannabinoids inhibit fibrogenesis in diffuse systemic sclerosis fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*, 48, 1050-6.
- GHOSH, A. K., BHATTACHARYYA, S., WEI, J., KIM, S., BARAK, Y., MORI, Y. & VARGA, J. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *FASEB J*, 23, 2968-77.
- GHOSH, S., PATEL, N., RAHN, D., MCALLISTER, J., SADEGHI, S., HORWITZ, G., BERRY, D., WANG, K. X. & SWERDLOW, R. H. 2007. The thiazolidinedione pioglitazone alters mitochondrial function in human neuron-like cells. *Mol Pharmacol*, 71, 1695-702.
- GIANNUZZI, V., CONTE, R., LANDI, A., OTTOMANO, S. A., BONIFAZI, D., BAIARDI, P., BONIFAZI, F. & CECI, A. 2017. Orphan medicinal products in

- Europe and United States to cover needs of patients with rare diseases: an increased common effort is to be foreseen. *Orphanet J Rare Dis*, 12, 64.
- GIL, J. M. & REGO, A. C. 2008. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci*, 27, 2803-20.
- GILBANE, A. J., DENTON, C. P. & HOLMES, A. M. 2013. Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells. *Arthritis Res Ther*, 15, 215.
- GONZALEZ, E. G., SELVI, E., BALISTRERI, E., AKHMETSHINA, A., PALUMBO, K., LORENZINI, S., LAZZERINI, P. E., MONTILLI, C., CAPECCHI, P. L., LUCATTELLI, M., BALDI, C., GIANCHECCHI, E., GALEAZZI, M., PASINI, F. L. & DISTLER, J. H. 2012. Synthetic cannabinoid ajulemic acid exerts potent antifibrotic effects in experimental models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 71, 1545-51.
- GRANJA, A. G., CARRILLO-SALINAS, F., PAGANI, A., GOMEZ-CANAS, M., NEGRI, R., NAVARRETE, C., MECHA, M., MESTRE, L., FIEBICH, B. L., CANTARERO, I., CALZADO, M. A., BELLIDO, M. L., FERNANDEZ-RUIZ, J., APPENDINO, G., GUAZA, C. & MUNOZ, E. 2012. A cannabigerol quinone alleviates neuroinflammation in a chronic model of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7, 1002-16.
- GREY, A., BOLLAND, M., GAMBLE, G., WATTIE, D., HORNE, A., DAVIDSON, J. & REID, I. R. 2007. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 1305-10.
- GRUBER, B. L. 2003. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*, 5, 147-53.
- GULBAKAN, B., OZGUL, R. K., YUZBASIOGLU, A., KOHL, M., DEIGNER, H. P. & OZGUC, M. 2016. Discovery of biomarkers in rare diseases: innovative approaches by predictive and personalized medicine. *EPMA J*, 7, 24.
- HANUS, L., ABU-LAFI, S., FRIDE, E., BREUER, A., VOGEL, Z., SHALEV, D. E., KUSTANOVICH, I. & MECHOULAM, R. 2001. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3662-5.
- HANUS, L. O., MEYER, S. M., MUNOZ, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O. & APPENDINO, G. 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat Prod Rep*, 33, 1357-1392.
- HARRIS, S. G. & PHIPPS, R. P. 2001. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol*, 31, 1098-105.
- HAUSER, S., ADELMANT, G., SARRAF, P., WRIGHT, H. M., MUELLER, E. & SPIEGELMAN, B. M. 2000. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem*, 275, 18527-33.
- HAYES, J. D., MCMAHON, M., CHOWDHRY, S. & DINKOVA-KOSTOVA, A. T. 2010. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal*, 13, 1713-48.
- HORNE, E. A., COY, J., SWINNEY, K., FUNG, S., CHERRY, A. E., MARRS, W. R., NAYDENOV, A. V., LIN, Y. H., SUN, X., KEENE, C. D., GROUZMANN, E., MUCHOWSKI, P., BATES, G. P., MACKIE, K. & STELLA, N. 2013. Downregulation of cannabinoid receptor 1 from neuropeptide Y interneurons in

- the basal ganglia of patients with Huntington's disease and mouse models. *Eur J Neurosci*, 37, 429-40.
- HUANG, S. M., BISOGNO, T., TREVISANI, M., AL-HAYANI, A., DE PETROCELLIS, L., FEZZA, F., TOGNETTO, M., PETROS, T. J., KREY, J. F., CHU, C. J., MILLER, J. D., DAVIES, S. N., GEPPETTI, P., WALKER, J. M. & DI MARZO, V. 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8400-5.
- HUBNER, R. H., GITTER, W., EL MOKHTARI, N. E., MATHIAK, M., BOTH, M., BOLTE, H., FREITAG-WOLF, S. & BEWIG, B. 2008. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques*, 44, 507-11, 514-7.
- HUNTINGTON STUDY GROUP. 1996. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. *Mov Disord*, 11, 136-42.
- IZZO, A. A., BORRELLI, F., CAPASSO, R., DI MARZO, V. & MECHOULAM, R. 2009. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 515-27.
- JADOON, K. A., RATCLIFFE, S. H., BARRETT, D. A., THOMAS, E. L., STOTT, C., BELL, J. D., O'SULLIVAN, S. E. & TAN, G. D. 2016. Efficacy and Safety of Cannabidiol and Tetrahydrocannabivarin on Glycemic and Lipid Parameters in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel Group Pilot Study. *Diabetes Care*, 39, 1777-86.
- JELASKA, A. & KORN, J. H. 2000. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 43, 2230-9.
- JIANG, C., TING, A. T. & SEED, B. 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391, 82-6.
- JIN, J., ALBERTZ, J., GUO, Z., PENG, Q., RUDOW, G., TRONCOSO, J. C., ROSS, C. A. & DUAN, W. 2013. Neuroprotective effects of PPAR-gamma agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem*, 125, 410-9.
- JINNIN, M. 2010. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol*, 37, 11-25.
- JOHRI, A., CHANDRA, A. & BEAL, M. F. 2013. PGC-1alpha, mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. *Free Radic Biol Med*, 62, 37-46.
- JONSSON, K. O., PERSSON, E. & FOWLER, C. J. 2006. The cannabinoid CB2 receptor selective agonist JWH133 reduces mast cell oedema in response to compound 48/80 in vivo but not the release of beta-hexosaminidase from skin slices in vitro. *Life Sci*, 78, 598-606.
- JOSHI, G., HARDAS, S., SULTANA, R., ST CLAIR, D. K., VORE, M. & BUTTERFIELD, D. A. 2007. Glutathione elevation by gamma-glutamyl cysteine ethyl ester as a potential therapeutic strategy for preventing oxidative stress in brain mediated by in vivo administration of adriamycin: Implication for chemobrain. *J Neurosci Res*, 85, 497-503.
- JULIEN, B., GRENARD, P., TEIXEIRA-CLERC, F., VAN NHIEU, J. T., LI, L., KARSAK, M., ZIMMER, A., MALLAT, A. & LOTERSZTAJN, S. 2005. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology*, 128, 742-55.
- KAPADIA, R., YI, J. H. & VEMUGANTI, R. 2008. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci*, 13, 1813-26.

- KARNIOL, I. G., SHIRAKAWA, I., KASINSKI, N., PFEFERMAN & CARLINI, E. A. 1974. Cannabidiol interferes with the effects of delta 9-tetrahydrocannabinol in man. *Eur J Pharmacol*, 28, 172-177.
- KATCHAN, V., DAVID, P. & SHOENFELD, Y. 2016. Cannabinoids and autoimmune diseases: A systematic review. *Autoimmun Rev*, 15, 513-28.
- KAUR, R., SIDHU, P. & SINGH, S. 2016. What failed BIA 10-2474 Phase I clinical trial? Global speculations and recommendations for future Phase I trials. *J Pharmacol Pharmacother*, 7, 120-6.
- KAYSER, C. & FRITZLER, M. J. 2015. Autoantibodies in systemic sclerosis: unanswered questions. *Front Immunol*, 6, 167.
- KEMP, J. M. & POWELL, T. P. 1971. The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 262, 383-401.
- KIM, J. H., SONG, J. & PARK, K. W. 2015. The multifaceted factor peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in metabolism, immunity, and cancer. *Arch Pharm Res*, 38, 302-12.
- KLOTZ, L., BURGDORF, S., DANI, I., SAIJO, K., FLOSSDORF, J., HUCKE, S., ALFERINK, J., NOWAK, N., BEYER, M., MAYER, G., LANGHANS, B., KLOCKGETHER, T., WAISMAN, A., EBERL, G., SCHULTZE, J., FAMULOK, M., KOLANUS, W., GLASS, C., KURTS, C. & KNOLLE, P. A. 2009. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med*, 206, 2079-89.
- KOGAN, N. M., SCHLESINGER, M., PRIEL, E., RABINOWITZ, R., BERENSHTEIN, E., CHEVION, M. & MECHOULAM, R. 2007. HU-331, a novel cannabinoid-based anticancer topoisomerase II inhibitor. *Mol Cancer Ther*, 6, 173-83.
- KONO, Y. 1978. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*, 186, 189-95.
- KRIEG, T. & TAKEHARA, K. 2009. Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*, 48 Suppl 3, iii14-8.
- KUMAR, A., VAISH, M. & RATAN, R. R. 2014. Transcriptional dysregulation in Huntington's disease: a failure of adaptive transcriptional homeostasis. *Drug Discov Today*, 19, 956-62.
- LANGFORD, R. M., MARES, J., NOVOTNA, A., VACHOVA, M., NOVAKOVA, I., NOTCUTT, W. & RATCLIFFE, S. 2013. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis. *J Neurol*, 260, 984-97.
- LASTRES-BECKER, I., BIZAT, N., BOYER, F., HANTRAYE, P., FERNANDEZ-RUIZ, J. & BROUILLET, E. 2004. Potential involvement of cannabinoid receptors in 3-nitropropionic acid toxicity in vivo. *Neuroreport*, 15, 2375-9.
- LEASK, A. 2012. MEK/ERK inhibitors: proof-of-concept studies in lung fibrosis. *J Cell Commun Signal*, 6, 59-60.
- LECKA-CZERNIK, B., MOERMAN, E. J., GRANT, D. F., LEHMANN, J. R., MANOLAGAS, S. C. & JILKA, R. L. 2002. Divergent Effects of Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma2 Ligands on Adipocyte Versus Osteoblast Differentiation. *Endocrinology*, 143, 2376-2384.
- LEE, J. J. & POPE, J. E. 2016. Diagnosis and Management of Systemic Sclerosis: A Practical Approach. *Drugs*, 76, 203-13.
- LEHRKE, M. & LAZAR, M. A. 2005. The many faces of PPARgamma. *Cell*, 123, 993-9.

- LIANG H. & WARD, W. F. 2006. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.*, 30:145–151.
- LIGRESTI, A., DE PETROCELLIS, L. & DI MARZO, V. 2016. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol Rev*, 96, 1593-659.
- LIM, D., FEDRIZZI, L., TARTARI, M., ZUCCATO, C., CATTANEO, E., BRINI, M. & CARAFOLI, E. 2008. Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *J Biol Chem*, 283, 5780-9.
- LIM, M. P., DEVI, L. A. & ROZENFELD, R. 2011. Cannabidiol causes activated hepatic stellate cell death through a mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cell Death Dis*, 2, e170.
- LIU, J., GAO, B., MIRSHAHI, F., SANYAL, A. J., KHANOLKAR, A. D., MAKRIYANNIS, A. & KUNOS, G. 2000. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J*, 346 Pt 3, 835-40.
- LODZKI, M., GODIN, B., RAKOU, L., MECHOULAM, R., GALLILY, R. & TOUITOU, E. 2003. Cannabidiol-transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *J Control Release*, 93, 377-87.
- LOPEZ-SENDON MORENO, J. L., GARCIA CALDENTEY, J., TRIGO CUBILLO, P., RUIZ ROMERO, C., GARCIA RIBAS, G., ALONSO ARIAS, M. A., GARCIA DE YEBENES, M. J., TOLON, R. M., GALVE-ROPERH, I., SAGREDO, O., VALDEOLIVAS, S., RESEL, E., ORTEGA-GUTIERREZ, S., GARCIA-BERMEJO, M. L., FERNANDEZ RUIZ, J., GUZMAN, M. & GARCIA DE YEBENES PROUS, J. 2016. A double-blind, randomized, cross-over, placebo-controlled, pilot trial with Sativex in Huntington's disease. *J Neurol*, 263, 1390-400.
- LU, H. R., ZHU, H., HUANG, M., CHEN, Y., CAI, Y. J., MIAO, Z. H., ZHANG, J. S. & DING, J. 2005. Reactive oxygen species elicit apoptosis by concurrently disrupting topoisomerase II and DNA-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol*, 68, 983-94.
- LUCK, H. (1971). Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzyme analysis*. New York: Academic Press; p. 885.
- MACDONALD, M. E., AMBROSE, C. M., DUYAO, M. P., MYERS, R. H., LIN, C., SRINIDHI, L., BARNES, G., TAYLOR, S. A., JAMES, M., GROOT, N. & MACFARLANE, H. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72, 971-83.
- MACKIE, K. 2008. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 10-4.
- MADALA, S. K., SCHMIDT, S., DAVIDSON, C., IKEGAMI, M., WERT, S. & HARDIE, W. D. 2012. MEK-ERK pathway modulation ameliorates pulmonary fibrosis associated with epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46, 380-8.
- MARQUART, S., ZERR, P., AKHMETSHINA, A., PALUMBO, K., REICH, N., TOMCIK, M., HORN, A., DEES, C., ENGEL, M., ZWERINA, J., DISTLER, O., SCHETT, G. & DISTLER, J. H. 2010. Inactivation of the cannabinoid receptor CB1 prevents leukocyte infiltration and experimental fibrosis. *Arthritis Rheum*, 62, 3467-76.
- MASSI, A.T. 1980. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American

Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum*, 23, 581-90.

- MATSUDA, L. A., LOLAIT, S. J., BROWNSTEIN, M. J., YOUNG, A. C. & BONNER, T. I. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-4.
- MCCAWE, E. A., HU, H., GOMEZ, G. T., HEBB, A. L., KELLY, M. E. & DENOVAN-WRIGHT, E. M. 2004. Structure, expression and regulation of the cannabinoid receptor gene (CB1) in Huntington's disease transgenic mice. *Eur J Biochem*, 271, 4909-20.
- MCPARTLAND, J. M. 2008. Expression of the endocannabinoid system in fibroblasts and myofascial tissues. *J Bodyw Mov Ther*; 12, 169-82.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N. E., SCHATZ, A. R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B. R., COMPTON, D. R. & COLS. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50, 83-90.
- MECHOULAM, R. & GAONI, Y. 1965. A Total Synthesis of D Δ -1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*, 87, 3273-5.
- MECHOULAM, R., PETERS, M., MURILLO-RODRIGUEZ, E. & HANUS, L. O. 2007. Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers*, 4, 1678-92.
- MESTRE, T. A. & SAMPAIO, C. 2017. Huntington Disease: Linking Pathogenesis to the Development of Experimental Therapeutics. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17, 18.
- MILMAN, G., MAOR, Y., ABU-LAFI, S., HOROWITZ, M., GALLILY, R., BATKAI, S., MO, F. M., OFFERTALER, L., PACHER, P., KUNOS, G. & MECHOULAM, R. 2006. N-arachidonoyl L-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2428-33.
- MILLER, L. K. & DEVI, L. A. 2011. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol Rev*, 63, 461-70.
- MORIMOTO, R. I. 2008. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev*, 22, 1427-38.
- MUNOZ-LUQUE, J., ROS, J., FERNANDEZ-VARO, G., TUGUES, S., MORALES-RUIZ, M., ALVAREZ, C. E., FRIEDMAN, S. L., ARROYO, V. & JIMENEZ, W. 2008. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 475-83.
- MUNRO, S., THOMAS, K. L. & ABU-SHAAR, M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-5.
- NAYAK, A., ANSAR, R., VERMA, S. K., BONIFATI, D. M. & KISHORE, U. 2011. Huntington's Disease: An Immune Perspective. *Neurol Res Int*, 2011, 563784.
- O'REILLY, S., HUGLE, T. & VAN LAAR, J. M. 2012. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology (Oxford)*, 51, 1540-9.
- O'SULLIVAN, S. E. 2007. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*, 152, 576-82.
- OBARA, W., KAWA, Y., RA, C., NISHIOKA, K., SOMA, Y. & MIZOGUCHI, M. 2002. T cells and mast cells as a major source of interleukin-13 in atopic dermatitis. *Dermatology*, 205, 11-7.

- OKADA, Y., REINACH, P. S., SHIRAI, K., KITANO, A., KAO, W. W., FLANDERS, K. C., MIYAJIMA, M., LIU, H., ZHANG, J. & SAIKA, S. 2011. TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice. *Am J Pathol*, 178, 2654-64.
- ORR, A. L., LI, S., WANG, C. E., LI, H., WANG, J., RONG, J., XU, X., MASTROBERARDINO, P. G., GREENAMYRE, J. T. & LI, X. J. 2008. N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J Neurosci*, 28, 2783-92.
- PACHER, P., BATKAI, S. & KUNOS, G. 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58, 389-462.
- PALAZUELOS, J., AGUADO, T., PAZOS, M. R., JULIEN, B., CARRASCO, C., RESEL, E., SAGREDO, O., BENITO, C., ROMERO, J., AZCOITIA, I., FERNANDEZ-RUIZ, J., GUZMAN, M. & GALVE-ROPERH, I. 2009. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain*, 132, 3152-64.
- PALUMBO-ZERR, K., HORN, A., DISTLER, A., ZERR, P., DEES, C., BEYER, C., SELVI, E., CRAVATT, B. F., DISTLER, O., SCHETT, G. & DISTLER, J. H. 2012. Inactivation of fatty acid amide hydrolase exacerbates experimental fibrosis by enhanced endocannabinoid-mediated activation of CB1. *Ann Rheum Dis*, 71, 2051-4.
- PARK, B. V. & PAN, F. 2015. The role of nuclear receptors in regulation of Th17/Treg biology and its implications for diseases. *Cell Mol Immunol*, 12, 533-42.
- PATTANAIK, D., BROWN, M., POSTLETHWAITE, B. C. & POSTLETHWAITE, A. E. 2015. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front Immunol*, 6, 272.
- PAZOS, M. R., SAGREDO, O. & FERNANDEZ-RUIZ, J. 2008a. The endocannabinoid system in Huntington's disease. *Curr Pharm Des*, 14, 2317-25.
- PAZOS, M. R., TOLON, R. M., BENITO, C., RODRIGUEZ, C. F., GORGOJO, J. J., NEVADO, M., ALVAREZ, M., ARIAS, F., ALMODOVAR, F., FERNANDEZ, M. T., LLEDO, J. L., GONZALEZ, S., FERNANDEZ-RUIZ, J. J. & ROMERO, J. 2008b. Cannabinoid CB1 receptors are expressed by parietal cells of the human gastric mucosa. *J Histochem Cytochem*, 56, 511-6.
- PELICANO, H., CARNEY, D. & HUANG, P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*, 7, 97-110.
- PERTWEE, R. G. 2008. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol*, 13, 147-59.
- PERTWEE, R. G., HOWLETT, A. C., ABOOD, M. E., ALEXANDER, S. P., DI MARZO, V., ELPHICK, M. R., GREASLEY, P. J., HANSEN, H. S., KUNOS, G., MACKIE, K., MECHOULAM, R. & ROSS, R. A. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev*, 62, 588-631.
- PERTWEE, R. G. & ROSS, R. A. 2002. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 101-21.
- PORTER, A. C., SAUER, J. M., KNIERMAN, M. D., BECKER, G. W., BERNA, M. J., BAO, J., NOMIKOS, G. G., CARTER, P., BYMASTER, F. P., LEESE, A. B. & FELDER, C. C. 2002. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301, 1020-4.
- PUIGSERVER, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*, 24, 78-90.
- QUINTANILLA, R. A., JIN, Y. N., FUENZALIDA, K., BRONFMAN, M. & JOHNSON, G. V. 2008. Rosiglitazone treatment prevents mitochondrial dysfunction in mutant

- huntingtin-expressing cells: possible role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in the pathogenesis of Huntington disease. *J Biol Chem*, 283, 25628-37.
- RAJESH, M., MUKHOPADHYAY, P., HASKO, G., HUFFMAN, J. W., MACKIE, K. & PACHER, P. 2008a. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol*, 153, 347-57.
- RAJESH, M., MUKHOPADHYAY, P., HASKO, G. & PACHER, P. 2008b. Cannabinoid CB1 receptor inhibition decreases vascular smooth muscle migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 377, 1248-52.
- RAMASWAMY, S., MCBRIDE, J. L. & KORDOWER, J. H. 2007. Animal models of Huntington's disease. *ILAR J*, 48, 356-73.
- RASTINEJAD, F., HUANG, P., CHANDRA, V. & KHORASANIZADEH, S. 2013. Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *J Mol Endocrinol*, 51, T1-T21.
- RENAUDINEAU, Y., REVELEN, R., LEVY, Y., SALOJIN, K., GILBURG, B., SHOENFELD, Y. & YOUINO, P. 1999. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6, 156-60.
- RICOTE, M., LI, A. C., WILLSON, T. M., KELLY, C. J. & GLASS, C. K. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391, 79-82.
- RIEDER, S. A., CHAUHAN, A., SINGH, U., NAGARKATTI, M. & NAGARKATTI, P. 2010. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology*, 215, 598-605.
- RIZOS, C. V., KEI, A. & ELISAF, M. S. 2016. The current role of thiazolidinediones in diabetes management. *Arch Toxicol*, 90, 1861-81.
- ROCK, E. M., LIMEBEER, C. L., MECOULAM, R., PIOMELLI, D. & PARKER, L. A. 2008. The effect of cannabidiol and URB597 on conditioned gaping (a model of nausea) elicited by a lithium-paired context in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 196, 389-95.
- ROSENTHALER, S., POHN, B., KOLMANZ, C., HUU, C. N., KREWENKA, C., HUBER, A., KRANNER, B., RAUSCH, W. D. & MOLDZIO, R. 2014. Differences in receptor binding affinity of several phytocannabinoids do not explain their effects on neural cell cultures. *Neurotoxicol Teratol*, 46, 49-56.
- ROSS, C. A. & TABRIZI, S. J. 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*, 10, 83-98.
- SAGREDO, O., RAMOS, J. A., DECIO, A., MECOULAM, R. & FERNANDEZ-RUIZ, J. 2007. Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid in vivo by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors. *Eur J Neurosci*, 26, 843-51.
- SAPPINO, A. P., MASOUE, I., SAURAT, J. H. & GABBIANI, G. 1990. Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *Am J Pathol*, 137, 585-91.
- SATO, T., MCKERCHER, S. R. & LIPTON, S. A. 2014. Reprint of: Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radic Biol Med*, 66, 45-57.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- SCHROT, R. J. & HUBBARD, J. R. 2016. Cannabinoids: Medical implications. *Ann Med*, 48, 128-41.

- SERVETTAZ, A., KAVIAN, N., NICCO, C., DEVEAUX, V., CHEREAU, C., WANG, A., ZIMMER, A., LOTERSZTAJN, S., WEILL, B. & BATTEUX, F. 2010. Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. *Am J Pathol*, 177, 187-96.
- SEVER, R. & GLASS, C. K. 2013. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a016709.
- SHIN, J. Y., FANG, Z. H., YU, Z. X., WANG, C. E., LI, S. H. & LI, X. J. 2005. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol*, 171, 1001-12.
- SIEGMUND, S. V., UCHINAMI, H., OSAWA, Y., BRENNER, D. A. & SCHWABE, R. F. 2005. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology*, 41, 1085-95.
- STERGIOPOULOS, A. & POLITIS, P. K. 2013. The role of nuclear receptors in controlling the fine balance between proliferation and differentiation of neural stem cells. *Arch Biochem Biophys*, 534, 27-37.
- SUGIURA, T., KONDO, S., SUKAGAWA, A., NAKANE, S., SHINODA, A., ITOH, K., YAMASHITA, A. & WAKU, K. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215, 89-97.
- SUMAGIN, R., LOMAKINA, E. & SARELIUS, I. H. 2008. Leukocyte-endothelial cell interactions are linked to vascular permeability via ICAM-1-mediated signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, H969-H977.
- SUN, Y., LIU, W.Z., LIU, T., FENG, X., YANG, N., & ZHOU, H.F. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptor & Signal Transduction Research*, 35, 600–604.
- SWINNEY, D. C. & XIA, S. 2014. The discovery of medicines for rare diseases. *Future Med Chem*, 6, 987-1002.
- SZELES, L., TOROCSI, D. & NAGY, L. 2007. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1771, 1014-30.
- TARUSCIO, D., GENTILE, A. E., EVANGELISTA, T., FRAZZICA, R. G., BUSHBY, K. & MONTERRAT, A. M. 2014. Centres of Expertise and European Reference Networks: key issues in the field of rare diseases. The EUCERD Recommendations. *Blood Transfus*, 12 Suppl 3, s621-5.
- TESFAMARIAM, B. & DEFELICE, A. F. 2007. Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders. *Vascul Pharmacol*, 46, 229-37.
- TRETTEL, F., RIGAMONTI, D., HILDITCH-MAGUIRE, P., WHEELER, V. C., SHARP, A. H., PERSICHETTI, F., CATTANEO, E. & MACDONALD, M. E. 2000. Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum Mol Genet*, 9, 2799-809.
- TROJANOWSKA, M. 2008. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*, 47 Suppl 5, v2-4.
- VALDEOLIVAS, S., NAVARRETE, C., CANTARERO, I., BELLIDO, M. L., MUNOZ, E. & SAGREDO, O. 2015. Neuroprotective properties of cannabigerol in Huntington's disease: studies in R6/2 mice and 3-nitropropionate-lesioned mice. *Neurotherapeutics*, 12, 185-99.
- VALDEOLIVAS, S., SAGREDO, O., DELGADO, M., POZO, M. A. & FERNANDEZ-RUIZ, J. 2017. Effects of a Sativex-Like Combination of Phytocannabinoids on Disease Progression in R6/2 Mice, an Experimental Model of Huntington's Disease. *Int J Mol Sci*, 18.

- VALIVETI, S., HAMMELL, D. C., EARLES, D. C. & STINCHCOMB, A. L. 2004. Transdermal delivery of the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2: in vitro/in vivo correlation. *Pharm Res*, 21, 1137-45.
- VAN DEN HOOGEN, F., KHANNA, D., FRANSEN, J., JOHNSON, S. R., BARON, M., TYNDALL, A., MATUCCI-CERINIC, M., NADEN, R. P., MEDSGER, T. A., JR., CARREIRA, P. E., RIEMEKASTEN, G., CLEMENTS, P. J., DENTON, C. P., DISTLER, O., ALLANORE, Y., FURST, D. E., GABRIELLI, A., MAYES, M. D., VAN LAAR, J. M., SEIBOLD, J. R., CZIRJAK, L., STEEN, V. D., INANC, M., KOWAL-BIELECKA, O., MULLER-LADNER, U., VALENTINI, G., VEALE, D. J., VONK, M. C., WALKER, U. A., CHUNG, L., COLLIER, D. H., CSUKA, M. E., FESSLER, B. J., GUIDUCCI, S., HERRICK, A., HSU, V. M., JIMENEZ, S., KAHALEH, B., MERKEL, P. A., SIERAKOWSKI, S., SILVER, R. M., SIMMS, R. W., VARGA, J. & POPE, J. E. 2013. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 65, 2737-47.
- VARA, D., MORELL, C., RODRIGUEZ-HENCHE, N. & DIAZ-LAVIADA, I. 2013. Involvement of PPARgamma in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*, 4, e618.
- VARGA, J. & ABRAHAM, D. 2007. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*, 117, 557-67.
- VEN-SHUN L., DAEOCK C., MOON-SHONG T. & HAROLD K. (1996). Concerning *in Vitro* Mitomycin–DNA Alkylation. *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (15), pp 3765–3766
- VERHOECKX, K. C., KORTHOUT, H. A., VAN MEETEREN-KREIKAMP, A. P., EHLERT, K. A., WANG, M., VAN DER GREEF, J., RODENBURG, R. J. & WITKAMP, R. F. 2006. Unheated Cannabis sativa extracts and its major compound THC-acid have potential immuno-modulating properties not mediated by CB1 and CB2 receptor coupled pathways. *Int Immunopharmacol*, 6, 656-65.
- WALKER, F. O. 2007. Huntington's disease. *Lancet*, 369, 218-28.
- WANG, L., WALTENBERGER, B., PFERSCHY-WENZIG, E. M., BLUNDER, M., LIU, X., MALAINER, C., BLAZEVIC, T., SCHWAIGER, S., ROLLINGER, J. M., HEISS, E. H., SCHUSTER, D., KOPP, B., BAUER, R., STUPPNER, H., DIRSCH, V. M. & ATANASOV, A. G. 2014. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): a review. *Biochem Pharmacol*, 92, 73-89.
- WANG, L. H., YANG, X. Y., ZHANG, X., HUANG, J., HOU, J., LI, J., XIONG, H., MIHALIC, K., ZHU, H., XIAO, W. & FARRAR, W. L. 2004. Transcriptional inactivation of STAT3 by PPARgamma suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells. *Immunity*, 20, 205-18.
- WEI, J., ZHU, H., KOMURA, K., LORD, G., TOMCIK, M., WANG, W., DONIPARTHI, S., TAMAKI, Z., HINCHCLIFF, M., DISTLER, J. H. & VARGA, J. 2014. A synthetic PPAR-gamma agonist triterpenoid ameliorates experimental fibrosis: PPAR-gamma-independent suppression of fibrotic responses. *Ann Rheum Dis*, 73, 446-54.
- WELCH, J. S., RICOTE, M., AKIYAMA, T. E., GONZALEZ, F. J. & GLASS, C. K. 2003. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6712-7.

- WELLS, A. U., STEEN, V. & VALENTINI, G. 2009. Pulmonary complications: one of the most challenging complications of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*, 48 Suppl 3, iii40-4.
- WHITING, P. F., WOLFF, R. F., DESHPANDE, S., DI NISIO, M., DUFFY, S., HERNANDEZ, A. V., KEURENTJES, J. C., LANG, S., MISSO, K., RYDER, S., SCHMIDLKOFER, S., WESTWOOD, M. & KLEIJNEN, J. 2015. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*, 313, 2456-73.
- WU, M., MELICHIAN, D. S., CHANG, E., WARNER-BLANKENSHIP, M., GHOSH, A. K. & VARGA, J. 2009. Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Am J Pathol*, 174, 519-33.
- WYNN, T. A. & BARRON, L. 2010. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*, 30, 245-57.
- WYNN, T. A. & VANNELLA, K. M. 2016. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, 44, 450-62.
- YAMAMOTO, T. & KATAYAMA, I. 2011. Vascular changes in bleomycin-induced scleroderma. *Int J Rheumatol*, 2011, 270938.
- YAMAMOTO, T. & NISHIOKA, K. 2002. Animal model of sclerotic skin. V: Increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol*, 102, 77-83.
- YAMAMOTO, T. & NISHIOKA, K. 2005. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol*, 14, 81-95.
- YAMAMOTO, T., TAKAGAWA, S., KATAYAMA, I., YAMAZAKI, K., HAMAZAKI, Y., SHINKAI, H. & NISHIOKA, K. 1999a. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol*, 112, 456-62.
- YAMAMOTO, T., TAKAHASHI, Y., TAKAGAWA, S., KATAYAMA, I. & NISHIOKA, K. 1999b. Animal model of sclerotic skin. II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice. *J Rheumatol*, 26, 2628-34.
- YANABA, K. 2016. Strategy for treatment of fibrosis in systemic sclerosis: Present and future. *J Dermatol*, 43, 46-55.
- YANG, X. Y., WANG, L. H., CHEN, T., HODGE, D. R., RESAU, J. H., DASILVA, L. & FARRAR, W. L. 2000. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem*, 275, 4541-4.
- ZOLEZZI, J. M. & INESTROSA, N. C. 2013. Peroxisome proliferator-activated receptors and Alzheimer's disease: hitting the blood-brain barrier. *Mol Neurobiol*, 48, 438-51.
- ZUCCATO, C., VALENZA, M. & CATTANEO, E. 2010. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev*, 90, 905-81.

Anexo I

Artículo original titulado “The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor- γ and CB2 pathways” Sci Rep; 6:21703.

Anexo II

Artículo original titulado “VCE-003.2, a novel cannabigerol derivative, enhances neuronal progenitor cell survival and alleviates symptomatology in murine models of Huntington’s” Sci Rep; 6: 29789

Anexo III

Curriculum vitae del doctorando