

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Departamento de Psicobiología



**INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE EL SISTEMA
ENDOCANNABINOIDE Y DOPAMINÉRGICO: PAPEL EN
EL CONTROL PSICOMOTOR TRAS LA EXPOSICIÓN
CRÓNICA A CANNABINOIDES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Margarita Moreno Montoya

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Navarro García
Fernando Rodríguez de Fonseca

Madrid, 2003

ISBN:84-669-2435-3

Departamento de Psicobiología
Facultad de Psicología

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID



INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE EL SISTEMA
ENDOCANNABINOIDE Y DOPAMINERGICO: PAPEL EN EL
CONTROL PSICOMOTOR TRAS LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A
CANNABINOIDES

Margarita Moreno Montoya
2003

D. Miguel Navarro García, Catedrático de Psicofarmacología en el Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid.

D. Fernando Rodríguez de Fonseca, director de la Fundación Hospital Carlos Haya de Málaga.

CERTIFICAN:

Que la licenciada Dña. Margarita Moreno Montoya ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos experimentales que han conducido a la elaboración de esta Tesis Doctoral titulada “Interacciones funcionales entre el sistema endocannabinoide y dopaminérgico: papel en el control psicomotor tras la exposición crónica a cannabinoides”.

Consideramos que tanto el contenido científico como la presentación de esta memoria reúnen las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que conste ante quien proceda, firmamos el presente en Madrid a 24 de Septiembre de dos mil tres.

El Director de la Tesis
Fdo. Miguel Navarro García

El Co-Director de la Tesis
Fdo. Fernando Rodríguez de Fonseca

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'FR', is located in the lower right quadrant of the page. The signature is fluid and cursive, written over a light gray rectangular background.

AGRADECIMIENTOS

Deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han apoyado de alguna u otra forma en el desarrollo de este trabajo, y especialmente:

A Miguel Navarro García, por la oportunidad que me ha concedido, su confianza, interés y apoyo en este trabajo.

A Fernando Rodríguez Fonseca, por su dedicación, enseñanzas y ayuda en el desarrollo de en este proyecto.

A Larry Parsons, por la oportunidad y su inestimable ayuda en el aprendizaje y desarrollo de la microdiálisis.

A M^a Angeles Villanúa, por su colaboración en la medición de los niveles hormonales.

A todos mis compañeros de laboratorio: Inmaculada, Ainhoa, Belén, Raquel1, Raquel2, Jose Manuel, Jose Antonio, Gustavo, Nacho, Miguel Angel y Jose Luis; y especialmente a Leticia Escuredo y a Raúl Muñoz por su ayuda en la supervivencia cotidiana.

Finalmente agradecer a todo el personal técnico que nos ayuda a que estos trabajos sean posibles: Mateo, Luis, Ana y Coco.

INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y DOPAMINÉRGICO: PAPEL EN EL CONTROL PSICOMOTOR TRAS LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A CANNABINOIDES

El sistema cannabinoide endógeno está siendo considerado como un modulador de los circuitos de neurotransmisión que regulan las áreas del cerebro implicadas en conducta motora. El objetivo de esta tesis ha sido el de estudiar los efectos psicomotores de la interacción entre los sistemas endocannabinoide-dopaminérgico en ratas adultas tras la exposición crónica a cannabinoides en el periodo perinatal y en el adulto. La exposición perinatal con el agonista cannabinoide delta-9-tetrahydrocannabinol (THC 0.1, 0.5, 2 mg/kg) produjo cambios en las repuestas motoras inducidas por el agonista dopaminérgico D1/D2 apomorfin (0.1 mg/kg) y el agonista D2 quinpirol (0.5 mg/kg) en el periodo adulto. La exposición a THC incrementó la sensibilidad a los efectos motores inducidos por estos agonistas dopaminérgicos. La exposición crónica con el agonista cannabinoide HU-210 (20 µg/kg) en animales adultos produjo una alteración en las conductas psicomotoras tras la administración del agonista D1 SKF38393 (8 mg/kg) y el agonista D2 quinpirol (0.5 mg/kg). La exposición crónica con el agonista cannabinoide WIN552122 (4 mg/kg) en animales adultos produjo un incremento en las conductas motoras en condiciones basales e incrementó las respuestas motoras tras la administración aguda del agonista D2 quinpirol (0.5 mg/kg). El estudio con microdiálisis mostró que la exposición a WIN552122 produjo un incremento en la neurotransmisión GABAérgica en el globo pálido, sin producir cambios significativos en la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado dorsal. Estos resultados indican que la desensibilización del sistema cannabinoide endógeno tras la exposición crónica a cannabinoides altera el papel modulador en los procesos de neurotransmisión implicados en el desarrollo de las conductas motoras, induciendo cambios en la funcionalidad dopaminérgica. La alteración de las respuestas dopaminérgicas podría relacionarse con la alteración del control del sistema endocannabinoide en la neurotransmisión GABAérgica, apoyando el papel interactivo del sistema endocannabinoide en el control funcional de las conductas motoras.

Agonistas cannabinoides, neurotransmisión, respuesta motora

FUNCTIONAL INTERACTIONS BETWEEN ENDOCANNABINOID AND DOPAMINERGIC SYSTEM: ROLE IN PSYCHOMOTOR CONTROL AFTER CHRONIC EXPOSURE TO CANNABINOIDS

The endogenous cannabinoid system is being considered as a modulator of the neurotransmission implicated in brain areas that regulate motor behaviors. The purpose of this thesis has been to study the psychomotor effects of the interactions between the endocannabinoid-dopaminergic systems in adult rats after chronic exposure to cannabinoids in the perinatal and in the adult period. The perinatal exposure to the cannabinoid agonist delta-9-tetrahydrocannabinol (THC 0.1, 0.5, 2 mg/kg) produced changes in the motor responses induced by dopaminergic D1/D2 agonist apomorphine (0.1 mg/kg) and the D2 agonist quipirole (0.5 mg/kg) in the adult period. THC exposure increased the sensitivity to motor effects induced by these dopaminergic agonists. The chronic exposure to cannabinoid agonist HU-210 (20 µg/kg) in adult rats produced an alteration in psychomotor behaviors after acute administration of D1 agonist SKF38393 (8 mg/kg) and D2 agonist quinpirole (0.5 mg/kg). Chronic exposure to cannabinoid agonist WIN552122 (4 mg/kg) in adult rats produced an increased motor activity in basal conditions and enhanced motor responses after acute administration of D2 agonist quinpirole (0.5 mg/kg). Microdialysis study showed that chronic WIN552122 induced an increase in GABA signaling in globus pallidus, without any effect on dopamine signalling in dorsal striatum. These results indicate that the desensitization of the endogenous cannabinoid system after chronic exposures to cannabinoids could alter the regulatory role in the neurotransmission processes implicated in motor behaviors, inducing changes in behavioral dopaminergic functionality in the adulthood. The alteration in behavioral dopaminergic responses could be mediated by alterations in endocannabinoid control on GABAergic neurotransmission, supporting the interactive role of the endocannabinoid system in the functional control of motor activities.

Cannabinoid agonists, neurotransmission, motor responses

ÍNDICE

I - INTRODUCCIÓN

1

1. El sistema cannabinoide endógeno

- 1.1. Introducción
- 1.2. Neurobiología del sistema cannabinoide endógeno
 - 1.2.1. Los receptores cannabinoides
 - 1.2.2. Los cannabinoides endógenos
 - 1.2.3. Neuroanatomía funcional del sistema cannabinoide endógeno
- 1.3. Farmacología del sistema cannabinoide endógeno

2. Los cannabinoides y la conducta

- 2.1. Efectos comportamentales producidos por los cannabinoides
- 2.2. Modelos perinatales en animales
- 2.3. Modelos crónicos en animales adultos

3. Control motor: sistema cannabinoide como regulador fisiológico de los ganglios basales

- 3.1. Los ganglios basales: circuito de regulación de la actividad motora
- 3.2. Presencia del sistema endocannabinoide en los ganglios basales
- 3.3. Modulación cannabinoide de la neurotransmisión en los ganglios basales
 - 3.3.1. Efectos sobre la neurotransmisión de GABA
 - 3.3.2. Efectos sobre la neurotransmisión de glutamato
 - 3.3.3. Efectos sobre la neurotransmisión de dopamina
- 3.4. Perspectivas futuras: los cannabinoides y las patologías de los ganglios basales

II - PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

31

III - MATERIAL Y METODOS

34

1. Animales de experimentación

- 1.1. Experimento I: Tratamiento crónico con Δ^9 THC durante el periodo perinatal
- 1.2. Experimento II y III: Tratamiento crónico con cannabinoides durante el periodo adulto

2. Tratamientos

- 2.1. Exp. I: Tratamiento crónico con Δ^9 THC durante el periodo perinatal
- 2.2. Exp. II y III: Tratamiento crónico con cannabinoides durante el periodo adulto
- 2.3. Tratamiento agudo con agonistas de dopamina en el periodo adult

3. Estudios comportamentales

4. Microdiálisis de los niveles de dopamina y GABA

- 4.1. Cirugía estereotáxica
- 4.2. Implantación de la sonda de microdiálisis
- 4.3. Análisis de las muestras de dopamina y GABA

5. Determinación de los niveles hormonales en plasma

6. Diseño experimental

Experimento I: Estudio de los efectos comportamentales de la activación dopaminérgica en el animal adulto tras el tratamiento crónico con Δ^9 THC durante el periodo perinatal

- 6.1. Posibles efectos tóxicos de la exposición perinatal con Δ^9 THC desde el desarrollo gestacional hasta el periodo adulto
- 6.2. Efectos comportamentales y neuroendocrinos de la exposición perinatal con Δ^9 THC en el animal adulto
- 6.3. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1/D2 en animales adultos tras la exposición perinatal con Δ^9 THC
- 6.4. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos tras la exposición perinatal con Δ^9 THC

Experimento II: Estudio de los efectos comportamentales de la activación dopaminérgica tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto

- 6.5. Efectos comportamentales 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210 en animales adultos
 - 6.5.1. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210
 - 6.5.2. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210
- 6.6. Efectos comportamentales 96 horas tras el tratamiento crónico con HU210 en animales adultos
 - 6.6.1. Efectos de la estimulación de los receptores D2 en animales adultos 96horas tras el tratamiento crónico con HU210
- 6.7. Efectos comportamentales 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN 55212-2 en animales adultos.
 - 6.7.1. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN55212-2

Experimento III: Estudio de los efectos en los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales en respuesta a la activación del receptor D2 tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto

- 6.8. Efectos en la liberación de dopamina en el estriado dorsal en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN55212-2
 - 6.8.1. Respuesta neuroquímica de la liberación de dopamina en el estriado dorsal por la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico de WIN55212-2
- 6.9. Efectos en la liberación de GABA en el globo pálido en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN 55212-2
 - 6.9.1. Respuesta neuroquímica de la liberación de GABA en el globo pálido por la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico de WIN55212-2

7. Análisis estadísticos

IV- RESULTADOS

51

Exp. I: Estudio de los efectos comportamentales de la activación dopaminérgica en el animal adulto tras el tratamiento crónico con Δ^9 THC durante el periodo perinatal

52

- 1. Posibles efectos tóxicos de la exposición perinatal con Δ^9 THC desde el desarrollo gestacional hasta el periodo adulto
- 2. Efectos comportamentales y neuroendocrinos de la exposición perinatal con Δ^9 THC en el animal adulto
 - 2.1. Efectos comportamentales
 - 2.2. Efectos neuroendocrinos
- 3. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1/D2 en animales adultos tras la exposición perinatal con Δ^9 THC
 - 3.1. Efectos en actividad motora
 - 3.2. Efectos en otras conductas
- 4. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos tras la exposición perinatal con Δ^9 THC
 - 4.1. Efectos en actividad motora
 - 4.2. Efectos en estereotipias
 - 4.3. Efectos en otras conductas

Exp. II: Estudio de los efectos comportamentales de la activación dopaminérgica tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto

75

5. Efectos comportamentales 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210 en animales adultos

- 5.1. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210
- 5.2. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210

6. Efectos comportamentales 96 horas tras el tratamiento crónico con HU210 en animales adultos

- 6.1. Efectos de la estimulación de los receptores D2 en animales adultos 96 horas tras el tratamiento crónico con HU210

7. Efectos comportamentales 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN 55212-2 en animales adultos

- 7.1. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN55212-2

Exp. III: Estudio de los efectos en los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales en respuesta a la activación del receptor D2 tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto 98

8. Efectos en la liberación de dopamina en el estriado dorsal en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN55212-2

- 8.1. Respuesta neuroquímica de la liberación de dopamina en el estriado dorsal por la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico de WIN55212-2

9. Efectos en la liberación de GABA en el globo pálido en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN 55212-2

- 9.1. Respuesta neuroquímica de la liberación de GABA en el globo pálido por la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico de WIN55212-2

V- DISCUSIÓN

103

1. Efectos comportamentales de la activación dopaminérgica en el animal adulto tras el tratamiento crónico con Δ^9 THC durante el periodo perinatal

- 1.1. Modificaciones del comportamiento motor en el periodo adulto por la exposición perinatal con Δ^9 THC
- 1.2. Dimorfismo sexual por la exposición perinatal con Δ^9 THC: cambios neuroendocrinos en el periodo adulto
- 1.3. Alteraciones en la respuesta comportamental de activación dopaminérgica en el periodo adulto por la exposición perinatal con Δ^9 THC

2. **Efectos comportamentales de la activación dopaminérgica tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto**
 - 2.1. Cambios en el comportamiento motor por el tratamiento crónico con cannabinoides en animales adultos
 - 2.2. Alteraciones en la respuesta comportamental de activación dopaminérgica por el tratamiento crónico con cannabinoides

3. **Efectos en los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales en respuesta a la activación del receptor D2 tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto**

VI - CONCLUSIONES **122**

VII - BIBLIOGRAFÍA **125**

I - INTRODUCCION

1) EL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

1.1. Introducción

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos psicoactivos presentes en una resina secretada a partir de las hojas y brotes florecidos de la planta *cannabis sativa*. El uso de esta planta tiene una gran antigüedad, particularmente en la India, se consumía en las ceremonias religiosas tribales y también se tomaba como medicina. En el siglo XIX, se prescribía ampliamente en el mundo occidental para varias dolencias y malestares, como la tos, fatiga, reumatismo, asma, delirium tremens, jaquecas y reglas dolorosas. Permaneció en la farmacopea de los Estados Unidos hasta el año 1937, en el que tras la aparición de la Ley de Impuestos "Marijuana Tax Act", y la introducción de los analgésicos e hipnóticos sintéticos, se completó su derogación como medicina.

La planta *cannabis sativa* contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes, de los que unos 60 son considerados dentro del grupo de los cannabinoides (Dewey, 1986). El punto de partida de la investigación en el campo de los cannabinoides puede situarse en el año 1964, cuando los investigadores Gaoni y Mechoulam realizaron el aislamiento y síntesis química del principio activo de la *cannabis sativa*, el (-)- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC). Dicho hallazgo supuso el origen para años de investigación fructífera, los cuales se encuentran resumidos en las referencias que se muestran en la Tabla 1.1.

Durante estos años, los resultados de las investigaciones no solo se han centrado en la explicación de las bases farmacológicas de los efectos de los cannabinoides, sino que el descubrimiento de que estos compuestos desarrollarían su acción a través de un sistema cannabinoide endógeno presente en el organismo (Devane et al., 1988) ha supuesto un claro avance para el estudio de las importantes implicaciones de los cannabinoides en la funcionalidad del sistema nervioso central así como en la expresión de la conducta.

TABLA 1.1. Los principales avances en la investigación en cannabinoides

| Evento | Fecha | Referencia |
|--|--------------|---|
| Primeros usos médicos del cannabis | 3000 A.C. | Mechoulam, 1986; Dewey, 1986. |
| Aislamiento del Delta-9-Tetrahidrocannabinol | 1964 | Gaoni y Mechoulam, 1964. |
| Cannabinoides sintéticos | 1980-1988 | Dewey, 1986; Mechoulam et al., 1987. |
| Descripción de los receptores cannabinoides | 1988 | Devane et al., 1988 |
| Clonación y cartografía cerebral de los receptores cannabinoides CB1 | 1990 | Herkenham et al., 1990, 1991a; Matsuda et al., 1990. |
| Neurofarmacología CB1 | 1988-1995 | Howlett et al., 1986; Howlett, 1995; Mackie y Hille, 1992; Mackie et al., 1995; Deadwyler et al., 1995; Bouaboula et al., 1995. |
| Aislamiento y bioquímica de la anandamida | 1992-1995 | Devane et al., 1992; Di Marzo et al., 1994; Sugiura et al., 1996; Cadas et al., 1996; Desarnaud et al., 1995. |
| Neurofarmacología de la anandamida | 1993-1997 | Fride y Mechoulam, 1993; Crawley et al., 1993; Felder et al., 1993; Smith et al., 1994; Beltramo et al., 1997. |
| Síntesis del antagonista de CB1 | 1994 | Rinaldi-Carmona et al., 1994. |
| Aislamiento y funciones del 2-araquidonil glicerol | 1995-1997 | Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995; Stella et al., 1997; Bisogno et al., 1997. |
| Neuroanatomía funcional del CB1 | 1996-1997 | Sim et al., 1996a; Breivogel et al., 1997; Rodríguez de Fonseca et al., 1997. |
| Identificación y funciones del transportador de la anandamida | 1997 | Beltramo et al., 1997; Calignano et al., 1997. |
| Generación de animales knockout CB1 | 1999 | Ledent et al., 1999; Steiner et al., 1999; Zimmer et al., 1999. |
| Clonación y funciones de la FAAH | 1996-2002 | Cravatt et al., 1996, 2001; Sipe et al., 2002 |

1.2. Neurobiología del sistema cannabinoide endógeno

En la actualidad se conoce que el sistema cannabinoide endógeno, al igual que otros sistemas de neurotransmisión del organismo, esta compuesto principalmente por receptores específicos de membrana como el receptor cannabinoide CB1, densamente expresado en el sistema nervioso central (Matsuda et al., 1990); y el receptor cannabinoide CB2, localizado en el sistema nervioso periférico y relacionado con el sistema inmune (Munro et al., 1993). Además el sistema cannabinoide endógeno cuenta con unos ligandos endógenos que activan estos receptores, siendo los más conocidos la anandamida (Devane et al., 1992) y el 2-araquidonil glicerol (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). La evidencia de la existencia de un sistema cannabinoide endógeno en el organismo ha proporcionado nuevas perspectivas de investigación en el campo de los cannabinoides cuyos objetivos se basan en dilucidar el papel fisiológico de este sistema así como su mediación en los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides exógenos sobre el organismo.

1.2.1. Los receptores cannabinoides

Los cannabinoides producen sus efectos sobre el organismo mediante la activación de receptores específicos de membrana. Aunque parece posible la existencia de un nuevo receptor cannabinoide CB3 (Fride et al., 2003), hasta el momento solo se han identificado y estudiado dos receptores para cannabinoides, el CB1 localizado principalmente en el sistema nervioso central (Matsuda et al., 1990); y el receptor cannabinoide CB2, localizado en el sistema nervioso periférico (Munro et al., 1993). Ambos receptores para cannabinoides pertenecen a la familia de receptores asociados a proteínas G, caracterizado por la presencia de siete dominios transmembrana, como es el caso de los receptores metabotrópicos para las monoaminas y los neuropéptidos.

Los principales mecanismos intracelulares en los que están implicados los receptores cannabinoides CB1 incluyen: la inhibición de la adenilato ciclasa, la regulación de distintos canales iónicos (Deadwyler et al., 1995; Mackie y Hille, 1992), y la activación de la vía de las MAP quinasas (Bouaboula et al., 1995; Howlett, 1998). Los efectos identificados hasta el momento se encuentran regulados por el acoplamiento de los receptores CB1 a la familia de proteínas $G_{i,o}$; sistema que comparte con otros receptores con los que se encuentra co-localizado en las mismas neuronas. La activación de los receptores CB1 produciría una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa lo que daría lugar al descenso en los niveles de AMPc intracelular, afectando por tanto la capacidad de fosforilación de las proteínas quinasas. Además la activación de los receptores CB1 también induciría una inhibición de los canales

Ca^{2+} y un aumento en la conductancia del K^+ . La presencia presináptica de los receptores cannabinoides CB1, junto con su colocación con otros receptores como los GABAérgicos GABA-B, los dopaminérgicos D2, los opioides, los glutamatérgicos y los colinérgicos (Ameri, 1999; Childers y Deadwyler, 1996), parece estar asociado a funciones de modulación de las sinapsis del SNC, interviniendo tanto en la inhibición de la neurotransmisión como en los procesos de recaptación (Gessa et al., 1997; Maneuf et al., 1996a,b; Schlicker y Kathmann, 2001; Szabo et al., 1998; Tsou et al., 1998).

En cuanto al receptor cannabinoide CB2, su activación también produciría una inhibición de la adenilato ciclasa y una activación de la vía de las MAP quinasas, sin embargo no produciría modificaciones en la regulación de los canales iónicos (Felder et al., 1995).

1.2.2. Los cannabinoides endógenos

Los ligandos endógenos de los receptores para cannabinoides son compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, siendo los más representativos la etanolamida del ácido araquidónico, conocida como anandamida (Devane et al., 1992) y el 2-araquidonil glicerol (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Además también se han encontrado otros endocannabinoides nuevos como la palmitoil etanolamida (Sugiura et al., 2000) y el 2-araquidonil gliceril eter (Hanus et al., 2001).

La primera sustancia endógena identificada como agonista del receptor cannabinoide fue la anandamida, araquidonil etanolamida (Devane et al., 1992). Fue aislado por primera vez en el cerebro del cerdo, y subsecuentemente encontrado en órganos periféricos incluyendo la piel, el tejido cardiovascular, renal y reproductor (Calignano et al., 1997; Deutsch et al., 1997; Munro et al., 1993; Wagner et al., 1997). Su estructura no está relacionada a los cannabinoides naturales, sin embargo la anandamida es capaz de inducir la inhibición de la adenilato ciclasa al igual que el tetrahidrocannabinol (Howlett et al., 1988); además su administración produce los efectos clásicos de la actividad cannabinoide, como son: la inmovilidad, la catalepsia, la analgesia y la hipotermia (Crawley et al., 1993; Devane et al., 1992; Felder et al., 1993; Fride y Mechoulam, 1993; Mackie et al., 1993; Smith et al., 1994; Vogel et al., 1993).

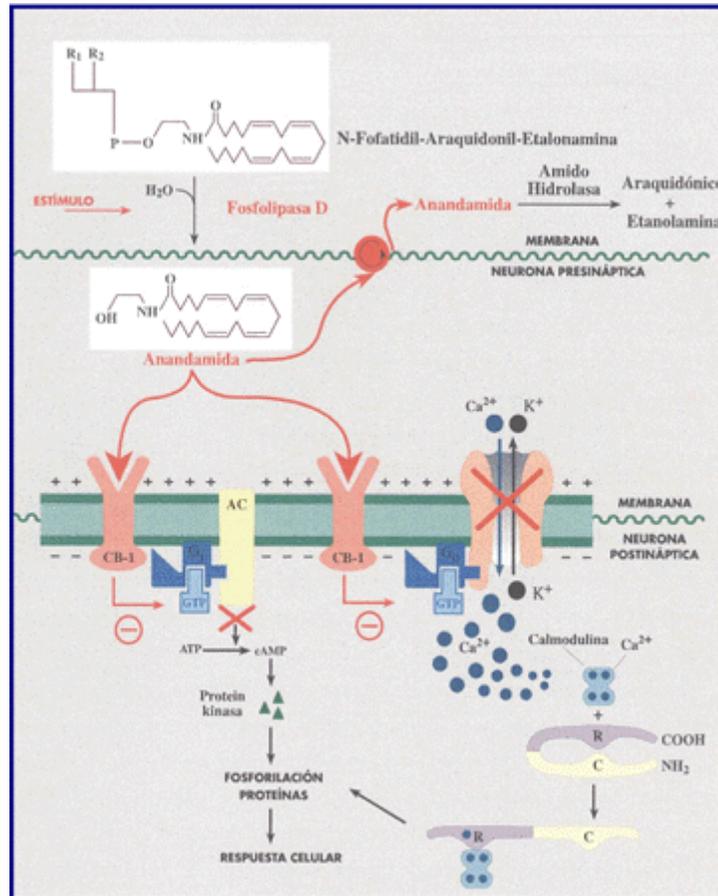
La síntesis de la anandamida se produce por la hidrólisis de un precursor fosfolípídico presente en la membrana celular, el N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina, catalizado por la fosfolipasa D; como se puede observar en la Figura 3.3. (Di Marzo et al., 1994). La liberación de anandamida es dependiente del calcio y se dispara por la despolarización neuronal (Cadas et al., 1996, 1997; Desarnaud et al., 1995; Sugiura et al., 1996). De hecho, la formación de anandamida tiene una variabilidad regional específica: se ha encontrado su liberación en el

estriado dorsal tras la activación del receptor de dopamina D2 (Giuffrida et al., 1999), pero no en el hipocampo tras la despolarización neuronal, donde si se dispara la producción de otros endocannabinoides (Stella et al., 1997).

La inactivación de la anandamida requiere dos etapas: la primera es la recaptación de la anandamida extracelular por un transportador de alta afinidad (Beltramo et al., 1997); y la segunda es la de su hidrólisis intracelular catalizado por una enzima asociada a membrana, el ácido graso amidohidrolasa o FAAH, dando lugar a sus dos componentes fundamentales el ácido araquidónico y la etanolamina (Cravatt et al. 1996; Di Marzo y Deutsch, 1998; Piomelli et al., 1998).

Además de otras aciletanolamidas con actividad cannabinomimética (Hanus, et al., 1993), el segundo ligando cannabinoide endógeno descubierto fue el 2-araquidonil glicerol (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Aunque inicialmente fue considerado el ligando endógeno para el receptor cannabinoide CB2, se descubrió que éste estaba presente en el cerebro y que se liberaba por el aumento de calcio intracelular elicitado durante la despolarización neuronal; ejerciendo efectos celulares similares a los descritos para los agonistas del CB1 (Stella et al., 1997). La síntesis del 2-araquidonil glicerol parece deberse a la acción de la enzima diacilglicerol lipasa que convierte el diacilglicerol en este endocannabinoide. Tras su liberación el 2-araquidonil glicerol tiene una vida muy corta, recaptado por el transportador de la anandamida es degradado por la acción de la monoacilglicerol lipasa convirtiéndolo en ácido araquidónico (Beltramo y Piomelli, 2000; Piomelli et al., 1999; Stella et al., 1997).

FIGURA 1.1. Los cannabinoides endógenos como la anandamida se liberan de los precursores lipídicos en la célula presináptica y actúan a través de la estimulación de los receptores CB1, produciendo una activación de los mecanismos de fosforilación. La anandamida es eliminada por procesos específicos de recaptación y se degrada por las reacciones enzimáticas intracelulares.



1.2.3. Neuroanatomía funcional del sistema cannabinoide endógeno

El receptor cannabinoide CB1 se localiza fundamentalmente en el sistema nervioso central. La presencia y distribución del receptor cannabinoide CB1 en el cerebro ha sido caracterizada tanto en la rata como en el ser humano (Herkenham et al., 1990,1991a,b; Tsou et al., 1998; Westlake et al., 1994), encontrándose expresado de forma abundante en distintas estructuras del encéfalo. De hecho, el receptor cannabinoide CB1 se haya presente en una concentración mayor que otros receptores asociados a proteínas G conocidos, comparándose incluso con la abundante presencia de los receptores ionotrópicos de glutamato en el cerebro (Herkenham et al., 1990).

La mayor densidad de los receptores cannabinoides CB1 en el cerebro se encuentra en la estructura de los ganglios basales (sustancia negra, globo pálido, núcleo entopeduncular y caudado-putamen lateral), en concreto en el estriado su presencia es 12 veces mayor que la de los receptores opioides μ y son dos veces más numerosos que la de los receptores dopaminérgicos D1 (Breivogel et al., 1997; Sim et al., 1996). Además de en los ganglios basales, el receptor cannabinoide CB1 se ha localizado en otras regiones del encéfalo como el cortex del cerebelo, el hipocampo, la corteza límbica, la extensión de la amígdala y en núcleos discretos del hipotálamo como el hipotálamo lateral, el núcleo ventromedial y paraventricular (Breivogel et al., 1997; Herkenham et al., 1990,1991a; Sim et al. 1996;).

El receptor cannabinoide CB2 se encuentra distribuido en el sistema nervioso periférico, localizándose principalmente en el bazo, las amígdalas y en distintas células del sistema inmune (Galiegue et al., 1995; Schatz et al., 1997). La presencia en estos tejidos y células parece estar relacionado con las propiedades inmunosupresoras de los cannabinoides (Klein et al., 1998, 2001).

Los ligandos endógenos cannabinoides, anandamida y 2-araquidonil glicerol se han encontrado en el cerebro en las áreas que corresponden con una mayor densidad de receptores cannabinoides CB1, como son: el estriado, la corteza y el hipocampo (Bisogno et al., 1999; Felder et al., 1996). Sin embargo, las concentraciones de 2-araquidonil glicerol en el cerebro son mucho mayores que las de anandamida (Stella et al., 1997).

La presencia del sistema cannabinoide endógeno en determinados núcleos del encéfalo ha sido relacionada con una posible acción moduladora sobre los fenómenos comportamentales mediados por estos centros nerviosos. De este modo, distintos autores han correlacionado

positivamente los efectos conductuales de los cannabinoides exógenos con las regiones cerebrales que median esas conductas Tabla 1.2.

TABLA 1.2. Regiones cerebrales que median los efectos de los cannabinoides

| Efectos Conductuales | Núcleos del encéfalo | Referencia |
|-----------------------------|--|---|
| Inhibición motora | Sustancia negra, globo pálido, caudado-putamen, cortex frontal, cerebelo | Herkenham et al., 1991b; Pertwee y Wickens, 1991; Miller y Walker, 1995,1996; Tersigni y Rosenberg, 1996; Sañudo-Peña y Walker, 1997; Maneuf et al., 1996a,b; García-Gil et al., 1999; Sañudo-Peña et al., 2000. |
| Disrupción en memoria | Hipocampo, cortex prefrontal | Heyser et al., 1993; Gifford y Ashby, 1996; Shen et al., 1996; Terranova et al., 1996; Gessa et al., 1997; Gifford et al., 1997b; Jentsch et al., 1997; Stella et al., 1997; Mallet y Beninger, 1998; Sullivan, 2000. |
| Antinocicepción | Medula espinal, gris periacueductal, rafe dorsal | Litchman y Martín, 1991a,b; Smith y Martín, 1992; Martin et al., 1993, 1995, 1996; Smith et al., 1994; Cook et al., 1995; Lichtman et al., 1996; Houser et al., 2000; Pertwee, 2001. |
| Neuroendocrinos | Hipotálamo, área preóptica | Dewey et al., 1970; Steger et al., 1983; Murphy et al., 1991, 1995,1998; Wenger et al., 1995, 1999; Fernández-Ruiz et al., 1997; Jackson y Murphy, 1997; Murphy et al., 1998; Del Arco et al., 2000. |
| Hipotermia | Área preóptica, tronco encefálico caudal | Schmeling y Hosco, 1980; Fitton y Pertwee, 1982; Ovadia et al., 1995; Perron et al., 2001. |
| Antiemesis | Cortex, núcleo del tracto solitario | London et al., 1979; Fan, 1995; Tramer et al., 2001. |
| Aumento de la ingesta | Hipotálamo lateral, área subpostrema | Foltin et al., 1986; Trojniar and Wise, 1991; Mattes et al., 1994; Koch, 2001. |
| Refuerzo y abstinencia | Área tegmental ventral, amígdala | Di Chiara e Imperato, 1988; Chen et al., 1993; Aceto et al., 1995; Tsou et al., 1995; French, 1997; Gifford et al., 1997a; Rodríguez de Fonseca et al., 1997; Tanda et al., 1997; Cheer et al., 2000. |

1.3. Farmacología del sistema cannabinoide endógeno

En la Figura 1.3. se muestra un esquema del funcionamiento del sistema cannabinoide endógeno. Las distintas clases de compuestos, como los agonistas parciales o enteros, los antagonistas neutros o los agonistas inversos, se dirigen a interferir con el receptor cannabinoide CB1, con el sistema de recaptación o con la actividad amidasa. Aún no se han probado los fármacos que afectan a la síntesis, ya que la identificación de las sustancias que inducen la liberación de los cannabinoides endógenos requerirá un análisis profundo de los receptores de neurotransmisores capaces de activar la escisión de distintos precursores lipídicos y el estudio de la variabilidad regional ya descrita para estos mecanismos (Giuffrida et al., 1999; Mechoulam et al., 1995).

Los agonistas cannabinoides

Existe una amplia variedad de moléculas que se comportan como agonistas de los receptores cannabinoides, activando las respuestas mediadas por éstos. Los agonistas cannabinoides han sido clasificados en función de su estructura química en cuatro clases:

A - “Los cannabinoides clásicos” son aquellos que presentan una estructura de dibenzopirano, entre ellos están los cannabinoides derivados de la cannabis sativa como el Δ^9 THC, el Δ^8 THC, el cannabinol o el cannabidiol, y los análogos sintéticos del Δ^9 THC como el (-)-11-hidroxi- Δ^8 -tetrahidrocannabinol-dimetilheptil o HU210, el HU243 y la nabilona.

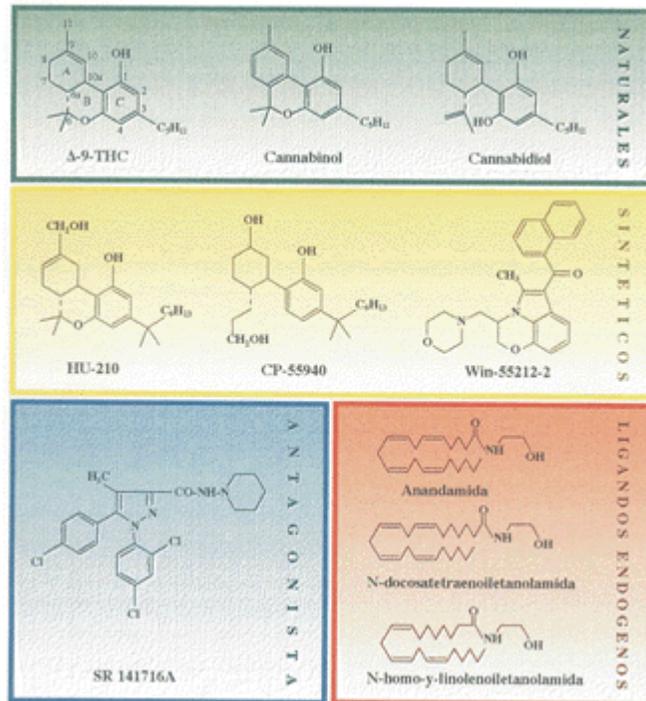
B - Los cannabinoides no-clásicos son compuestos análogos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 THC, pero con modificaciones sustanciales. A esta clase pertenece el CP-55,940 empleado para la caracterización del receptor CB1 (Devane et al., 1988), y otros agonistas cannabinoides como el CP55,244; CP50,556 o levonantradol y el desacetilevonantradol o DALN.

C - Los aminoalquilindoles constituyen la tercera clase de agonistas de receptor cannabinoide, tienen una estructura que no está relacionada con la de los cannabinoides clásicos, y deriva de la pravadolina. Su principal representante es el WIN 55,212-2.

D - Los eicosanoides son el último grupo descrito de agonistas cannabinoides, y son derivados del ácido araquidónico, aquí se incluyen los ligandos endógenos, siendo el representante principal la araquidonil etanolamida o anandamida. Además existen otros componentes como el

2-araquidonil glicerol, el 2-araquidonil gliceril eter y los derivados sintéticos como la araquidonil-2-cloroetilamida o ACEA y la araquidonilciclopropilamida o ACPA (Pertwee y Ross, 2002).

FIGURA 1.2. Estructura química de algunos cannabinoides representativos



Los análisis moleculares han identificado los puntos estructurales clave que permiten la interacción del receptor CB1 con al menos tres tipos diferentes de agonistas: los cannabinoides, los aminoalquilindoles y las aciletanolamidas (Howlett, 1995, 1998). Estudios "in vitro" han identificado las propiedades de asociación de éstos compuestos, exhibiendo características de agonistas completos el WIN 55,212-2, el 2-araquidonil glicerol y el HU-210; y de agonistas parciales el tetrahidrocannabinol y la anandamida. En general, se acepta que la anandamida es un agonista débil, mientras que el HU-210 y el CP 55,940 son agonistas más potentes (Consroe, 1998; Howlett, 1995; Pertwee, 1997)

Los antagonistas cannabinoides

El antagonista cannabinoide CB1 más utilizado hasta la fecha ha sido el SR141716A (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Este compuesto manifiesta una marcada selectividad, de modo que es capaz de prevenir o revertir las acciones de los agonistas cannabinoides tanto "in vitro" como "in vivo" que actúan en el receptor cannabinoide CB1 (Pertwee, 1997). A partir de su estructura se han desarrollado moléculas como el AM-251, el AM-281 y el AM-630 (Lan et al., 1999; Nakatsuka et al., 2003), pero también se han desarrollado otros antagonistas del receptor cannabinoide CB1 que difieren estructuralmente del SR141716A como el LY320135 (Felder et al., 1998). En cuanto a los receptores CB2 la molécula más potente y mejor caracterizada como antagonista selectivo es el SR144528 (Rinaldi-Carmona et al., 1998).

Bloqueantes de la recaptación

Se han descrito algunos compuestos que interfieren con la alta afinidad del transportador de anandamida, de los cuales el más selectivo que se ha descrito es un derivado de la anandamida, el AM404 (N-(4-hidroxifenil) araquidonilethanolamina). También se han propuesto otros compuestos que afectan al transportador de anandamida, incluyendo los vanilloides, el N-oleoylethanolina y la oleamida (Di Marzo y Deutsch, 1998; Piomelli et al., 1998). Solo existen estudios preliminares sobre sus características farmacológicas. Sin embargo, desde que los cannabinoides endógenos son formados y liberados de acuerdo a la demanda, los bloqueantes de la recaptación puede potenciar los efectos reguladores ejercidos por estos moduladores endógenos. Recientemente se han descrito otro grupo de fármacos, de los cuales el UCM707 ha mostrado ser un importante inhibidor selectivo del transportador endocannabinoide, produciendo una potenciación de los efectos hipokinéticos y antinociceptivos de la anandamida (De Lago et al., 2002).

Inhibidores de la degradación

La enzima que degrada a la anandamida, es decir, el ácido graso amidohidrolasa o FAAH, puede ser bloqueada por varios grupos de sustancias activas que pueden dividirse dependiendo de la reversibilidad de la inhibición. Los inhibidores reversibles se han diseñado con el fin de mimetizar el estado de transición de la interacción enzima sustrato existiendo tres clases estructuralmente diferentes: las trifluorometilcetonas, los α -cetoésteres y los α -cetoamidas. Los inhibidores irreversibles destacan los fluoruros de sulfonilo tales como el inhibidor inespecífico o PMSF, los fluoruros de palmitil o AM374 y el estearilsulfonilo o AM381 (Di Marzo y Deutsch, 1998; Piomelli et al., 1998). Algunos de estos compuestos muestran una actividad cannabinomimética parcial (Gueudet et al., 1995) probablemente debido al aumento de los niveles endógenos de anandamida. Sin embargo, el conjunto de inhibidores selectivos más potentes hasta el momento son el metilaraquidonilfluorofosfonato o MAFP (Pertwee y Ross, 2002), y los que están siendo desarrollados en la actualidad por los grupos de investigación de Cravatt (Boger et al., 2000; Leung et al, 2003) y los del grupo de Piomelli (Kathuria et al, 2003), mostrando además éste último una capacidad ansiolítica de los compuestos.

2) LOS CANNABINOIDES Y LA CONDUCTA

2.1. Efectos comportamentales producidos por los cannabinoides

Los cannabinoides han mostrado producir cambios en la conducta de los sujetos, estos cambios son debidos en su mayoría a la activación del sistema cannabinoide endógeno presente en estructuras del cerebro implicadas funcionalmente con determinadas conductas. En el apartado anterior se ha mostrado de forma resumida en la Tabla 1.2. la correlación positiva que establecen los distintos autores entre determinadas regiones del encéfalo, donde está presente el sistema cannabinoide endógeno, y su relación con los efectos comportamentales producidos por los cannabinoides.

Entre los variados efectos comportamentales de los cannabinoides se encuentran los producidos sobre la conducta alimentaria, al inducir hiperfagia (Koch et al., 2001; Mattes et al., 1994); los producidos sobre el procesamiento cognitivo y la memoria, al alterar los tiempos de reacción, la coordinación motora y la atención en distintas tareas cognitivas (Gifford et al., 1997b; Shen et al., 1996; Sullivan et al., 2000); y los producidos en las conductas de motivación y refuerzo, pues los cannabinoides inducen efectos euforizantes, ansiolíticos y adictivos (Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002; Tanda et al., 1997; Tsou et al., 1995); y al igual que en el caso de otras drogas de abuso estos efectos son causados por la activación de las neuronas de dopamina presentes en el sistema límbico del cerebro (French, 1997; Gardner, 1992; Navarro et al., 1993a, 1997; Rodríguez de Fonseca et al., 1997).

La alteración en la conducta emocional producida por los cannabinoides esta además relacionada por su capacidad de actuar como un agente estresor, ya que los cannabinoides producen una activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal o HPA que es el sistema responsable de mantener la homeostasis en la respuesta neurobiológica de estrés. La activación del eje HPA producirá lógicamente la estimulación de los receptores de glucocorticoides en el organismo, y en concreto los presentes en las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas; así los cannabinoides afectarán los mecanismos límbicos del control de las conductas emocionales (Piazza et al., 1996a,b; Rodríguez de Fonseca, 1991a, 1995).

Sin embargo, los efectos conductuales más destacables producidos por los cannabinoides son los recogidos en un patrón de comportamiento conocido como la "tétrada cannabinoide clásica", descrita en los modelos animales y que es signo de la actividad cannabimimética en el organismo. Este patrón esta compuesto por cuatro efectos principales producidos por la administración aguda de cannabinoides, que son: la analgesia, la hipotermia,

la inmovilidad y la catalepsia (Abood y Martín, 1992; Compton et al., 1991; Pertwee y Ross, 1991).

Los cannabinoides son sustancias capaces de inhibir la nocicepción o sensación de dolor, estudios en animales han mostrado su capacidad analgésica mediante un incremento en la latencia de permanencia en los tests de carácter nociceptivo como son el de la placa caliente y el denominado "tail-flick" (Cook et al., 1995; Pertwee, 1992, 2001; Smith y Martín, 1992, 1994). Los cannabinoides, al igual que otros depresores del SNC, reducen la temperatura corporal alterando el funcionamiento del centro hipotalámico regulador de la temperatura en el organismo (Crawley et al., 1993).

Finalmente, de entre el conjunto de efectos producidos por los cannabinoides podríamos destacar los relacionados al comportamiento motor, puesto que los cannabinoides han mostrado alterar esta conducta tan compleja en sus distintas facetas. Los estudios en animales muestran que entre las características de la alteración del comportamiento motor producida por los cannabinoides se encuentra por ejemplo la aparición de ataxia, el aumento de las conductas de inmovilidad, la disminución de la actividad motora espontánea o la expresión de la catalepsia como forma de inmovilidad activa (Pertwee, 1992; Pertwee et al., 1988; Pertwee y Ross 1991; Pertwee y Wickens, 1991; Rodríguez de Fonseca et al., 1997; Romero et al., 1996; Sañudo-Peña et al., 2000).

2.2. Modelos perinatales en animales

La exposición durante las etapas críticas del desarrollo a sustancias que alteran el funcionamiento del SNC, como los cannabinoides, han mostrado producir cambios disfuncionales a largo plazo en el desarrollo de determinadas conductas en el periodo adulto, tanto en los modelos animales como en el humano (Day et al., 1994a,b; Levitt, 1998; Navarro et al., 1994b, 1995; Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998b; Robins y Mills, 1993; Rodríguez de Fonseca et al., 1991a; Rubio et al., 1995, 1998; Zuckerman, 1991; Zuckerman et al., 1989).

Los cannabinoides administrados durante el periodo perinatal llegan a las crías durante la gestación, ya que los principios activos del cannabis cruzan la barrera placentaria; y durante la lactancia, al ser transferidos a través de la leche materna (Hutchings et al., 1989; Jakubovic et al., 1997). El sistema cannabinoide endógeno puede ser activado durante el desarrollo, puesto que el receptor cannabinoide CB1 y sus ligandos endógenos, anandamida y 2-araquidonil glicerol, se encuentran presentes desde las primeras etapas de la vida (Berrendero et al., 1999; Fernández-Ruiz et al., 2000; Rodríguez de Fonseca et al., 1993).

Los cannabinoides durante el desarrollo actuarían como un factor epigenético, al producir una activación del sistema cannabinoide endógeno, que afectaría la ontogénesis del SNC induciendo cambios que se mantendrán en el periodo adulto. (Navarro et al., 1994b, 1995; Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998; Walters y Carr, 1986, 1988).

Distintos estudios han mostrado que la de exposición continuada a cannabinoides, tanto sintéticos como naturales (endógenos), durante periodo perinatal han alterado la expresión de determinados comportamientos durante el periodo adulto de los animales, entre estos cambios se encuentran los decrementos en la actividad motora espontánea, el aumento de la actividad estereotipada, las alteraciones en el aprendizaje y la memoria, la afectación de la respuesta a condiciones de novedad y las alteraciones en el desarrollo de la conducta socio-sexual (Fride y Mechoulam, 1996a,b; Fried y Smith, 2001; Navarro et al., 1994a,1995,1996). En concreto, los efectos relacionados con las conductas motoras parecen ser producto de la alteraciones producidas por los cannabinoides en el desarrollo del sistema de neurotransmisión dopaminérgico como se comentara en el siguiente apartado (Rodríguez de Fonseca et al., 1991a, 1992a,b).

La mayoría de los efectos encontrados en los animales tratados perinatalmente con cannabinoides presentan un dimorfismo sexual, mostrándose más marcados en los animales machos (Navarro et al., 1994b). Este efecto parece estar relacionado con la capacidad de los cannabinoides de alterar el funcionamiento neuroendocrino durante la etapa del desarrollo, de modo, que la exposición a cannabinoides produciría alteraciones en la regulación del eje hipotalámico-pituitario-gonadal. La afectación diferencial sobre la regulación neuroendocrina podrá modificar por tanto el desarrollo ontogenético de los patrones comportamentales entre machos y hembras.

En humanos, también se han encontrado efectos conductuales a largo plazo por el consumo de cannabis durante el embarazo y la lactancia. Estudios longitudinales de madres fumadoras habituales de cannabis han mostrado que sus hijos tienen alteraciones en funciones cognitivas relacionadas con la atención y memoria, y problemas de conducta como un pobre control de los impulsos (Fried, 1985, 1995, 2002 a,b; Fried y Smith, 2001; O'Connell y Fried, 1991).

2.3. Modelos crónicos en animales adultos

Anteriormente habían sido descritos los efectos de la administración aguda de cannabinoides en animales adultos, citando la “tetrada cannabinoide” y destacando los efectos sobre el comportamiento motor. Sin embargo, los modelos de tratamiento crónico con cannabinoides muestran que la estimulación continuada del sistema cannabinoide endógeno produce el desarrollo del fenómeno tolerancia a los efectos producidos por la administración aguda de cannabinoides (Abood y Martin, 1992; Bass y Martin, 2000; Pertwee, 1991); mostrándose además en estos modelos una tolerancia completa a los efectos relacionados con la inhibición de la actividad motora (Rubino et al., 1997).

El desarrollo de dicha tolerancia estaría producido principalmente por mecanismos de farmacodinamia, relacionados con cambios en el receptor cannabinoide CB1 y su desensibilización. Entre estos cambios se encuentran la regulación a la baja del receptor (Breivogel et al., 1999, 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 1994a), los cambios en la interacción ligando-receptor (Kittler et al., 2000; Rodríguez de Fonseca et al., 1991b; Rubino et al., 2000; Zhuang et al., 1998), así como las modificaciones en la expresión de la proteína G asociada al receptor (Romero et al., 1998; Sim et al., 1996a).

Los mecanismos de farmacocinética hasta ahora no parecían estar tan implicados, ya que en general los cannabinoides, por su distribución lipofílica, parecen tener una semivida mas larga en el organismo llegando incluso a producir una atenuación del síndrome de abstinencia tras su cese (Dewey, 1986); puesto que la manifestación del síndrome de abstinencia va a depender en gran medida de la eliminación de la sustancia en el organismo (Aceto, 1990).

En los tratamientos crónicos con agonistas cannabinoides, como el Δ^9 THC o el HU210, no se ha observado un síndrome de abstinencia espontáneo tras su cese, sino que se ha precipitado por la administración del antagonista del receptor cannabinoide CB1, el SR141716A (Rinaldi-Carmona et al., 1994; Tsou et al., 1995; Breivogel et al., 2003). Entre los signos somáticos mostrados en el síndrome de abstinencia cannabinoide en animales se encuentra la presencia de una postura encogida, la ataxia, la hipolocomoción, las sacudidas, el temblor, la piloerección, y la ptosis parpebral (Aceto et al., 1996, 2001; Hutcheson et al., 1998; Ledent et al., 1999; Tzavara et al., 2000).

Sin embargo, últimos estudios en los tratamientos crónicos con agonistas cannabinoides, como el WIN55212 y la anandamida, parecen mostrar la aparición espontánea

del síndrome de abstinencia cannabinoide tras sus cese (Aceto et al., 2001; Costa et al., 2000); este hecho podría ser debido a que estos compuestos presentarían una tasa de eliminación más rápida que la de los anteriores agonistas cannabinoides (Maldonado y Rodríguez de Fonseca et al., 2002).

En humanos, estudios realizados en personas consumidoras habituales de cannabis han mostrado que la supresión del consumo produce cambios en la conducta emocional como la aparición de irritabilidad, agresividad y ansiedad en estas personas; estos cambios han sido considerados como signos de abstinencia del consumo continuado de cannabinoides (Crowley et al., 1998; Haney et al., 1999, 2003; Kouri et al., 1999, Kouri y Pope, 2000).

Los tratamientos crónicos con cannabinoides han mostrado también producir cambios en la respuesta motora a la administración aguda de sustancias como la Anfetamina o la heroína en animales de experimentación, dando lugar en ambos casos a una potenciación de la actividad motora y de las estereotipias producidas por estas sustancias (Gorriti et al., 1999; Lamarque et al., 2001; Muschamp y Siviy, 2002; Pontieri et al., 2001). El sistema cannabinoide endógeno se encuentra relacionado tanto con el sistema opioide como con el sistema dopaminérgico en estructuras del cerebro como los ganglios basales implicado en la conducta motora (Giuffrida et al., 1999; Navarro et al., 1998). De este modo el tratamiento crónico con cannabinoides habría producido modificaciones en la funcionalidad estos sistemas de neurotransmisión alterando los procesos de regulación y control del comportamiento motor.

3) CONTROL MOTOR: SISTEMA CANNABINOIDE COMO REGULADOR FISIOLÓGICO DE LOS GANGLIOS BASALES

En los últimos años, la investigación sobre los efectos psicomotores de los cannabinoides ha conducido a la consideración del sistema cannabinoide endógeno como un modulador de los procesos de neurotransmisión implicados en las principales estructuras del encéfalo que intervienen en la regulación y control del comportamiento motor, como es el caso de los ganglios basales (Fernández-Ruiz et al., 2002; Giuffrida y Piomelli, 2000; Glass et al., 1997; Rodríguez de Fonseca et al., 1998).

El papel del sistema endocannabinoide en la funcionalidad de los ganglios basales esta determinado por la observación de los siguientes fenómenos:

- Los cannabinoides se caracterizan por la producción de alteraciones en la regulación del comportamiento motor, como son producción de inmovilidad o la alteración de la actividad motora espontánea (Consroe, 1998; Rodríguez de Fonseca et al., 1997, 1998).
- Estos efectos psicomotores de los cannabinoides parecen ser consistentes con la distribución neuroanatómica de receptor cannabinoide CB1, el cual se encuentra ampliamente presente en áreas del SNC implicadas en la regulación y planificación de las conductas motoras, exhibiendo su densidad más alta en los ganglios basales (Glass et al., 1997; Herkenham et al., 1990, 1991b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou et al., 1998).
- Los cannabinoides interactúan funcionalmente con los principales neurotransmisores del SNC que constituyen el circuito de los ganglios basales; estos neurotransmisores son la dopamina, el GABA y el glutamato (Glass et al., 1997; Sañudo-Peña et al., 1999; Tsou et al., 1998).

3.1. Los ganglios basales: circuito de regulación de la actividad motora

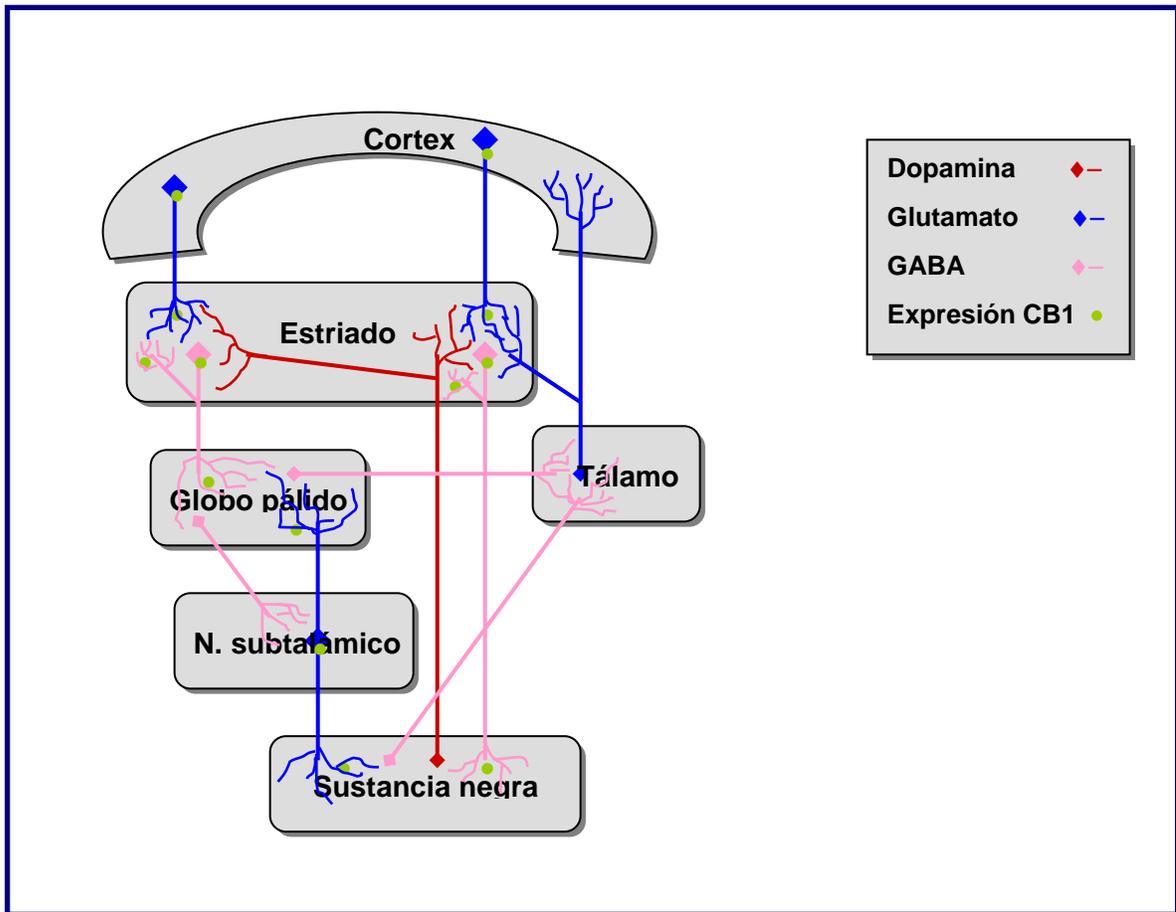
Los ganglios basales es una estructura funcional del encéfalo compuesta por un conjunto de núcleos subcorticales interconectados entre si, involucrados en diversos aspectos del control de la conducta motora (Alexander y Crutcher, 1990; Parent y Hazrati, 1995). Los núcleos que forman este circuito de neurotransmisión son:

- a) Una estructura que recibe aferencias desde el tálamo, el cortex sensorial, el cortex motor y el límbico; conocida como estriado y formada por el núcleo caudado y putamen (CP).
- b) Una estructura intermedia de conexiones compuesta por el globo pálido externo (GPe), los núcleos subtalámicos (STN) y la sustancia negra “parte compacta” (SNc).
- c) Una estructura que envía eferencias a áreas motoras del tálamo y el tronco del encéfalo, formada por el globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra “parte reticulada” (SNr).

Este circuito de neurotransmisión esta compuesto principalmente por neuronas de GABA, glutamato y dopamina; que reciben, procesan y envían información sobre el comportamiento motor (Fernández-Ruiz et al., 2002; Glass et al., 1997; Graybiel, 1990; Graybiel et al., 1994).

Los ganglios basales no solo están implicados en el inicio y cese de la actividad motora, sino también en otras facetas importantes del comportamiento motor como: la regulación de la postura y del tono muscular, el aprendizaje motor, así como en los aspectos emocionales-motivacionales de las respuestas motoras (Aldridge y Berridge, 1998; Kimura, 1995; Knowlton et al., 1996). La degeneración de las neuronas que componen este circuito de neurotransmisión produciría alteraciones y disfunciones en el control de la actividad motora como es el caso de la enfermedad de Parkinson o la corea de Huntington (Albin et al., 1989; Harrington y Haaland, 1991; Shelton y Knopman, 1991).

FIGURA 3.1. Esquema neurotransmisión en los ganglios basales



3.2. Presencia del sistema endocannabinoide en los ganglios basales

El sistema cannabinoide endógeno, compuesto por el receptor cannabinoide CB1 y sus ligandos endógenos, anandamida y 2-araquidonil glicerol o 2-AG, esta ampliamente presente en las diferentes estructuras de los ganglios basales (Berrendero et al., 1999; Bisogno et al., 1999; Hohmann y Herkenham, 2000).

Los estudios neuroanatómicos muestran, tanto en humanos como en animales, una densa expresión de los receptores cannabinoides CB1 en las neuronas de los ganglios basales con respecto a otras estructuras del encéfalo (Herkenham et al., 1990, 1991a,b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992). Los receptores cannabinoides CB1 se han localizado principalmente en las terminales axónicas presinápticas de las neuronas GABAérgicas que proyectan desde el estriado a la sustancia negra “parte reticulada” y a el globo pálido (Herkenham et al., 1991b; Westlake et al., 1994), y también en las neuronas de glutamato que proyectan desde los núcleos subtalámicos a la sustancia negra “parte reticulada” (Glass et al., 1997; Tsou et al., 1998). Aunque hasta ahora parece que los receptores cannabinoides CB1 no se encuentran expresados en las neuronas de dopamina del cerebro, si se han encontrado co-localizados con los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en las neuronas GABAérgicas del estriado (Julian et al., 2003; Malleaux y Vanderhaeguen, 1993; Mansour et al., 1992).

La presencia de los ligandos endógenos cannabinoides en los ganglios basales es superior a su localización en otras regiones del encéfalo, encontrándose la presencia de anandamida y 2-AG en las estructuras del globo pálido y de la sustancia negra (Bisogno et al., 1999; Di marzo et al., 2000a). Además en estas estructuras también se ha detectado una alta actividad de la enzima que degrada a la anandamida, el ácido graso amida hidrolasa (FAAH), localizada próxima a los receptores cannabinoides CB1 (Tsou et al., 1998).

3.3. Modulación cannabinoide de la neurotransmisión en los ganglios basales

Los efectos causados por los cannabinoides sobre la conducta motora parecen ser originados, dada la elevada presencia del receptor cannabinoide CB1 en los principales núcleos de los ganglios basales, al interactuar e interferir con la actividad de los neurotransmisores implicados en el circuito funcional que regula y controla el comportamiento motor (Romero et al., 2002; Sañudo-Peña et al., 1999).

La presencia del receptor cannabinoide CB1 en las terminales presinápticas de las neuronas de GABA y glutamato hace que los cannabinoides puedan tener un efecto directo sobre los procesos de liberación y recaptación de estos neurotransmisores (Schlicker y Kathmann, 2001), mientras que el efecto sobre las neuronas dopaminérgicas parece ser indirecto a través de la modulación de los otros dos neurotransmisores y la co-localización con los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en el estriado (Fernández-Ruiz et al., 2002; Rodríguez de Fonseca et al., 1998).

El control de la actividad motora parece depender del balance entre los sistemas excitatorios e inhibitorios que interactúan, y la presencia del receptor cannabinoide CB1 puede intervenir modulando este balance ejerciendo acciones sobre los neurotransmisores implicados (Alexander y Crutcher, 1990).

TABLA 3.1. Los principales efectos de los cannabinoides sobre la neurotransmisión en los ganglios basales.

| Neurotransmisores | Efectos neuroquímicos de los cannabinoides | Referencias |
|-------------------|---|--|
| GABA | Inhibición de la liberación de GABA en las terminales estriatonigrales | Wallmichrath y Szabo, 2002a, b |
| | Incremento de GABA por bloqueo de la recaptación en las terminales estriatopalidales | Maneuf et al., 1996a,b Miller y Walker, 1995;1996, Romero et al., 1998 |
| | Bloqueo de los efectos cannabinoides por el antagonista GABA-B | Romero et al., 1996 |
| Glutamato | Descenso en la liberación de glutamato en las terminales presinápticas de los núcleos subtalámicos y en el estriado | Gerdeman y Lovinger, 2001; Matsuda et al., 1993; Sañudo-Peña y Walker, 1997; Huang et al., 2001 |
| | Bloqueo de esta inhibición por el antagonista cannabinoide SR141716 | Szabo et al., 2000 |
| Dopamina | Disminución en la actividad de la TH y descenso en los receptores D1 y D2 en el estriado | Cadogan et al., 1997; Navarro et al., 1993a,b, 1994a; Romero et al., 1995a,b. |
| | Estimulación de la liberación de anandamida por el agonista D2 quinpirole | Giuffrida et al., 1999 |

3.3.1. Efectos sobre la neurotransmisión de GABA

La relación entre los cannabinoides y el neurotransmisor GABA se produce en distintas regiones del encéfalo, ya que los receptores cannabinoides CB1 se han localizado en las terminales presinápticas de las neuronas GABAérgicas de los núcleos eferentes de los ganglios basales (Herkenham et al., 1991a), del hipocampo (Tsou et al., 1998) y co-localizados sobre las mismas neuronas en el cerebelo (Pacheco et al., 1993). Así se han descrito efectos de las interacciones GABA-cannabinoides en el control de determinados comportamientos, como la conducta motora (Maneuf et al., 1996a; Romero et al., 1998; Wickens y Pertwee, 1993) y la memoria (Hampson y Deadwyler, 1999, 1998).

El efecto de la activación del receptor cannabinoide en la neurotransmisión GABAérgica en los ganglios basales es aún controvertido, ya que distintos estudios muestran que la activación del receptor cannabinoide CB1, localizado en las terminales presinápticas de las neuronas GABAérgicas estriatoeferentes inhibiría la liberación de GABA entre las terminales estriatonigrales y las neuronas de la sustancia negra "parte reticulada" (Wallmichrath y Szabo, 2002a, b). Este efecto parece ser producido ya que la liberación postsináptica de los ligandos endógenos cannabinoides, anandamida y 2-AG, actuarían como una señal retrógrada inhibitoria sobre el terminal presináptico. Este efecto ha sido descrito en distintas estructuras del encéfalo como en el cortex prefrontal, en la corteza, en el hipocampo, en el área tegmental ventral y en el cerebelo (Chevalleyre y Castillo, 2003; Diana et al., 2001; Ferraro et al., 2001; Pistis et al., 2002; Szabo et al., 2002). Sin embargo, otros estudios indican que los cannabinoides potenciarían la neurotransmisión GABAérgica mediante la inhibición de la recaptación tanto en el globo pálido como en la sustancia negra, como en las neuronas GABA estriatonigrales (Maneuf et al., 1996a,b; Miller y Walker, 1995, 1996; Romero et al., 1998). Este aumento de GABA produciría una inhibición de la activación de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales produciendo por tanto una inhibición de las conductas motoras (Gueudet et al., 1995).

La relación entre la inhibición motora producida por los cannabinoides y la actividad de GABA esta determinada por distintos hallazgos: la administración de tetrahidrocannabinol en el globo pálido, núcleo GABAérgico, inducía catalepsia; mientras que el bloqueo de los receptores cannabinoides CB1, con el antagonista cannabinoide SR141716A, en las neuronas eferentes del estriado reducía la actividad de la liberación del neurotransmisor GABA (Pertwee y Wickens, 1991). La mayoría de los signos de inhibición motora, efectos hipoquinéticos, causados por los cannabinoides se atenúan tras el bloqueo de los receptores GABA-B, y no por el bloqueo de los receptores GABA-A (Romero et al., 1996). Así mismo los cannabinoides se han mostrado efectivos para incrementar tanto la síntesis como la liberación de este neurotransmisor en

animales con lesiones en las neuronas GABAérgicas del estriado, como las producidas en la enfermedad de Huntington (Lastres-Becker et al., 2002).

3.3.2. Efectos sobre la neurotransmisión de glutamato

Los cannabinoides sintéticos y los cannabinoides endógenos son capaces de alterar la actividad del neurotransmisor glutamato, los cannabinoides actuarían básicamente en la terminal presináptica inhibiendo la liberación de glutamato en neuronas de distintas estructuras del encéfalo como el hipocampo, el cerebelo así como también en los ganglios basales (Levenes et al., 1998; Shen et al., 1996; Shen y Thayer, 1999).

El glutamato constituye uno de los principales neurotransmisores excitatorios implicado en las funciones de los ganglios basales, los núcleos subtalámicos se encuentran conectados mediante proyecciones glutamatérgicas con la sustancia negra y el globo pálido. Estudios realizados sobre la administración de cannabinoides han mostrado que debido a la influencia inhibitoria de los cannabinoides sobre la regulación de la conducta motora (Miller y Walker, 1998), los cannabinoides provocarían un descenso en la liberación de glutamato desde las terminales de los núcleos subtalámicos, inhibiendo por tanto la activación de los núcleos que se encuentran conectados como la sustancia negra y el globo pálido (Gerdeman y Lovinger, 2001; Matsuda et al., 1993; Sañudo-Peña y Walker, 1997); así como el descenso en la neurotransmisión de glutamato en el estriado (Huang et al., 2001). Esta inhibición en la liberación de glutamato por la actividad cannabinoide puede ser bloqueada mediante la administración del antagonista cannabinoide CB1 el SR141716A (Szabo et al., 2000).

3.3.3. Efectos sobre la neurotransmisión de dopamina

El neurotransmisor dopamina y sus dos familias de receptores D1 (D1,D2) y D2 (D2,D3,D4) constituyen un sistema esencial para el control fisiológico de estructuras de los ganglios basales como el estriado, las alteraciones en este sistema dan lugar a trastornos como la enfermedad de Parkinson (Graybiel et al., 1994).

La interacción entre receptores dopaminérgicos y cannabinoides tiene un substrato neurobiológico ya que ambos poseen una estructura similar al pertenecer a la familia de receptores asociados a proteínas G (Howlett, 1995; Matsuda et al., 1990). Así ambos receptores están acoplados al mismo sistema de transducción, incluyendo el control de la síntesis de AMPc, y la regulación de los canales de Ca^{2+} y de K^+ (Hampson et al., 1995; Howlett, 1995; Mackie y Hille, 1992). De este modo la estimulación de los receptores cannabinoides CB1 localizados en las principales áreas dopaminérgicas del cerebro, como son la

mesocorticolímbica, la nigroestriatal y la tuberoinfundibular; produciría una modulación directa en las neuronas dopaminérgicas o interferiría en la transducción de la señal dopaminérgica.

En el circuito de los ganglios basales, las neuronas dopaminérgicas proyectan del estriado a la sustancia negra del encéfalo, y aunque no se ha localizado la presencia de los receptores cannabinoides CB1 en las neuronas dopaminérgicas si se han encontrados expresados conjuntamente con los receptores D1 y D2 en otras neuronas del estriado, compartiendo de esta forma el sistema de transducción (Fernández-Ruiz et al., 2002; Julian et al., 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 1998).

Distintos estudios muestran que el mecanismo por el cual el sistema cannabinoide produce modificaciones en la neurotransmisión dopaminérgica puede ser explicado por varias vías:

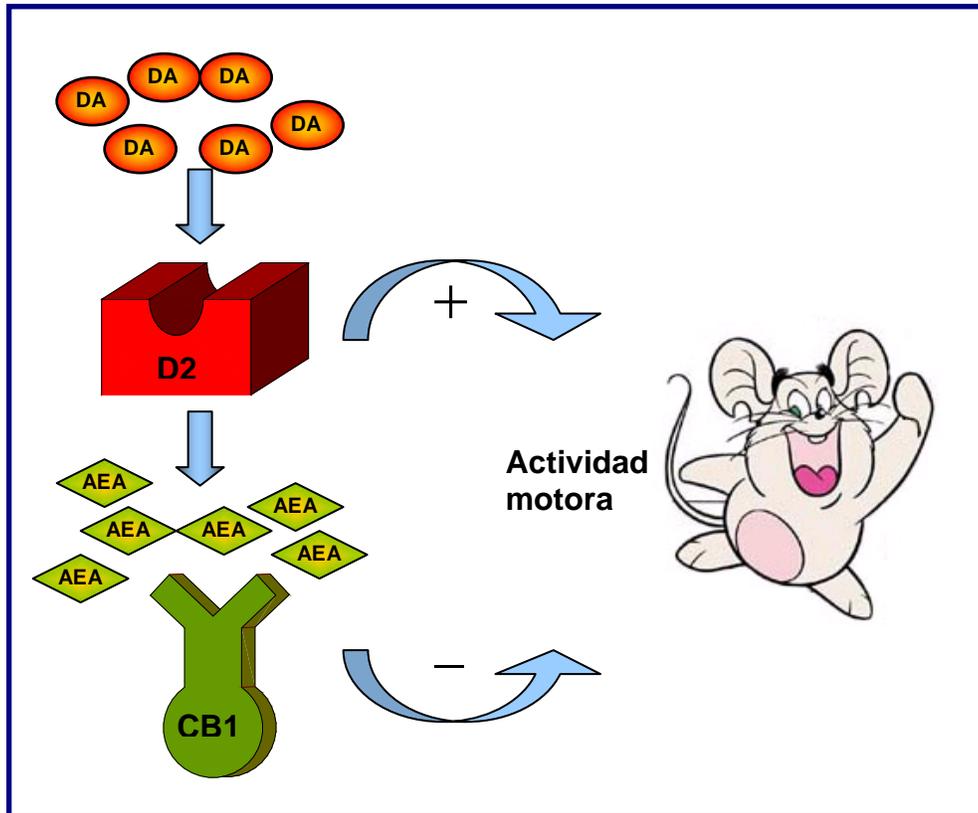
- La activación de los receptores CB1 implicaría la inhibición directa de la liberación de dopamina mediante la inhibición de la adenilato ciclasa en los receptores D1 y D2 (Glass y Felder, 1997). Además la expresión genética del receptor CB1 en el estriado parece estar bajo el control negativo de las neuronas de la sustancia negra (Lastres-Becker et al., 2001; Malleaux y Vanderhaeguen, 1993).
- Además el hecho de que los receptores cannabinoides CB1 también se localizan presinápticamente en las terminales de las neuronas GABAérgicas estriatopalidales y estriatonigrales, produciría un mecanismo de inhibición indirecta; pues al activarse estos receptores bloquearían la recaptación de GABA permitiendo así una mayor actuación de este neurotransmisor inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas (Glass et al., 1997). Aunque, como se ha comentado en el apartado anterior aún no se ha clarificado el papel de los cannabinoides sobre la modulación de la neurotransmisión GABAérgica (Wallmichrath y Szabo, 2002a, b).

La administración de cannabinoides en animales adultos ha mostrado afectar la neurotransmisión dopaminérgica nigroestriatal, ya que los cannabinoides producirían una inhibición en la actividad del precursor de la síntesis de dopamina la tirosina hidroxilasa TH; afectando por tanto a la liberación de dopamina y produciendo un decremento en la densidad de los receptores D1 y D2 en el estriado (Cadogan et al., 1997; Navarro et al., 1993a,b, 1994a; Romero et al., 1995a,b).

Los estudios de exposición perinatal a cannabinoides muestran modificaciones a largo plazo en la neurotransmisión dopaminérgica, produciéndose cambios en la recaptación de dopamina, en el perfil ontogenético de los receptores D1 y D2, y provocando una reducción en la expresión del gen específico de la enzima precursora de la síntesis de dopamina la tirosina hidroxilasa o TH (Bonnin et al., 1994, 1995; Fernández-Ruiz et al., 1994; Rodríguez de Fonseca et al., 1991a, 1992b; Suarez et al., 1999).

La interacción entre el sistema cannabinoide y el dopaminérgico en el control de las conductas motoras ha sido demostrada por distintos estudios: el tratamiento crónico con agonistas de dopamina ha mostrado producir una modulación en las respuestas motoras producidas por la administración de cannabinoides (Rodríguez de Fonseca et al., 1994b), la administración de cannabinoides en los ganglios basales han mostrado contrarrestar los efectos motores producidos por la administración del agonista dopaminérgico D2 quinpirole (Sañudo-Peña et al., 1996, 1998) y finalmente la liberación del ligando endógeno anandamida en el estriado ha mostrado que puede ser inducida por la activación de los receptores dopaminérgicos D2, no produciéndose este efecto por la activación de los receptores dopaminérgicos D1 (Giuffrida et al., 1999). Esta interrelación entre los dos sistemas, el endocannabinoide y el dopaminérgico, y más concretamente con el receptor dopaminérgico D2 esta aún siendo estudiada, aunque Giuffrida ha propuesto un modelo hipotético de la interacción funcional de ambos sistemas en el estriado, en el que la conducta motora estaría mediada por los inputs inhibitorios y excitatorios producidos por ambos sistemas Figura 3.2. (Giuffrida et al., 1999, 2000).

FIGURA 3.2. Modelo hipotético sobre la interacción funcional entre los sistemas endocannabinoide y dopaminérgico en el estriado. La activación de los receptores dopaminérgicos D2 induciría la liberación extracelular de anandamida. La anandamida actuaría contrarrestando las conductas motoras producidas por la activación de los receptores dopaminérgicos D2 por la activación de los receptores cannabinoides CB1.



En resumen, parece que la característica aparición de los efectos motores tras la administración de cannabinoides como el descenso de la actividad motora espontánea y de la conducta estereotipada, el incremento de la inactividad y la producción de catalepsia (Navarro et al., 1993b; Pertwee et al., 1988; Rodríguez de Fonseca et al., 1994a) son debidos por la acción moduladora de los cannabinoides sobre la neurotransmisión en los ganglios basales.

3.4. Perspectivas futuras: los cannabinoides y las patologías de los ganglios basales

La implicación del sistema cannabinoide endógeno en el control motor de los ganglios basales plantea también su participación en los trastornos psicomotores relacionados con esta estructura cerebral, tanto en los producidos por las enfermedades neurodegenerativas como por las patologías relacionadas con la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica.

El deterioro del sistema cannabinoide endógeno en los ganglios basales en enfermedades neurodegenerativas, que afectan directa o indirectamente al control de la conducta motora, ha sido hallado en los análisis postmortem del cerebro de personas que habían padecido enfermedades como la de Parkinson, la de Alzheimer o la corea de Huntington (Glass et al., 2000; Lastres y Becker, 2001; Westlake et al., 1994). Estos resultados han sido corroborados por estudios realizados con modelos experimentales de lesión en animales que reproducían estas enfermedades. Los modelos experimentales de la corea de Huntington han mostrado un descenso en los receptores cannabinoides CB1 en los ganglios basales (Lastres-Becker et al., 2002), mientras que modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson han mostrado un incremento de la expresión de los receptores CB1 en el estriado y de sus ligandos endógenos en el globo pálido (Di Marzo et al., 2000b; Lastres-Becker et al., 2001; Romero et al., 2002; Zeng et al., 1999).

En el caso de patologías relacionadas con el sistema dopaminérgico, se ha establecido la llamada "hipótesis cannabinoide de la esquizofrenia", ya que la exposición prolongada o la intoxicación con cannabinoides puede producir síntomas psicóticos parecidos a los de la esquizofrenia (Linszen et al., 1994; Thomas, 1993;). En los pacientes esquizofrénicos se ha encontrado niveles elevados de cannabinoides endógenos en el líquido cefalorraquídeo, lo que podría explicarse por un intento de homeostasis del sistema cannabinoide endógeno por la hiperfuncionalidad dopaminérgica (Leweke et al., 1999). Estudios en animales han mostrado que el tratamiento crónico con agonistas cannabinoides en una determinada dosis puede producir una exacerbación de los síntomas producidos por la administración de psicoestimulantes como la anfetamina, apoyando de este modo la participación del sistema cannabinoide en la manifestación de síntomas asociados con la esquizofrenia (Gorriti et al., 1999).

Los estudios sobre la terapéutica de los cannabinoides en las enfermedades relacionadas con la degeneración de los circuitos de neurotransmisión en los ganglios basales, han mostrado que en los modelos animales de enfermedades como la esclerosis múltiple o la

corea de Huntington los agonistas cannabinoides pueden actuar mejorando sus síntomas (Baker et al., 2000, 2001; Lastres-Becker et al., 2003; Pryce et al., 2003), mientras que en los modelos de la enfermedad de Parkinson han mostrado reducir la mejora de la akinesia producida por los agonistas de los receptores de dopamina D2, y no por los de los receptores D1 (Glass, 2001; Maneuf et al, 1997).

Estudios pre-clínicos en humanos han mostrado que el bloqueo de los receptores cannabinoides CB1 mejora las disquinesias producidas por los tratamientos prolongados de dopamina en la enfermedad de Parkinson (Brotchie, 1998). La administración oral de tetrahidrocannabinol en pacientes con el síndrome de Tourette puede reducir y aliviar la producción de los tics y de las conductas compulsivas (Müller-Vahl et al., 2003).

El carácter neuromodulador del sistema cannabinoide endógeno supone un nuevo punto de vista sobre la investigación en cannabinoides. El conocimiento sobre el papel clave que desempeña este sistema en la regulación de los circuitos de neurotransmisión implicados en los ganglios basales permite que en la actualidad se plantee el estudio sobre la posible utilización de los derivados cannabinoides para la terapéutica de trastornos los relacionados con el comportamiento motor. En un futuro no muy lejano podremos disponer de compuestos cannabinoides con acciones farmacológicas más específicas que puedan tener utilidades como terapia en los trastornos motores relacionados con las patologías de los ganglios basales.

II - PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La novedad sobre el estudio del carácter neuromodulador del sistema cannabinoide endógeno, hace que hasta el momento no hayan sido conocidos ciertos aspectos sobre los efectos de la activación continuada de este sistema.

Cuando se produce la activación permanente de un sistema de neurotransmisión se van a producir una serie de cambios tanto en su estructura como en sus interacciones con los demás sistemas. De este modo un tratamiento continuado con agonistas del receptor cannabinoide CB1 que mantengan una activación permanente del sistema cannabinoide endógeno producirá cambios no solo en el propio sistema sino también en las interacciones funcionales que mantiene con los circuitos de neurotransmisión en los ganglios basales, y en concreto con el sistema dopaminérgico clave en esta estructura, dando lugar a modificaciones en el control psicomotor.

El planteamiento de este trabajo consistió en el desarrollo de modelos conductuales en animales, tanto en el periodo de desarrollo como en el periodo adulto, que permitiesen estudiar los efectos producidos por los tratamientos crónicos con cannabinoides sobre el comportamiento psicomotor, así como los cambios producidos en los sistemas de neurotransmisión que participan en este comportamiento, y en concreto el sistema dopaminérgico por ser otro importante sistema de modulación en el cerebro. Dado que el sistema dopaminérgico es considerado como uno de los neurotransmisores más importantes relacionados con el control de las conductas motoras y dado que actualmente se están descubriendo nuevas facetas sobre la interacción del sistema cannabinoide endógeno con el receptor dopaminérgico D2, se escogió como estrategia neuropsicofarmacológica la respuesta al desafío con agonistas de los receptores de dopamina D1 y D2, específicamente con los agonistas del receptor D2, pues estudios anteriores muestran un mayor interrelación en el control de las conductas motoras, tras el tratamiento crónico con cannabinoides, con el fin de comprobar las posibles alteraciones producidas sobre la respuesta regulación de la neurotransmisión implicada en control de las respuestas motoras. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar las alteraciones producidas en el comportamiento motor en el periodo adulto, por la exposición con cannabinoides durante la etapa de desarrollo del SNC. Se realizó una exposición perinatal al agonista cannabinoide delta-9-tetrahidrocannabinol evaluando durante el periodo adulto de estos animales los efectos en el comportamiento motor, así como los efectos en determinadas hormonas para la posible comprobación de un dimorfismo sexual en los resultados.

- Evaluar la posible modificación a largo plazo en la respuesta comportamental a un estímulo dopaminérgico por la exposición con cannabinoides durante el periodo de desarrollo del SNC. Tras realizar un tratamiento en el periodo perinatal con el agonista cannabinoide delta-9-tetrahidrocannabinol, se estudiaron los efectos en la respuesta comportamental al desafío farmacológico con el agonista de los receptores dopaminérgicos D1/D2 apomorfina y el agonista de los receptores dopaminérgicos D2 quinpirole en el periodo adulto de los animales.

- Estudiar las modificaciones en el comportamiento motor producidas por la exposición crónica a cannabinoides en el periodo adulto. Se realizó un tratamiento crónico en animales adultos con los agonistas cannabinoides HU210 y WIN55212-2, evaluando el comportamiento motor de los animales tras el cese del tratamiento crónico.

- Evaluar la posible alteración en la respuesta comportamental a un estímulo dopaminérgico por la exposición crónica con cannabinoides en el periodo adulto. Para ello se realizó un tratamiento crónico con los agonistas cannabinoides HU210 y WIN55212-2, y tras el cese se evaluaron los efectos en la respuesta comportamental al desafío farmacológico con el agonista del receptor dopaminérgico D1 SKF38393 y el agonista del receptor dopaminérgico D2 quinpirole en animales adultos.

- Análisis de las posibles modificaciones en la neurotransmisión de los ganglios basales, implicada en las conductas motoras, por la exposición crónica con cannabinoides en el periodo adulto. Se realizó un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212-2 en animales adultos, y tras el cese se registraron los niveles en la liberación del neurotransmisor dopamina en el estriado dorsal y la liberación de GABA en el globo pálido.

- Estudio de los posibles cambios producidos en la respuesta neuroquímica en los ganglios basales tras la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 por la exposición crónica con cannabinoides en el periodo adulto. Se realizó un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212-2 en animales adultos, y tras el cese se registraron los niveles de la liberación del neurotransmisor dopamina en el estriado dorsal y de la liberación de GABA en el globo pálido en respuesta a la administración del agonista de los receptores D2 quinpirole.

III - MATERIAL Y MÉTODOS

1) ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1. Experimento I: Tratamiento crónico con Δ^9 THC durante el periodo perinatal

Los animales empleados fueron ratas wistar de ambos sexos. Los animales nacidos en el C.A.I. de la Facultad de Psicología (UCM), para el tratamiento perinatal, permanecieron en condiciones constantes de luz-oscuridad (luz 8:00-20:00), temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad; y con acceso libre al consumo de agua y de la comida estándar (Panlab, Barcelona) hasta el momento del sacrificio.

Previamente al inicio del tratamiento perinatal se procedió a la reproducción de los animales objeto de estudio. Para ello se emplearon un grupo de ratas wistar hembra, de aproximadamente ocho semanas de edad y de 200-250 g de peso, para su fertilización. A su llegada al C.A.I. Facultad de Psicología (UCM) fueron colocadas en cajas de plexiglás, en una habitación con control del periodo luz-oscuridad (luz 8:00-20:00), de la temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y de la humedad, con acceso libre al consumo de agua y de la comida estándar.

Durante 14 días se llevo a cabo un estudio del ciclo estral de dichas ratas hembras. Mediante la realización de un frotis, con una pipeta de plástico y suero salino 0.9 %, se recogieron muestras del exudado vaginal. Las muestras se observaron en un microscopio óptico para identificar la presencia de los tipos celulares característicos de las distintas fases del ciclo estral: células epiteliales nucleadas en el proestro, células cornificadas en el estro, leucocitos en el metaestro, y presencia de leucocitos y células epiteliales nucleadas en el diestro (Nelson, 1996). Identificando de este modo la fase del ciclo estral en la que se encontraba cada hembra. Con el objeto de controlar el inicio y duración de la gestación, para la correcta administración del tratamiento, solo aquellas hembras que mostraron una regularidad en el ciclo, es decir, las que mostraron tres o más ciclos regulares de cuatro días, fueron escogidas para el estudio perinatal. Una vez que las hembras se encontraron en la fase proestro del ciclo (fase más fértil), se dejaron con una rata macho de la misma cepa (wistar) para que se produjera la fecundación. Al día siguiente, se tomaron muestras de la vagina, de forma que solo aquellas hembras que mostraron la presencia de espermatozoides se consideraron como preñadas y se utilizaron para el estudio perinatal. Este día fue considerado como el primer día de gestación, el tratamiento perinatal Δ^9 -tetrahidrocannabinol comenzó en el 5º día de gestación y terminó el 24º día postnatal (final de la lactancia); después se produjo el destete de las crías y fueron separadas, formando grupos de 4 ó 5 por caja, de acuerdo con el sexo y el tratamiento.

1.2. Experimento II y III: Tratamiento crónico con cannabinoides durante el periodo adulto

Los animales empleados fueron ratas wistar macho (peso aprox. 225-250 g). Los animales fueron estabulados en condiciones constantes en un C.A.I., con control del periodo luz-oscuridad (luz 8:00-20:00), temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad; y con acceso libre al consumo de agua y de la comida estándar hasta el momento del sacrificio.

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con la Directiva del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC) de la Comunidad Europea, que regula la investigación con animales.

2) TRATAMIENTOS

2.1. Exp. I: Tratamiento crónico con $\Delta^9\text{THC}$ durante el periodo perinatal

En el tratamiento de exposición perinatal se empleo el agonista cannabinoide **delta-9-tetrahidrocannabinol ($\Delta^9\text{THC}$)** de una pureza mayor del 95%, en solución de etanol, proporcionado por National Institute on Drug Abuse (NIDA) Research Triangle Institute.

Se utilizaron 3 dosis distintas de $\Delta^9\text{THC}$ 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg y 2 mg/kg. Estas dosis fueron seleccionadas de acuerdo con estudios anteriores (Rubio et al., 1998) y a partir de la extrapolación de datos estimados del consumo moderado de éste compuesto en humanos, considerando las diferencias en la vía de administración y en el área corporal (Nahas, 1984).

Inmediatamente antes de su utilización, el $\Delta^9\text{THC}$ disuelto en etanol se emulsiono en aceite de sésamo, y posteriormente el etanol fue evaporado por la exposición a gas nitrógeno, quedando así lista la emulsión para administrar. Para el grupo de tratamiento control se siguió los mismos pasos, se emulsionó una cantidad media de etanol absoluto en aceite de sésamo y posteriormente se evaporó en atmósfera de nitrógeno.

El tratamiento se administró mediante una dosis única diaria por vía oral, en un volumen de 0.1 ml, para cada rata madre durante el periodo perinatal. La administración tuvo lugar entre las 10:00-12:00 horas de la mañana, comenzando el 5º día de gestación y finalizando el 24º día de lactancia, día en el que las camadas fueron destetadas.

2.2. Exp. II y III: Tratamiento crónico con cannabinoides durante el periodo adulto

Para el tratamiento de exposición crónica a cannabinoides se emplearon los agonistas cannabinoides

A) **HU210**: *delta-8-tetrahydrocannabinol-dimethyl-heptyl*, distribuido por Tocris (Cookson Ltd, UK). Se empleo una dosis de 20 μ g/kg, de acuerdo con otros estudios sobre tratamiento crónico con este cannabinoide (Rodríguez de Fonseca et al., 1994b). Para su administración fue disuelto en una solución compuesta por salino 0.9%, propilenglicol, y Tween-80 (90:5:5 v/v) que fue empleado como vehículo. El tratamiento se administró mediante una dosis única diaria durante 14 días por vía i.p., en un volumen de 0.1 ml. La administración tuvo lugar entre las 10:00-12:00 horas de la mañana.

B) **WIN55,212-2**: *R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl)-(1-naphthalenyl) methanone mesylate*, distribuido por Sigma Aldrich química (St. Louis, MO, EEUU). Se empleo una dosis de 4 mg/kg al día, de acuerdo con otros estudios sobre tratamiento crónico con este cannabinoide (Aceto et al., 2001; Pontieri et al., 2001). Para su administración fue disuelto en una solución compuesta por salino 0.9%, etanol y Tween-80 (90:5:5 v/v) que fue empleado como vehículo. El tratamiento se administró mediante dos dosis diarias de 2mg/kg durante 14 días por vía i.p., en un volumen de 0.1 ml. Se empleo un régimen de administración continuo, inyectando una dosis de 2 mg/kg cada 12 horas, con el fin de mantener un nivel constante del cannabinoide en el organismo, ya que el WIN55212 posee un metabolismo farmacocinético más rápido que otros cannabinoides.

2.3. Tratamiento agudo con agonistas de dopamina en el periodo adulto

Tras el tratamiento crónico con cannabinoides, tanto en la exposición perinatal como en la adulta, los animales fueron sometidos a la administración aguda de agonistas dopaminérgicos.

- **Apomorfina**: *Apomorphine Hydrochloride hemihydrate*, distribuido por Sigma Aldrich química (St. Louis, MO, EEUU), es un agonista no selectivo de los receptores dopaminérgicos D1 y D2. Se empleo una dosis de 0.1 mg/kg mediante administración s.c., como vehículo se utilizó suero salino.

- **SKF38393**: distribuido por Tocris (Cookson Ltd, UK), es un agonista selectivo de los receptores dopaminérgicos D1. Se empleó una dosis de 8 mg/kg mediante administración s.c. Como vehículo se utilizó suero salino.
- **Quinpirole**: (-) – *Quinpirole hydrochloride*, distribuido por Tocris (Cookson Ltd, UK), es un agonista selectivo de los receptores dopaminérgicos D2/D3. Se emplearon dos dosis 0.25 y 0.5 mg/kg s.c. Como vehículo se utilizó suero salino.

Todas las dosis se seleccionaron en base a estudios previos que han mostrado la existencia de interacciones farmacológicas entre los receptores dopaminérgicos y cannabinoides (Giuffrida et al., 1999; Rodríguez de Fonseca et al., 1994b).

3) ESTUDIOS COMPORAMENTALES

Para estudiar los efectos sobre el comportamiento motor del tratamiento crónico con cannabinoides se han valorado determinadas conductas relacionadas con la actividad motora de los animales como la locomoción y la inmovilidad; también se han evaluado la producción de estereotipias dada la influencia de la activación dopaminérgica sobre esta conducta; y se han registrado otras conductas relacionadas con la actividad espontánea de los animales como la conducta exploratoria y la de autolimpieza.

Todos los estudios comportamentales se realizaron durante el periodo de edad adulta de los animales, empleando cajas de observación de PVC de 40x30x30 cm. En las sesiones de evaluación se situaba a cada animal en una caja de observación, registrándose la actividad locomotora mediante un “actímetro”, y valorándose las demás conductas mediante la observación de las grabaciones realizadas en video-casete de cada sesión. El día anterior al experimento se situaba a los animales en cada caja de observación durante 10 minutos con el fin de lograr una habituación.

La conducta locomotora fue evaluada mediante un “actímetro”, del que disponía cada caja de observación, compuesto por un sistema de fotocélulas que registra el movimiento del animal. Estas cajas están equipadas con dos filas de células fotoeléctricas, la fila superior situada a una altura de 10 cm y consta de 4 células; la fila inferior situada a una altura de 2 cm y consta de 5 células; con una separación en ambas filas de 8 cm entre cada célula. El sistema

consta además de dos filas enfrentadas a las anteriores, de idénticas características en cuanto a la situación y altura, pero constituidas por elementos que emiten rayos infrarrojos. El sistema está realizado con una electrónica digital basada en codificadores de prioridad adaptable a interfaz de ordenador a través de una PIO 8255. El software cuenta de forma acumulativa, el número de cortes o cruces que se producen en cada barrera o haz. El total acumulado de los cruces en la fila superior y en la fila inferior de barreras se tomó como una medida de la actividad locomotora total.

Las grabaciones de las sesiones en video-casete fueron evaluadas por observadores entrenados en conducta animal. En éstas se valoraron principalmente las siguientes conductas:

- a. *Conducta de inmovilidad*: definida como el tiempo medido en segundos que el animal permanece quieto o inmóvil.
- b. *Conductas de estereotipia*: se registró como el total de la producción de conductas de forma repetitiva, más de dos veces consecutivas. Así como la producción de conductas de balanceo de la cabeza.
- c. *Conductas de exploración*: se registraron como la suma de la frecuencia de las conductas de olisqueo y erguimiento del animal.
- d. *Conductas de autolimpieza*: registrado como el tiempo medido en segundos que el animal emplea en conductas de acicalamiento o aseo.

Además en algunos estudios se registró la producción de varias expresiones conductuales como: saltos, movimientos orales, postura encogida, cierre parpebral (ptosis) y piloerección.

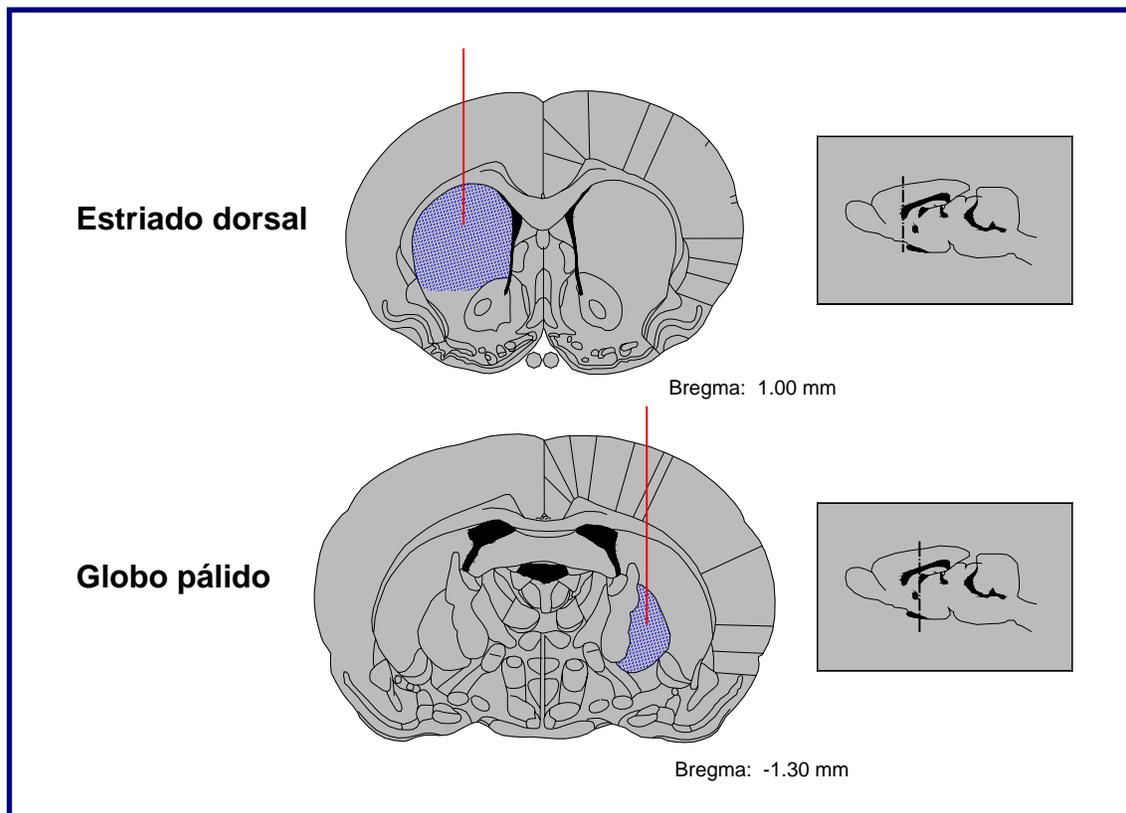
Cada sesión de evaluación constó de varios periodos de medida, estas se realizaron tras la administración de los agonistas de dopamina, a los 30 minutos, a los 60 y los 120 minutos. En cada periodo se realizó una valoración durante cinco minutos de la conducta del animal.

4) MICRODIALISIS DE LOS NIVELES DE DOPAMINA Y GABA

El estudio de microdiálisis sobre los niveles de dopamina y GABA se llevo a cabo en el Departamento de Neurofarmacología del Scripps Research Institute, San Diego, CA, EEUU .

4.1. Cirugía estereotáxica

Para llevar a cabo el estudio de microdiálisis se realizó un doble implante en el cerebro de los animales de dos cánulas de acero inoxidable de 25 G. Los animales fueron anestesiados con gas isoflurano y mediante cirugía estereotáxica se implantó una cánula en la región del estriado dorsolateral en el cerebro, de acuerdo con las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson 1997, tomando como referencia el punto bregma sobre el cráneo (antero posterior +1.0 mm, lateral \pm 2.5 mm, ventral +2.8 mm); y la otra cánula fue implantada en la región del globo pálido (antero posterior -1.3 mm, lateral \pm 3.0 mm, ventral +5.0 mm) mediante el mismo procedimiento. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con cemento metacrílico y dos tornillos de acero. Las dos cánulas fueron implantadas en hemisferios opuestos con el fin de evitar interferencia entre ellas. Finalmente se colocó un obturador metálico para mantener el buen estado del implante durante el experimento. Tras una semana de recuperación los animales comenzaron a recibir el tratamiento crónico de WIN55212-2.

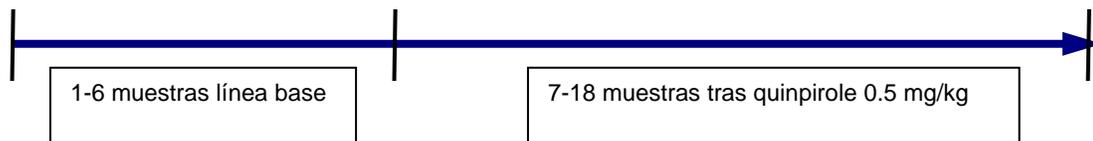


4.2. Implantación de la sonda de microdiálisis

Tras la última inyección del tratamiento crónico con cannabinoides, y previamente al día experimental en el que se realizó el desafío con agonistas de dopamina, los animales fueron nuevamente anestesiados mediante gas isoflurano para la introducción y fijación de las sondas de microdiálisis dentro del cerebro a través de las cánulas de acero previamente implantadas en el estriado dorsal y en el globo pálido. Tras el implante de la sonda comenzó la perfusión de una solución de líquido ceforraquídeo artificial, con una velocidad de flujo de 0.2 microlitros por min. durante 10 horas; y dos horas antes del experimento la velocidad de flujo de la solución fue incrementada hasta la velocidad de flujo deseada para el experimento que era 0.6 microlitros por min.

La composición del líquido ceforraquídeo artificial para la recogida de las muestras estaba formado por Na Cl 145 mM, K Cl 2.8 mM, Mg Cl₂ 1.2 mM, Ca Cl₂ 1.2 mM, d-Glucosa 5.4 mM, y ascorbato 0.25 mM. La solución se preparó en agua bi-distilada, se ajustó a un pH de 7.2-7.4 y se filtró.

La secuencia del experimento fue la siguiente, primero se recogieron 6 muestras de línea base, y tras estas se inyectó el agonista dopaminérgico, para después seguir recogiendo las muestras. En total fueron recogidas 18 muestras, con una frecuencia de 10 min. entre cada una de ellas, obteniendo de esta forma un volumen total en cada muestra de 60 microlitros.



Tras el experimento los animales se sacrificaron con una campana de halotano y los cerebros fueron extraídos con el fin de verificar con ayuda de un criotomo que efectivamente las cánulas se encontraban posicionadas correctamente en ambas estructuras, el estriado dorsal y el globo pálido, en el cerebro de los animales.

4.3. Análisis de las muestras de dopamina y GABA

Las concentraciones de dopamina fueron determinadas a partir de las alícuotas de 5 µl recogidas en la microdiálisis, analizadas mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de detección electroquímica. La dopamina fue separada en una columna de 1 x 100

mm (BetaBasic 3 μm C18; Keystone Analytical, Bellefonte, PA, EEUU) bombeando una fase móvil compuesta por tampón fosfato 50 mM, NaH_2PO_4 con 17% Acetonitrilo (v/v), 0.2 mM Na_2EDTA , 3.7 mM ácido 1-decanosulfónico y 4.9 mM trietilamina (pH 4.2). El flujo de trabajo fue de 35 $\mu\text{l}/\text{min}$, empleando una bomba de inyección constante ISCO Modelo 500D (Lincoln, NE, EEUU). El eluido se analizó en un sistema de detección electroquímico que consistía en dos electrodos de fibra de carbono montados en serie (EG&G Princeton Applied Research Modelo MP1304; Trenton, NJ, EEUU). El primer electrodo en el flujo de paso se ajustó a un potencial de +700 mV, respecto a un electrodo de referencia de AG/AgCl (Modelo RE4; BioAnalytical Systems) que fue utilizado para reducir la señal para el segundo electrodo de trabajo. El segundo electrodo se ajustó a 0 mV para la medición del pico de reducción producido por la dopamina. El potencial del electrodo y los análisis de intensidad fueron controlados por un detector amperométrico (EG&G Princeton Applied Research Modelo 400). Las curvas de calibración se realizaron diariamente a partir de disoluciones estándar recientes. Todos los reactivos y los estándares de dopamina fueron distribuidos por Sigma Aldrich química (St. Louis, MO, EEUU).

El análisis de GABA se realizó empleando electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser. La derivatización del GABA se consiguió mezclando 5 μl de la alícuota obtenida en la microdialísis con 9 μl de tampón borato 40 nM (pH 10.5), que contenía 3.8 nM KCN y 1 μl de naftaleno-2,3-dicarboxialdehído 5nM en metanol; dejándose reaccionar la mezcla a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min. antes de colocar las muestras en el cargador refrigerado (10°C) del aparato de electroforesis capilar (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EEUU). El dializado derivatizado se cargo en un capilar de 90cm (diámetro interno 30, la muestra se carga aplicando una presión de 50mb durante 10s) y los aminoácidos se separaron utilizando +15kV y una solución de electrolitos compuesta por un tampón borato 100mM (pH 9.2), SDS 30 mM y hidroxipropil-ciclodextrina 2 mM. La concentración de GABA se detectó mediante un detector de fluorescencia inducida por láser (Zetalif, Picometrics, Ramon Ville, France) de 442nm de HeCd (30 mW, Melles Griot, Carlsbad, CA, EEUU). Los estándares de calibración externa se ensayaron en duplicado y se intercalaron en la secuencia de muestras. El límite de detección del ensayo fue de 1nM. Todos los reactivos y los estándares de aminoácido fueron distribuidos por Sigma Aldrich química (St. Louis, MO, EEUU).

5) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES HORMONALES EN PLASMA

Los análisis de hormonas fueron llevados a cabo en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Una vez que los animales fueron sacrificados mediante decapitación, manteniendo la hora del sacrificio constante para evitar las variaciones inducidas por el ritmo circadiano sobre los parámetros hormonales a estudiar (Wirz-Justice, 1987), se procedió a la extracción rápida de las muestras de plasma de los animales en tubos de plástico con 400 microlitros de etilendiaminotetracetato sódico EDTA al 6%. A continuación se centrifugaron a 2500 x g durante 15 minutos a 4°C y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

La determinación de los niveles hormonales de las muestras de plasma recogidas se realizó mediante técnicas de radio inmuno ensayo o RIA. Todas las muestras fueron medidas en un mismo ensayo para evitar variaciones interanálisis.

El RIA se basa en una reacción de competencia entre la hormona de la muestra y una cantidad fija de la misma hormona marcada radiactivamente que se combina con el anticuerpo específico para la hormona a medir. La cantidad de hormona marcada radioactivamente que esta unida al anticuerpo será inversamente proporcional a la concentración de la hormona no marcada presente en el plasma. La separación de la hormona libre de la marcada ligada al anticuerpo se lograra por un sistema de doble anticuerpo. La concentración de la hormona se calcula ajustando la radiactividad unida al anticuerpo a una curva patrón resultante de representar la radiactividad unida al anticuerpo obtenida para cantidades conocidas de la hormona no marcada.

La determinación de los niveles en plasma de la hormona corticosterona se realizó mediante una técnica específica de RIA utilizando hidroxipatita para la separación de las fases libre y unida (Villanúa y Gamallo, 1985; Gamallo et al., 1992). Se prepararon tubos con 100 µl de diluciones patrón de corticosterona (Ikapharm) de 0 a 80 ng/ml en un tampón fosfato 5 mM, NaCl 0.15 M, con 0.6 g/l de albúmina de suero bovino y 0.2 g/l de gamma globulina (pH 7.4). Se extrajeron 25 o 50 µl de plasma en un volumen final de 500 µl de agua bidestilada con 5 ml de éter dietílico, congelándose la fase acuosa de la extracción a -20°C y decantandose la fase orgánica en tubos de cristal de 10 ml. Se evaporó el éter en corriente de aire y el residuo seco de la fase orgánica se reconstituyó en 1 ml de tampón fosfato 5 mM, NaCl 0.15 M, con 0.6 g/l de albúmina de suero bovino y 0.2 g/l de gamma-globulina (pH 7.4). Se añadieron 100 µl del anticuerpo de corticosterona (anti-corticosterona, Bioclin) a una dilución inicial de 1:1000 en un

tampón fosfato 5 mM, NaCl 0.15 M, con 0.6 g/l de albúmina de suero bovino y 0.2 g/l de gamma-globulina (pH 7.4). Se añadieron 100 µl de antígeno de corticosterona marcado radiactivamente con el isótopo H³ (1,2-H³corticosterona 43 Ci/mmol, Amersham; 10.000 cpm/tubo) en tampón fosfato 5 mM, NaCl 0.15 M, con 0.6 g/l de albúmina de suero bovino y 0.2 g/l de gamma-globulina (pH 7.4); y se dejó incubar durante 24 horas a 4°C. Se añadieron 150 µl de hidroxapatita 25g/l a cada tubo dejándose incubar durante 15 minutos a 4°C. Se centrifugaron todos los tubos a 1500g durante 15 minutos a 4°C, aspirándose posteriormente el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1ml de tampón fosfato 1mM (pH 7.4) y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 50 µl de tampón fosfato 0.05M añadiéndose 2ml de líquido de centelleo y se contaron durante 2 minutos en un contador de centelleo líquido. El límite de detección del ensayo fue de 0.05 ng.

La determinación de los niveles en plasma de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) fue realizada empleando un kit específico de RIA para esta hormona (Diagnostic Systems Laboratories, Inc; Texas, EEUU). Se preparan tubos con 200 µl de las diluciones patrón de la hormona adrenocorticotropa (ACTH estándar), añadiéndose 100 µl del anticuerpo de hormona adrenocorticotropa y se dejó incubar durante 4 horas a 4°C. Se añadió el antígeno de hormona adrenocorticotropa marcado radiactivamente por el isótopo I¹²⁵ y se dejó incubar durante 24 horas a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se añadió un 1 ml del segundo anticuerpo, es un antisuero de cabra contra gamma globulinas de conejo y se agitaron todos los tubos dejándose incubar a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugaron todos los tubos a 1500 X g (aprox. 3000 rpm) durante 15 minutos a 4°C y se aspiró el sobrenadante, contándose los precipitados en un espectrofotómetro de radiación gamma. El límite de detección del ensayo fue de 3.5 pg.

La determinación de los niveles de las hormonas prolactina (PRL) y luteinizante (LH) se realizó mediante la técnica de RIA de hormonas polipeptídicas. Para el análisis de la hormona prolactina se preparan tubos con 200 µl de las diluciones patrones de prolactina rPRL-RP3 de 0 a 25 ng/ml en un tampón fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, con 10 g/l de albúmina de suero bovino (pH 7.6). Se añaden 200 µl del anticuerpo de prolactina anti-rPRL-S9 a una dilución inicial de 1:200.000 en un tampón fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, con etilendiaminotetraacetato sódico (EDTA) 0.025 M y tritiplex 0.02 M (pH 7.6), se le añade suero de conejo al 0.25% y se preincuba durante 20 minutos a 4°C. Se añaden 200 µl del antígeno de prolactina marcado radiactivamente con el isótopo I¹²⁵ (I¹²⁵-PRL-16, 15.000 cpm/tubo) en tampón fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, con 10 g/l de albúmina de suero bovino (pH 7.6) y se incuba durante 48 horas a 4°C. Tras la incubación, se añaden 500 µl de la solución de segundo anticuerpo, un antisuero de oveja contra la fracción constante de gamma globulinas de conejo desarrollado por los Dres. Ariznavarreta y Tresguerres (Universidad Complutense de Madrid), a cada tubo y se incuba

durante 20 minutos a 4°C. Se centrifugan los tubos a 1500g durante 15 minutos a 4°C, y se aspira el sobrenadante, contándose los precipitados en un espectrofotómetro de radiación gamma. El límite de detección del ensayo fue de 0.02 ng.

Para el análisis de la hormona luteinizante se preparan tubos con 200 µl de las diluciones patrones de hormona luteinizante rLH-RP3 de 0 a 25 ng/ml en tampón tampón fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, con 10 g/l de albúmina de suero bovino (pH 7.6). Se añaden 200 µl del anticuerpo de hormona luteinizante anti-rLH-S11 a una dilución inicial de 1:200.000 un tampón fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, con etilendiaminotetraacetato sódico (EDTA) 0.025 M y tritriplex 0.02 M (pH 7.6) y se añade suero de conejo al 1% y tritón X-100 al 0.5%; se preincuba durante 48 horas a 4°C. Se añaden 200 µl del antígeno de hormona luteinizante marcada radiactivamente con el isótopo I¹²⁵ (I¹²⁵-LH-I9, 15.000 cpm/tubo) en tampón fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, con 10 g/l de albúmina de suero bovino (pH 7.6); y se incuba durante 72 horas a 4°C. Se añaden 500 µl de la solución de segundo anticuerpo a cada tubo, y se incuba durante 20 minutos a 4°C. Se centrifugan los tubos a 1500g durante 15 minutos a 4°C y se aspira el sobrenadante, contándose los precipitados en un espectrofotómetro de radiación gamma. El límite de detección del ensayo fue de 4 pg.

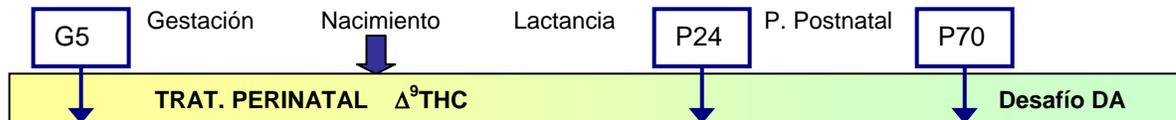
Los antígenos y anticuerpos específicos para hormonas fueron suministrados por el NIH (National Hormone and Pituitary Program, Bethesda, MD, Estados Unidos).

6) DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento I: Estudio de los efectos comportamentales de la activación dopaminérgica en el animal adulto tras el tratamiento crónico con Δ^9 THC durante el período perinatal

Para estudiar los efectos del tratamiento perinatal con cannabinoides en el periodo adulto, se realizó una exposición desde el 5º día de gestación hasta el 24º día de lactancia con el agonista cannabinoide Δ^9 - tetrahidrocannabinol en ratas wistar preñadas; dividiéndolas aleatoriamente en grupos de acuerdo con el tratamiento perinatal de Δ^9 THC. En total se formaron cuatro grupos, uno de control que utilizó como vehículo aceite de sésamo y tres de diferentes dosis de Δ^9 - tetrahidrocannabinol 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg y 2 mg/kg.

Una vez terminado el tratamiento perinatal, tras el final de la lactancia día postnatal 24, los animales fueron separados de las camadas colocándolos aleatoriamente en cajas de plexiglás de acuerdo con el sexo y el tratamiento perinatal, manteniéndose así hasta el periodo adulto, aproximadamente día 70 postnatal, en el que se realizaron los estudios de conducta. Las hembras fueron ovariectomizadas previamente al desarrollo de los experimentos para evitar la variabilidad en la conducta debido a los cambios en el ciclo.



6.1. Posibles efectos tóxicos de la exposición perinatal con $\Delta^9\text{THC}$ desde el desarrollo gestacional hasta el periodo adulto

Con el fin de evaluar los posibles efectos tóxicos del tratamiento perinatal con $\Delta^9\text{THC}$ se llevo a cabo un control sobre determinados parámetros en la gestación y en la lactancia, así como un seguimiento del peso de los animales hasta el periodo adulto.

En el periodo perinatal, es decir en la gestación y lactancia, se controlaron los siguientes parámetros en todos los grupos experimentales:

- Variación diaria del peso de la madre
- Consumo diario de comida por la madre (g)
- Consumo diario de agua por la madre (ml)
- Duración de la gestación
- Tamaño de la camada al nacimiento
- Peso de la camada al nacimiento (g)
- Número de machos y de hembras
- Mortalidad postnatal

A partir del nacimiento también se evaluó el peso de las crías, cada cinco días, hasta el periodo adulto día 70 postnatal. Durante la lactancia se controló el crecimiento de los animales el peso de la camada en gramos; y durante la pubertad mediante el peso individual de cada animal en gramos, diferenciando los grupos por el sexo y el tratamiento perinatal.

6.2. Efectos comportamentales y neuroendocrinos de la exposición perinatal con Δ^9 THC en el animal adulto

En el periodo adulto, aproximadamente día 70 postnatal, se evaluaron las posibles alteraciones motoras y neuroendocrinas producidas tanto en los grupos de los animales macho como en los grupos de los animales hembra formados por la administración perinatal de las distintas dosis de Δ^9 THC (vehículo, 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg y 2 mg/kg). Se realizó un estudio comportamental de los animales en condiciones basales tras la administración de salino, valorando la conductas motoras, la conducta de autolimpieza, la actividad estereotipada y la conducta exploratoria. Además se realizó un análisis de los niveles en plasma de las hormonas adrenocorticotropa, corticosterona, prolactina y hormona luteinizante.

6.3. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1/D2 en animales adultos tras la exposición perinatal con Δ^9 THC

Tras el tratamiento perinatal a Δ^9 THC, en el periodo adulto se estudio la respuesta comportamental a la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1/D2 tanto en los grupos formados por los animales macho como en los formados por los animales hembra. En la etapa adulta de los animales, aproximadamente día 70 postnatal, cada grupo de tratamiento perinatal de Δ^9 THC fue dividido en dos, empleándose uno como grupo control al que se le administró salino, y otro como grupo de desafío al que se le administró el agonista de los receptores dopaminérgicos D1/D2 apomorfin (0.1 mg/kg). Se realizó un estudio comportamental valorando la actividad motora, las estereotipias, la conducta de autolimpieza y la conducta exploratoria tras la administración, a los 60 minutos y a los 120 minutos.

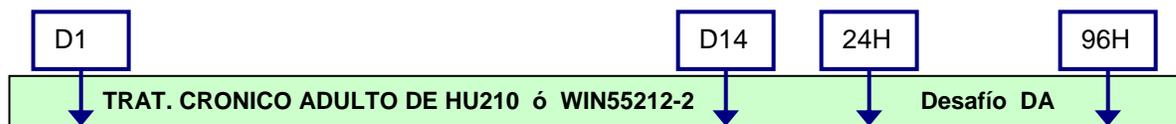
6.4. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos tras la exposición perinatal con Δ^9 THC

Tras el tratamiento perinatal a Δ^9 THC, en el periodo adulto se estudio la respuesta comportamental a la estimulación del los receptores dopaminérgicos D2, tanto en los grupos formados por los animales macho como en los formados por los animales hembra. En la etapa adulta de los animales, aproximadamente día 70 postnatal, cada grupo de tratamiento perinatal de Δ^9 THC fue dividido en dos, empleándose uno como grupo control al que se le administró salino, y otro como grupo de desafío al que se le administró el agonista del receptores

dopaminérgicos D2 quinpirole (0.5 mg/kg). Se realizó un estudio comportamental valorando la actividad motora, las estereotipias, la conducta de autolimpieza y la conducta exploratoria tras la administración del tratamiento, a los 60 minutos y a los 120 minutos.

Experimento II: Estudio de los efectos comportamentales de la activación dopaminérgica tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto

Para estudiar los efectos comportamentales del tratamiento crónico con cannabinoides durante el periodo adulto, se realizó una administración crónica de un agonista cannabinoide, HU210 o WIN55212-2, durante 14 días en animales adultos macho.



6.5. Efectos comportamentales 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210 en animales adultos

Para estudiar los efectos comportamentales del tratamiento crónico con el agonista cannabinoide HU210 24 horas tras su cese, se administró durante 14 días el agonista cannabinoide HU210 en la dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en animales macho adultos, empleando un grupo control al que se le administró vehículo. 24 horas tras la última administración del tratamiento crónico, se realizó un estudio del comportamiento motor de los animales en condiciones basales tras la administración de salino, valorando la conducta de inmovilidad y la locomoción.

6.5.1. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210

Tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide HU210 en animales adultos, se estudio la respuesta comportamental de la activación de los receptores dopaminérgicos D1. Para ello, 24 horas tras la última administración, cada grupo de tratamiento crónico fue dividido en dos grupos, uno de desafío al que se le administró el agonista de los receptores dopaminérgicos D1 SKF38393 (8 mg/kg) y un grupo control al que se le administró salino. Se

realizó un estudio comportamental valorando la conducta de inmovilidad, la locomoción y las estereotipias tras la administración, a los 30 min., a los 60 min. y a los 120 min.

6.5.2. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210

Tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide HU210 en animales adultos, se estudio la respuesta comportamental de la activación de los receptores dopaminérgicos D2. Para ello, 24 horas tras la ultima administración, cada grupo de tratamiento crónico fue dividido en dos grupos, uno de desafío al que se le administró el agonista de los receptores dopaminérgicos D2 quinpirole (0.5 mg/kg) y un grupo control al que se le administró salino. Se realizó un estudio comportamental valorando la conducta de inmovilidad, la locomoción y las estereotipias tras la administración, a los 30 min., a los 60 min. y a los 120 min.

6.6. Efectos comportamentales 96 horas tras el tratamiento crónico con HU210 en animales adultos

Para estudiar los efectos comportamentales del tratamiento crónico con el agonista cannabinoide HU210 96 horas tras su cese, se administró durante 14 días el agonista cannabinoide HU210 en la dosis de 20 µg/kg en animales macho adultos, empleando un grupo control al que se le administró vehículo. Se realizó un estudio del comportamiento motor de los animales en condiciones basales tras la administración de salino, a las 24, 48, 72 y 96 horas tras el cese del tratamiento crónico, evaluando los cambios en la conducta de inmovilidad y en la locomoción. Puesto que el HU210 es un compuesto lipofílico que tarda en ser eliminado por el organismo, se realizó la valoración de conducta en días sucesivos, tras la ultima administración del cannabinoide, con el objeto de comprobar la ausencia de actividad cannabonomimética y poder realizar el desafío con el agonista dopaminérgico.

6.6.1. Efectos de la estimulación de los receptores D2 en animales adultos 96horas tras el tratamiento crónico con HU210

Tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide HU210 en animales adultos, se estudio la respuesta comportamental de la activación de los receptores dopaminérgicos D2. Para ello, 96 horas tras la ultima administración, cada grupo de tratamiento crónico fue dividido en tres grupos, uno de control al que se le administró salino y dos grupos de desafío con el

agonista de los receptores dopaminérgicos D2 quinpirole, en las dosis 0.25 y 0.5 mg/kg. Se realizó un estudio comportamental valorando la conducta de inmovilidad, la locomoción y las estereotipias tras la administración, a los 30 min., a los 60 min. y a los 120 min.

6.7.Efectos comportamentales 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN 55212-2 en animales adultos

Para estudiar los efectos comportamentales del tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212-2, se administró durante 14 días el agonista cannabinoide WIN55212-2 en la dosis de 4 mg/kg en animales macho adultos, empleando un grupo control al que se le administró vehículo. A las 24 horas tras la última administración del tratamiento crónico, se realizó un estudio del comportamiento motor de los animales en condiciones basales tras la administración de salino, valorando la conducta de inmovilidad y la locomoción.

6.7.1. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN55212-2

Tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212-2 en animales adultos, se estudio la respuesta comportamental de la activación de los receptores dopaminérgicos D2. Para ello, 24 horas tras la última administración, cada grupo de tratamiento crónico fue dividido en dos grupos, uno de desafío al que se le administró el agonista de los receptores dopaminérgicos D2 quinpirole (0.5 mg/kg) y un grupo control al que se le administró salino. Se realizó un estudio comportamental valorando la conducta de inmovilidad, la locomoción y las estereotipias tras la administración, a los 30 min., a los 60 min. y a los 120 min.

Experimento III: Estudio de los efectos en los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales en respuesta a la activación del receptor D2 tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto

Para estudiar los efectos del tratamiento crónico con cannabinoides en los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales, se realizó una administración crónica del agonista cannabinoide WIN55212 en una dosis de 4 mg/kg durante 14 días en animales adultos macho.

6.8.Efectos en la liberación de dopamina en el estriado dorsal en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN55212-2

Tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212-2, se estudiaron los posibles cambios en la neurotransmisión de dopamina. Para ello se realizó un estudio de microdiálisis sobre la liberación de dopamina en el estriado dorsal en condiciones basales tras la administración de salino en animales adultos macho, 24 horas tras el cese del tratamiento crónico con cannabinoides.

6.8.1. Respuesta neuroquímica de la liberación de dopamina en el estriado dorsal por la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico de WIN55212-2

Tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212-2 en animales adultos, se estudio la respuesta neuroquímica de la activación de los receptores dopaminérgicos D2. Para ello, 24 horas tras la ultima administración, cada grupo de tratamiento crónico fue dividido en dos grupos, uno de desafío al que se le administró el agonista de los receptores dopaminérgicos D2 quinpirole (0.5 mg/kg) y un grupo control al que se le administró salino, realizándose un estudio de microdiálisis sobre la liberación de dopamina en el estriado dorsal.

6.9.Efectos en la liberación de GABA en el globo pálido en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN 55212-2

Tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212-2, se estudiaron los posibles cambios en la neurotransmisión de GABA. Para ello se realizó un estudio de microdiálisis sobre la liberación de GABA en el globo pálido en condiciones basales tras la administración de salino en animales adultos macho, 24 horas tras el cese del tratamiento crónico con cannabinoides.

6.9.1. Respuesta neuroquímica de la liberación de GABA en el globo pálido por la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico de WIN55212-2

Tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212-2 en animales adultos, se estudio la respuesta neuroquímica del neurotransmisor GABA por la activación de los receptores dopaminérgicos D2. Para ello, 24 horas tras la ultima administración, cada grupo

de tratamiento crónico fue dividido en dos grupos, uno de desafío al que se le administró el agonista de los receptores dopaminérgicos D2 quinpirole (0.5 mg/kg) y un grupo control al que se le administró salino, realizándose un estudio de microdiálisis sobre la liberación de GABA en el globo pálido.

7) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico de todos los resultados obtenidos en los distintos estudios, obteniéndose la media, el error estándar (e.e.m.) y se realizó un contraste de hipótesis de normalidad. Los resultados fueron analizados empleando para ello distintos test paramétricos en función de la composición de las variables. Para la comparación entre dos únicos grupos experimentales se realizó mediante el test de Student, mientras que en el caso de comparación de múltiples grupos se realizó mediante análisis de varianza ANOVA, realizando análisis post hoc con el estadístico de contraste Tukey en el caso de encontrar diferencias significativas. En todos los casos se adoptó un nivel de confianza del 95% como criterio de significación estadística (probabilidad de error menor de 0.050).

Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico informático SPSS.

IV - RESULTADOS

Experimento I

***Estudio de los efectos comportamentales de la activación dopaminérgica
en el animal adulto tras el tratamiento crónico con Δ^9 THC durante el
periodo perinatal***

1) POSIBLES EFECTOS TÓXICOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL CON Δ^9 THC DESDE EL DESARROLLO GESTACIONAL HASTA EL PERIODO ADULTO

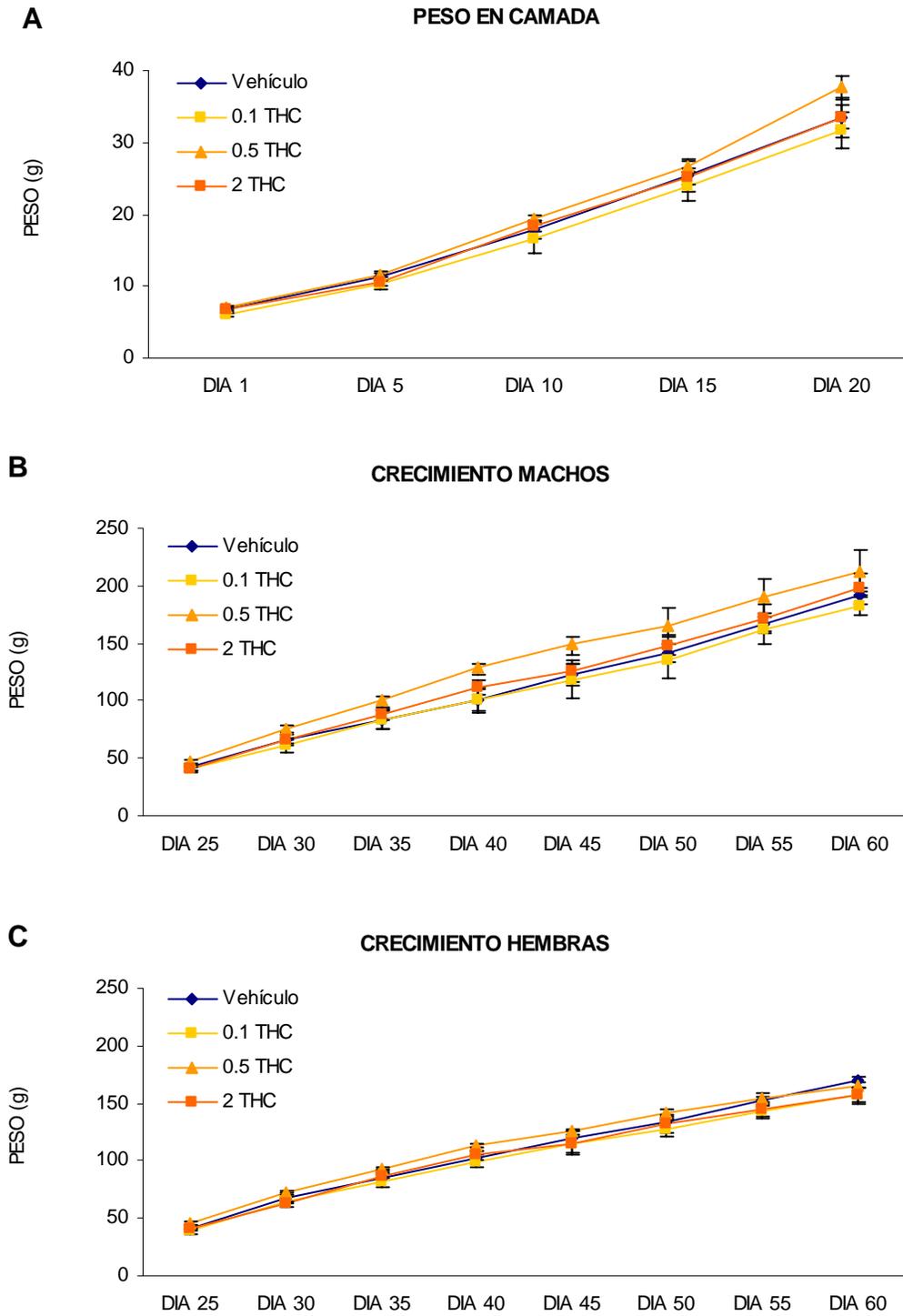
Con el fin de evaluar los posibles efectos tóxicos de la administración de Δ^9 THC, se registraron diversos parámetros generales de toxicidad durante la gestación, en el periodo postnatal y el en puberal hasta el periodo adulto (día 70 postnatal). La **tabla I** muestra un resumen de los parámetros obtenidos durante la gestación y lactancia medidos durante la exposición perinatal a Δ^9 THC. La figura 1A muestra el peso en camada de las crías desde el nacimiento hasta el final de la lactancia (día 20 postnatal). Las figuras 1B y 1C muestran el aumento del peso de las crías desde el final de la lactancia hasta el periodo adulto.

La exposición perinatal a Δ^9 THC no produjo diferencias significativas en ninguno de los **parámetros gestacionales y postnatales** registrados, únicamente el grupo expuesto a la dosis más alta de Δ^9 THC (2 mg/kg) mostró una tendencia tanto en gestación como en lactancia a un mayor consumo de agua y comida, así como a una mayor ganancia de peso durante la gestación.

TABLA I. Parámetros gestación y lactancia medidos durante la exposición perinatal a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm Error Estándar de la Media (E.E.M.).

| Parámetros | Tratamiento Δ^9 THC | | | |
|---------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | + Vehículo | + 0.1 mg/kg | + 0.5 mg/kg | + 2 mg/kg |
| Consumo de comida (g) | | | | |
| Gestación | 20.60 \pm 0.46 | 20.95 \pm 0.34 | 21.40 \pm 0.74 | 22.10 \pm 0.62 |
| Lactancia | 53.25 \pm 4.56 | 54.33 \pm 3.89 | 57.83 \pm 4.50 | 57.66 \pm 4.30 |
| Consumo de agua (ml) | | | | |
| Gestación | 37.50 \pm 1.26 | 34.70 \pm 1.08 | 39.36 \pm 1.05 | 41.36 \pm 1.50 |
| Lactancia | 72.91 \pm 5.75 | 70.20 \pm 5.61 | 79.16 \pm 6.50 | 82.16 \pm 6.60 |
| Ganancia de peso madres (g) | 115.20 \pm 3.03 | 110.00 \pm 5.60 | 115.75 \pm 6.28 | 122.33 \pm 18.61 |
| Duración de la gestación (días) | 22.60 \pm 0.24 | 22.00 \pm 0.00 | 22.75 \pm 0.29 | 22.33 \pm 0.41 |
| Tamaño de la camada | 11.80 \pm 0.89 | 12.25 \pm 0.73 | 11.25 \pm 0.99 | 13.00 \pm 0.71 |
| Peso de la camada (g) | 79.50 \pm 4.10 | 75.90 \pm 2.80 | 79.10 \pm 5.60 | 87.40 \pm 8.03 |
| Nº Machos | 6.00 \pm 1.32 | 6.50 \pm 1.11 | 5.50 \pm 0.33 | 7.33 \pm 1.08 |
| Nº Hembras | 5.80 \pm 0.89 | 5.75 \pm 1.19 | 5.75 \pm 1.09 | 5.67 \pm 1.47 |
| Mortalidad postnatal | 0.60 \pm 0.67 | 0.00 \pm 0.29 | 0.00 \pm 0.00 | 0.67 \pm 0.82 |

FIGURA 1. Pesos de animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. **1A** pesos en camada durante la lactancia. **1B** y **1C** pesos de machos y hembras hasta el periodo adulto. Los valores corresponden a las medias \pm Error Estándar de la Media (E.E.M.).



2) EFECTOS COMPORTAMENTALES Y NEUROENDOCRINOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL CON Δ^9 THC EN EL ANIMAL ADULTO

2.1. Efectos comportamentales

Los animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC mostraron en periodo adulto en condiciones basales un patrón comportamental significativamente diferente a los animales tratados con vehículo, **figura 2**. Los animales de ambos sexos expuestos perinatalmente a Δ^9 THC, en las dosis 0.1 y 2 mg/kg, mostraron un aumento en el tiempo de inmovilidad $F_{(3,76)} = 3.88$, $P < 0.012$; $F_{(3,78)} = 6.92$, $P < 0.000$, figura 2A y B. Así mismo la exposición perinatal a Δ^9 THC produjo un descenso en la conducta de locomoción en condiciones basales durante el periodo adulto tanto en machos $F_{(3,54)} = 4.13$, $P < 0.010$; como en hembras $F_{(3,78)} = 7.19$, $P < 0.000$, figura 2C y D.

Las **tablas II y III** muestran que en el caso de otras conductas en condiciones basales en el periodo adulto solo en el grupo de las hembras expuestas perinatalmente a Δ^9 THC se observaron diferencias significativas: en la conducta estereotipada, $F_{(3,78)} = 16.70$, $P < 0.000$; así como en la conducta exploratoria $F_{(3,78)} = 6.2$, $P < 0.001$ $F_{(3,78)} = 6.2$, $P < 0.001$.

2.2. Efectos neuroendocrinos

La exposición perinatal a Δ^9 THC ha mostrado producir alteraciones neuroendocrinas principalmente en el grupo de los machos en el periodo adulto en condiciones basales. La figura 3A y B muestra los niveles plasmáticos de la **hormona corticosterona**. En machos, la exposición perinatal a las dosis más altas de Δ^9 THC (0.5 y 2 mg/kg) produjo un descenso significativo en los niveles plasmáticos de corticosterona medidos en el periodo adulto, $F_{(3,33)} = 17.39$, $P < 0.000$. Por el contrario, en hembras la exposición perinatal a la dosis más baja de Δ^9 THC (0.1 mg/kg) produjo un aumento significativo de los niveles de corticosterona en plasma $F_{(3,35)} = 4.74$ $P < 0.007$. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas, ni en animales macho ni en hembras, por la exposición perinatal a Δ^9 THC (2 mg/kg) en los niveles plasmáticos de **hormona adrenocorticotropa (ACTH)**, destacando únicamente una tendencia al descenso en el grupo de los machos $F_{(1,13)} = 3.59$, $P < 0.080$ (Figura 3C y D).

En los niveles en plasma de otras hormonas medidas, como son **prolactina (PRL)** y **hormona luteinizante (LH)**, no se encontraron diferencias significativas ni en el grupo de los animales macho ni en el de las hembras (Figura 4). Mostrando solamente una ligera tendencia, en ambos sexos, al incremento en los niveles plasmáticos de prolactina en los grupos

expuestos perinatalmente a Δ^9 THC, $F_{(3,33)}=1.78$ $P < 0.170$; $F_{(3,35)}=2.32$, $P < 0.091$ respectivamente.

FIGURA 2. Locomoción e inmovilidad en el periodo adulto (aprox. día 70) de animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo.

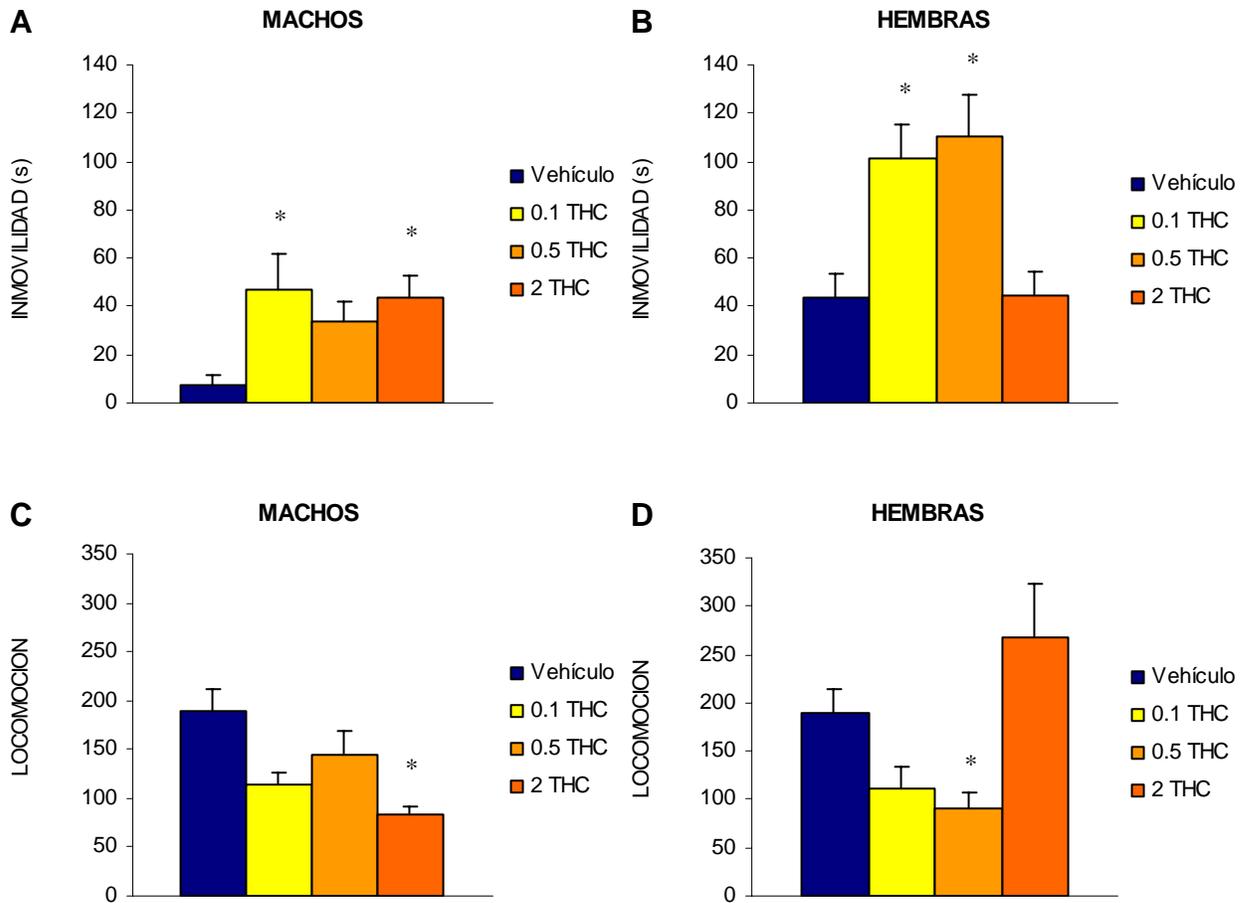


TABLA II. Conductas en machos durante el periodo adulto expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo.

| Parámetros Machos | Tratamiento Δ^9 THC | | | |
|-----------------------|----------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | + Vehículo | + 0.1 mg/kg | + 0.5 mg/kg | + 2 mg/kg |
| Conducta exploratoria | 42.89 \pm 3.85 | 37.45 \pm 3.94 | 37.00 \pm 2.94 | 43.95 \pm 3.19 |
| Autolimpieza (s) | 8.72 \pm 1.90 | 19.30 \pm 5.28 | 12.75 \pm 3.07 | 8.78 \pm 2.43 |
| Estereotipias | 10.26 \pm 2.72 | 6.15 \pm 2.05 | 6.25 \pm 2.46 | 8.05 \pm 2.90 |

TABLA III. Conductas en hembras durante el periodo adulto expuestas perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo.

| Parámetros Hembras | Tratamiento Δ^9 THC | | | |
|-----------------------|----------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | + Vehículo | + 0.1 mg/kg | + 0.5 mg/kg | + 2 mg/kg |
| Conducta exploratoria | 36.82 \pm 3.05 | 28.47 \pm 1.85 | 27.50 \pm 3.01 | 44.50 \pm 4.33 |
| Autolimpieza (s) | 11.26 \pm 2.22 | 8.83 \pm 2.78 | 11.22 \pm 2.88 | 14.80 \pm 3.12 |
| Estereotipias | 7.43 \pm 1.68 | 2.94 \pm 1.48 | 1.40 \pm 0.86* | 17.73 \pm 2.89* |

FIGURA 3. Niveles basales en plasma de las hormonas corticosterona y ACTH en el periodo adulto de animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo vehículo.

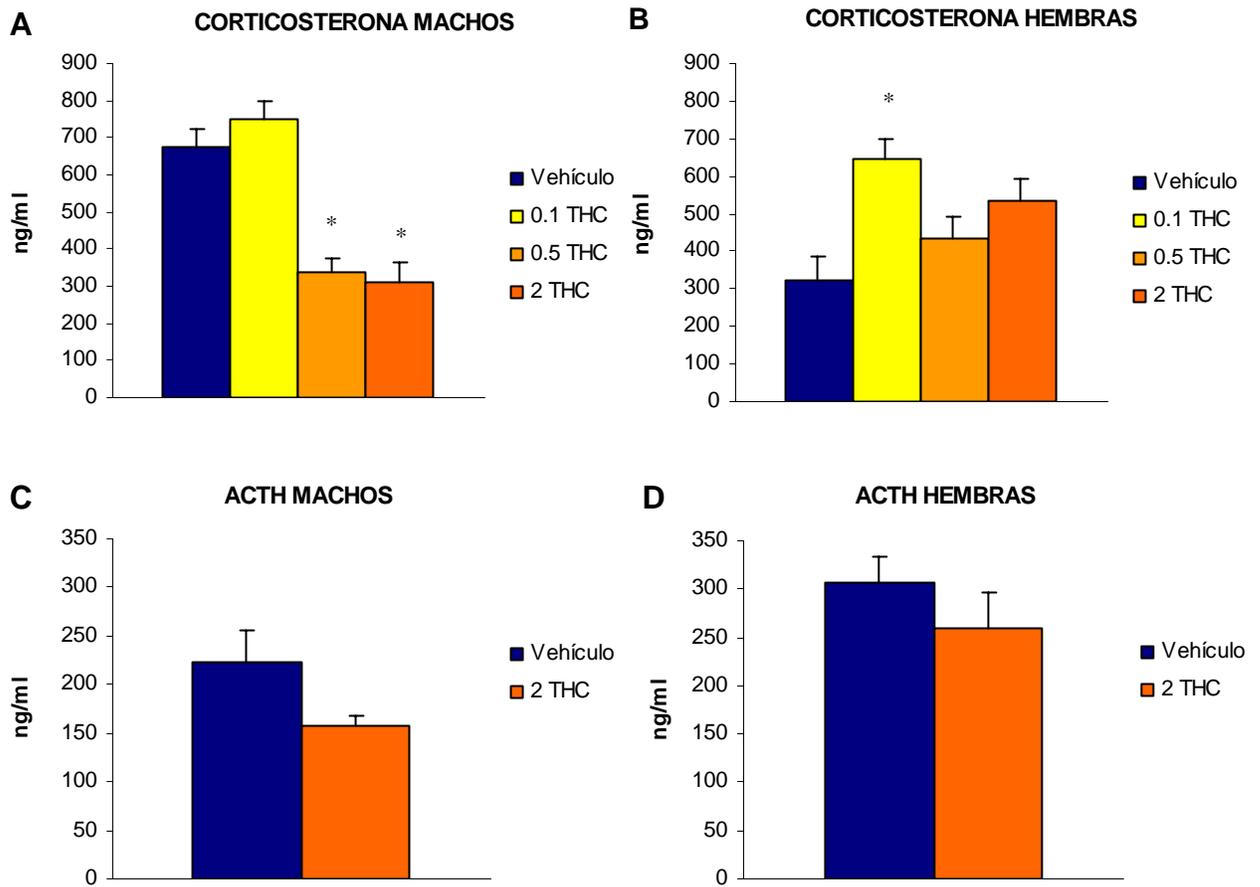
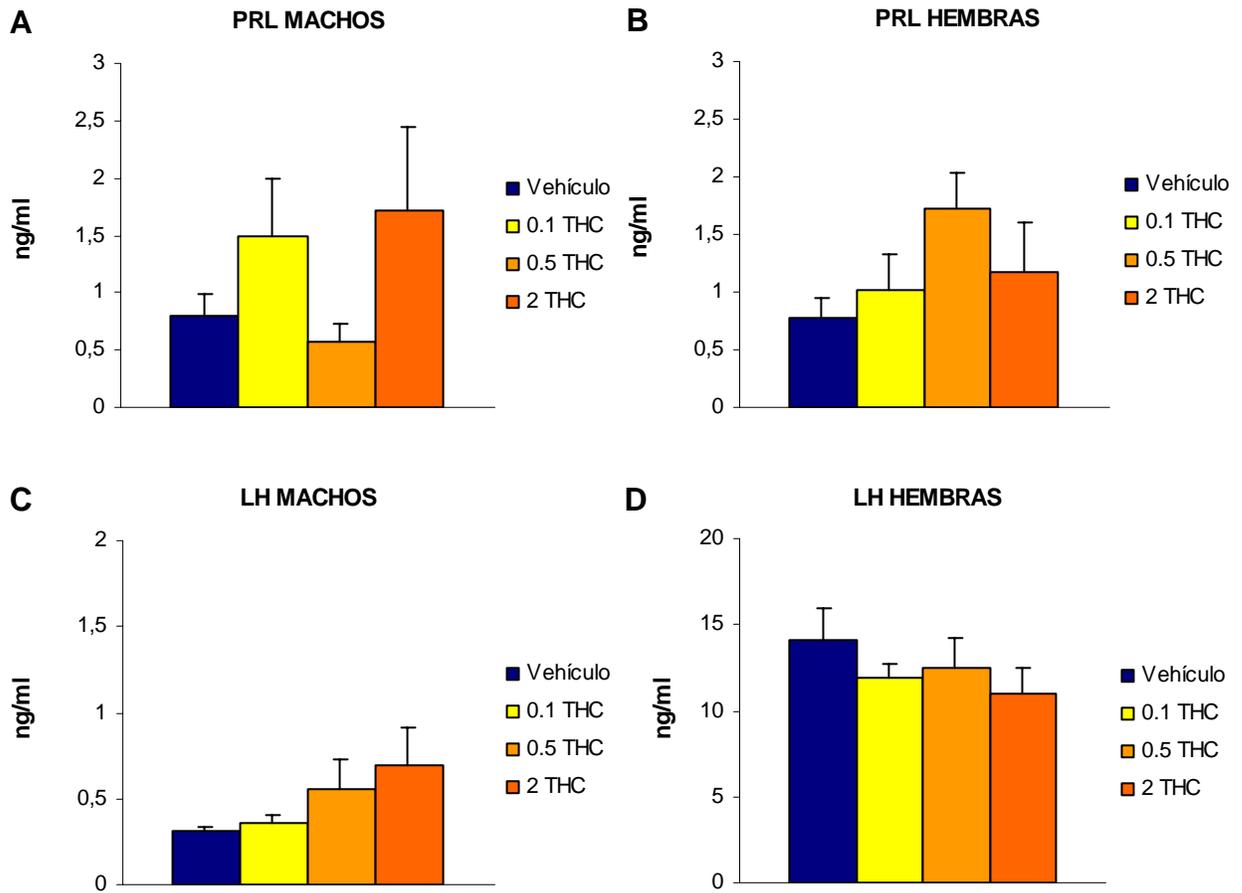


FIGURA 4. Niveles basales en plasma de prolactina y hormona luteinizante en el periodo adulto de animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo vehículo.



3) RESPUESTA COMPORTAMENTAL DE LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1/D2 EN ANIMALES ADULTOS TRAS LA EXPOSICIÓN PERINATAL CON Δ^9 THC

3.1. Efectos en actividad motora

En la **figura 5** se muestran los efectos en la **conducta de inmovilidad** tras la administración aguda del agonista dopaminérgico D1/D2 apomorfina (0.1 mg/kg), en animales adultos tratados perinatalmente con Δ^9 THC. A los 5 minutos, la administración de apomorfina produjo un incremento en la conducta de inmovilidad tanto en los animales machos $F_{(7,74)}= 9.96$, $P < 0.000$ como en las hembras $F_{(7,76)}= 9.3$, $P < 0.000$ respecto a la administración aguda de salino. A los 60 y 120 minutos se continua observando un incremento significativo en el tiempo de inmovilidad solo en los animales macho expuestos perinatalmente a Δ^9 THC por la administración aguda de apomorfina; a los 60 min $F_{(7,73)}= 5.57$ $P < 0.000$, y a los 120 min $F_{(7,75)}= 6.57$, $P < 0.000$; mostrandose este incremento significativamente mayor en los grupos de exposición perinatal Δ^9 THC respecto al grupo vehículo-apomorfina a los 60 min $F_{(3,38)}= 3.24$, $P < 0.033$ y a los 120 min $F_{(3,38)}= 7.66$, $P < 0.000$.

En la **figura 6** se muestran los efectos en la **conducta de locomoción** tras la administración aguda del agonista dopaminérgico D1/D2 apomorfina (0.1 mg/kg), en animales adultos tratados perinatalmente con Δ^9 THC. A los 5 minutos, la administración de apomorfina produjo un descenso en la actividad locomotora tanto en los animales macho $F_{(7,74)}= 6.24$, $P < 0.000$ como en hembra $F_{(7,73)}= 12.82$, $P < 0.000$; respecto al grupo salino. A los 60 min, el grupo de machos expuesto a la dosis mas alta de Δ^9 THC (2 mg/kg) mostró una marcada reducción en la actividad locomotora tras la administración de apomorfina respecto a la administración de salino $F_{(7,70)}=3.11$, $P < 0.006$; siendo esta reducción en una tendencia diferente a la administración de apomorfina en el grupo tratado perinatalmente con vehiculo $F_{(3,35)}=2.74$, $P < 0.058$. No se encontraron diferencias significativas en el grupo de las hembras en este tiempo. A los 120 min, la administración de apomorfina produjo una reducción en la actividad locomotora de las hembras del grupo expuesto a la dosis mas alta de Δ^9 THC (2 mg/kg) respecto a la administración de salino $F_{(7,76)}= 6.41$, $P < 0.000$; no encontrándose diferencias significativas en el grupo de los machos.

FIGURA 5. Inmovilidad tras la administración de apomorfina (0.1 mg/kg) en el periodo adulto de animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo salino; # $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-apomorfina.

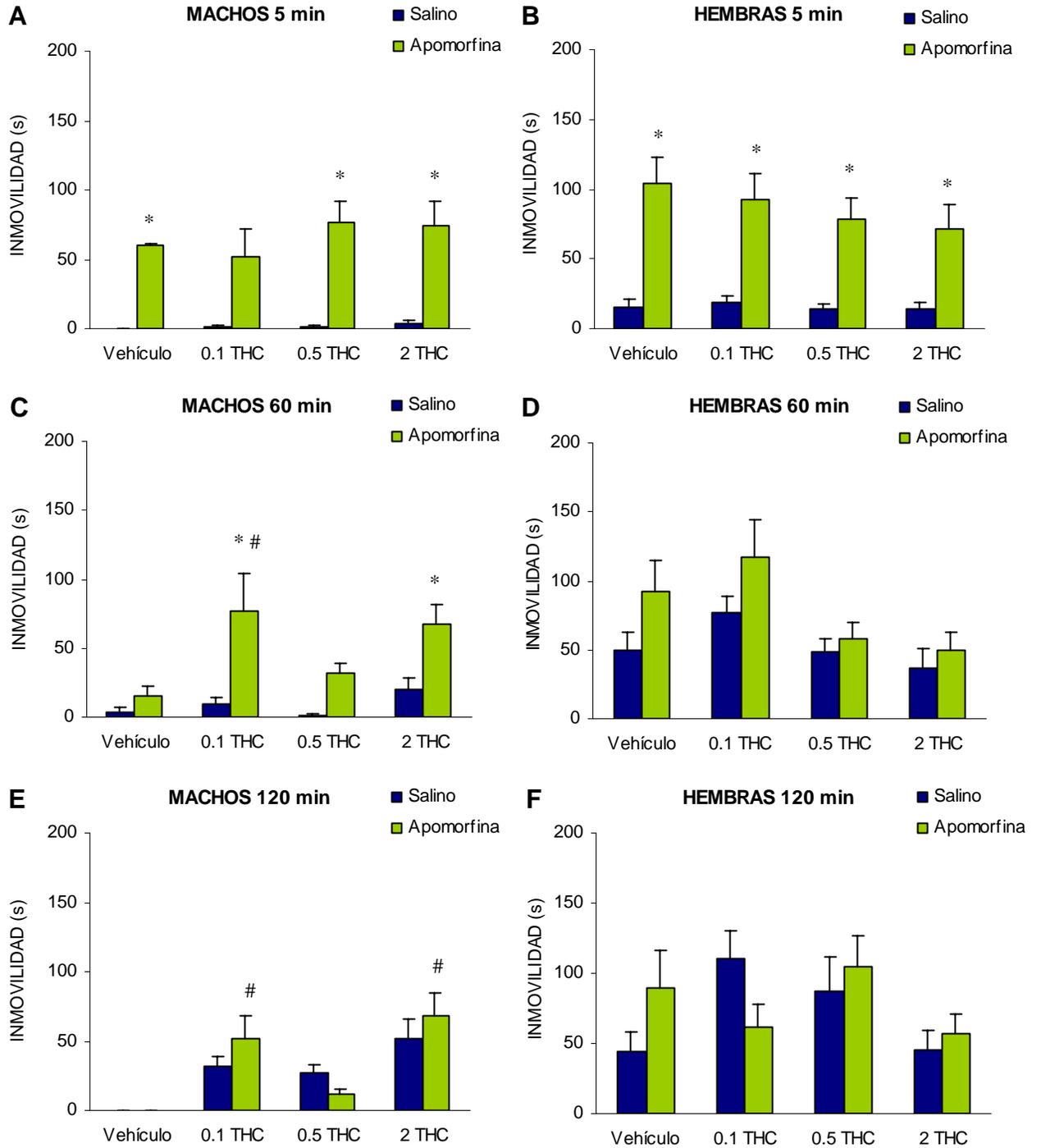
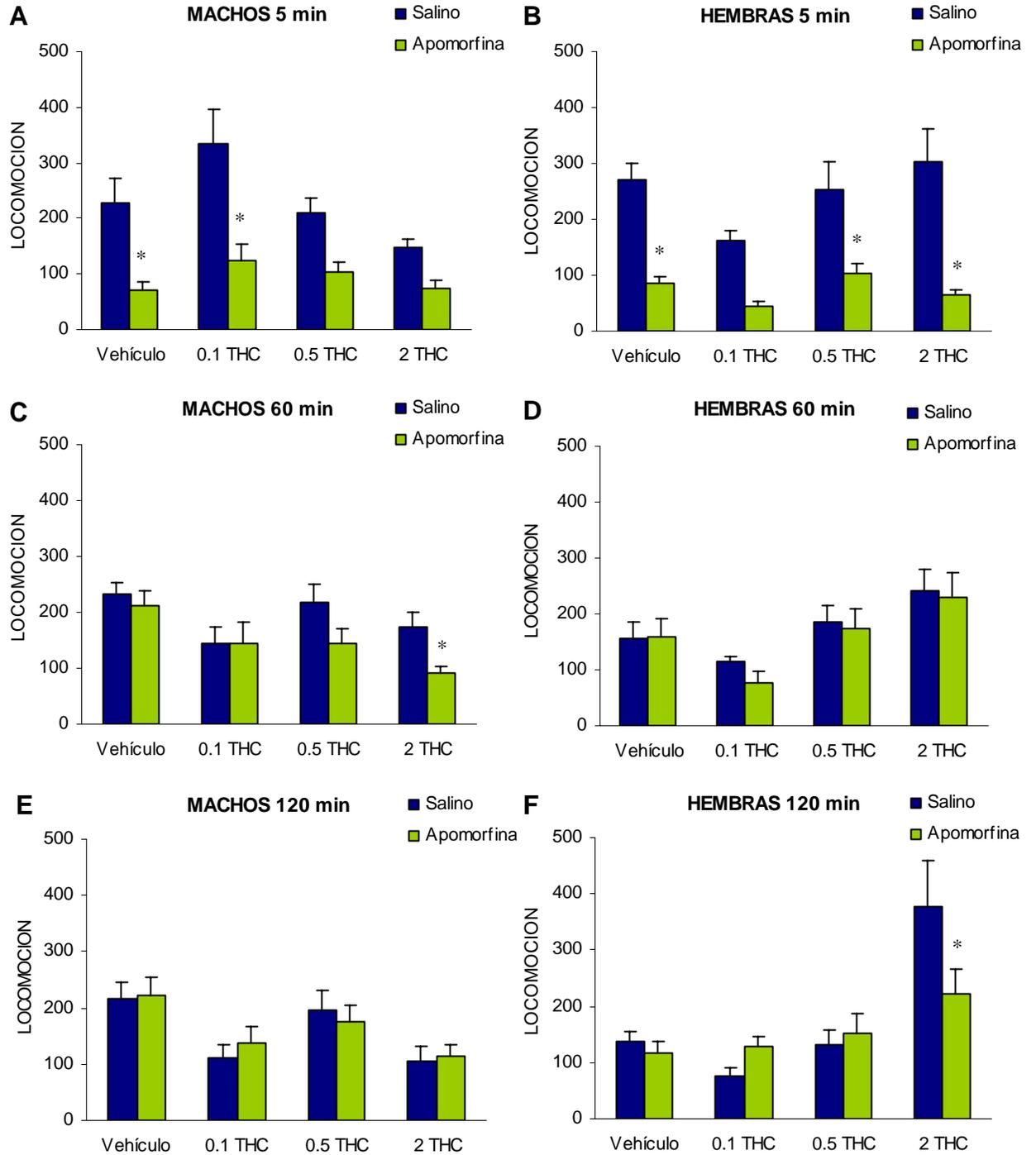


FIGURA 6. Locomoción tras la administración de apomorfina (0.1 mg/kg) en el periodo adulto de animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-apomorfina.



3.2. Efectos en otras conductas

En la **tabla IV** se muestran los efectos en distintas **conductas** tras la administración aguda del agonista dopaminérgico D1/D2 apomorfina (0.1 mg/kg), en animales adultos **macho** tratados perinatalmente con Δ^9 THC.

Tras la administración de apomorfina, a los 5 min la conducta exploratoria se redujo en los machos $F(7,74)=8,852$ $P.000$ respecto al grupo salino, manteniéndose este mismo patrón de reducción significativa de la conducta exploratoria a los 60 min tanto respecto al grupo salino $F(7,73)=2.56$, $P < .0020$ como respecto al grupo vehículo-apomorfina $F(3,38)= 3.79$, $P < 0.018$; desapareciendo dicho efecto a los 120 min.

No se encontraron diferencias significativas en la conducta de autolimpieza tras la administración de apomorfina a los machos adultos perinatalmente expuestos a Δ^9 THC.

Respecto a la conducta de estereotipia solo se observaron diferencias significativas a los 5 min de la administración de apomorfina en el grupo de los machos, produciéndose un aumento significativo respecto al grupo salino $F(7,74)=3.07$, $P < 0.007$; así como respecto al grupo vehículo-apomorfina $F(3,37)=3.94$, $P < 0.015$.

En la **tabla V** se muestran los efectos en distintas **conductas** tras la administración aguda del agonista D1/D2 apomorfina (0.1 mg/kg), en animales adultos **hembra** tratados perinatalmente con Δ^9 THC.

En la conducta exploratoria en las hembras solo se produjeron diferencias significativas a los 5 min. de la administración de apomorfina, observándose un descenso de esta conducta $F(7,76)= 6.74$, $P < 0.000$ respecto el grupo salino.

En la conducta de autolimpieza se produjo así mismo un descenso significativo a los 5 min tras la administración de apomorfina respecto al grupo salino $F(7,76)=4.73$, $P < 0.000$. Destacando sin embargo a los 60 min., el aumento en la conducta de autolimpieza tras la administración de apomorfina en el grupo de hembras expuestas a la dosis mas alta de Δ^9 THC (2 mg/kg) $F(3,39)=6.44$, $P < 0.001$ respecto al grupo vehículo-apomorfina.

TABLA IV. Conductas en machos tras la administración de apomorfina (0.1 mg/kg) en el periodo adulto expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-apomorfina.

| Parámetros | Machos | 5 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|---------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina |
| Exploración | 47.4 \pm 4.1 | 26.4 \pm 3.4* | 47.1 \pm 2.9 | 23.9 \pm 3.8* | 48.1 \pm 4.4 | 29.2 \pm 1.5* | 41.0 \pm 3.8 | 25.5 \pm 3.5 | |
| Autolimpieza | 18.4 \pm 4.1 | 6.00 \pm 2.1 | 9.0 \pm 1.6 | 12.2 \pm 3.2 | 11.8 \pm 2.2 | 7.2 \pm 2.7 | 13.7 \pm 3.5 | 10.3 \pm 1.3 | |
| Estereotipias | 4.0 \pm 1.5 | 0 \pm 0 | 8.6 \pm 1.5 | 1.8 \pm 1.3 | 4.2 \pm 1.9 | 8.7 \pm 4.0# | 7.2 \pm 2.2 | 1.0 \pm 0.6 | |

| Parámetros | Machos | 60 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina |
| Exploración | 39.8 \pm 3.1 | 50.5 \pm 3.5 | 41.1 \pm 3.1 | 36.1 \pm 4.6# | 43.6 \pm 4.4 | 37.2 \pm 2.0 | 44.0 \pm 11 | 34.7 \pm 4.5# | |
| Autolimpieza | 6.8 \pm 2.1 | 5.2 \pm 1.5 | 10.8 \pm 2.8 | 7.2 \pm 2.2 | 11.3 \pm 2.7 | 18.3 \pm 4.4 | 17.1 \pm 4.1 | 18.0 \pm 6.7 | |
| Estereotipias | 3.9 \pm 1.4 | 11.4 \pm 3.8 | 7.5 \pm 2.6 | 12.4 \pm 5.1 | 10.7 \pm 3.8 | 9.5 \pm 2.0 | 2.5 \pm 0.8 | 4.4 \pm 1.7 | |

| Parámetros | Machos | 120 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina |
| Exploración | 43.9 \pm 3.7 | 44.0 \pm 4.3 | 39.2 \pm 4.3 | 34.7 \pm 4.6 | 38.4 \pm 4.5 | 43.6 \pm 2.6 | 42.8 \pm 3.1 | 37.3 \pm 5.8 | |
| Autolimpieza | 5.9 \pm 1.9 | 3.3 \pm 1.7 | 5.4 \pm 1.5 | 3.0 \pm 1.3 | 17.4 \pm 5.3 | 14.1 \pm 4.5 | 11.4 \pm 3.9 | 16.1 \pm 6.0 | |
| Estereotipias | 13.5 \pm 2.1 | 10.9 \pm 4.0 | 10.2 \pm 3.4 | 10.6 \pm 3.7 | 11.0 \pm 5.1 | 4.7 \pm 1.2 | 6.7 \pm 1.8 | 2.3 \pm 6.9 | |

TABLA V. Conductas en hembras tras la administración de apomorfina (0.1 mg/kg) en el periodo adulto expuestas perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-apomorfina.

| Parámetros | Hembras | 5 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|---------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina |
| Exploración | 35.1 \pm 3.4 | 21.7 \pm 2.2* | 36.5 \pm 2.4 | 24.2 \pm 2.4 | 43.9 \pm 3.5 | 28.4 \pm 2.1* | 37.7 \pm 4.1 | 28.3 \pm 3.2 | |
| Autolimpieza | 2.7 \pm 3.6 | 5.8 \pm 2.3 | 25.4 \pm 7.5 | 5.9 \pm 2.5* | 8.4 \pm 2.8 | 1.0 \pm 0.9 | 24.8 \pm 8.0 | 7.6 \pm 1.9 | |
| Estereotipias | 3.5 \pm 1.0 | 0 \pm 0 | 5.3 \pm 3.1 | 0 \pm 0 | 9.1 \pm 2.7 | 4.2 \pm 1.8 | 17.2 \pm 4.5 | 4.8 \pm 1.8* | |

| Parámetros | Hembras | 60 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina |
| Exploración | 37.1 \pm 4.3 | 31.1 \pm 3.5 | 30.5 \pm 2.1 | 25.6 \pm 4.2 | 41.0 \pm 4.7 | 39.6 \pm 3.6 | 40.5 \pm 4.5 | 35.3 \pm 3.6 | |
| Autolimpieza | 6.9 \pm 2.5 | 9.7 \pm 3.1 | 9.3 \pm 4.3 | 1.0 \pm 0.4 | 2.4 \pm 1.5 | 11.6 \pm 4.2 | 13.3 \pm 4.1 | 23.5 \pm 4.0# | |
| Estereotipias | 5.6 \pm 2.2 | 8.5 \pm 3.7 | 3.7 \pm 1.9 | 2.6 \pm 0.7 | 3.7 \pm 2.1 | 8.0 \pm 2.8 | 20.9 \pm 3.9 | 12.1 \pm 2.0 | |

| Parámetros | Hembras | 120 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina | Salino | Apomorfina |
| Exploración | 34.9 \pm 4.3 | 27.3 \pm 3.0 | 27.8 \pm 3.0 | 40.9 \pm 4.3 | 31.6 \pm 5.4 | 27.1 \pm 3.8 | 43.2 \pm 5.7 | 40.3 \pm 4.5 | |
| Autolimpieza | 10.5 \pm 3.2 | 12.0 \pm 3.1 | 10.0 \pm 4.2 | 9.7 \pm 4.1 | 8.2 \pm 2.7 | 4.1 \pm 2.2 | 21.0 \pm 6.0 | 17.7 \pm 4.3 | |
| Estereotipias | 5.7 \pm 1.7 | 4.5 \pm 2.2 | 0.6 \pm 0.5 | 6.4 \pm 1.5 | 0.6 \pm 0.5 | 4.0 \pm 1.5 | 18.3 \pm 4.4 | 13.0 \pm 2.6 | |

4) RESPUESTA COMPORTAMENTAL DE LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2 EN ANIMALES ADULTOS TRAS LA EXPOSICIÓN PERINATAL CON Δ^9 THC

4.1. Efectos en actividad motora

En la **figura 7** se muestran los efectos en la **conducta de inmovilidad** tras la administración aguda del agonista dopaminérgico D2 quinpirole (0.5 mg/kg), en animales adultos tratados perinatalmente con Δ^9 THC. A los 5 min, la administración de quinpirole produjo un aumento significativo tanto en machos $F_{(7,73)} = 25.98$, $P < 0.000$; como en hembras $F_{(7,73)} = 17.58$, $P < 0.000$, del tiempo empleado en inmovilidad respecto al grupo salino. Sin embargo, es de destacar que además en el grupo de los machos este incremento de la inmovilidad por la administración de quinpirole fue significativamente superior en los grupos que habían sido expuestos perinatalmente a Δ^9 THC $F_{(3,38)} = 15.87$, $P < 0.000$ respecto al grupo vehículo-quinpirole; no encontrándose estas diferencias en el grupo de las hembras. A continuación, podemos destacar un descenso de la inmovilidad por la administración de quinpirole en el tiempo 60 min, tanto en machos $F_{(7,73)} = 4.38$, $P < 0.000$, como en hembras $F_{(7,73)} = 10.34$, $P < 0.000$ respecto al grupo salino; así como en el tiempo 120 min en machos $F_{(7,73)} = 3.52$, $P < 0.003$; y en hembras $F_{(7,73)} = 12.25$, $P < 0.000$ respecto al grupo salino; destacando sobretodo este descenso de la inmovilidad por la administración de quinpirole especialmente en los grupos expuestos perinatalmente a Δ^9 THC.

En la **figura 8** se muestran los efectos en la **conducta de locomoción** tras la administración aguda del agonista D2 quinpirole (0.5 mg/kg), en animales adultos tratados perinatalmente con Δ^9 THC. A los 5 min, la administración de quinpirole produjo en machos un descenso significativo de la locomoción $F_{(7,70)} = 10.07$, $P < 0.000$ respecto al grupo salino, así como los grupos expuestos perinatalmente a Δ^9 THC mostraron un descenso significativamente mayor tras la administración de quinpirole $F_{(3,38)} = 3.32$, $P < 0.030$ respecto el grupo vehículo-quinpirole. En los tiempos 60 y 120 min no se mostraron diferencias significativas ni en machos ni en hembras.

FIGURA 7. Inmovilidad tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en el periodo adulto de animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo salino; # $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.

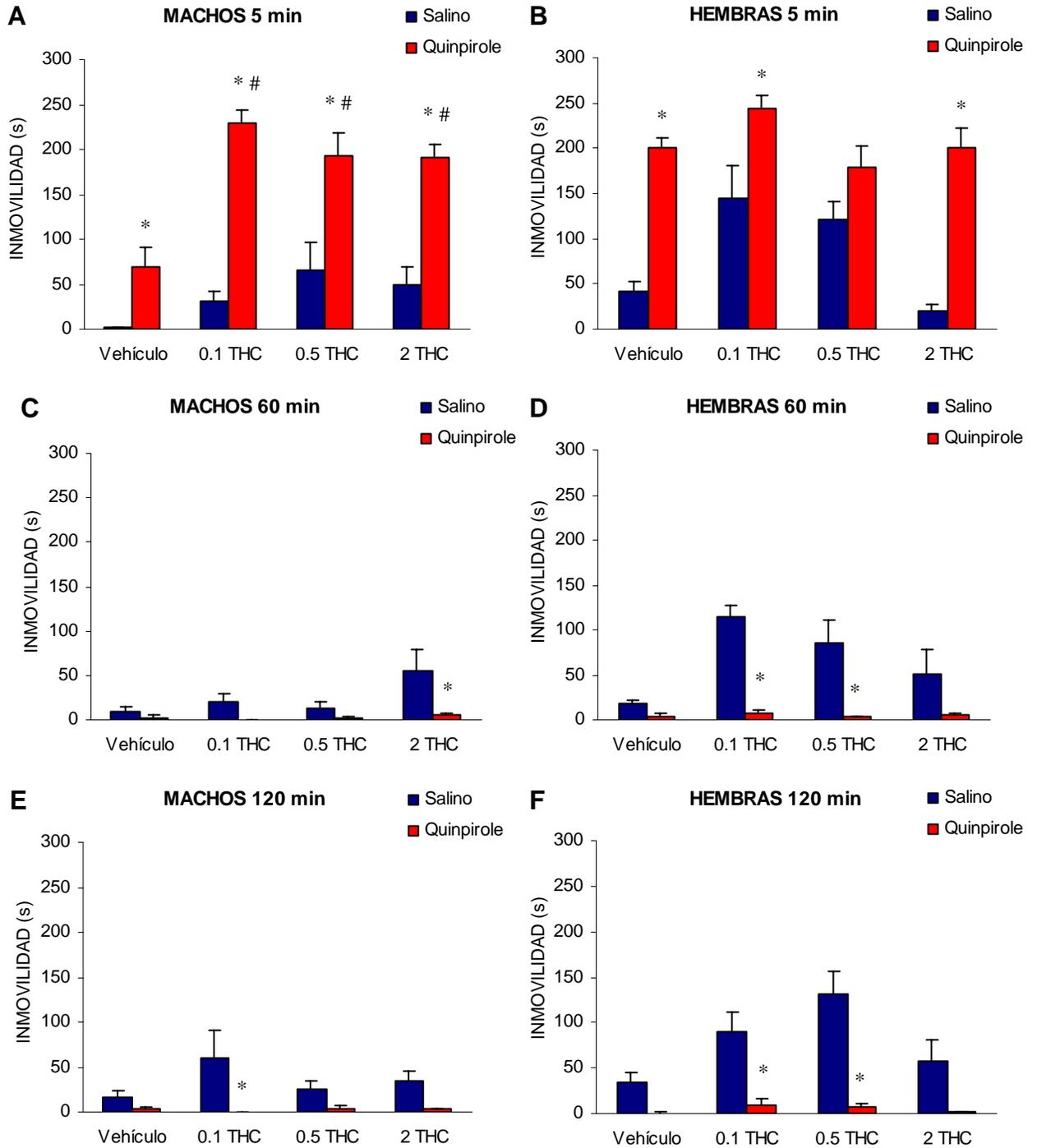
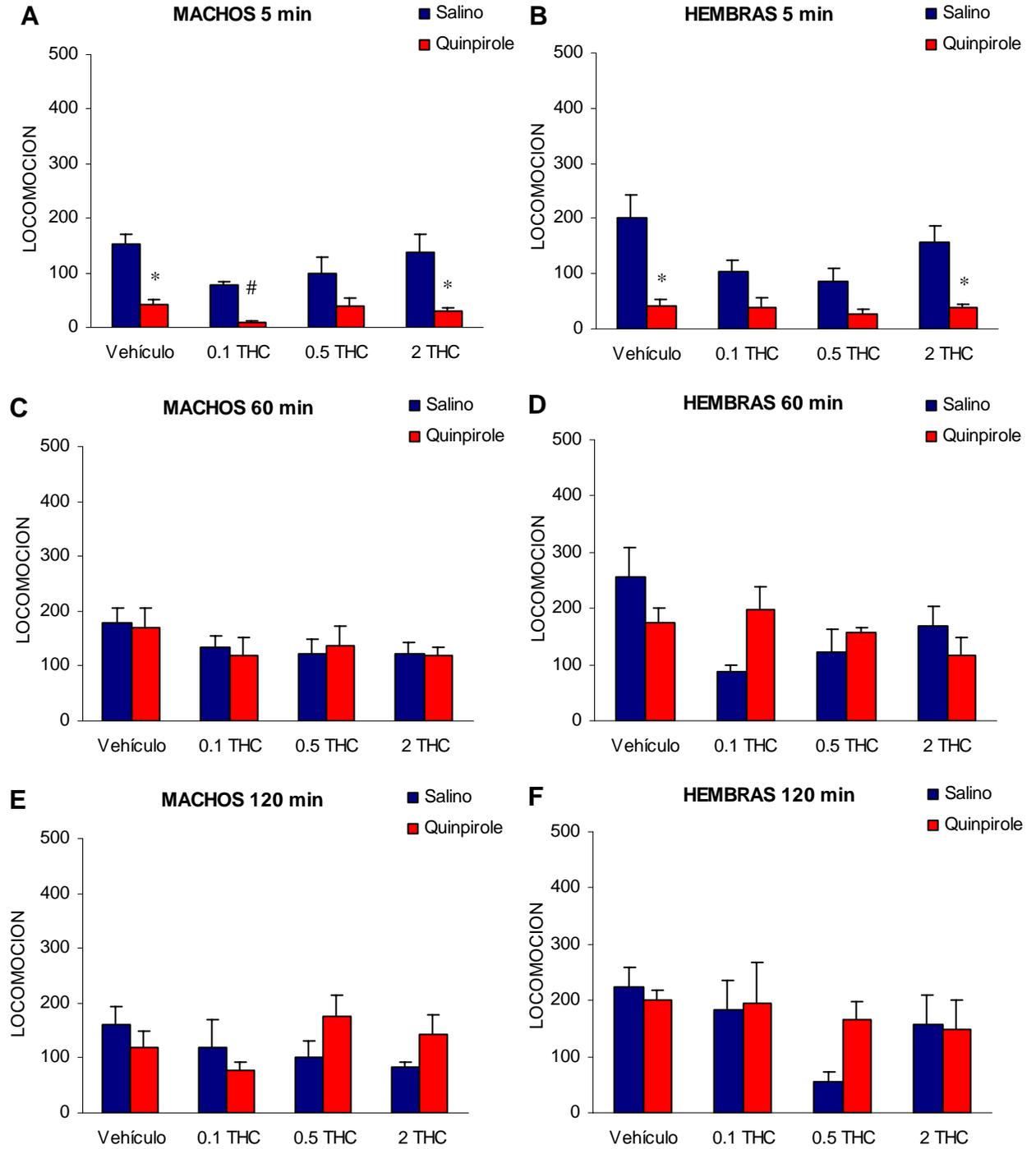


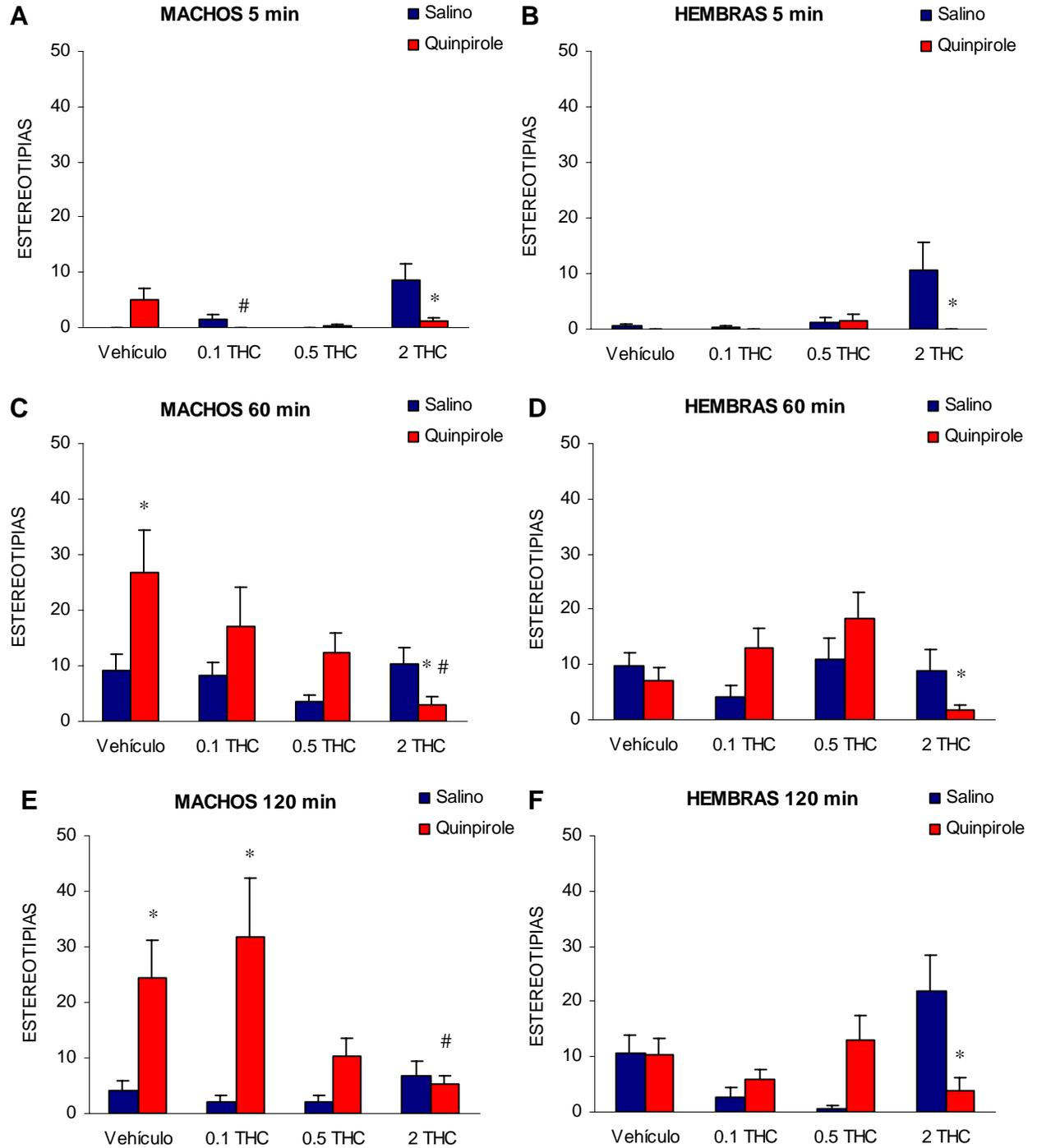
FIGURA 8. Locomoción tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en el periodo adulto de animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo salino; # $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.



4.2. Efectos en estereotipias

En la **figura 9** se muestran los efectos en la **actividad estereotipada** tras la administración aguda del agonista dopaminérgico D2 quinpirole (0.5 mg/kg), en animales adultos tratados perinatalmente con Δ^9 THC. A los 5 min, la administración de quinpirole produjo un descenso significativo de la actividad estereotipada tanto en machos respecto al grupo salino $F_{(7,73)}= 5.21$, $P < 0.000$ como respecto al grupo vehículo-quinpirole $F_{(3,38)}= 3.62$, $P < 0.021$ por la exposición perinatal a Δ^9 THC; como también en hembras respecto al grupo salino $F_{(7,73)}= 5.13$, $P < 0.000$. A los 60 min, en el grupo de animales macho la administración de quinpirole produjo un aumento significativo de las estereotipias en el grupo vehículo $F_{(7,73)}= 3.20$, $P < 0.005$ respecto grupo salino mientras que se produjo un descenso dosis dependiente en esta conducta en los grupos expuestos perinatalmente a Δ^9 THC $F_{(3,38)}= 3.27$, $P < 0.032$. En hembras se observó una tendencia al incremento de las estereotipias tras la administración de quinpirole en todos los grupos respecto al grupo salino $F_{(7,73)}= 2.46$, $P < 0.025$ excepto en el grupo que recibió la dosis mas alta de Δ^9 THC (2 mg/kg) donde al igual que en los machos se observó un descenso significativo en las estereotipias respecto el grupo vehículo-quinpirole $F_{(3,36)}= 4.46$, $P < 0.009$. A los 120 min, en los animales macho se siguió observando un incremento de las estereotipias tras la administración de quinpirole en el grupo vehículo y también en el grupo con la dosis mas baja de Δ^9 THC $F_{(7,73)}= 5.70$, $P < 0.000$ respecto al grupo salino; mientras que los grupos expuestos a las dosis mas altas (0.5 y 2 mg/kg) mostraron una reducción con respecto al grupo vehículo-quinpirole $F_{(3,38)}= 3.8$, $P < 0.018$. Finalmente en hembras se siguió observando una reducción significativa de las estereotipias del grupo expuesto a la dosis mas alta de Δ^9 THC respecto del grupo salino $F_{(7,73)}= 4.47$, $P < 0.000$.

FIGURA 9. Estereotipia tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en el periodo adulto de animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo salino; # $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.



4.3. Efectos en otras conductas

En la **tabla VI** se muestran los efectos en distintas **conductas** tras la administración aguda del agonista dopaminérgico D2 quinpirole (0.5 mg/kg), en animales adultos **macho** tratados perinatalmente con Δ^9 THC.

A los 5 min, se observa una disminución en las conductas exploratorias tras la administración de quinpirole $F_{(7,73)}= 8.2$, $P < 0.000$ respecto del grupo salino así como en el grupo expuesto a la dosis mas baja de Δ^9 THC (0.1 mg/kg) respecto del grupo vehículo-quinpirole $F_{(3,38)}= 2.96$, $P < 0.044$. No se produjeron diferencias significativas en 60 y 120 min en esta conducta.

Sin embargo, esta reducción en la conducta exploratoria también fue acompañada por una reducción en la conducta de autolimpieza tras la administración de quinpirole en los animales macho produciéndose a los 5 min $F_{(7,73)}= 6.57$, $P < 0.000$; a los 60 min $F_{(7,73)}= 9.09$, $P < 0.000$; y a los 120 min $F_{(7,73)}= 2.87$, $P < 0.010$ respecto del grupo salino.

En la **tabla VII** se muestran los efectos en distintas **conductas** tras la administración aguda del agonista D2 quinpirole (0.5 mg/kg), en animales adultos **hembra** tratados perinatalmente con Δ^9 THC.

La conducta exploratoria en hembras se redujo tras la administración de quinpirole en los tiempos 5 min $F_{(7,73)}= 10.79$, $P < 0.000$ y 120 min $F_{(7,73)}= 2.89$, $P < 0.010$ respecto del grupo salino.

La conducta de autolimpieza solo se vio reducida a los 5 min en los animales hembra tras la administración de quinpirole $F_{(7,73)}= 8.81$, $P < 0.000$ respecto del grupo salino. No se encontraron diferencias significativas respecto a esta conducta durante los tiempos 60 y 120 min.

TABLA VI. Conductas en macho tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en el periodo adulto expuestos perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo salino; # $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.

| Parámetros | Machos | 5 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|--------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole |
| Exploración | 38.7 \pm 4.7 | 24.2 \pm 3.8 | 36.4 \pm 4.9 | 10.1 \pm 2.5*# | 28.8 \pm 5.5 | 15.3 \pm 5.1 | 43.5 \pm 5.8 | 16.5 \pm 2.0* | |
| Autolimpieza | 27.1 \pm 4.7 | 8.9 \pm 2.9* | 28.8 \pm 8.6 | 2.0 \pm 1.0* | 22.1 \pm 4.9 | 8.9 \pm 3.4 | 11.3 \pm 3.6 | 2.3 \pm 1.4 | |

| Parámetros | Machos | 60 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole |
| Exploración | 39.7 \pm 5.1 | 35.9 \pm 3.1 | 40.7 \pm 3.9 | 33.0 \pm 5.7 | 44.7 \pm 3.5 | 36.7 \pm 3.9 | 43.1 \pm 6.7 | 40.0 \pm 3.0 | |
| Autolimpieza | 21.5 \pm 4.6 | 3.7 \pm 1.4* | 28.0 \pm 4.9 | 2.5 \pm 1.3* | 18.0 \pm 5.8 | 4.8 \pm 2.6 | 9.1 \pm 3.8 | 1.7 \pm 0.9 | |

| Parámetros | Machos | 120 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole |
| Exploración | 41.7 \pm 7.2 | 25.2 \pm 3.6 | 35.7 \pm 6.8 | 24.7 \pm 4.3 | 39.3 \pm 5.8 | 33.5 \pm 3.5 | 41.5 \pm 5.8 | 39.6 \pm 4.9 | |
| Autolimpieza | 10.1 \pm 2.8 | 9.8 \pm 4.5 | 31.4 \pm 9.0 | 3.7 \pm 2.1* | 11.5 \pm 4.8 | 8.3 \pm 4.6 | 5.8 \pm 2.6 | 10.1 \pm 7.4 | |

TABLA VII. Conductas en hembras tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en el periodo adulto expuestas perinatalmente a Δ^9 THC. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-quinpirole.

| Parámetros | Hembras | 5 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|--------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole |
| Exploración | 34.5 \pm 4.3 | 13.4 \pm 1.1* | 24.5 \pm 7.8 | 8.2 \pm 2.0 | 28.3 \pm 4.3 | 14.2 \pm 1.6 | 51.2 \pm 8.1 | 10.8 \pm 3.4* | |
| Autolimpieza | 26.5 \pm 5.2 | 0.9 \pm 0.6* | 15.3 \pm 5.9 | 0 \pm 0 | 12.6 \pm 4.1 | 0.4 \pm 0.4 | 19.0 \pm 5.2 | 1.2 \pm 0.6* | |

| Parámetros | Hembras | 60 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole |
| Exploración | 50.2 \pm 5.7 | 32.7 \pm 5.1 | 28.1 \pm 2.6 | 36.9 \pm 4.4 | 40.9 \pm 6.1 | 40.9 \pm 1.4 | 46.7 \pm 7.1 | 31.5 \pm 3.0 | |
| Autolimpieza | 14.0 \pm 5.1 | 1.5 \pm 0.9 | 23.0 \pm 7.1 | 9.0 \pm 5.4 | 18.0 \pm 7.8 | 2.2 \pm 1.2 | 23.3 \pm 7.6 | 3.8 \pm 2.9 | |

| Parámetros | Hembras | 120 min. | | Tratamiento | | | | Δ^9 THC | |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|
| | | + Vehículo | | + 0.1 mg/kg | | + 0.5 mg/kg | | + 2 mg/kg | |
| | | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole | Salino | Quinpirole |
| Exploración | 42.4 \pm 5.7 | 26.6 \pm 4.4 | 29.2 \pm 1.9 | 33.7 \pm 3.8 | 26.5 \pm 4.1 | 39.3 \pm 4.2 | 45.7 \pm 6.9 | 24.8 \pm 3.7* | |
| Autolimpieza | 15.0 \pm 4.4 | 1.3 \pm 1.1 | 11.0 \pm 5.2 | 21.7 \pm 13 | 17.5 \pm 6.1 | 4.5 \pm 3.3 | 12.6 \pm 4.1 | 0.4 \pm 0.3 | |

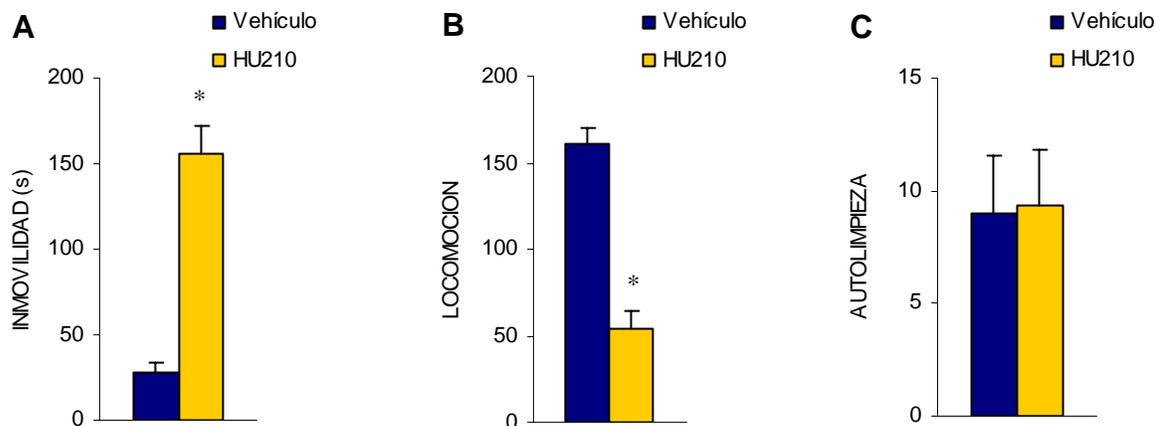
Experimento II

***Estudio de los efectos comportamentales de la activación dopaminérgica
tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto***

5) EFECTOS COMPORTAMENTALES 24 HORAS TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON HU210 EN ANIMALES ADULTOS

Los animales tratados crónicamente con HU210 mostraron una alteración el **patrón de conductas motoras** 24 horas tras la última administración del cannabinoide. La figura 1A muestra un aumento significativo del tiempo empleado en inmovilidad $F_{(1,46)} = 56.8$, $P < 0.000$, respecto al grupo tratado crónicamente con vehículo. Así mismo, de acuerdo con este resultado la figura 1B muestra como los animales expuestos a un tratamiento crónico a HU210 también mostraron un descenso significativo en la actividad locomotora $F_{(1,46)} = 63.49$, $P < 0.000$; respecto al grupo vehículo. Sin embargo no se mostraron diferencias significativas entre ambos grupos en el tiempo empleado en la conducta de autolimpieza.

FIGURA 1. Actividad motora y conducta de autolimpieza en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo.



5.1. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210

Los efectos sobre la respuesta comportamental de la administración aguda del agonista dopaminérgico D1 SKF38393 (8 mg/kg) 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210 se muestran en las figuras 2, 3 y 4. En la **figura 2** se muestran los efectos en la **conducta de inmovilidad** tras la administración aguda de SKF38393 en animales expuestos crónicamente con HU210. En general, el grupo de animales expuesto a HU210 mostró mayor inmovilidad que el grupo tratado crónicamente con vehículo. Encontrados diferencias significativas a los 120 min, donde la administración de SKF38393 produjo un mayor aumento de la inmovilidad en el grupo tratado crónicamente con HU210 $F_{(1,11)} = 7.77$, $P < 0.019$; respecto al grupo vehículo-SKF38393.

En la **figura 3** se muestran los efectos en la **conducta de locomoción** tras la administración aguda del agonista D1 SKF38393 en animales expuestos crónicamente con HU210. A los 5 min, la administración de SKF38393 produjo un descenso significativo en la actividad locomotora en el grupo tratado crónicamente con HU210 $F_{(1,11)} = 10.01$, $P < 0.010$; respecto al grupo vehículo-SKF38393. Este descenso de la actividad locomotora siguió manifestándose a los 20 min tras la administración de SKF38393 en el grupo tratado crónicamente con HU210 $F_{(1,11)} = 10.84$, $P < 0.008$, respecto al grupo vehículo-SKF38393. A los 60 min solo se observaron diferencias significativas en el grupo tratado crónicamente con vehículo por la administración de SKF38393 que redujo la actividad locomotora $F_{(1,11)} = 5.87$, $P < 0.036$; respecto al grupo salino. A los 120 minutos, se sigue observando el descenso de la actividad locomotora en el grupo tratado crónicamente con vehículo por la administración de SKF38393 $F_{(1,11)} = 6.83$, $P < 0.026$, respecto al grupo salino. En el grupo tratado crónicamente con HU210 este descenso típico de la actividad locomotora por la administración de SKF38393 se vio potenciado siendo significativamente mas bajo en el grupo tratado con HU210 $F_{(1,11)} = 5.32$, $P < 0.044$, respecto al grupo vehículo-SKF38393

En la **figura 4** se muestran los efectos en la **conducta estereotipada** tras la administración aguda del agonista D1 SKF38393 (8 mg/kg) en animales expuestos crónicamente con HU210. A los 5 min, la administración de SKF38393 produjo un aumento significativo de las estereotipias en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(1,11)} = 7.92$, $P < 0.018$, respecto grupo salino. A los 20 min, la administración de SKF38393 produjo un descenso en las estereotipias en el grupo tratado crónicamente con HU210 $F_{(1,11)} = 5.404$, $P < 0.042$; respecto al grupo vehículo-SKF38393. A los 60 y 120 min no se produjeron diferencias

significativas aunque si se puede destacar que el efecto mostrado a los 20 minutos en el descenso de estereotipias en el grupo tratado crónicamente con HU210 tiende a mantenerse a modo de tendencia en estos tiempos.

FIGURA 2. Inmovilidad tras la administración de SKF38393 (8 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 µg/kg). Los valores corresponden a las medias ± E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-SKF38393.

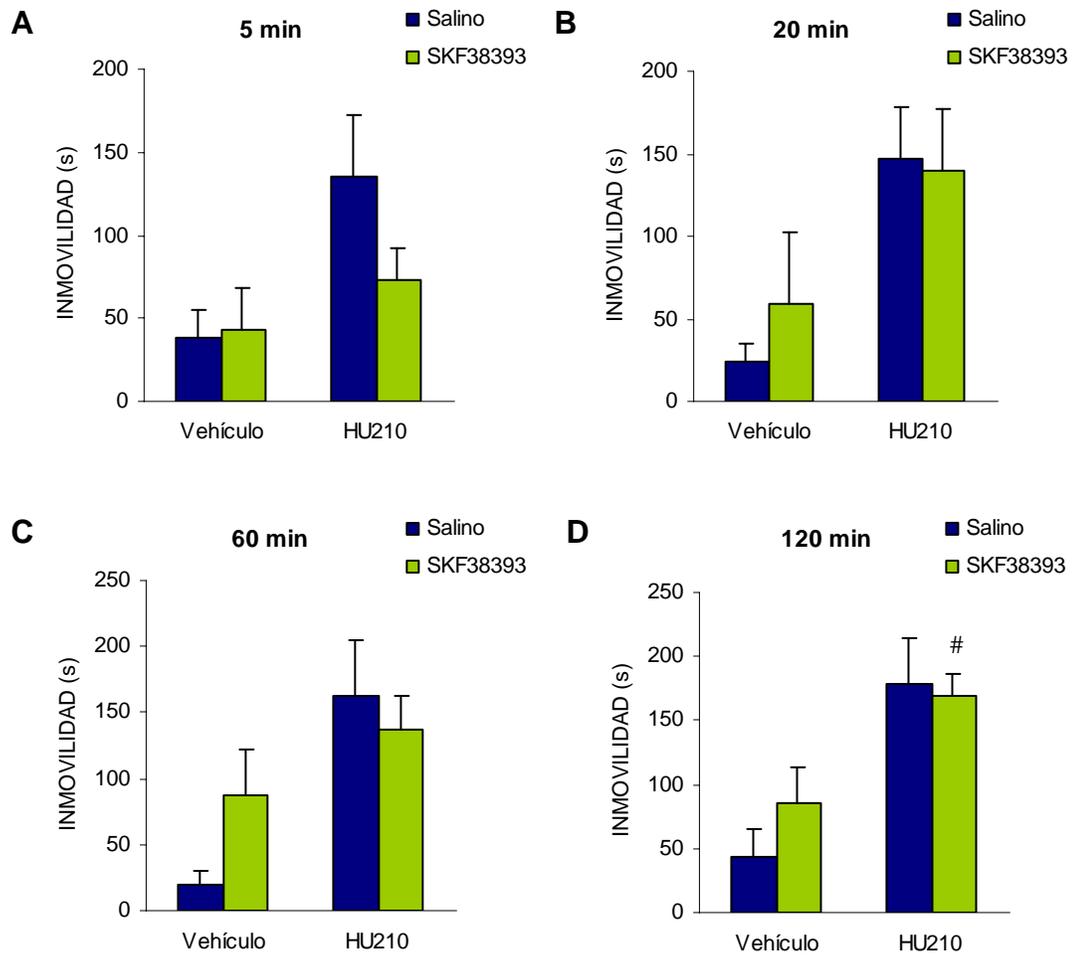


FIGURA 3. Locomoción tras la administración de SKF38393 (8 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 µg/kg). Los valores corresponden a las medias ± E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-SKF38393.

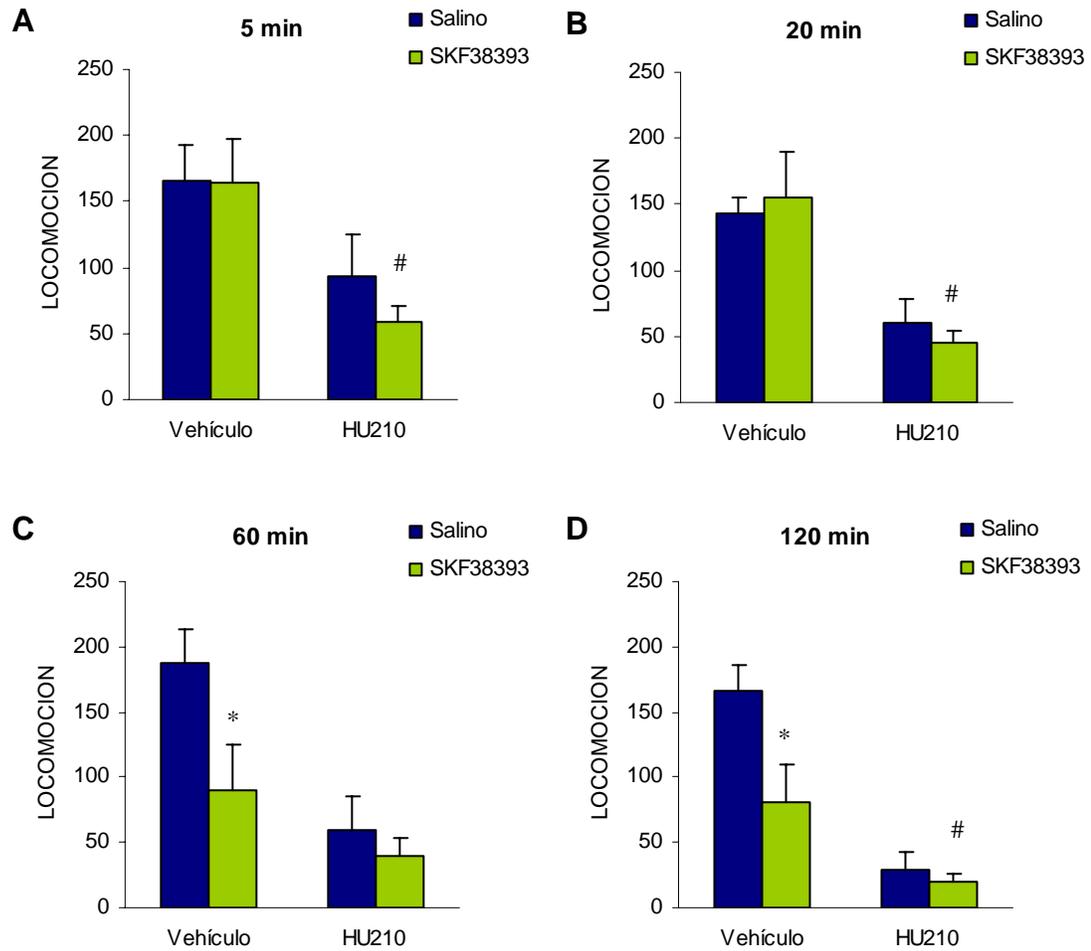
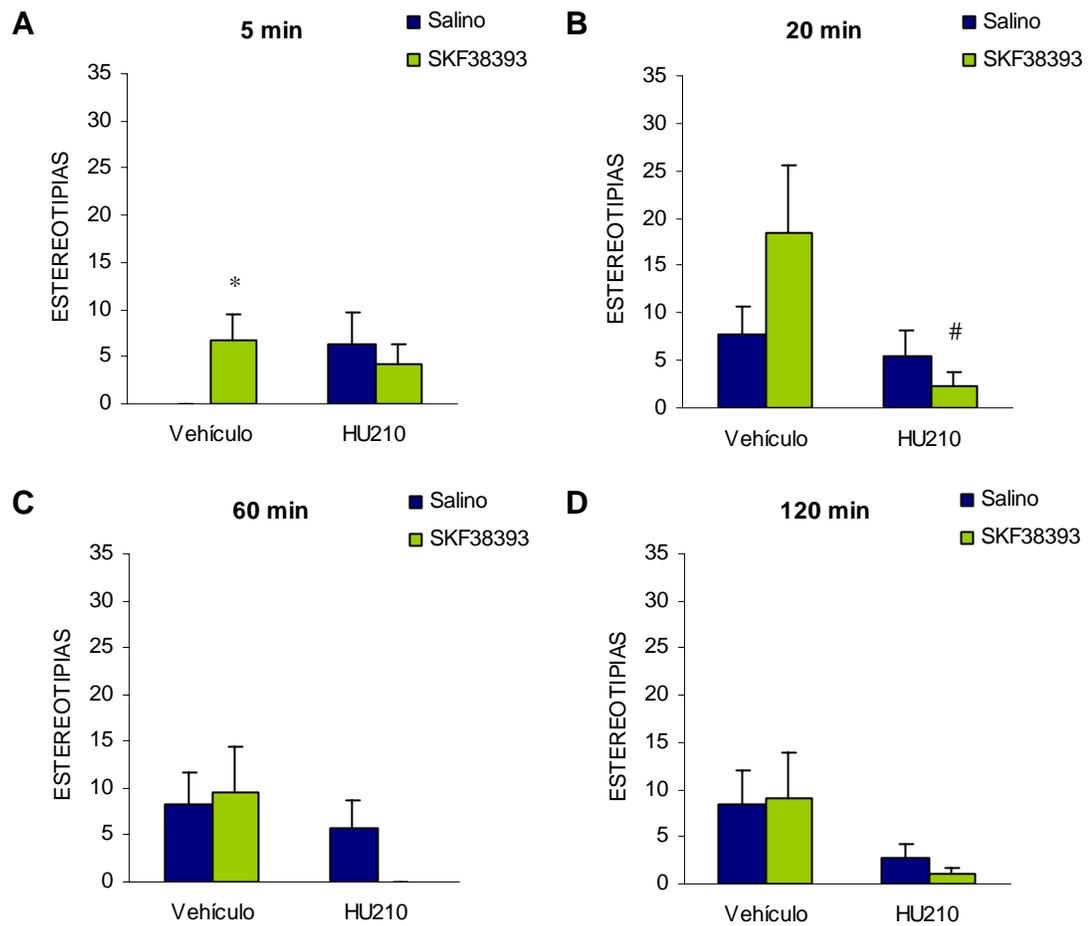


FIGURA 4. Estereotipia tras la administración de SKF38393 (8 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 µg/kg). Los valores corresponden a las medias ± E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-SKF38393.



5.2. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210

Los efectos en la respuesta comportamental de la administración aguda del agonista dopaminérgico D2 quinpirole (0.5 mg/kg) 24 horas tras el tratamiento crónico con HU210 se muestran en las figuras 5, 6 y 7.

En la **figura 5** se muestran los efectos en la **conducta de inmovilidad** tras la administración aguda de quinpirole en animales expuestos crónicamente con HU210. A los 5 min, la administración de quinpirole produjo un aumento significativo en la conducta de inmovilidad, especialmente en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(1,11)} = 39.9$ $P < 0.000$, respecto al grupo salino. A los 20 min, este aumento en el tiempo empleado en inmovilidad por la administración de quinpirole se sigue manifestando sobre todo en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(1,11)} = 22.6$, $P < 0.001$, respecto al grupo salino. A los 60 y 120 min, la administración de produce una reducción significativa en la conducta de inmovilidad especialmente en el grupo tratado crónicamente con HU210 hallándose diferencias significativas $F_{(1,11)} = 14.29$, $P < 0.004$; $F_{(1,11)} = 8.66$, $P < 0.015$, respecto al grupo salino.

En la **figura 6** se muestran los efectos en la **conducta de locomoción** tras la administración aguda de quinpirole en animales expuestos crónicamente con HU210. A los 5 min, la administración de quinpirole produce un descenso en la conducta locomotora, siendo significativo en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(1,11)} = 12.63$, $P < 0.005$, respecto al grupo salino. A los 20 min, este descenso de la actividad locomotora solo se mantiene en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(1,11)} = 23.83$, $P < 0.001$, respecto al grupo salino. A los 60 min, no se observan diferencias significativas aunque si una clara tendencia al aumento de la actividad locomotora tras la administración de quinpirole en el grupo tratado crónicamente con HU210, que es significativamente mayor a los 120 min respecto $F_{(1,11)} = 7.49$, $P < 0.021$ al grupo salino.

En la **figura 7** se muestran los efectos en la **conducta estereotipada** tras la administración aguda de quinpirole en animales expuestos crónicamente con HU210. En general, no se produjeron diferencias significativas en ningún grupo, aunque es de destacar la tendencia al incremento de las estereotipias a los 60 y 120 min de la administración de quinpirole en ambos grupos tratados crónicamente respecto al grupo salino.

FIGURA 5. Inmovilidad tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 µg/kg). Los valores corresponden a las medias ± E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-quinpirole.

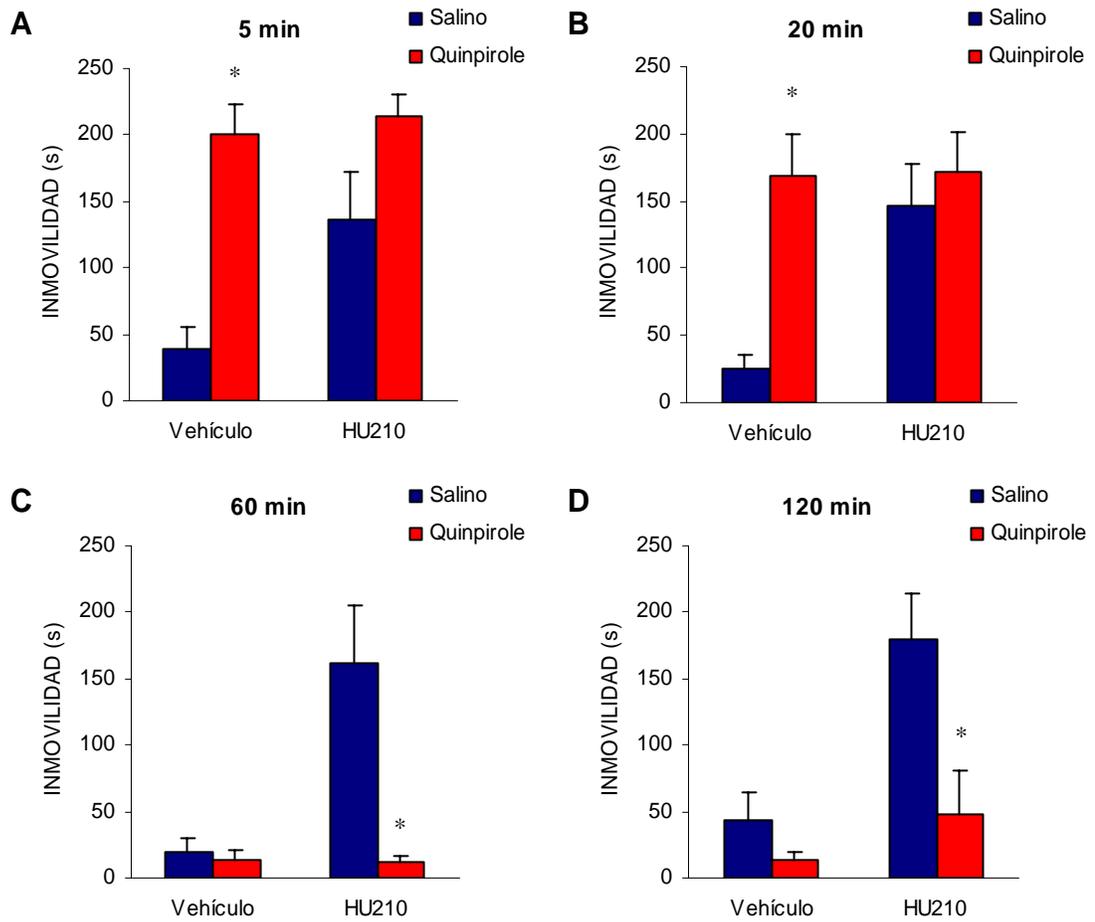


FIGURA 6. Locomoción tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 µg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-quinpirole.

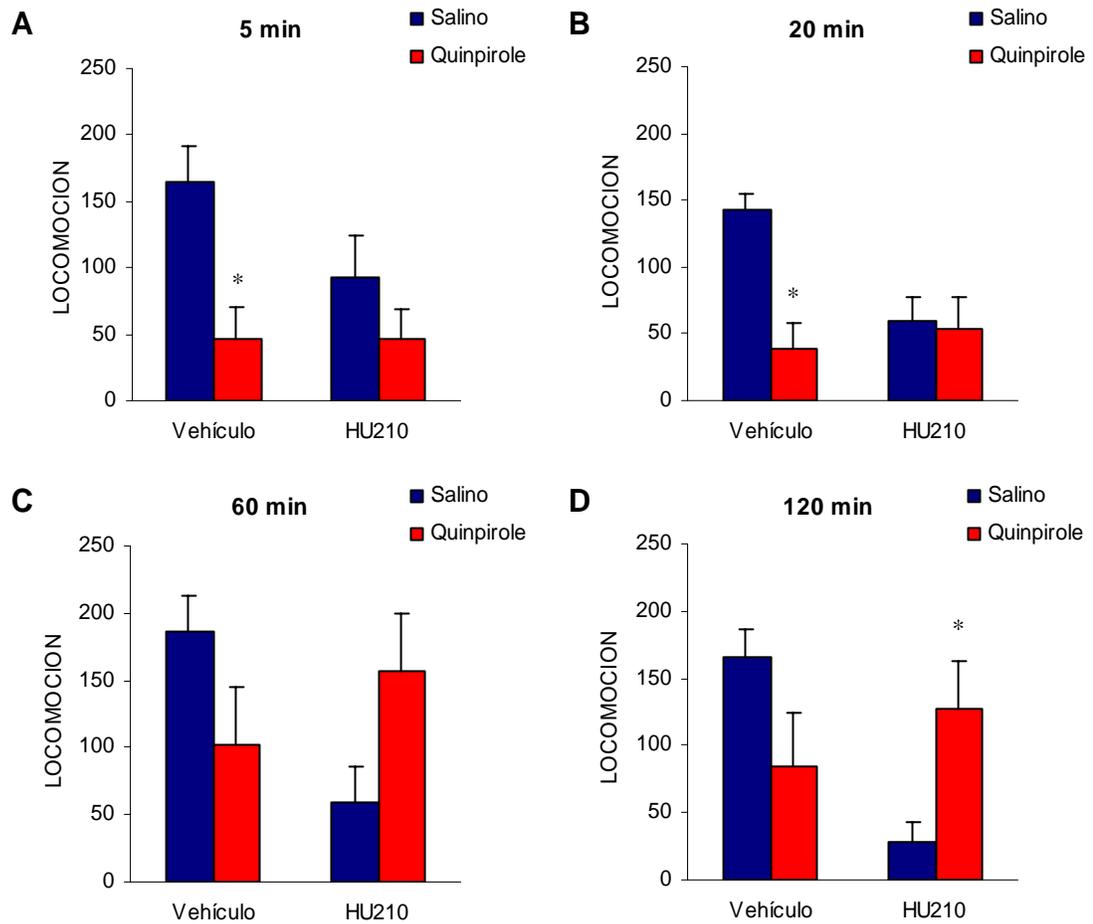
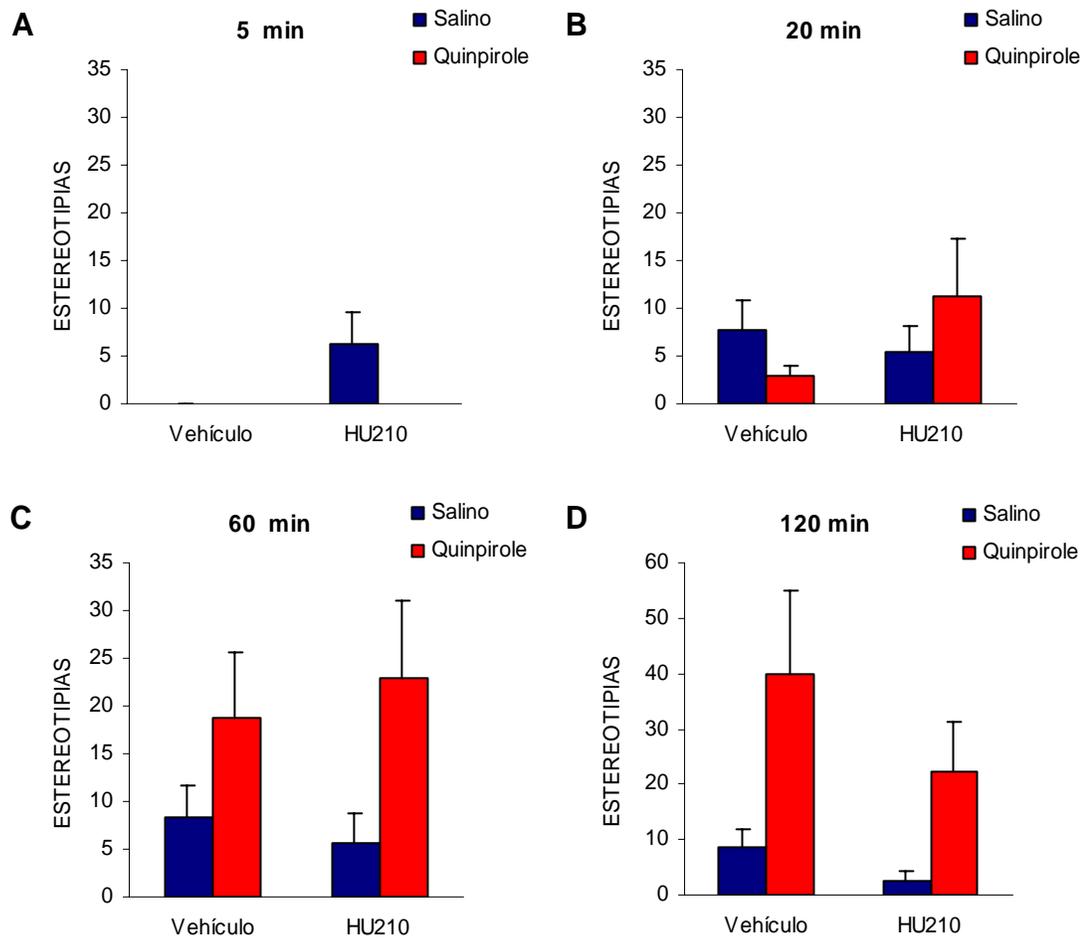


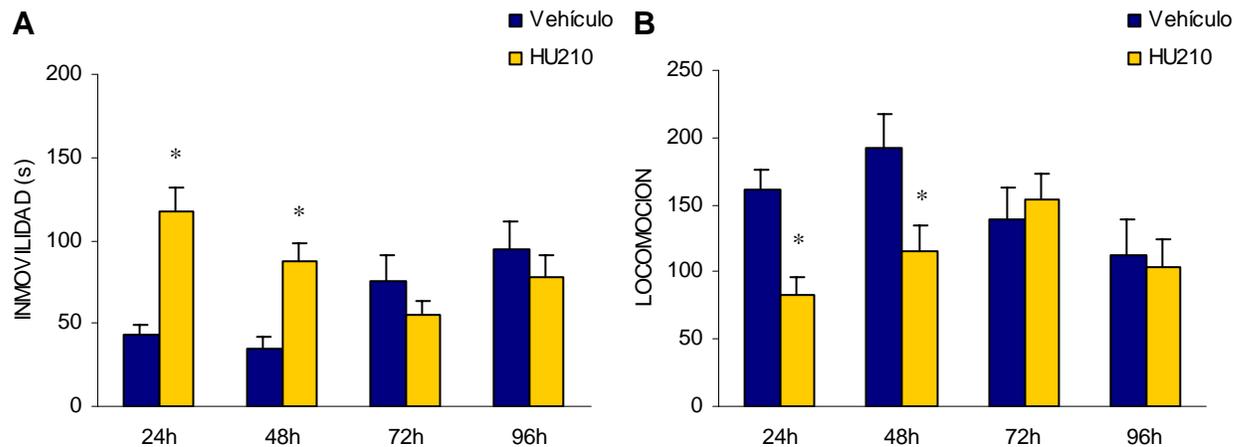
FIGURA 7. Estereotipia tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 µg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo salino; # $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.



6) EFECTOS COMPORTAMENTALES 96 HORAS TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON HU210 EN ANIMALES ADULTOS

Los animales tratados crónicamente con HU210 mostraron una alteración el **patrón de conductas motoras** 24 y 48 horas tras la última administración del cannabinoide. En la figura 8A se muestra el aumento significativo de la conducta de inmovilidad en aquellos animales tratados crónicamente con HU210 24 y 48 h tras la última administración $F_{(1,52)} = 21.56$, $P < 0.000$; $F_{(1,34)} = 16.13$, $P < 0.000$, respecto al grupo vehículo. La figura 8B muestra un descenso significativo de la actividad locomotora en aquellos animales tratados crónicamente con HU210 24 y 48 h tras la última administración $F_{(1,52)} = 16.81$, $P < 0.000$; $F_{(1,34)} = 6.31$, $P < 0.017$, respecto al grupo vehículo. Sin embargo este patrón de conducta motora alterada se estabiliza a las 72 y 96 h después de la última administración del tratamiento crónico con HU210 no encontrándose diferencias significativas.

FIGURA 8. Actividad motora en animales adultos 96 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo.



6.1. Efectos de la estimulación de los receptores D2 en animales adultos 96 horas tras el tratamiento crónico con HU210

Los efectos en la respuesta comportamental de la administración aguda del agonista dopaminérgico D2 quinpirole (0.25 y 0.5 mg/kg) 96 horas tras el tratamiento crónico con HU210 se muestran en las figuras 9, 10 y 11.

En la **figura 9** se muestran los efectos en la **conducta de inmovilidad** tras la administración aguda de quinpirole, 96 horas después de la exposición crónica con HU210. A los 5 min, la administración de quinpirole produce un aumento de la conducta de inmovilidad, siendo significativo en el grupo tratado crónicamente con vehículo en la dosis 0.25 mg/kg de quinpirole $F_{(2,17)} = 4.54$ $P < 0.029$ respecto al grupo salino. A los 30 min, la administración de quinpirole 0.25 mg/kg sigue mostrando un aumento en la conducta de inmovilidad siendo significativo en el grupo tratado crónicamente con HU210 $F_{(2,17)} = 17.96$ $P < 0.000$ respecto al grupo salino. Mientras que la administración de quinpirole 0.5 mg/kg produjo un descenso notable en esta conducta en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(2,17)} = 5.07$ $P < 0.021$, respecto al grupo salino; así como produjo un descenso de la inmovilidad mayor en el grupo tratado crónicamente con HU210 siendo significativamente más reducido $F_{(1,11)} = 9.4$, $P < 0.012$, respecto al grupo vehículo-quinpirole 0.5 mg/kg. A los 60 y 120 min, la administración de quinpirole no produjo diferencias significativas en la conducta de inmovilidad, sin embargo se observa una tendencia al descenso en esta conducta en ambos tiempos, siendo más pronunciada en el caso del grupo expuesto crónicamente a HU210, $F_{(2,17)} = 3.29$ $P < 0.065$; $F_{(2,17)} = 3.33$ $P < 0.063$, respecto al grupo salino.

En la **figura 10** se muestran los efectos en la **conducta de locomoción** tras la administración aguda de quinpirole, 96 horas después de la exposición crónica con HU210. A los 5 min, la administración de quinpirole no produjo diferencias significativas aunque se observa una tendencia al descenso de la actividad locomotora. A los 30 min, la administración de quinpirole produjo un grave descenso en la conducta locomotora, las dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg produjeron una reducción de esta actividad tanto en el grupo tratado crónicamente con vehículo, $F_{(2,17)} = 5.63$ $P < 0.015$; como el tratado con HU210, $F_{(2,17)} = 18.34$ $P < 0.000$, respecto al grupo tratado con salino. Sin embargo, el descenso de la actividad locomotora provocado por la administración de la dosis de quinpirole 0.5 mg/kg en el grupo tratado crónicamente con HU210 fue significativamente menor que la producida por la misma dosis en la condición de tratamiento crónico con vehículo, $F_{(1,11)} = 21.66$, $P < 0.001$ respecto al grupo vehículo-quinpirole 0.5 mg/kg. Manifestando una alteración en la respuesta ante la administración de quinpirole 0.5

mg/kg por el tratamiento crónico previo con HU210. A los 60 min, la administración de la dosis de quinpirole 0.25 mg/kg sigue manifestando una reducción en la conducta locomotora tanto en el grupo tratado crónicamente con vehículo como en el de HU210. Por el contrario, la administración de la dosis de 0.5 mg/kg parece incrementar la actividad de esta conducta especialmente en el grupo tratado crónicamente con HU210. A los 120 min, solo la administración de quinpirole 0.5 mg/kg produjo diferencias significativas en el grupo tratado crónicamente con HU210, en concreto produjo un gran aumento de la conducta locomotora $F_{(2,17)} = 9.86$ $P < 0.002$, respecto al grupo salino, así como este aumento se muestra con una tendencia mucho mayor que en el caso de la administración de la misma dosis en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(1,11)} = 4.79$, $P < 0.053$, respecto al grupo vehículo-quinpirole 0.5 mg/kg. Esta es una muestra de la sensibilización de la conducta locomotora 96 h después del tratamiento crónico con HU210 ante el desafío con el agonista D2, quinpirole en la dosis de 0.5 mg/kg.

En la **figura 11** se muestran los efectos en la **conducta estereotipada** tras la administración aguda de quinpirole, 96 horas después de la exposición crónica con HU210. A los 5 min, la administración de quinpirole muestra una tendencia al incremento en el número de estereotipias solo en el grupo tratado crónicamente con HU210, siendo mayor esta tendencia con la dosis más alta de quinpirole. A los 30 min, no se produjeron diferencias significativas por la administración de quinpirole en el grupo tratado crónicamente con vehículo respecto al grupo salino. Sin embargo en el grupo tratado crónicamente con HU210, se observa un gran aumento de las estereotipias por la administración de ambas dosis de quinpirole, mostrando una tendencia mayor en la dosis más alta, $F_{(2,17)} = 15.39$ $P < 0.000$ respecto al grupo salino. Además este incremento en la conducta estereotipada fue también significativamente en ambas dosis en el grupo tratado crónicamente con HU210 respecto al tratado crónicamente con vehículo, de modo que la dosis de quinpirole 0.25 mg/kg $F_{(1,11)} = 39.1$, $P < 0.000$, y la dosis de quinpirole 0.5 mg/kg $F_{(1,11)} = 21.24$, $P < 0.001$, respecto al grupo vehículo-quinpirole respectivamente. A los 60 min, la administración de quinpirole produjo un leve incremento de las estereotipias en el grupo tratado crónicamente con vehículo sin llegar a ser significativo. En grupo tratado crónicamente con HU210 la administración de 0.25 mg/kg de quinpirole también produjo un incremento de las estereotipias sin llegar a ser significativo, sin embargo la administración de la dosis de 0.5 mg/kg de quinpirole produjo un gran incremento de la conducta estereotipada en los animales tratados crónicamente con HU210 $F_{(2,17)} = 6.79$ $P < 0.008$ respecto a la administración de salino en este mismo grupo de tratamiento crónico, así como $F_{(1,11)} = 6.5$, $P < 0.029$ respecto al grupo tratado con vehículo-quinpirole 0.5 mg/kg. A los 120 min, la administración de quinpirole sigue mostrando un incremento en las estereotipias en ambos grupos tratados crónicamente, siendo significativo este aumento solamente en la administración de la dosis más alta de quinpirole 0.5 mg/kg, en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(2,17)} = 4.58$ $P < 0.028$, respecto al grupo

salino del mismo grupo de tratamiento crónico; así como en el grupo tratado crónicamente con HU210 $F_{(2,17)} = 8.02$ $P < 0.004$, respecto al grupo salino del mismo grupo de tratamiento crónico; mostrando este último grupo una tendencia mayor en el incremento de las estereotipias respecto al grupo tratado crónicamente con vehículo con la misma dosis de quinpirol. Al igual que en los resultados anteriores se sigue manifestando, en este caso de una forma más pronunciada, la sensibilización causada por el tratamiento crónico de HU210 96h antes ante el desafío con el agonista D2 quinpirol, en especial con la dosis más alta.

FIGURA 9. Inmovilidad tras la administración de quinpirole (0.25 y 0.5 mg/kg) en animales adultos 96 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 µg/kg). Los valores corresponden a las medias ± E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-quinpirole.

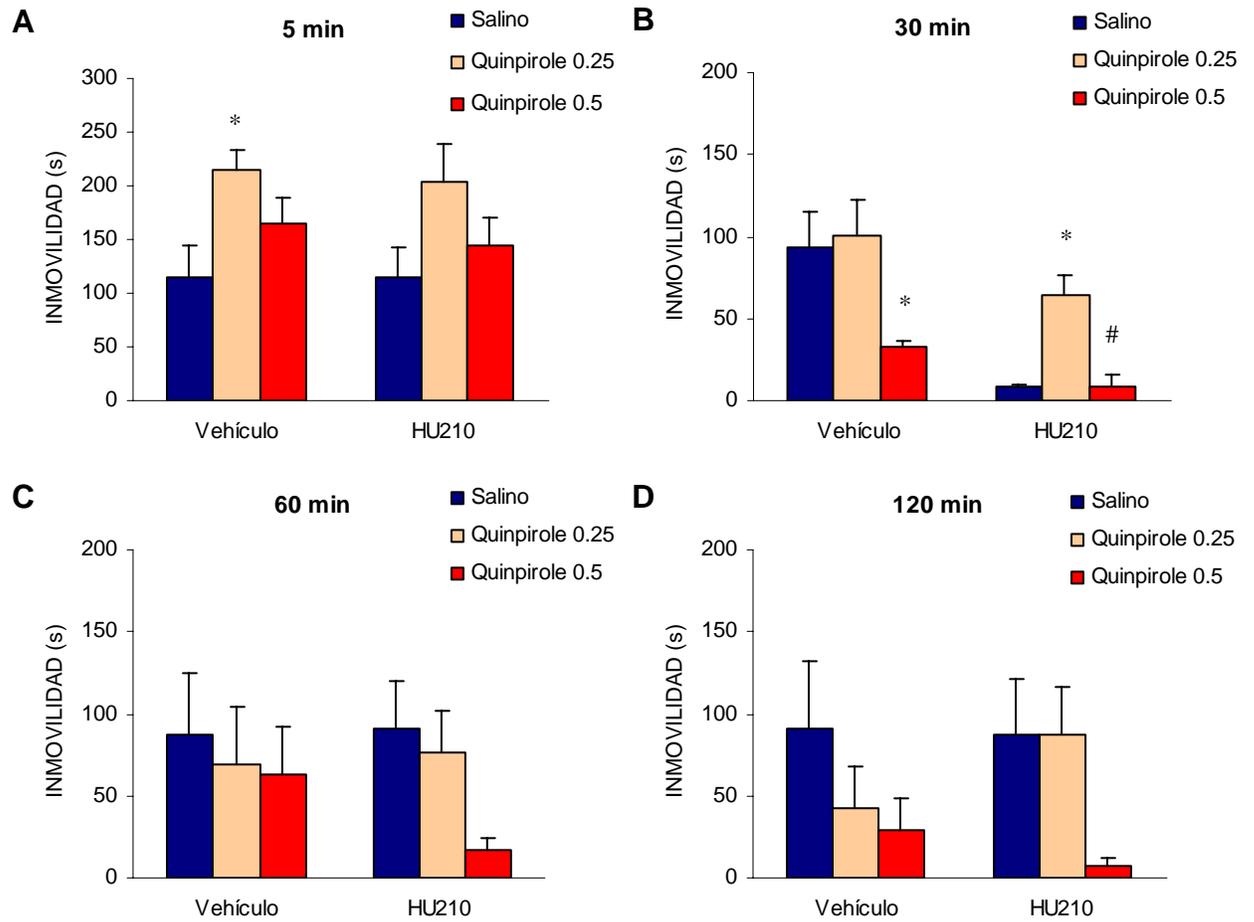


FIGURA 10. Locomoción tras la administración de quinpirole (0.25 y 0.5 mg/kg) en animales adultos 96 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 µg/kg). Los valores corresponden a las medias ± E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-quinpirole.

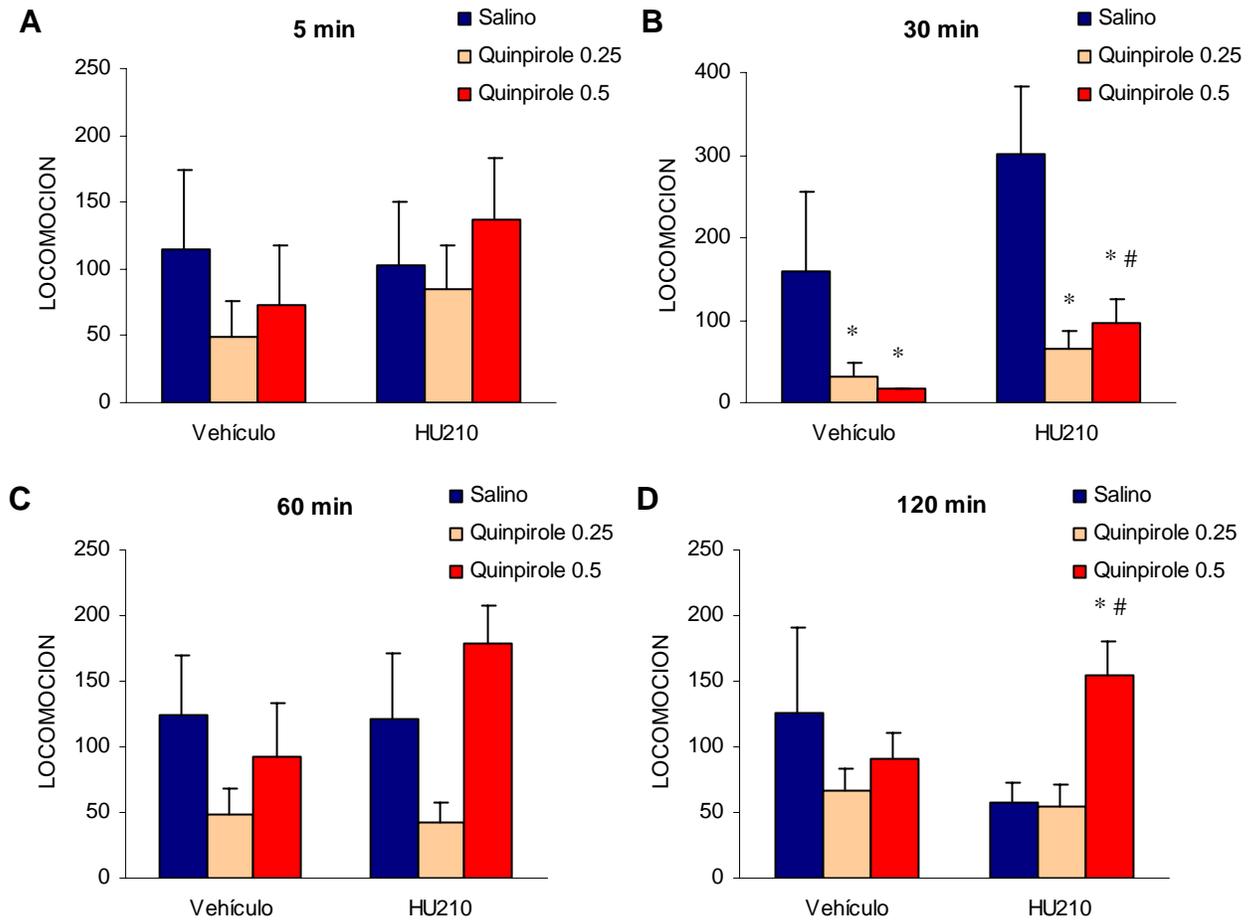
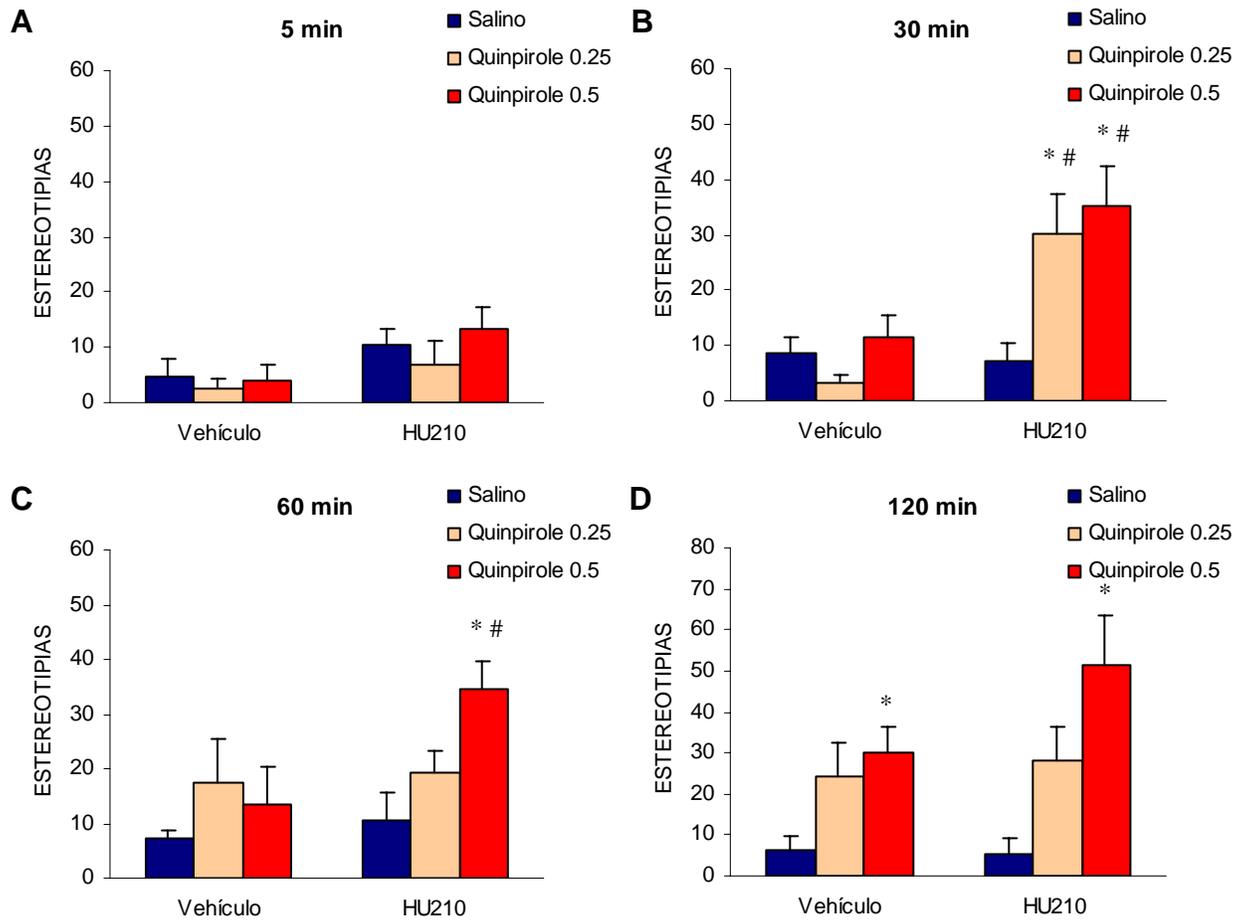


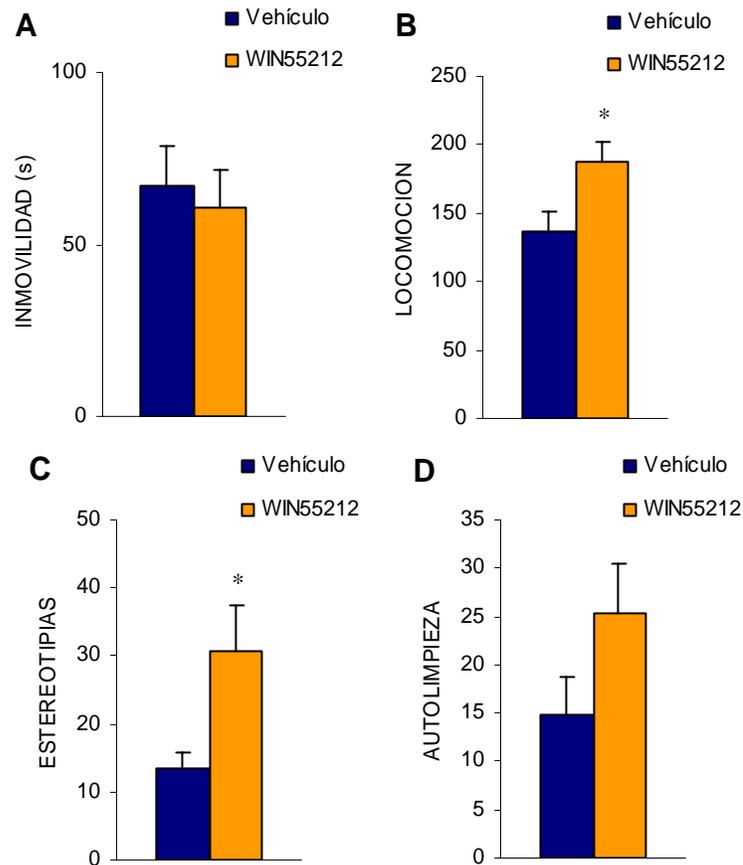
FIGURA 11. Estereotipia tras la administración de quinpirole (0.25 y 0.5 mg/kg) en animales adultos 96 h tras ser tratados crónicamente con HU210 (20 µg/kg). Los valores corresponden a las medias ± E.E.M. * P < 0.05, vs. grupo salino; # P < 0.05, vs. grupo vehículo-quinpirole.



7) EFECTOS COMPORTAMENTALES 24 HORAS TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON WIN 55212-2 EN ANIMALES ADULTOS

Los resultados tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55210 (4 mg/kg) durante 14 días, muestran alteraciones comportamentales conductuales en condiciones basales; produciéndose un aumento significativo en los grupos tratados crónicamente con el cannabinoide tanto de la conducta de locomoción, $F_{(1,47)} = 5.79$, $P < 0.020$, como de las estereotipias $F_{(1,47)} = 6.26$, $P < 0.016$, respecto al los animales tratados crónicamente con vehículo. Sin embargo, no se mostraron diferencias significativas en la conducta de inmovilidad y en la de autolimpieza en los animales tratados crónicamente con WIN55212.

FIGURA 12. Actividad motora, estereotipias y conducta de autolimpieza en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con WIN55212 (4 mg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo.



7.1. Respuesta comportamental de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico con WIN55212-2

Los efectos sobre la respuesta comportamental tras la administración aguda del agonista dopaminérgico D2 quinpirole (0.5 mg/kg) en animales tratados crónicamente con WIN55212 se muestran en las figuras 13, 14 y 15.

En la **figura 13**, se muestran los efectos en la **conducta de inmovilidad** tras la administración aguda de quinpirole, 24 horas tras el cese del tratamiento crónico con WIN55212. A los 5 min, la administración quinpirole produjo un aumento significativo en la conducta de inmovilidad tanto en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(1,11)} = 23.47$, $P < 0.001$; como en el grupo tratado crónicamente con WIN55212 $F_{(1,11)} = 134.91$, $P < 0.000$ respecto al grupo salino. Pero este incremento en la conducta de inmovilidad se acentuó de forma significativa por el tratamiento crónico con WIN55212, $F_{(1,12)} = 10.58$, $P < 0.008$ respecto a la producida en el grupo vehículo-quinpirole. A los 60 min, la administración de quinpirole produjo un descenso significativo en la conducta de inmovilidad en ambos grupos de tratamiento crónico, el vehículo-quinpirole $F_{(1,11)} = 22.74$, $P < 0.001$; y el de WIN55212-quinpirole $F_{(1,11)} = 14.58$, $P < 0.003$, respecto al grupo al que se le administró salino. A los 120 min, se siguió observando esta reducción significativa en la conducta de inmovilidad en los dos grupos por la administración de quinpirole, grupo vehículo-quinpirole $F_{(1,11)} = 18.37$, $P < 0.002$; y en el grupo de WIN55212-quinpirole $F_{(1,11)} = 14.29$, $P < 0.003$ respecto a la administración de salino.

En la **figura 14**, se muestran los efectos en la **conducta de locomoción** tras la administración aguda de quinpirole, 24 horas tras el cese del tratamiento crónico con WIN55212. A los 5 min, tras la administración de quinpirole se produjo un descenso significativo de la locomoción en ambos grupos de tratamiento crónico, vehículo-quinpirole $F_{(1,11)} = 9.75$, $P < 0.011$; y en el grupo WIN55212-quinpirole $F_{(1,12)} = 28.91$, $P < 0.000$, respecto a la administración de salino. A los 30 min, se produjo un aumento significativo en la conducta de locomoción del grupo de tratamiento crónico de WIN55212 por la administración de quinpirole, $F_{(1,12)} = 9.05$, $P < 0.012$ respecto al grupo vehículo-quinpirole.

En la **figura 15**, se muestran los efectos en la **conducta de estereotipia** tras la administración aguda de quinpirole, 24 horas tras el cese del tratamiento crónico con WIN55212. A los 5 min, la administración de quinpirole produjo diferencias significativas en el grupo tratado crónicamente con WIN55212 $F_{(1,12)} = 9.47$, $P < 0.011$ respecto al grupo salino, por la disminución en la actividad estereotipada; observándose también esa tendencia en el grupo de

tratamiento crónico con vehículo por la administración de quinpirole, $F_{(1,12)}= 4.15$, $P < 0.066$ respecto al grupo salino. A los 30 min, la administración de quinpirole produce un aumento en las estereotipias tanto en el grupo de tratamiento crónico vehículo, $F_{(1,11)}= 13.69$, $P < 0.004$, como la tendencia a este incremento en el grupo de tratamiento crónico con WIN55212 respecto al grupo salino; además también parece existir una tendencia de diferencia en el efecto de la administración de quinpirole por el tratamiento crónico con WIN55212, $F_{(1,12)}= 3.75$, $P < 0.079$ respecto al grupo de tratamiento crónico vehículo. A los 60 min, la administración de quinpirole produjo un incremento significativo de la estereotipias tanto en el grupo tratado crónicamente con vehículo $F_{(1,11)}= 82.44$, $P < 0.000$; como en el tratado con WIN55212 $F_{(1,12)}= 5.22$, $P < 0.043$ respecto a la administración de salino. Además la tendencia observada sobre la diferencia en la respuesta de la administración de quinpirole en ambos grupos de tratamiento crónico tendió a incrementarse de modo que la administración de quinpirole produjo una potenciación en la respuesta de incremento de la estereotipias en el grupo tratado crónicamente con el agonista cannabinoide WIN55212, $F_{(1,12)}= 6.47$, $P < 0.027$, respecto al grupo vehículo-quinpirole. A los 120 min, la administración de quinpirole siguió produciendo un incremento significativo en las estereotipias tanto en el grupo de tratamiento crónico vehículo $F_{(1,11)}= 28.23$, $P < 0.000$, como en el grupo de tratamiento crónico WIN55212 $F_{(1,12)}= 38.93$, $P < 0.000$, respecto a la administración de salino. Sin embargo, en este caso no se produjeron diferencias significativas en el efecto del quinpirole entre ambos tratamientos crónicos.

FIGURA 13. Inmovilidad tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con WIN55212 (4 mg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo salino; # $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.

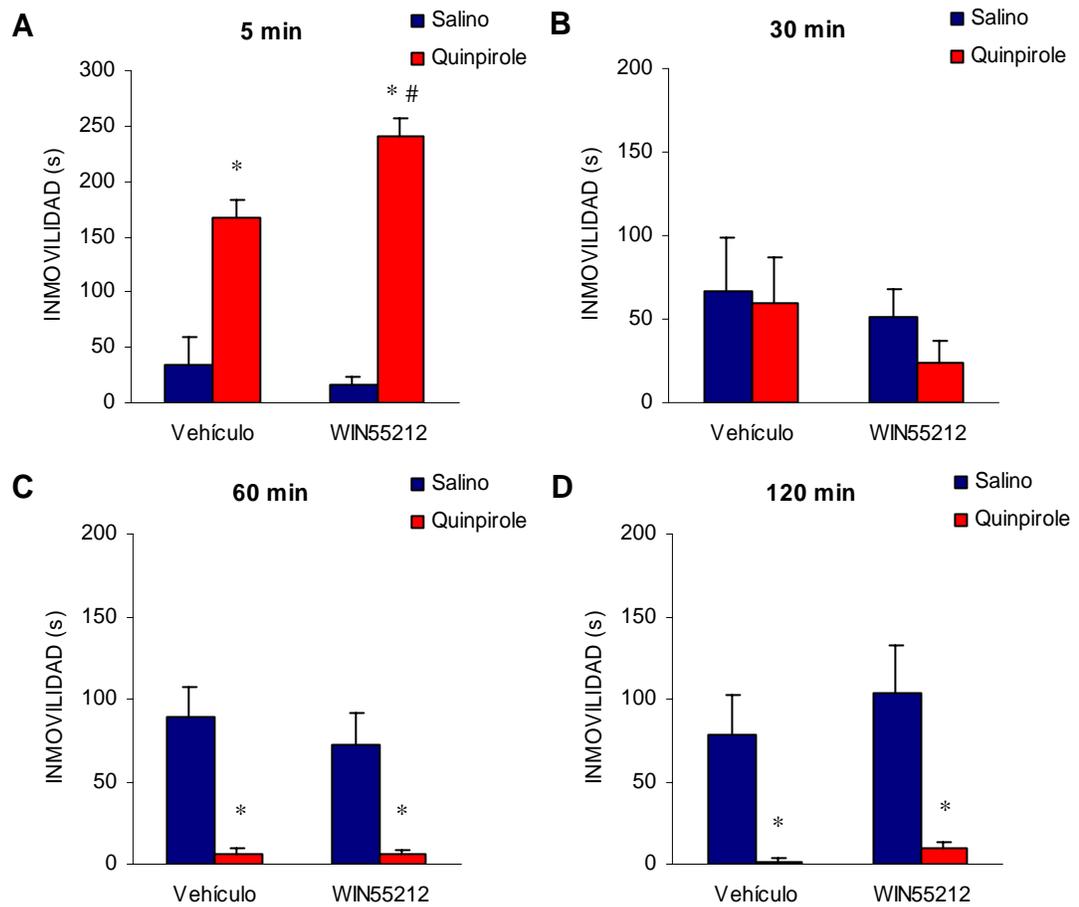


FIGURA 14. Locomoción tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con WIN55212 (4 mg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo salino; # $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.

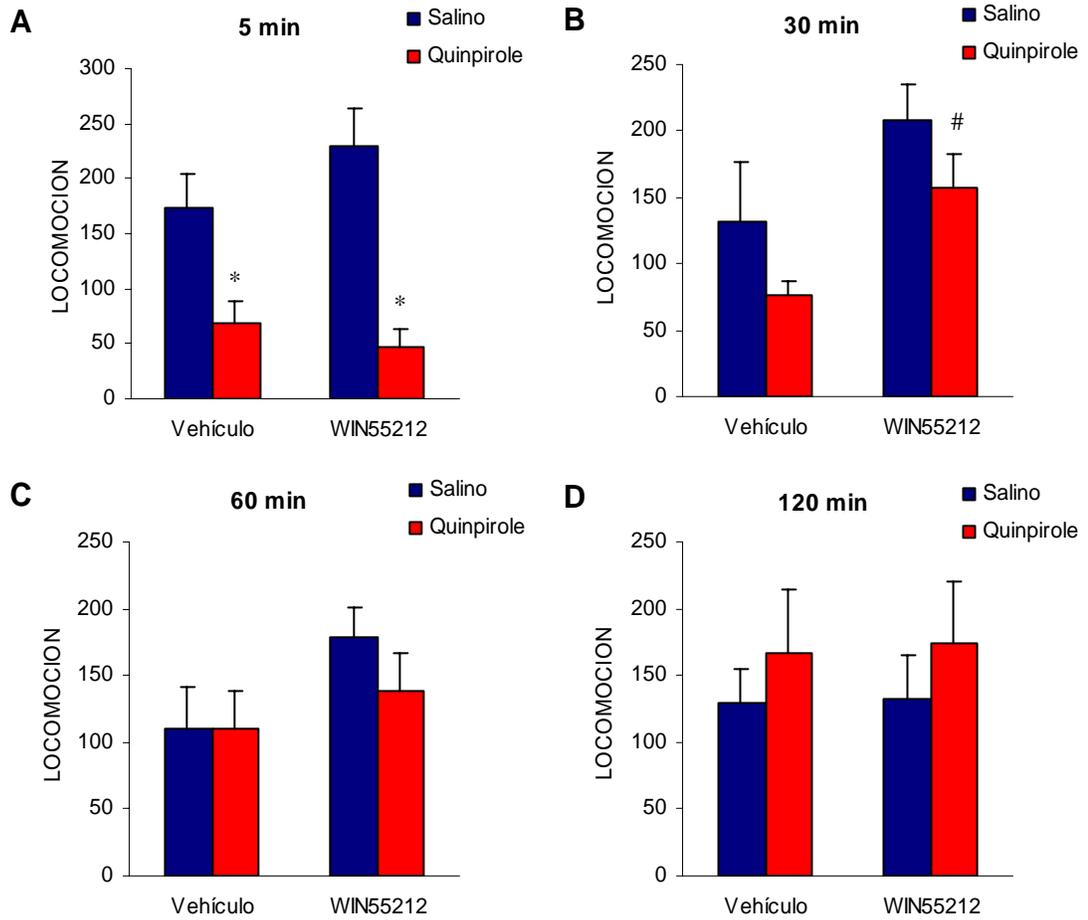
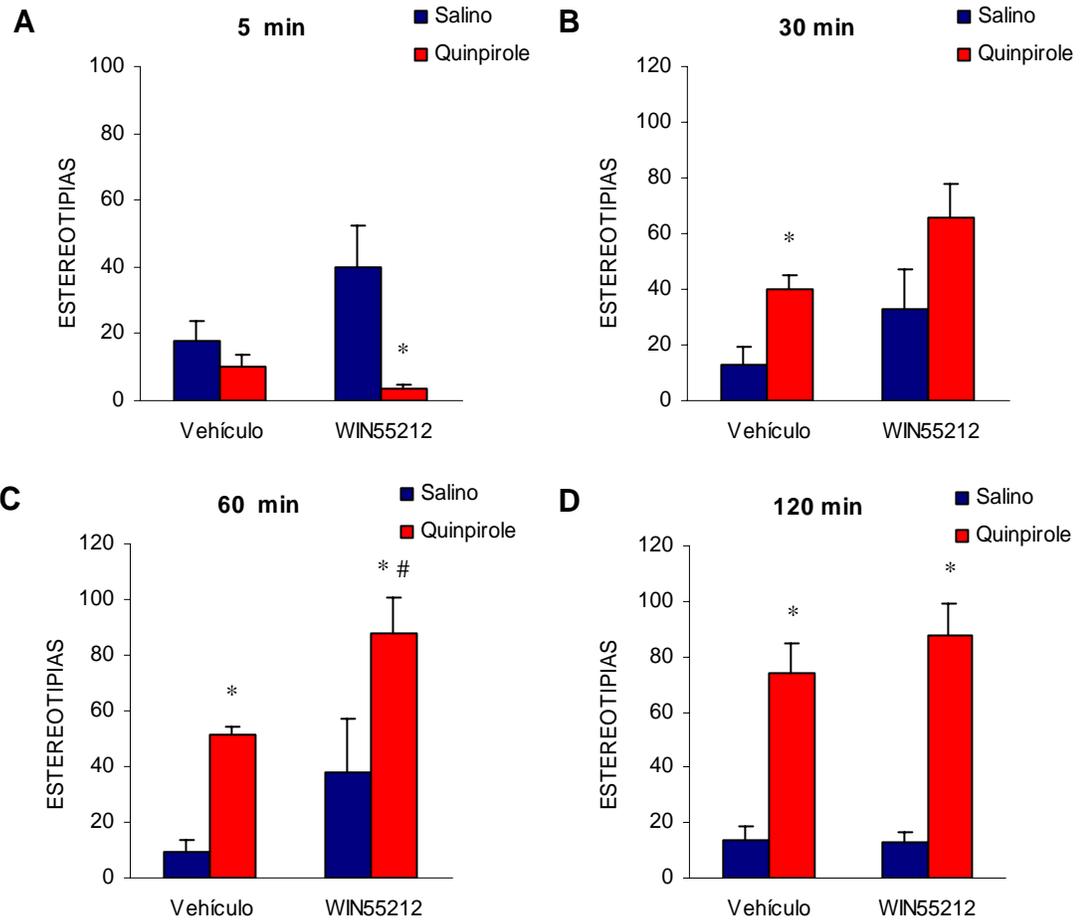


FIGURA 15. Estereotipia tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con WIN55212 (4 mg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo salino; # $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.



Experimento III

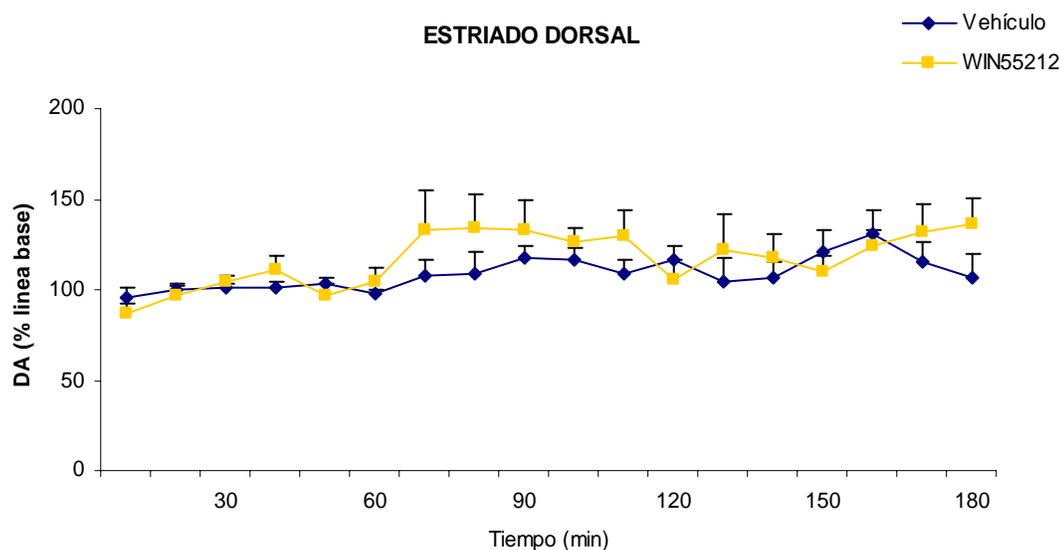
Estudio de los efectos en los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales en respuesta a la activación del receptor D2 tras el tratamiento crónico con cannabinoides en el periodo adulto

8) EFECTOS EN LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA EN EL ESTRIADO DORSAL EN ANIMALES ADULTOS 24 HORAS TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON WIN55212

En la **figura 1** se muestran los efectos en los niveles basales del neurotransmisor dopamina en el estriado dorsal 24 horas tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212 en animales adultos.

Las muestras recogidas a lo largo del experimento no mostraron diferencias significativas en las concentraciones del neurotransmisor dopamina en el estriado dorsal entre los grupos tratados crónicamente con el agonista cannabinoide y los tratados con vehículo en condiciones basales.

FIGURA 1. Liberación de dopamina en el estriado dorsal en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con WIN55212 (4 mg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo.

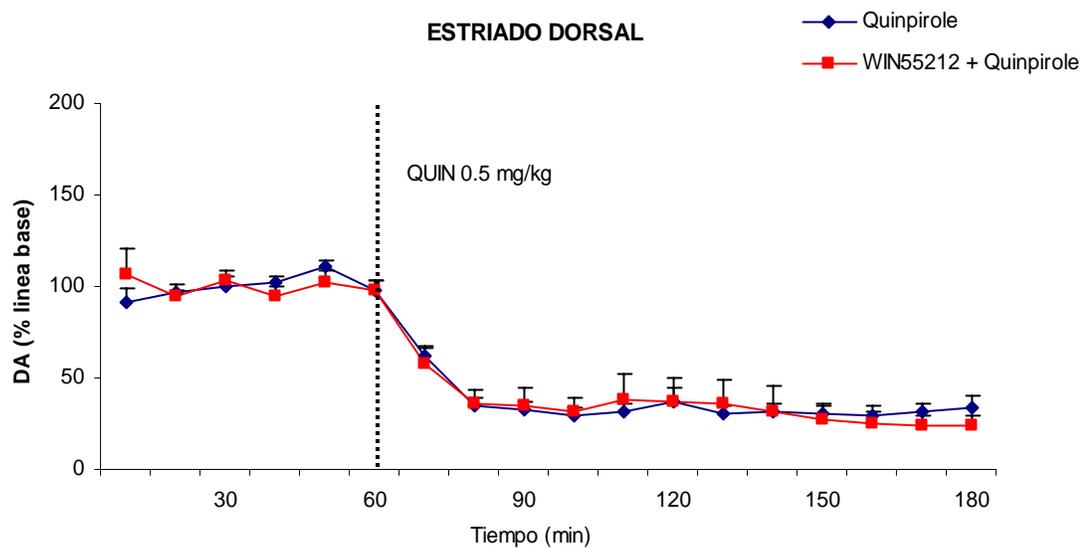


8.1. Respuesta neuroquímica de la liberación de dopamina en el estriado dorsal por la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico de WIN55212-2

En la **figura 2** se muestran los efectos en la liberación del neurotransmisor dopamina en el estriado dorsal tras la estimulación de los receptores D2 con el agonista dopaminérgico quinpirole (0.5 mg/kg) en animales tratados crónicamente con el agonista canabinoide WIN55212.

La administración del agonista dopaminérgico D2 quinpirole produjo diferencias significativas en las concentraciones de dopamina respecto a los animales a los que se les administró salino, produciendo un descenso en la liberación de dopamina en el estriado dorsal tanto en el grupo de tratamiento crónico vehículo como en el de WIN55212. Sin embargo, el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212 no mostró producir diferencias significativas en la respuesta neuroquímica de descenso de liberación de dopamina en el estriado dorsal tras la administración de quinpirole con respecto al grupo vehículo-quinpirole.

FIGURA 2. Liberación de dopamina en el estriado dorsal tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con WIN55212 (4 mg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.

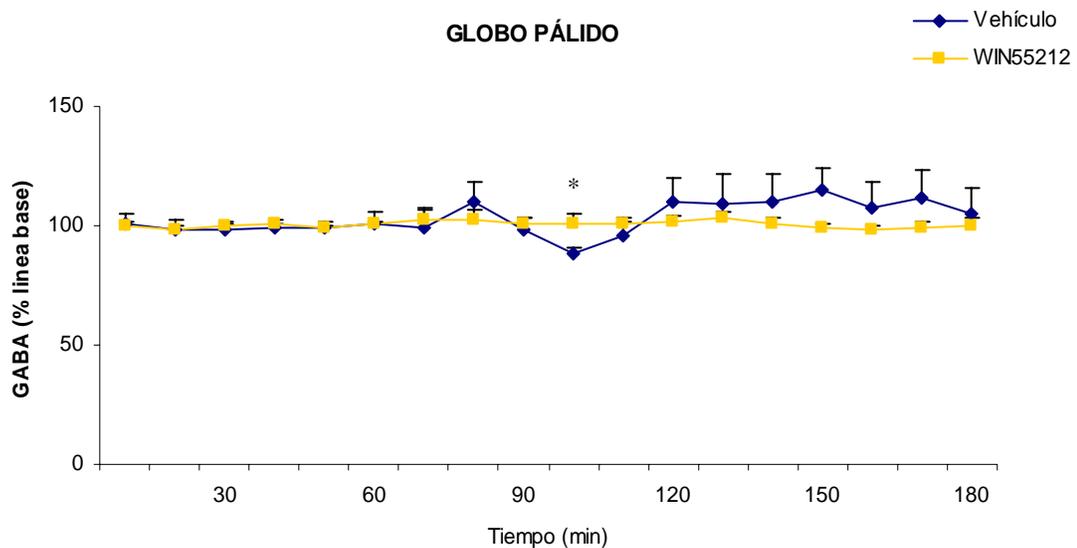


9) EFECTOS EN LA LIBERACIÓN DE GABA EN EL GLOBO PÁLIDO EN ANIMALES ADULTOS 24 HORAS TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON WIN 55212-2

En la **figura 3** se muestran los efectos en los niveles basales del neurotransmisor GABA en el globo pálido 24 horas tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212 en animales adultos.

El tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212 produjo diferencias significativas produciendo un aumento en la concentración del neurotransmisor GABA, en el globo pálido $F_{(1,11)} = 8.22$, $P < 0.017$, con respecto al grupo tratado crónicamente con vehículo en condiciones basales.

FIGURA 3. Liberación de GABA en el globo pálido en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con WIN55212 (4 mg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo.

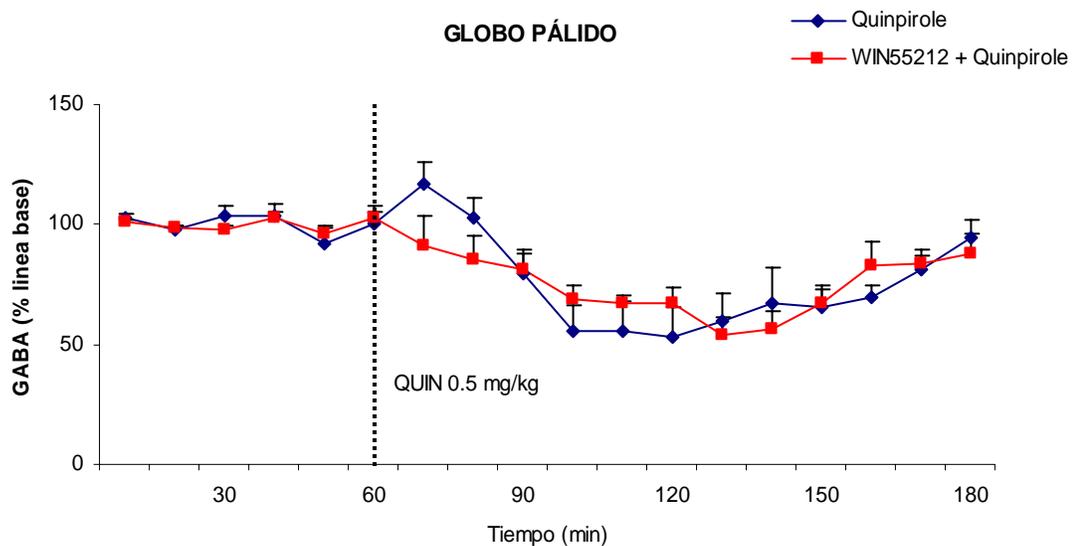


9.1. Respuesta neuroquímica de la liberación de GABA en el globo pálido por la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 en animales adultos 24 horas tras el tratamiento crónico de WIN55212-2

En la **figura 4** se muestran los efectos en la liberación del neurotransmisor GABA en el globo pálido tras la estimulación de los receptores D2 con el agonista dopaminérgico quinpirole (0.5 mg/kg) en animales tratados crónicamente con el agonista cananbinoide WIN55212.

La administración del agonista dopaminérgico D2 quinpirole produjo un descenso siginificativo en la liberación de GABA en el globo pálido tanto en el grupo de tratamiento crónico vehículo como en el grupo de tratamiento WIN55212, respecto a los animales a los que se les administró salino. Sin embargo, el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212 no mostró producir diferencias significativas en la respuesta neuroquímica de descenso de liberación de GABA en el estriado dorsal tras la administración de quinpirole con respecto al grupo vehículo-quinpirole.

FIGURA 4. Liberación de GABA en el globo pálido tras la administración de quinpirole (0.5 mg/kg) en animales adultos 24 h tras ser tratados crónicamente con WIN55212 (4 mg/kg). Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. * $P < 0.05$, vs. grupo vehículo-quinpirole.



V - DISCUSIÓN

1) EFECTOS COMPORTAMENTALES DE LA ACTIVACIÓN DOPAMINÉRGICA EN EL ANIMAL ADULTO TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON Δ^9 THC DURANTE EL PERIODO PERINATAL

La exposición perinatal con Δ^9 THC no parece haber sido perjudicial o tóxica en cuanto al adecuado crecimiento de los animales hasta el periodo adulto, pues no se han observado diferencias significativas en los resultados obtenidos sobre distintos parámetros gestacionales y postnatales.

Sin embargo, si se han detectado ciertas tendencias en algunos parámetros en los grupos tratados con Δ^9 THC, mostrando un mayor consumo tanto de agua como de comida en el periodo gestacional y de lactancia con respecto al grupo vehículo. De hecho, la ganancia de peso en las madres, definida como la diferencia entre el peso el día antes del nacimiento de las crías y el día antes de la fecundación, fue mayor en aquellos animales tratados con la dosis más alta de Δ^9 THC. Esta tendencia podría ser debido a uno de los efectos característicos de los cannabinoides que es la producción de hiperfagia (Williams y Kirkham, 1999; Berry y Mechoulam, 2002).

1.1. Modificaciones del comportamiento motor en el periodo adulto por la exposición perinatal con Δ^9 THC

La presencia del sistema cannabinoide endógeno desde las etapas tempranas del desarrollo, como la gestación y periodo postnatal (Fernández-Ruiz et al., 2000; Rodríguez de Fonseca et al., 1993), plantea la participación de este sistema en los procesos de desarrollo del SNC en el organismo. La activación del sistema cannabinoide endógeno durante estas etapas de suma plasticidad va a producir cambios ontogenéticos no solo en la maduración de los sistemas de neurotransmisión, sino también en la expresión de las conductas relacionadas con estos sistemas.

Los resultados de este trabajo muestran que efectivamente la exposición perinatal al agonista cannabinoide Δ^9 THC ha producido una modificación en la expresión de las conductas motoras, en condiciones basales, en el periodo adulto. Las alteraciones en las conductas psicomotoras, mostradas tanto en animales macho como en hembra, consistieron en un incremento significativo del tiempo empleado en inmovilidad, así como un descenso en la conducta de locomoción en el periodo adulto por la exposición perinatal a Δ^9 THC. Estos efectos

son consistentes con los resultados hallados en otros estudios sobre exposición perinatal a cannabinoides, en los que en el periodo adulto se mostró una alteración psicomotora caracterizada por la atenuación de las conductas motoras (Fernández-Ruiz et al., 1994; Fride y Mechoulam, 1996a,b; Navarro et al., 1994a,b).

Los cambios producidos en el comportamiento psicomotor, en los animales tratados perinatalmente con cannabinoides, están relacionados directamente con la capacidad del sistema cannabinoide endógeno de interactuar funcionalmente con los sistemas de neurotransmisión implicados en las conductas motoras, como son GABA, glutamato y dopamina.

En la actualidad no existen muchos trabajos sobre los efectos de la exposición perinatal a cannabinoides sobre la neurotransmisión de GABA y glutamato; aunque si se ha mostrado que la exposición perinatal a cannabinoides produce una sensibilización a la administración del agonista del receptor GABAérgico GABA-B baclofen, produciendo una potenciación del descenso de la actividad motora (García-Gil et al., 1999a); y estudios sobre la neurotransmisión de glutamato, han mostrado un descenso en sus niveles en el hipocampo en los animales tratados perinatalmente con cannabinoides (Mereu et al., 2003).

Los efectos más conocidos en cuanto a los cambios en la neurotransmisión relacionados con el comportamiento motor producidos por la exposición perinatal con cannabinoides son sobre el sistema dopaminérgico. Distintos estudios han mostrado que los animales tratados perinatalmente con cannabinoides mostraban alteraciones en la neurobiología de la neurotransmisión dopaminérgica, mostrando un decremento en la expresión génica y en la actividad de la enzima de síntesis de la dopamina la tirosina hidroxilasa (Bonnin et al., 1994,1995; Suarez et al., 2000), o manifestando cambios en la actividad dopaminérgica en estructuras relacionadas con el comportamiento motor como el estriado (Navarro et al., 1994a; Rodríguez de Fonseca et al., 1991a, 1992b).

Los cambios producidos en los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales, y especialmente en el sistema de neurotransmisión dopaminérgico, por la activación del sistema cannabinoide endógeno en las etapas de desarrollo perinatal podrían ser el origen de las modificaciones en el comportamiento motor observadas en los animales expuestos perinatalmente a cannabinoides.

De este modo las alteraciones descritas en la neurobiología del sistema de neurotransmisión dopaminérgico, producidas por la acción de los cannabinoides en la etapa perinatal, podrían ponerse de manifiesto en cuanto a su influencia sobre el comportamiento

motor mediante el estudio de la respuesta comportamental a la activación del sistema dopaminérgico en animales tratados perinatalmente con cannabinoides.

1.2. Dimorfismo sexual por la exposición perinatal con Δ^9 THC: cambios neuroendocrinos en el periodo adulto

El sistema cannabinoide endógeno esta presente en el centro de regulación de las funciones neuroendocrinas del organismo, el hipotálamo; también se encuentra presente en otras regiones del encéfalo como la amígdala central que regulan la actividad hipotalámica (Herkenham et al., 1990; Mailleux y Vanderhaeguen, 1992), y en órganos periféricos del organismo relacionados con la regulación del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal, como son los ovarios y los testículos (Galiegue et al., 1995; Gerard et al., 1991).

De acuerdo con los resultados, la exposición perinatal al agonista cannabinoide Δ^9 THC ha producido una alteración en el patrón neuroendocrino de actividad del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal o HPA en el periodo adulto. Esta alteración presenta un dimorfismo sexual ya que mientras que los animales macho expuestos perinatalmente a Δ^9 THC muestran un descenso significativo en los niveles plasmáticos de la hormona corticoesterona, respecto al grupo vehículo, los animales hembra mostraron un aumento. No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a los niveles plasmáticos de la hormona ACTH, sin embargo se observa una tendencia al descenso, al igual que en el resultado anterior, en el grupo de animales macho expuestos a la dosis más alta de Δ^9 THC. Estos resultados están en concordancia con los de otros estudios realizados sobre exposición perinatal a cannabinoides, en los que a dosis mayores de Δ^9 THC se encontraron alteraciones significativas tanto en corticosterona como en ACTH y en CRH (Del Arco et al., 2000; Navarro et al., 1994b, 1995; Rubio et al., 1995, 1998).

Las modificaciones producidas en el eje HPA, serían causadas por su activación continuada producida por los cannabinoides en el periodo perinatal a través de la liberación del factor liberador de corticotropina CRH (Murphy et al., 1998; Rodríguez de Fonseca et al., 1991b, 1997). Los cannabinoides podrían ejercer una acción directa por la presencia del receptor cannabinoide CB1 en el hipotálamo ventromedial, centro de localización de los cuerpos celulares de las neuronas CRH (Herkenham et al., 1991b; Fernández-Ruiz et al., 1997), o bien una acción indirecta por la capacidad de los cannabinoides de interactuar con la regulación de ciertos neurotransmisores implicados en la liberación de esta hormona (Chen et al., 1990; Di et al., 2003; Murphy et al., 1990b; Rodríguez de Fonseca et al., 1992c). De este modo la estimulación de la liberación de la hormona CRH produciría una señal en cascada, que activaría

la liberación de ACTH y finalmente la de los glucocorticoides. La activación permanente del eje HPA en desarrollo, por la exposición perinatal a cannabinoides, podría producir una modificación neuroadaptativa en este eje por los efectos neurotóxicos del incremento de glucocorticoides durante la ontogenia del SNC (McCormick et al., 1995; Demiere et al., 1992; Rodríguez de Fonseca et al., 1997; Rubio et al., 1995, 1998). Distintos estudios han mostrado que el aumento de corticosterona en el SNC podría afectar no solo a la neurotransmisión dopaminérgica, sino también a la respuesta locomotora en los animales (Deroche et al., 1995; Marinelli y Piazza, 2002; Piazza et al., 1996a,b).

Los resultados obtenidos en la hormona prolactina, no muestran diferencias significativas por la exposición perinatal con Δ^9 THC. Aunque los estudios realizados sobre la administración aguda de cannabinoides muestran una inhibición en la secreción de prolactina (Ho et al., 2000; Murphy et al., 1990b, 1998; Rodríguez de Fonseca et al., 1992c), otros estudios de exposición perinatal a cannabinoides no mostraron tampoco diferencias significativas en el periodo adulto (Del Arco et al., 2000; Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998b). La prolactina es una hormona que se encuentra bajo el control dopaminérgico en el núcleo arqueado del hipotálamo, y aunque no parecen mostrarse cambios en su liberación tras la exposición perinatal a cannabinoides, es posible que existan alteraciones silenciosas en la actividad de las neuronas dopaminérgicas del hipotálamo como resultado de la activación cannabinoide durante la ontogénesis. De este modo, estudios realizados en el periodo peripuberal de los animales, así como estudios de desafío con agonistas de dopamina han mostrado alteraciones en la secreción de esta hormona como consecuencia de la exposición perinatal con cannabinoides (Fernández-Ruiz et al., 1994; García-Gil et al., 1996; Rodríguez de Fonseca et al., 1991a). La exposición perinatal a cannabinoides podría producir cambios en la actividad hipotalámica, influyendo sobre los niveles de prolactina, en el periodo peripuberal pero desapareciendo este efecto con el desarrollo en la edad adulta

Como se ha comentado anteriormente el sistema cannabinoide endógeno también está presente en el eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal o HPG. Los estudios de administración aguda de cannabinoides muestran una inhibición directa en la secreción de la hormona luteinizante, mostrándose de forma más clara cuando los animales estaban gonadectomizados (Murphy et al., 1990a, 1996, 1998; Wenger et al., 1999, 2001); sin embargo los estudios de exposición perinatal con cannabinoides muestran un incremento durante los periodos de desarrollo, desapareciendo este efecto en la edad adulta (Wenger et al., 1991, 1997). En este estudio no se han obtenido alteraciones significativas en los niveles plasmáticos de la hormona luteinizante en el periodo adulto por la exposición perinatal a Δ^9 THC, aunque puede que como en el estudio anterior dicha alteración solo se manifieste durante los periodos de desarrollo y no

en la etapa adulta. Las posibles alteraciones en el eje HPG podrían explicar el carácter sexualmente dimórfico de los resultados comportamentales producidos por la exposición perinatal a cannabinoides en los distintos estudios (Dalterio y Bartke, 1979; Navarro et al., 1996), así como en los resultados obtenidos en este trabajo por la estimulación con agonistas de dopamina en animales perinatalmente tratados con Δ^9 THC.

En el dimorfismo sexual hallado en los resultados suele prevalecer, al igual que en otro estudios, una mayor sensibilidad en la respuesta comportamental de los machos frente a las hembras. Este hecho podría deberse a las diferencias en la expresión génica del receptor cannabinoide CB1 en la hipófisis anterior, existiendo una mayor presencia en los machos que en las hembras. En las hembras esta expresión del receptor cannabinoide CB1 ha mostrado ser variable de acuerdo con el ciclo ovárico; aunque aún así y en condiciones de gonadectomía los machos seguirían exhibiendo una mayor densidad del receptor cannabinoide CB1 (Gonzalez et al., 2000; Rodríguez de Fonseca et al., 1994b)

1.3. Alteraciones en la respuesta comportamental de activación dopaminérgica en el periodo adulto por la exposición perinatal con Δ^9 THC

Los efectos del tratamiento crónico con cannabinoides en la etapa perinatal sobre la funcionalidad de los ganglios de la base y el sistema dopaminérgico en el control y regulación de las conducta motoras, se manifiesta en este estudio a través de las alteraciones en la respuesta comportamental tras la estimulación de los receptores de dopaminérgico D1/D2 en animales expuestos perinatalmente a Δ^9 THC.

Como se muestra en diversos estudios la administración de una dosis de 0.1 mg/kg del agonista dopaminérgico D1/D2 apomorfina en animales suele afectar la conducta de inmovilidad, la locomoción y las estereotipias (Usiello et al., 2000; Wilcox et al., 1980, 1990). En este estudio los resultados muestran que el tratamiento perinatal con Δ^9 THC en los animales macho ha producido una alteración en cuanto a la respuesta comportamental inducida por de la administración aguda del agonista dopaminérgico D1/D2 apomorfina, ya que los grupos de animales macho expuestos perinatalmente a Δ^9 THC mostraron una potenciación de los efectos sobre la conducta de inmovilidad, en la disminución de la locomoción y de la conducta exploratoria respecto de los animales que recibieron la misma dosis de apomorfina pero su tratamiento perinatal fue el de vehículo. Las modificaciones en la respuesta comportamental de la estimulación de los receptores D1/D2 con el agonista dopaminérgico apomorfina podría ser el resultado de la alteración en la ontogénesis del sistema dopaminérgico así como de la sensibilidad de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en las estructuras cerebrales implicadas

con el control de las conductas motoras como el sistema dopaminérgico nigroestriado (Fernández-Ruiz et al., 1992, 1994; Rodríguez de Fonseca., 1990, 1991a).

La administración aguda del agonista dopaminérgico D2 quinpirole en dosis de 0.5 mg/kg produce un efecto bifásico en la conducta de los animales, comenzando por una fase de incremento de la inmovilidad para posteriormente de los 30 a los 120 min. tras su administración mostrar un aumento en las conductas motoras y estereotipadas (Eilam y Szechtman, 1989; Sullivan et al, 1998). Los resultados de este estudio manifiestan que la exposición perinatal a Δ^9 THC en los animales macho ha producido una alteración en la respuesta comportamental inducida por la estimulación de los receptores D2 mediante la administración aguda del agonista dopaminérgico quinpirole, mostrándose de una forma más marcada que en el desafío anterior con el agonista dopaminérgico D1/D2 apomorfina. Las alteraciones en la respuesta comportamental tras la estimulación de los receptores D2 consistió en la potenciación de la inmovilidad característica tras la administración de quinpirole en los animales tratados perinatalmente con Δ^9 THC; así como por la aparición de una respuesta de tolerancia a los efectos del aumento de la actividad estereotipada a los 60 y 120 minutos tras la administración de quinpirole, siendo este efecto dosis dependiente, de modo que la actividad estereotipada se redujo en función de la dosis de Δ^9 THC a la que fueron expuestos los animales en el periodo perinatal.

Los resultados muestran que las alteraciones producidas en el comportamiento motor por la exposición perinatal con Δ^9 THC parecen manifestarse de una forma más pronunciada por la estimulación del receptor dopaminérgico D2 mediante el agonista dopaminérgico quinpirole. Distintos estudios, realizados sobre modelos animales de la enfermedad de Parkinson así como con ratones knock-out han mostrado la importancia de la implicación del receptor dopaminérgico D2 en las funciones de control y coordinación de las conductas motoras por encima de los demás receptores de dopamina (Picetti et al., 1997; Saiardi et al., 1998; Usiello et al., 2000). Estudios realizados con primates no humanos, han mostrado que la coadministración de cannabinoides y agonistas dopaminérgicos D2 producían una potenciación de la sedación inducida por los cannabinoides, no llegándose a producir este efecto por la administración de agonistas dopaminérgicos D1 (Meschler et al., 2000).

De acuerdo con la caracterización neurofarmacológica de los efectos motores bifásicos de la administración de una dosis baja de quinpirole, la supresión del movimiento tras la administración se produciría por la activación de los autoreceptores dopaminérgicos presinápticos D2; mientras que la aparición de la hiperactividad tendría lugar por la posterior

activación de los receptores dopaminérgicos postsinápticos D2 (Eilam y Szechtman, 1989; Picetti et al., 1997).

En los resultados hallados en los grupos expuestos perinatalmente a Δ^9 THC la alteración en la respuesta comportamental producida por la administración de quinpirole, caracterizada por la potenciación de la hipoactividad en la fase inicial, así como por el descenso de la hiperactividad en la fase posterior, revelan la alteración en el desarrollo de los receptores dopaminérgicos D2 en el control y regulación de las conductas motoras como también se ha mostrado en otros estudios de exposición perinatal a cannabinoides (Fernández-Ruiz et al., 1994; Rodríguez de Fonseca et al., 1991a).

De este modo, los resultados sugieren que la exposición perinatal con Δ^9 THC podría haber incrementado la sensibilidad presináptica de los autoreceptores dopaminérgicos D2 a la estimulación con agonistas dopaminérgicos como apomorfina y quinpirole. Este posible incremento en la sensibilidad presináptica de los autoreceptores D2 podría de este modo influir en un decremento de la síntesis y de la liberación de dopamina dando lugar a la inmovilidad observada tras el desafío con estos agonistas dopaminérgicos en los animales macho tratados perinatalmente con Δ^9 THC. Este incremento en la sensibilidad podría estar mediado por la interacción entre los receptores cannabinoides CB1 y los autoreceptores dopaminérgicos D2 en el estriado área clave en el control del comportamiento motor.

La implicación del sistema cannabinoide endógeno en la modulación de la actividad dopaminérgica en el estriado ha sido demostrado tanto en estudios in vitro, en los que el receptor cannabinoide CB1 ha mostrado estar asociado negativamente a la adenilato ciclasa y a la liberación de dopamina en el estriado (Cadogan et al., 1997); así como por estudios in vivo donde la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 por el agonista quinpirole produce la liberación de la anandamida, provocando una inhibición de la actividad locomotora mediada por la dopamina (Giuffrida et al., 1999). La anandamida liberada parece actuar sinérgicamente con los autoreceptores dopaminérgicos D2 los que parecen mediar en la inhibición motora, pero antagonicamente con los receptores dopaminérgicos postsinápticos D2 los cuales causan la activación motora (Beltramo et al., 2000; Picetti et al., 1997).

La localización presináptica de los receptores cannabinoides CB1 le permite ejercer acciones de modulación sobre la liberación de determinados neurotransmisores (Schilcker y Kathmann, 2001). Este rol del sistema endocannabinoide como modulador de la liberación de neurotransmisión (Di Marzo et al., 1998) explicado anteriormente en la introducción adquiere una relevancia especial por su posible participación en el desarrollo del SNC. La exposición

perinatal a cannabinoides, activaría de un modo permanente el sistema cannabinoide endógeno durante el desarrollo produciendo modificaciones en sus interacciones con los sistemas de neurotransmisión implicados en el control del comportamiento motor, como el sistema dopaminérgico. Aunque no se han encontrado receptores cannabinoides CB1 expresados en las terminales dopaminérgicas en animales adultos, estos si han sido localizados en las neuronas monoaminérgicas durante las etapas de desarrollo (Hernández et al., 2000).

La activación continuada del sistema cannabinoide endógeno durante el desarrollo podría por tanto producir alteraciones permanentes en la funcionalidad de los receptores dopaminérgicos presinápticos D2, manifestadas en el periodo adulto por la alteración en la respuesta comportamental tras su activación.

2) EFECTOS COMPORTAMENTALES DE LA ACTIVACIÓN DOPAMINÉRGICA TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON CANNABINOIDES EN EL PERIODO ADULTO

2.1. Cambios en el comportamiento motor por el tratamiento crónico con cannabinoides en animales adultos

Los resultados obtenidos sobre el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide HU210 en animales adultos muestran que 24 horas tras el cese de la administración existen diferencias significativas en las conductas motoras, como el aumento de la inmovilidad y el descenso de la locomoción, característico de la actividad de los cannabinoides en el organismo. Estos resultados se siguen manteniendo incluso 48 horas tras el cese del tratamiento crónico con el agonista cannabinoide HU210, reflejando por tanto que la actividad cannabinomimética continúa. Los efectos sobre la actividad motora producida por la administración crónica con el agonista cannabinoide HU210 dejaron de ser significativos a las 72 horas tras el cese de su administración.

La razón por la que se siguen observando los efectos sobre la actividad motora tras el cese del tratamiento crónico se debe a que el agonista cannabinoide HU210 parece tener una semivida más larga en el organismo al ser eliminado más lentamente, no llegando incluso a producir un síndrome de abstinencia tras su cese (Dewey, 1986)

Sin embargo, los resultados obtenidos 24 horas tras la exposición crónica con el agonista cannabinoide WIN55212 en animales adultos parecen mostrar el desarrollo de tolerancia a los efectos agudos de los cannabinoides ya que no se observan los signos característicos como el descenso en locomoción y el aumento en inmovilidad. El desarrollo rápido de dicha tolerancia podría estar relacionado con el hecho de que el agonista cannabinoide WIN55212 tiene unas propiedades farmacocinéticas distintas a los demás cannabinoides, ya que su eliminación del organismo es más rápida, llegando incluso a poder producir un síndrome de abstinencia en los animales tras el tratamiento crónico (Aceto et al., 2001; Costa et al., 2000; Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002). De este modo los resultados muestran que los animales tratados crónicamente con el agonista cannabinoide WIN55212 muestran 24 horas tras el cese de la administración una serie de efectos conductuales, como el incremento significativo de la actividad locomotora o el aumento de las estereotipias respecto a los animales que recibieron vehículo, que indicarían un estado de activación producido por el cese de la activación cannabinoide, así como la posible alteración en los circuitos de neurotransmisión por su interacción con el sistema cannabinoide endógeno en el organismo.

Los estudios sobre el tratamiento crónico con agonistas cannabinoides en animales adultos muestran que efectivamente se produce el desarrollo de tolerancia a los efectos característicos de los cannabinoides (Abood y Martín, 1992; Bass y Martín, 2000). El desarrollo de dicha tolerancia estaría producida principalmente por mecanismos de farmacodinamia relacionados con cambios en el receptor cannabinoide CB1 y su desensibilización.

La exposición crónica a cannabinoides ha mostrado producir un descenso de la presencia de los receptores cannabinoides CB1 en distintas regiones del encéfalo, y más concretamente en áreas de los ganglios basales relacionadas con el control del comportamiento motor como el estriado (Romero et al., 1999; Rubino et al., 2000; Rodríguez de Fonseca et al., 1992b, 1994a; Zhuang et al., 2000). Además también han sido descritos otros cambios en cuanto al receptor cannabinoide CB1 tras el tratamiento crónico con agonistas cannabinoides, como las alteraciones en la interacción ligando-receptor, cambios en la expresión de la proteína G asociada al receptor, e incrementos en los niveles de AMPc y en la actividad de las proteína quinasas en áreas del cerebro donde se observó un decremento de los receptores cannabinoides CB1 (Kittler et al., 2000; Romero et al., 1999; Rubino et al., 2000; Sim et al., 1996a).

Estos efectos de regulación a la baja de los receptores cannabinoides CB1 en animales por el tratamiento crónico con agonistas cannabinoides han mostrado estar también acompañados por el descenso en los ligandos endógenos cannabinoides como anandamida o 2-araquidionil glicerol en el estriado (Di Marzo et al., 2000a).

Los cambios estructurales producidos en el sistema cannabinoide endógeno tras el tratamiento crónico con cannabinoides, así como los resultados obtenidos en cuanto a la modificación de las conductas motoras tras el desarrollo de tolerancia a los efectos de los cannabinoides apoyan el papel funcional del sistema cannabinoide endógeno en la interacción con los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales para el control y regulación de los comportamientos motores.

De este modo, si uno de los efectos agudos de los cannabinoides ha sido la inhibición de la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado, posiblemente por la inhibición en la recaptación del neurotransmisor GABA (Romero et al., 1995a; 1998), la desensibilización del sistema cannabinoide endógeno por el tratamiento crónico con cannabinoides podría por tanto producir una desinhibición de la neurotransmisión dopaminérgica como se podría deducir dados los resultados comportamentales 24 horas tras el cese del tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212 en el que se observa un incremento en las conductas motoras.

2.2. Alteraciones en la respuesta comportamental de activación dopaminérgica por el tratamiento crónico con cannabinoides

Los resultados de la estimulación tanto de los receptores dopaminérgicos D1 como D2, con los agonistas SKF38393 y quinpirole, 24 horas tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide HU210 no parecen mostrar los efectos comportamentales de una posible desinhibición del sistema dopaminérgico, tras los cambios producidos por la activación constante del sistema cannabinoide endógeno. Los resultados encontrados tras la estimulación del receptor dopaminérgico D1, como el incremento de la conducta de inmovilidad y el descenso en la conducta de locomoción y estereotipias, así como los efectos de la estimulación del receptor dopaminérgico D2 parecen ser producto más que de la estimulación de esos receptores de la actividad cannabinomimética aún presente en el organismo.

De este modo, la posible desinhibición del sistema dopaminérgico podría no manifestarse ya que, como se ha indicado en el apartado anterior, el HU210 es un cannabinoide con una semivida larga que tarda en ser eliminado del organismo; por lo que posiblemente en el momento del desafío con los agonistas de dopamina aún se encontrasen activos los efectos característicos de los cannabinoides como se muestra en los resultados obtenidos en condiciones basales 24 horas tras la última administración del cannabinoide.

De acuerdo con este planteamiento, la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 96 horas tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide HU210, momento en el que de acuerdo con los signos comportamentales parece haberse eliminado el cannabinoide del organismo, podría mostrar entonces las posibles alteraciones en la respuesta comportamental de la activación del sistema dopaminérgico.

Los resultados obtenidos muestran efectivamente una sensibilización conductual de la estimulación de los receptores D2 tras el tratamiento crónico con HU210 a 96 horas de la última administración del cannabinoide. Las alteraciones en la respuesta comportamental de la activación de los receptores D2, están caracterizadas por una potenciación en los efectos de hiperactividad característicos del agonista dopaminérgico quinpirole produciendo un incremento en la conducta de locomoción y en las estereotipias en los animales tratados crónicamente con el agonista cannabinoide. Además, esta potenciación en la respuesta hiperactiva producida por el agonista quinpirole ha mostrado ser incluso dependiente de dosis, de modo que la administración de una dosis de 0.25 mg/kg producía un menor aumento de la actividad en los animales tratados crónicamente con HU210 que la producida empleando las dosis de 0.5 mg/kg quinpirole.

Los resultados obtenidos 24 horas tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212 han mostrado las mismas alteraciones en la respuesta comportamental por la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2 mediante la administración del agonista quinpirole. La administración de la dosis 0.5 mg/kg de quinpirole produjo una potenciación de sus efectos sobre el aumento en la conducta de locomoción y en las estereotipias en los animales tratados crónicamente con el agonista WIN55212. Además de estos efectos, también se produjo un aumento de la conducta de inmovilidad inicial característica tras la administración de quinpirole.

De este modo parece que la activación continuada del sistema cannabinoide endógeno en el periodo adulto produciría modificaciones en la respuesta comportamental de la activación dopaminérgica mediante la estimulación de los receptores D2. Los efectos neurofarmacológicos del agonista dopaminérgico quinpirole, descritos en un apartado anterior, muestran que su secuencia se caracteriza por la estimulación inicial de los autoreceptores presinápticos D2 produciendo efectos de inmovilidad para posteriormente estimular los receptores postsinápticos D2 produciendo un aumento de las conductas motoras y de la actividad estereotipada (Eilam y Szechtman, 1989; Picetti et al., 1997). Los resultados en este estudio muestran que el tratamiento crónico con agonistas cannabinoide en el periodo adulto, ya sea HU210 o WIN55212, produce principalmente una sensibilización en los receptores postsinápticos D2 manifestada por la potenciación de los efectos comportamentales producidos tras su estimulación con el agonista dopaminérgico D2 quinpirole.

La sensibilización comportamental de la activación de los receptores dopaminérgicos D2 podría ser debido por tanto a la posible desinhibición de la neurotransmisión dopaminérgica producida tras la desensibilización del sistema cannabinoide endógeno. El tratamiento con agonistas cannabinoide afectaría por tanto el papel modulador del sistema cannabinoide endógeno en su interacción con el sistema dopaminérgico en el control y regulación de las conductas motoras.

El aumento de la actividad motora por la desinhibición del tono dopaminérgico tras el tratamiento crónico con cannabinoide ha sido también observado en otros estudios. El bloqueo farmacológico del receptor CB1 mediante la administración del antagonista cannabinoide SR141716A ha mostrado producir un incremento en las conductas motoras en animales tratados crónicamente con el agonista cannabinoide Δ^9 THC (Aceto et al., 1995; Tsou et al., 1995). En otros estudios de tratamiento crónico con agonistas cannabinoide también se ha puesto de manifiesto la aparición de la sensibilización en la respuesta comportamental tras el

desafío mediante la administración de psicoestimulantes como la anfetamina, que producirían una activación en el sistema de neurotransmisión dopaminérgico (Gorriti et al., 1999; Lamarque et al., 2001; Muschamp y Siviy, 2002; Pontieri et al., 2001).

La existencia de estos cambios en la respuesta comportamental dopaminérgica tras la activación continuada por los cannabinoides son una muestra de la interacción funcional entre los dos sistemas en el control y regulación del comportamiento motor. Esta interacción reciproca ha sido demostrada también en diversos estudios sobre los efectos en el sistema cannabinoide de las lesiones o el bloqueo del sistema dopaminérgico.

La desensibilización del sistema dopaminérgico mediante el tratamiento crónico con agonistas de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 ha mostrado producir una potenciación de las respuestas comportamentales de acinesia y de catalepsia inducidas por la estimulación de los receptores cannabinoides mediante la administración aguda del agonista cannabinoide HU210 (Rodríguez de Fonseca et al., 1994b). Estudios de lesión en el sistema dopaminérgico nigroestriatal han mostrado producir cambios en el sistema cannabinoide endógeno como el incremento en la expresión mRNA del receptor cannabinoide CB1 en el estriado (Romero et al., 2000; Zeng et al., 1999).

En los modelos animales de enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema dopaminérgico como el Parkinson, se han mostrado que el descenso en la conducta locomotora esta asociada a un aumento en los niveles del ligando endógeno 2-araquidonil glicerol en el globo pálido, mientras que la mejora de los signos motores por la administración de agonistas de dopamina se acompañaba por un decremento en los niveles de 2-araquidonil glicerol y anandamida (Di Marzo et al., 2000b). De este modo en estos mismos estudios se mostró que la administración conjunta de los agonistas dopaminérgicos con agonistas cannabinoides producía un descenso en el alivio de los signos de la acinesia producida por el modelo de Parkinson, mientras que la administración conjunta con el antagonista del receptor cannabinoide CB1 SR141716A produjo una mejora total de estos signos (Di Marzo et al., 2000b; Maneuf et al., 1997).

Además de estos efectos, el hecho de que la estimulación de los receptores D2 en el estriado este asociado a la liberación de anandamida apoya aún más el papel del sistema cannabinoide endógeno como un mecanismo de retroalimentación inhibitorio capaz de modular la actividad dopaminérgica en el estriado para la regulación y control de las conductas motoras (Giuffrida et al., 1999; Beltramo et al., 2000).

De este modo, el incremento de la actividad motora producida por la activación del sistema dopaminérgico parece ser contrarrestada por la inhibición producida por la activación del sistema cannabinoide endógeno. Sin embargo en el caso de una saturación del sistema cannabinoide endógeno, por el tratamiento crónico con agonistas cannabinoides, los resultados de este estudio nos indican que efectivamente se produciría una potenciación en la respuesta de activación motora inducida por la estimulación del sistema dopaminérgico, ya que existiría una desensibilización o bloqueo del sistema cannabinoide endógeno y no se retroalimentación inhibitoria de dicha activación.

La desinhibición de la respuesta comportamental de estimulación dopaminérgica en los animales tratados crónicamente con cannabinoides, estaría apoyada por los resultados hallados en este estudio como: el aumento de la actividad motora en condiciones basales tras el cese del tratamiento crónico con cannabinoides, y por la potenciación en el aumento de las respuestas de locomoción y estereotipia tras la estimulación postsináptica de los receptores dopaminérgicos D2. Sin embargo, el estudio de los efectos neuroquímicos en la liberación de los neurotransmisores probablemente implicados en esta desinhibición comportamental, como dopamina y GABA, tras la exposición crónica con cannabinoides podría verificar las alteraciones en los mecanismos de modulación del comportamiento motor tras la activación continuada del sistema cannabinoide endógeno.

3) EFECTOS EN LOS CIRCUITOS DE NEUROTRANSMISIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR D2 TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON CANNABINOIDES EN EL PERIODO ADULTO

El sustrato neuroanatómico de las interacciones funcionales en el control de las conductas motoras entre el sistema cannabinoide endógeno y el sistema dopaminérgico ha sido puesto de manifiesto por la localización conjunta de los receptores cannabinoides CB1 y los receptores dopaminérgicos en las mismas neuronas de proyección del estriado, compartiendo de este modo los mecanismos de transducción (Herkenham et al., 1991b; Meschler y Howlett, 2001).

Además la abundante presencia del receptor cannabinoide CB1 en las terminales presinápticas de las neuronas GABA inhibitorias del estriado ha mostrado también afectar a la neurotransmisión dopaminérgica, produciendo modificaciones en la activación de los núcleos de salida de los ganglios basales como la sustancia negra y el globo pálido. Así mismo, las proyecciones de la neuronas de dopamina de la sustancia negra han mostrado inervar las neuronas el estriado que expresarían conjuntamente los receptores cannabinoides CB1 y los dopaminérgicos (Fernández-Ruiz et al., 2002; Julian et al., 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 1998).

El papel en la regulación fisiológica del sistema cannabinoide endógeno en las interacciones entre los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales parece por tanto ser clave a través de su localización presináptica en la neuronas GABA, y la expresión conjunta con los receptores dopaminérgicos. La alteración en este papel modulador por la activación continuada del sistema inducirá cambios en la liberación de los neurotransmisores.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212 no produjo diferencias significativas en los niveles basales de liberación del neurotransmisor dopamina medidos en el estriado dorsal, 24 horas tras el cese de la administración del cannabinoide.

La estimulación del receptor dopaminérgico mediante la administración del agonista dopaminérgico D2 quinpirole no produjo diferencias significativas en la respuesta de liberación de dopamina en el estriado dorsal, ni en la respuesta de liberación de GABA en el globo pálido por el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212, 24 horas tras el cese de su administración.

Aunque los resultados mostrados en este estudio no muestran la aparición de cambios en la liberación de dopamina en condiciones basales en el estriado dorsal tras la desensibilización del sistema cannabinoide endógeno, otros estudios realizados sobre el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide Δ^9 THC han mostrado producir un incremento significativo en las concentraciones de dopamina en el estriado dorsal (Jentsch et al., 1998).

De acuerdo con los resultados obtenidos la administración de quinpirole, al igual que en otros estudios (Szabo et al., 1999; Starke et al., 1989), ha producido un descenso en los niveles de liberación de dopamina en el estriado dorsal tanto en el grupo de tratamiento crónico vehículo como en el del tratamiento con el cannabinoide WIN55212. Así de acuerdo con los efectos bifásicos sobre la neurotransmisión dopaminérgica del agonista D2 quinpirole, se habrían observando únicamente los efectos en el descenso de la liberación de dopamina por la activación de los autoreceptores D2 presinápticos (Picetti et al., 1997). El tratamiento crónico con WIN55212 no mostró producir alteraciones en la respuesta de descenso de la liberación presináptica de dopamina en el estriado dorsal por la administración de quinpirole. Sin embargo, el registro de la actividad postsináptica nos hubiera ofrecido una posible prueba de la alteración en la activación dopaminérgica por la desensibilización del sistema cannabinoide endógeno, completando de este modo los resultados obtenidos sobre la potenciación del aumento de las conductas motoras.

Sin embargo, los niveles basales de la liberación de GABA en el globo pálido mostraron diferencias significativas por el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212, mostrando un incremento en sus niveles en condiciones basales, 24 horas tras el cese de la administración cannabinoide, respecto a la administración crónica de vehículo.

La administración del agonista dopaminérgico quinpirole produjo un descenso en los niveles de la liberación de GABA en el globo pálido, tanto en el grupo de tratamiento vehículo como en el del tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212. El mecanismo por el que se observa esta reducción en los niveles de GABA en el globo pálido se debe a las interacciones establecidas entre ambos sistemas, de modo que la activación dopaminérgica por la administración del agonista quinpirole produciría una estimulación de los receptores D2 situados en las terminales estriatopálidas, que actuarían en la presinapsis reduciendo la liberación de GABA en el globo pálido (Cooper y Stanford, 2001; Querejeta et al., 2001).

Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en los animales tratados crónicamente con el agonista cannabinoide WIN55212 en la respuesta de descenso de la liberación de GABA en el globo pálido por la administración de quinpirole.

Las únicas diferencias encontradas en este estudio por el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212, 24 horas tras el cese de su administración, se han producido en los niveles basales de la liberación de GABA en el globo pálido, donde se ha mostrado un incremento en sus concentraciones. Este resultado no parece estar de acuerdo con hallazgos anteriores sobre los efectos producidos sobre la neurotransmisión GABAérgica tras la activación del sistema cannabinoide endógeno, en los que se muestra un incremento en los niveles de la liberación de GABA en globo pálido (Maneuf et al., 1996a,b). Sin embargo, estudios recientes aún no publicados del grupo de Larry Parsons, Dept. Neurofarmacología del Scripps Research Institute, han mostrado que la administración de una dosis aguda de 5 mg/kg del agonista cannabinoide WIN55212-2 produce un descenso significativo en los niveles basales de la liberación de GABA en el globo pálido ventral.

Esta modulación en los niveles de GABA en el globo pálido por la administración de agonistas cannabinoides estaría inducido por la activación de los receptores cannabinoides CB1 presentes en las terminales presinápticas GABA estriatopalidales (Glass et al., 1997). El mecanismo por el que la activación del receptor cannabinoide CB1 produciría un inhibición de la liberación de GABA se explicaría ya que el sistema cannabinoide endógeno actuaría como señal retrógrada inhibitoria de la liberación de la neurotransmisión (Shlicker y Kathmann, 2001).

Estudios recientes sobre otras áreas del cerebro han mostrado que la activación del sistema cannabinoide endógeno produciría principalmente un inhibición en la liberación de GABA, este efecto ha sido mostrado en diversas áreas como las terminales estriatonigrales (Wallmichrath y Szabo, 2002a,b), el estriado (Szabo et al., 1998), el núcleo accumbens (Hoffman y Lupica, 2001; Manzoni y Bockaert, 2001), el area tegmental ventral (Szabo et al., 2002), el cerebelo (Takahashi y Linden, 2000) y en el cortex prefrontal (Ferraro et al., 2001; Pistis et al., 2002).

De acuerdo con los últimos hallazgos, si realmente el efecto de la activación de los receptores cannabinoides produjese un descenso en la liberación de GABA en el globo pálido, la desensibilización del sistema cannabinoide endógeno que implicaría la inhibición de la presencia del receptor cannabinoide CB1 en la terminales presinápticas estriatopalidales, así como un descenso en la actividad de sus ligandos endógenos anadamida y 2-araquidonil glicerol en el globo pálido (Di Marzo et al., 2000a) explicaría el aumento observado en la

liberación de GABA en el globo pálido en condiciones basales en los animales expuestos crónicamente a la administración del agonista cannabinoide WIN55212.

VI - CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento crónico en el periodo perinatal con el agonista cannabinoide Δ^9 THC ha mostrado producir modificaciones en la ontogénesis de los comportamientos motores en los grupos de animales de ambos sexos, induciendo un incremento en la conducta de inmovilidad y un descenso en la conducta de locomoción en condiciones basales durante el periodo adulto.

2. Las alteraciones en los niveles de la hormona corticosterona en el periodo adulto en condiciones basales, revela los cambios sexualmente dimórficos producidos por la exposición crónica a Δ^9 THC en el periodo perinatal sobre la actividad del eje HPA. De este modo se mientras que los animamales macho mostraron un incremento tanto en los niveles de la hormona costicosterona como en ACTH, los animales hembra mostraron un descenso.

3. La estimulación de los receptores dopaminérgicos D1/D2, mediante la administración aguda de los agonistas dopaminérgicos apomorfin y quinpirole, mostraron alteraciones en las respuestas comportamentales de inmovilidad y estereotipia en el periodo adulto en los animales tratados perinatalmente con Δ^9 THC. De este modo, la exposición perinatal a cannabinoides muestra modificaciones a largo plazo mostradas en el periodo adulto en el perfil de activación dopaminérgica tras la administración de agonistas de dopamina, produciéndose efectos más marcados en los animales macho y en concreto mostrándose una sensibilización de la respuesta comportamental a la estimulación de los receptores D2 presinápticos.

4. El tratamiento crónico con los agonistas cannabinoides, HU210 y WIN55212-2, en el periodo adulto ha producido cambios en las respuestas conductuales de inmovilidad y locomoción que revelan el desarrollo de tolerancia en estos animales a los fenómenos comportamentales producidos por los cannabinoides.

5. La estimulación de los receptores D2, mediante el agonista dopaminérgico quinpirole, mostró producir una sensibilización en la respuestas comportamentales de inmovilidad, locomoción y estereotipia, en los animales tratados crónicamente con cannabinoides durante el periodo adulto. Estas alteraciones comportamentales se caracterizaron por la alteración de la activación dopaminérgica postsináptica de los receptores dopaminérgicos D2.

6. El tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN55212-2, mostró producir alteraciones en los circuitos de neurotransmisión de los ganglios basales, produciendo un incremento en los niveles basales de la liberación del neurotransmisor GABA en el globo pálido. La desensibilización producida en el sistema cannabinoide endógeno en los ganglios basales, tras el tratamiento crónico con agonistas cannabinoides, modificaría por tanto la respuesta de liberación de GABA.

VII - BIBLIOGRAFÍA

- Abood, M.E., Martin, B.R. (1992). Neurobiology of marijuana abuse. *Trends in Neuroscience*. 13, 201-6.
- Aceto, M.D. (1990). Assessment of physical dependence techniques for the evaluation of abused drugs. En Adler, M.W., Cowan, A. (Eds.). *Modern Methods in Pharmacology: Testing and Evaluation of Drugs of Abuse*. Wiley-Liss, New York, NY, 76-79.
- Aceto, M.D., Scates, S.M., Lowe, J.A., Martin, B.R. (1996). Dependence on delta 9-tetrahydrocannabinol: studies on precipitated and abrupt withdrawal. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 278, 1290-5.
- Aceto, M.D., Scates, S.M., Martin, B.R. (2001). Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55212-2. *European Journal of Pharmacology*. 23, 416, 75-81.
- Aceto, M.D., Scates, S.M., Lowe, J.A., Martin B.R. (1995). Cannabinoid precipitated withdrawal by the selective cannabinoid receptor antagonist, SR141716A. *European Journal of Pharmacology*. 282, R1-R2.
- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B. (1995). The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends in Neuroscience*. 18, 63-4.
- Aldridge, J.W., Berridge, K.C. (1998). Coding of serial order by neostriatal neurons: a "natural action" approach to movement sequence. *Journal of Neuroscience*. 18, 2777-87.
- Alexander, G.E., Crutcher, M.D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neuronal substrates of parallel processing. *Trends in Neuroscience*. 13, 266-271.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*. 58, 315-348.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Huffman, J.W., Layward, L. (2000). Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*. 404, 84-7.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Makriyannis, A., Khanolkar, A., Layward, L., Fezza, F., Bisogno, T., Di Marzo, V. (2001). Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB Journal*. 15, 300-2.
- Bass, C.E., Martin, B.R. (2000). Time course for the induction and maintenance of tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Drug and Alcohol Dependence*. 60, 113-9.
- Beltramo, M., Piomelli, D. (2000). Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylethanolamide. *Neuroreport*. 11, 1231-5.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. 277, 1094-7.
- Beltramo, M., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Calignano, A., Gorriti, M.A., Grammatikopoulos, G., Sadile, A.G., Giuffrida, A., Piomelli, D. (2000). Reversal of dopamine D₂ receptor responses by anandamide transport inhibitor. *Journal of Neuroscience*. 20, 3401-3407.

- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. 277, 1094-7.
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J.A., Di Marzo, V., Fernández-Ruiz, J.J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse*. 33, 181-91.
- Berry, E.M., Mechoulam, R. (2002). Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacology and Therapeutics*. 95, 185-90.
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., Di Marzo, V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 256, 377-80.
- Bisogno, T., Sepe, N., Melck, D., Maurelli, S., De Petrocellis, L., Di Marzo, V. (1997). Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochemical Journal*. 322, 671-7.
- Boger, D.L., Sato, H., Lerner, A.E., Hedrick, M.P., Fecik, R.A., Miyauchi, H., Wilkie, G.D., Austin, B.J., Patricelli, M.P., Cravatt, B.F. (2000). Exceptionally potent inhibitors of fatty acid amide hydrolase: the enzyme responsible for degradation of endogenous oleamide and anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 97, 5044-9.
- Bonnin, A., De Miguel, R., Rodríguez Manzanique, J.C., Fernández-Ruiz, J.J., Santos, A., Ramos, J.A. (1994). Changes in tyrosine hydroxylase gene expression in mesencephalic catecholaminergic neurons of immature and adult male rats perinatally exposed to cannabinoids. *Developmental Brain Research*. 81, 147-153.
- Bonnin, A., De Miguel, R., Hernández, M.L., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1995). The prenatal exposure to δ^9 -tetrahydrocannabinol affects gene expression and the activity of tyrosine hydroxylase during early brain development. *Life Sciences*. 56, 2177-2184.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., LeFur, G., Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochemistry Journal*. 312, 637-41.
- Breivogel, C.S., Scates, S.M., Beletskaya, I.O., Lowery, O.B., Aceto, M.D., Martin, B.R. (2003). The effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol physical dependence on brain cannabinoid receptors. *European Journal of Pharmacology*. 459, 139-50.
- Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Vogt, L.J., Sim-Selley, L.J. (1999). Chronic Delta (9)-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 73, 2447-2459.
- Breivogel, C.S., Sim, L.J., Childers, S.R. (1997). Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 282, 1632-42.
- Brotchie, J.M. (1998). Adjuncts to dopamine replacement: a pragmatic approach to reducing the problem of dyskinesia in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 13, 871-6.

- Cadas, H., Di Tomaso, E., Piomelli, D. (1997). Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *Journal of Neuroscience*. 17, 1226-42.
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venarce, L., Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *Journal of Neuroscience*. 16, 3934.
- Cadogan, A.K., Alexander, S.P.H., Boyd, E.A., Kendall, D.A. (1997). Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *Journal of Neurochemistry*. 69, 1131-1137.
- Calignano, A., La Rana, G., Makriyannis, A., Lin, S.Y., Beltramo, M., Piomelli, D. (1997). Inhibition of intestinal motility by anandamide, an endogenous cannabinoid. *European Journal of Pharmacology*. 340, R7-8.
- Cheer, J.F., Kendall, D.A., Marsden, C.A. (2000). Cannabinoid receptors and reward in the rat: a conditioned place preference study. *Psychopharmacology*. 151, 25-30.
- Chen, J., Marmur, R., Pulles, A., Paredes, W., Gardner, E.L. (1993). Ventral tegmental microinjections of Δ^9 -tetrahydrocannabinol enhances ventral tegmental somatodendritic dopamine levels but not forebrain dopamine levels: Evidence for local neural action by marijuana's psychoactive ingredient. *Brain Research*. 621, 65-70.
- Chen, J., Paredes, W., Li, J., Smith, D., Lowinson, J., Gardner, E.L. (1990). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockade enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology*. 102, 156-162.
- Chevalyere, V., Castillo, P.E. (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron*. 38, 461-72.
- Childers, S.R., Deadwyler, S.A. (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*. 27, 819-27.
- Compton, D.R., Johnson, M.R., Meloin, L.S., Martin, B.R. (1991). Pharmacological evaluation of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 260, 201-209.
- Consroe, P. (1998). Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders. *Neurobiology of Disease*. 5, 534-51.
- Cook, S.A., Welch, S.P., Litchman, A.H., Martin B.R. (1995). Evaluation of cAMP involvement in cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sciences*. 56, 2049-2056.
- Cooper, A.J., Stanford, I.M. (2001). Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs in vitro. *Neuropharmacology*. 41, 62-71.
- Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., Lichtman, A.H. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 98, 9371-6.

- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Learner, R.A., Gilula, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 384, 83-7.
- Crawley, J.N., Corwin, R.L., Robinson, J.K., Felder, C.C., Devane, W.A., Axelrod, J. (1993). Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 46, 967-72.
- Crowley, T.J., Macdonald, M.J., Whitmore, E.A., Mikulich, S.K. (1998). Cannabis dependence, withdrawal, and reinforcing effects among adolescents with conduct symptoms and substance use disorders. *Drug and Alcohol Dependence*. 50, 27-37.
- Dalterio, S., Bartke, A. (1979). Perinatal exposure to cannabinoids alters male reproductive function in mice. *Science*. 205, 1420-1422.
- Day, N.L., Richardson, G.A., Goldschmidt, L., Robles, N., Taylor, P.M., Stoffer, D.S., Cornelius, M.D. (1994a). Effect of prenatal marijuana exposure on the cognitive development of offspring at age three. *Neurotoxicology and Teratology*. 16, 169-175.
- Day, N.L., Richardson, G.A., Geva, D., Robles, N. (1994b). Alcohol, Marijuana, and Tobacco: Effects of prenatal exposure on offspring growth and morphology at age six. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 18, 4.
- De Lago, E., Fernández-Ruiz, J., Ortega-Gutiérrez, S., Viso, A., López-Rodríguez, M.L., Ramos, J.A. (2002). UCM707, a potent and selective inhibitor of endocannabinoid uptake, potentiates hypokinetic and antinociceptive effects of anandamide. *European Journal of Pharmacology*. 449, 99-103.
- Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Mu, J., Whyte, A., Childers, S.R. (1995). Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 273, 734-43.
- Del Arco, I., Muñoz, R., Rodríguez de Fonseca, F., Escuredo, L., Martín-Calderon, J.L., Navarro, M., Villanúa, M.A. (2000). Maternal exposure to the synthetic cannabinoid HU-210: effects on the endocrine and immune systems of the adult male offspring. *Neuroimmunomodulation*. 7, 16-26.
- Demiére, J.M., Piazza, P.V., Guegan, G., Abrous, N., Maccari, S., Le Moal, M., Simon, H. (1992). Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self-administration in adult offspring of stressed mothers. *Brain Research*. 586, 135-139.
- Deroche, V., Marinelli, M., Maccari, S., Le-Moal, M., Simon, H., Piazza, P.V. (1995). Stress-induced sensitization and glucocorticoids. I. Sensitization of dopamine-dependent locomotor effects of amphetamine and morphine depends on stress-induced corticosterone secretion. *Journal of Neuroscience*. 15, 7181-8100.
- Desarnaud, F., Cadas, H., Piomelli, D. (1995). Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 6030-5.
- Deutsch, D.G., Goligorsky, M.S., Schmid, P.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H.O., Das, S.K., Dey, S.K., Arreaza, G., Thorup, C., Stefano, G.B., Moore, L.C. (1997). Production and

- physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *Journal of Clinical Investigation*. 100, 1538-46.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*. 34, 605-613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, R.G., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, L.A., Ettinger, A., Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258, 1946-1949.
- Dewey, W.L. (1986). Cannabinoid Pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 38, 151-178.
- Dewey, W.L., Peng, T.C., Harris, L.S. (1970). The effect of 1-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the hypothalamo-hypophyseal-adrenal axis of rats. *European Journal of Pharmacology*. 12, 382-384.
- Di Chiara, G., Imperato, A. (1988). Drug abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 85, 5274-5278.
- Di Marzo, V., Berrendero, F., Bisogno, T., Gonzalez, S., Cavaliere, P., Romero, J., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (2000a). Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Journal of Neurochemistry*. 74, 1627-35.
- Di Marzo, V., Hill, M.P., Bisogno, T., Crossman, A.R., Brotchie, J.M. (2000b). Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB Journal*. 14, 1432-8.
- Di Marzo, V., Deutsch, D. (1998). Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiology of Disease*. 5, 386-404.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 372, 686-91.
- Di S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K.C., Tasker, J.G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *Journal of Neuroscience*. 23, 4850-7.
- Diana, M.A., Levenes, C., Mackie, K., Marty, A. (2002). Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids. *Journal of Neuroscience*. 22, 200-8.
- Eilam, D., Szechtman, H. (1989). Biphasic effect of D2 agonist quinpirole on locomotion and movements. *European Journal of Pharmacology*. 161, 151-157.
- Fan, P. (1995). Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT₃ receptors in rat nodose ganglion neurons. *Journal of Neurophysiology*. 73, 907-910.
- Felder, C.C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D.N., Richardson, J.M., Riggan, R.M., Koppel, G.A., Paul, S.M., Becker, G.W. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Letters*. 393, 231-5.

- Felder, C.C., Briley, E.M., Axelrod, J., Simpson, J.T., Mackie, K., Devane, W.A. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 90, 7656-60.
- Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, L.A., Mitchell, R.L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology.* 48, 443-450.
- Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Glass, M., Mackie, K.P., Fahey, K.J., Cullinan, G.J., Hunden, D.C., Johnson, D.W., Chaney, M.O., Koppel, G.A., Brownstein, M. (1998). LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 284, 291-7.
- Fernández-Ruiz, J.J., Muñoz, R.M., Romero, J., Villanúa, M.A., Makriyannis, A., Ramos, J.A. (1997). Time course of the effects of different cannabimimetics on prolactin and gonadotrophin secretion: evidence for the presence of CB-1 receptors in hypothalamic structures and their involvement in the effect of cannabimimetics. *Biochemical Pharmacology.* 53, 1919-1927.
- Fernández-Ruiz, J.J., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Ramos J.A. (1992). Maternal cannabinoid exposure and brain development: changes in the ontogeny of dopaminergic neurons. En Bartke, A., Murphy, L.L. (Eds.) *Neurobiology and neurophysiology of cannabinoids: Biochemistry and physiology of substance abuse.* Boca Raton, Florida, USA: CRC Press. IV, 119-164.
- Fernández-Ruiz, J.J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., Gonzalez, S., Ramos, J.A. (2002). Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 66, 257-67.
- Fernández-Ruiz, J.J., Berrendero, F., Hernández, M.L., Ramos, J.A. (2000). The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends in Neuroscience.* 23, 14-20.
- Fernández-Ruiz, J.J., Bonnín, A., Cebeira, M., Ramos, J.A. (1994). Ontogenic and adult changes in the activity of hypothalamic and extrahypothalamic dopaminergic neurons after perinatal cannabinoid exposure in rats. En Palomo, T., Archer, T. (Eds.), *Strategies for Studying Brain Disorders.* Farrand Press, 357-390.
- Ferraro, L., Tomasini, M.C., Cassano, T., Bebe, B.W., Siniscalchi, A., O'Connor, W.T., Magee, P., Tanganelli, S., Cuomo, V., Antonelli, T. (2001). Cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 inhibits rat cortical dialysate gamma-aminobutyric acid levels. *Journal of Neuroscience Research.* 66, 298-302.
- Fitton, A.G., Pertwee, R.G. (1982). Changes in body temperature and oxygen consumption rate of conscious mice produced by intrahypothalamic and intracerebroventricular injections of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Brain Journal of Pharmacology.* 75, 409-414.
- Foltin, R.W., Brady, J.V., Fishman, M.W. (1986). Behavioural analysis of marijuana effects on food intake in humans. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour.* 25, 577-582.
- French, E.D. (1997). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptor. *Neuroscience Letters.* 226, 159-162.

- Fride, E., Fook, A., Rosenberg, E., Faigenboim, M., Cohen, V., Barda, L., Blau, H., Mechoulam, R. (2003). Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB(1) receptor knockout mice: evidence for a "CB(3)" receptor. *European Journal of Pharmacology*. 461, 27-34.
- Fride, E., Mechoulam, R. (1993). Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *European Journal of Pharmacology*. 231, 313-4.
- Fride, E., Mechoulam, R. (1996a). Developmental aspects of anandamide: ontogeny of response and prenatal exposure. *Psychoneuroendocrinology*. 21, 157-172.
- Fride, E., Mechoulam, R. (1996b). Ontogenetic development of the response to anandamide and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in mice. *Developmental Brain Research*. 95, 131-134.
- Fried, P.A., Smith, A.M. (2001). A literature review of the consequences of prenatal marijuana exposure. An emerging theme of a deficiency in aspects of executive function. *Neurotoxicology and Teratology*. 23, 1-11.
- Fried, P.A. (2002a). Adolescents prenatally exposed to marijuana: examination of facets of complex behaviors and comparisons with the influence of in utero cigarettes. *Journal of Clinical Pharmacology*. 42, 97-102.
- Fried, P.A. (2002b). Conceptual issues in behavioral teratology and their application in determining long-term sequelae of prenatal marijuana exposure. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 43, 81-102.
- Fried, P.A. (1995). Prenatal exposure to marijuana and tobacco during infancy, early and middle childhood: effects and an attempt at synthesis. *Archives of Toxicology Supplement*. 17, 233-60
- Fried, P.A. (1985). Postnatal consequences of maternal marijuana use. *NIDA Research Monograph*. 59, 61-72.
- Fried, P.A., Smith, A.M. (2001). A literature review of the consequences of prenatal marijuana exposure, an emerging theme of a deficiency in aspects of executive function. *Neurotoxicology and Teratology*. 23, 1-11.
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European Journal of Biochemistry*. 232, 54-61.
- Gamallo, A., Alario, P., Gonzalez-Abad, M.J., Villanúa, M.A. (1992). Acute noise stress, ACTH administration and blood pressure alteration. *Physiology Behavior*. 51, 1201-1205.
- Gaoni, Y., Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of American Chemical Society*. 86, 1646-47.
- García-Gil, L., De Miguel, R., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1996). Perinatal Delta-9-tetrahydrocannabinol exposure in rats modifies the responsiveness of midbrain dopaminergic neurons in adulthood to a variety of challenges with dopaminergic drugs. *Drug and Alcohol Dependence*. 42, 155-166.
- García-Gil, L., De Miguel, R., Romero, J., Perez, A., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1999a). Perinatal Delta-(9)-tetrahydrocannabinol exposure augmented the magnitude of motor inhibition caused by GABA(B), but not GABA(A), receptor agonists in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 21, 277-283.

- García-Gil, L., Romero, J., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1999b). Cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several brain regions of adult male and female rats perinatally exposed to Delta (9)-tetrahydrocannabinol. *Drug and Alcohol Dependence*. 55, 127-136.
- Gardner, E.L. (1992). Cannabinoid interaction with brain reward systems-The neurobiological basis of cannabinoid abuse. En Murphy, L., Bartke, A. (Eds.) *Marijuana and Cannabinoids, Neurobiology and Neurophysiology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 275-335.
- Gerard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochemistry Journal*. 279, 129-134.
- Gerdeman, G., Lovinger, D.M. (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *Journal of Neurophysiology*. 85, 468-471.
- Gessa, G.L., Mascia, M.S., Casu, M.A., Carta, G. (1997). Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *European Journal of Pharmacology*. 327, R1-2.
- Gifford, A.N., Ashby, C.R.J. (1996). Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by cannabinoid antagonist, SR 141716A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 277, 1431-1436.
- Gifford, A.N., Gardner, E.L., Ashby, C.R.J. (1997a). The effect of intravenous administration of delta-9-tetrahydrocannabinol on the activity of A10 dopamine neurons recorded in vivo in anesthetized rats. *Neuropsychobiology*. 36, 96-99.
- Gifford, A.N., Samiian, L., Gatley, S.J., Ashby, C.R.J. (1997b). Examination of the effect of the cannabinoid agonist, CP 55,940, on electrically evoked transmitter release from the rat brain slices. *European Journal of Pharmacology*. 324, 187-192.
- Giuffrida, A., Piomelli, D. (2000). The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control. *Chemistry and Physics of Lipids*. 108, 151-8.
- Giuffrida, A., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D. (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature Neuroscience*. 2, 358-363.
- Glass, M., Dragunow, M., Faull, R.L. (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience*. 97, 505-19.
- Glass, M. (2001). The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*. 25, 743-65.
- Glass, M., Brotchie, J.M., Maneuf, Y.P. (1997). Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. *European Journal of Neuroscience*. 9, 199-203.
- Glass, M., Felder, C.C. (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *Journal of Neuroscience*. 17, 5327-33.

- Gonzalez, S., Bisogno, T., Wenger, T., Manzanares, J., Milone, A., Berrendero F., Di Marzo, V., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (2000). Sex steroid influence on cannabinoid CB(1) receptor mRNA and endocannabinoid levels in the anterior pituitary gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 270, 260-6.
- Gorriti, M.A., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Palomo, T. (1999). Chronic (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats. *European Journal of Pharmacology*. 365, 133-142.
- Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W., Kimura, M. (1994). The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*. 265, 1826-31.
- Graybiel, A.M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in Neuroscience*. 13, 244-54.
- Gueudet, C., Santucci, VV., Rinaldi-Carmona, M., Soubrie, P., Le Fur, G. (1995). The CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A affects A9 dopamine neuronal activity in the rats. *Neuroreport*. 6, 1421-1425.
- Hampson, R.E., Evans, G.J., Mu, J., Zhuang, S.Y., King, V.C., Childers, S.R., Deadwyler, S.A. (1995). Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons. *Life Science*. 56, 2081-8.
- Hampson, R.E., Deadwyler, S. (1999). Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Science*. 65, 715-23.
- Hampson, R.E., Deadwyler, S. (1998). Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiology of Disease*. 5, 474-82.
- Haney, M., Hart, C.L., Ward, A.S., Foltin, R.W. (2003). Nefazodone decreases anxiety during marijuana withdrawal in humans. *Psychopharmacology*. 165, 157-65.
- Haney, M., Ward, A.S., Comer, S.D., Foltin, R.W., Fischman, M.W. (1999). Abstinence symptoms following smoked marijuana in humans. *Psychopharmacology*. 141, 395-404.
- 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. *Proceedings in National Academy of Science U.S.A.* 98, 3662-5.
- Hanus, L., Gopher, A., Almog, S., Mechoulam, R. (1993). Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 36, 3032-4.
- Harrington, D.L., Haaland, K.Y. (1991). Sequencing in Parkinson's disease. Abnormalities in programming and controlling movement. *Brain*. 114, 99-115.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., De Costa, B.R., Richfield, E.K. (1991b). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Research*. 547, 267-274.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., De Costa, B.R., Rice, K.C. (1991a). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*. 11, 563-583.

- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., De Costa, B.R., Rice, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in the brain. *Proceedings of National Academy of Science U.S.A.* 87, 1932-1936.
- Hernández, M., Berrendero, F., Suarez, I., García-Gil, L., Cebeira, M., Mackie, K., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J. (2000). Cannabinoid CB(1) receptors colocalize with tyrosine hydroxylase in cultured fetal mesencephalic neurons and their activation increases the levels of this enzyme. *Brain Research.* 28, 56-65.
- Heyser, C.J., Hampson, R.E., Deadwyler, S.A. (1993). Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: Alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 264, 294-307.
- Ho, B.Y., Stadnicka, A., Prather, P.L., Buckley, A.R., Current, L.L., Bosnjak, Z.J., Kwok, W.M. (2000). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of prolactin release and signaling mechanisms in GH4C1 cells. *Endocrinology.* 141, 1675-85.
- Hoffman, A.F., Lupica, C.R. (2000). Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *Journal of Neuroscience.* 20, 2470-9.
- Hohmann, A.G., Herkenham, M. (2000). Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse.* 37, 71-80.
- Houser, S.J., Eads, M., Embrey, J.P., Welch, S.P. (2000). Dynorphin B and spinal analgesia: induction of antinociception by the cannabinoids CP55,940, Delta(9)-THC and anandamide. *Brain Research.* 857, 337-42.
- Howlett, A.C. (1995). Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 35, 607-634.
- Howlett, A.C. (1998). The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiology of Disease.* 5, 405-16.
- Howlett, A.C., Johnson, M.R., Melvia, L.S., Milhe, G.M. (1988). Nonclassical cannabinoid analgesic inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Molecular Pharmacology.* 33, 297-302.
- Howlett, A.C., Qualy, J.M., Khachatrian, L.L. (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Molecular Pharmacology.* 29, 307-13.
- Huang, C.C., Lo, S.W., Hsu, K.S. (2001). Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *Journal of Physiology.* 532, 731-48.
- Hutcheson, D.M., Tzavara, E.T., Smadja, C., Valjent, E., Roques, B.P., Hanoune, J., Maldonado, R. (1998). Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *British Journal of Pharmacology.* 125, 1567-77.
- Hutchings, D.E., Martin, B.R., Gamagaris, Z., Miller, N., Fico, T. (1989). Plasma concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. *Life Science.* 44, 697-701.

- Jackson, A.L., Murphy, L.L. (1997). Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the suppression of luteinizing hormone release by delta-9-tetrahydrocannabinol. *Neuroendocrinology*. 65, 446-452.
- Jakubovic, A., Hattori, T., Mc Geer, P.L. (1977). Radioactivity in suckled rats after giving ¹⁴C-tetrahydrocannabinol to the mother. *European Journal Pharmacology*. 22, 221-223.
- Jentsch, J.D., Verrico, C.D., Le, D., Roth, R.H. (1998). Repeated exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol reduces prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Neuroscience Letters*. 246, 169-72.
- Jentsch, J.D., Andrusiak, E., Tran, A., Bowers, B.M.J., Roth, R.H. (1997). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol increases prefrontal cortical catecholaminergic utilization and impairs spatial working memory in the rat: Blockade of dopaminergic effects with HA966. *Neuropsychopharmacology*. 16, 426-432.
- Julian, M.D., Martin, A.B., Cuellar, B., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Moratalla, R., García-Segura, L.M. (2003). Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience*. 119, 309-18.
- Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valino, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia G, La Rana, G., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V., Piomelli, D. (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nature Medicine*. 9, 76-81.
- Kimura, M. (1995). Role of basal ganglia in behavioral learning. *Neuroscience Research*. 22, 353-8.
- Kittler, J.T., Grigorenko, E.V., Clayton, C., Zhuang, S.Y., Bunday, S.C., Trower, M.M., Wallace, D., Hampson, R., Deadwyler, S. (2000). Large-scale analysis of gene expression changes during acute and chronic exposure to [Delta]9-THC in rats. *Physiological Genomics*. 3, 175-85.
- Klein, T.W., Newton, C.A., Friedman, H. (2001). Cannabinoids and the immune system. *Pain Research Management*. 6, 95-101.
- Klein, T.W., Friedman, H., Specter, S. (1998). Marijuana, immunity and infection. *Journal Neuroimmunology*. 83, 102-15.
- Knowlton, B.J., Mangels, J.A., Squire, L.R. (1996). A neostriatal habit learning system in humans. *Science*. 273, 1399-402.
- Koch, J.E. (2001). Delta(9)-THC stimulates food intake in Lewis rats: effects on chow, high-fat and sweet high-fat diets. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 68, 539-43.
- Kouri, E.M., Pope, H.G., Lukas, S.E. (1999). Changes in aggressive behavior during withdrawal from long-term marijuana use. *Psychopharmacology*. 143, 302-8.
- Kouri, E.M., Pope, H.G. (2000). Abstinence symptoms during withdrawal from chronic marijuana use. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*. 8, 483-92.
- Lamarque, S., Taghzouti, K., Simon, H. (2001). Chronic treatment with Delta(9)-tetrahydrocannabinol enhances the locomotor response to amphetamine and heroin. Implications for vulnerability to drug addiction. *Neuropharmacology*. 41, 118-29.

- Lan, R., Gatley, J., Lu, Q., Fan, P., Fernando, S.R., Volkow, N.D., Pertwee, R., Makriyannis, A. (1999). Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci.* 1, E4
- Lastres-Becker, I., De Miguel, R., De Petrocellis, L., Makriyannis, A., Di Marzo, V., Fernández-Ruiz, J. (2003). Compounds acting at the endocannabinoid and/or endovanilloid systems reduce hyperkinesia in a rat model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry.* 84, 1097-109.
- Lastres-Becker, I., Fezza, F., Cebeira, M., Bisogno, T., Ramos, J.A., Milone, A., Fernández-Ruiz, J., Di Marzo, V. (2001). Changes in endocannabinoid transmission in the basal ganglia in a rat model of Huntington's disease. *Neuroreport.* 12, 2125-9.
- Lastres-Becker, I., Hansen, H.H., Berrendero, F., De Miguel, R., Perez-Rosado, A., Manzanares, J., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J. (2002). Alleviation of motor hyperactivity and neurochemical deficits by endocannabinoid uptake inhibition in a rat model of Huntington's disease. *Synapse.* 44, 23-35.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Böhme, G.A., Imperato, A., Pedrazini, T., Roques, B.P., Vassart, G., Fratta, W., Parmentier, M. (1999). Unresponsiveness to cannabinoid and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science.* 283, 401-404.
- Leung, D., Hardouin, C., Boger, D.L., Cravatt, B.F. (2003). Discovering potent and selective reversible inhibitors of enzymes in complex proteomes. *Nature Biotechnology.* 21, 687-91.
- Levenes, C., Daniel, H., Soubrie, P., Crepel, F. (1998). Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *Journal of Physiology.* 510, 867-879.
- Levitt, P. (1998). Prenatal effects of drug abuse on brain development. *Drug and Alcohol Dependence.* 51, 109-125.
- Leweke, F.M., Giuffrida, A., Wurster, U., Emrich, H.M., Piomelli, D. (1999). Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport.* 10, 1665-9.
- Lichtman, A.H., Cook, S.A., Martin, B.R. (1996). Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: Evidence supporting periaqueductal gray involvement. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 276, 585-593.
- Linszen, D.H., Dingemans, P.M., Lenior, M.E. (1994). Cannabis abuse and the course of recent-onset schizophrenic disorders. *Archives of General Psychiatry.* 51, 273-9.
- Litchman, A.H., Martin, B.R. (1991a). Cannabinoid induced antinociception is mediated by a spinal α_2 -noradrenergic mechanism. *Brain Research.* 559, 309-314.
- Litchman, A.H., Martin B.R. (1991b). Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 258, 517-523.
- London, S.W., McCarthy, L.E., Borison, H.L. (1979). Suppression of cancer chemotherapy-induced vomiting in the cat by nabilone, a synthetic cannabinoid. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 160, 437-440.

- Mackie, K., Devane, W.A., Hille, B. (1993). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Molecular Pharmacology*. 44, 498-503.
- Mackie, K., Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*. 89, 3825-3829.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *Journal of Neuroscience*. 15, 6552-61.
- Mailleux, P., Vanderhaeghen, J.J. (1992). Distribution of neural cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding autoradiography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*. 48, 655-668.
- Mailleux, P., Vanderhaeghen, J.J. (1993). Dopaminergic regulation of cannabinoid receptor mRNA levels in the rat caudate-putamen: an in situ hybridization study. *Journal of Neurochemistry*. 61, 1705-1712.
- Maldonado, R., Rodríguez de Fonseca, F. (2002). Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *Journal of Neuroscience*. 22, 3326-31
- Mallet, P.E., Beninger, R.J. (1998). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by delta9-tetrahydrocannabinol or anandamide. *Psychopharmacology*. 140, 11-9.
- Maneuf, Y.P., Crossman, A.R., Brotchie, J.M. (1997). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 reduces D2, but not D1, dopamine receptor-mediated alleviation of akinesia in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 148, 265-70
- Maneuf, Y.P., Crossman, A.R., Brotchie, J.M. (1996a). Modulation of GABAergic transmission in globus pallidus by the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. *Synapse*. 22, 382-385.
- Maneuf, Y.P., Nash, J.E., Crossman, A.R., Brotchie, J.M. (1996b). Activation of the cannabinoid receptor by Δ^9 -tetrahydrocannabinol reduces γ -aminobutyric acid uptake in the globus pallidus. *European Journal of Pharmacology*. 308, 161-164.
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J.H., Zhou, Q., Civelli, O., Akil, H., Watson, S.J. (1992). A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience*. 46, 959-71.
- Manzoni, O.J., Bockaert, J. (2001). Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *European Journal of Pharmacology*. 412, R3-5.
- Marinelli, M., Piazza, P.V. (2002). Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *European Journal of Neuroscience*. 16, 387-94.
- Martin, W.J., Hohmann, A.G., Walker, J.M. (1996). Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: Correlation between electrophysiological and antinociceptive effects. *Journal of Neuroscience*. 16, 6601-6611.

- Martin, W.J., Lsi, N.K., Patrick, S.L., Tsou, K., Walker, J.M. (1993). Antinociceptive actions of cannabinoids following intraventricular administration in rats. *Brain Research*. 629, 300-304.
- Martin, W.J., Patrick, L.S., Coffin, P.O., Tsou, K., Walker, J.M. (1995). An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Science*. 56, 2103-2109.
- Matsuda, L.A., Bonner, T.I., Lolait, S.J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *Journal of Comparative Neurology*. 327, 535-550.
- 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, 561-564.
- Mattes, R.D., Engelman, K., Shaw, L.M., Elsohly, M.A. (1994). Cannabinoids and appetitive stimulation. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 49, 187-195.
- McCormick, C.M., Smythe, J.W., Sharma, S., Meaney, M. (1995). Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Research*. 84, 55-61.
- Mechoulam, R. (1986). The pharmacohistory of *Cannabis sativa*. En: Mechoulam, R. (Ed.). *Cannabinoids as Therapeutic Agents*. Boca-Raton, Florida, USA, CRC Press.
- 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., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*. 50, 83-90.
- Mechoulam, R., Lander, N., Srebnik, M., Brener, A., Segal, M., Feigenbaum, J.J., Jarbe, T.U.C., Consroe, P. (1987). Structure-activity relationships of the cannabinoids. En Rapaka, R.S., Makriyannis, A. (Eds.). *NIDA research monograph 79*. Rockville, MD, 15.
- Mereu, G., Fa, M., Ferraro, L., Cagianò, R., Antonelli, T., Tattoli, M., Ghiglieri, V., Tanganelli, S., Gessa, G.L., Cuomo, V. (2003). Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 100, 4915-20.
- Meschler, J.P., Howlett, A.C. (2001). Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology*. 40, 918-26.
- Meschler, J.P., Clarkson, F.A., Mathews, P.J., Howlett, A.C., Madras, B.K. (2000). D₂, but not D₁ dopamine receptor agonists potentiate cannabinoid induced sedation in nonhuman primates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 292, 952-959.
- Miller, A.S., Walker, J.M. (1998). Local effects of cannabinoids on spontaneous activity and evoked inhibition in the globus pallidus. *European Journal of Pharmacology*. 352, 199-205.
- Miller, A.S., Walker, J.M. (1995). Effects of a cannabinoid on spontaneous and evoked neural activity in the substantia nigra pars reticulata. *European Journal Pharmacology*. 279, 179-185.

- Miller, A.S., Walker, J.M. (1996). Electrophysiological effects of a cannabinoid on neural activity in the globus pallidus. *European Journal Pharmacology*. 304, 29-35.
- Muller-Vahl, K.R., Schneider, U., Prevedel, H., Theloe, K., Kolbe, H., Daldrup, T., Emrich, H.M. (2003). Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) is effective in the treatment of tics in Tourette syndrome: a 6-week randomized trial. *Journal of Clinical Psychiatry*. 64, 459-65.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365, 61-5.
- Murphy, L.L., Gher, J., Szary, A. (1995). Effects of prenatal exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol on reproductive, endocrine, and immune parameters of the male and the female rat offspring. *Endocrine*. 3, 875-881.
- Murphy, L.L., Muñoz, R.M., Adrian, B.A., Villanúa, M.A. (1998). Function of cannabinoid receptors in the neuroendocrine regulation of hormone secretion. *Neurobiology of Disease*. 5/6, 432-446.
- Murphy, L.L., Rodríguez de Fonseca, F., Steger, R.W. (1991). Delta-9-tetrahydrocannabinol antagonism of the anterior pituitary response to estradiol in immature female rats. *Steroids*. 56, 97-102.
- Murphy, L.L., Statham, B.C. (1996). The role of cannabinoid receptors in the luteinizing hormone (LH) and adrenocorticotropin (ACTH) response to cannabinoids. *Society for Neuroscience Abstracts*. 22, 1344.
- Murphy, L.L., Steger, R.W., Bartke, A. (1990a). Psychoactive and non psychoactive cannabinoids and their effects on reproductive neuroendocrine parameters. En Watson, R.R. (Ed). *Biochemistry and Physiology of Substance Abuse*. CRC Boca Raton, Fl., 73-93.
- Murphy, L.L., Steger, R.W., Smith, M.S., Bartke, A. (1990b). Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol, alone and in combinations, in luteinizing hormone and prolactin release and on hypothalamic neurotransmitters in the male rat. *Neuroendocrinology*. 52, 316-321.
- Muschamp, J.W., Sivi, S.M. (2002). Behavioral sensitization to amphetamine follows chronic administration of the CB1 agonist WIN 55,212-2 in Lewis rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 73, 835-42
- Nahas, G.G. (1984). *Toxicology and pharmacology. Marijuana in Science and Medicine*. Raven Press, New York, 102-247.
- Nakatsuka, T., Chen, H.X., Roper, S.N., Gu, J.G. (2003). Cannabinoid receptor-1 activation suppresses inhibitory synaptic activity in human dentate gyrus. *Neuropharmacology*. 45, 116-21.
- Navarro, M., Chowen, J., Rocio, A. Carrera, M., Del Arco, I., Villanúa, M.A., Martin, Y., Roberts, J.A., Koob, G.F., de Fonseca, F.R. (1998). CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport*. 9, 3397-402.
- Navarro, M., De Miguel, R., Rodríguez de Fonseca, F., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1996). Perinatal cannabinoid exposure modifies sociosexual approach behavior and the mesolimbic dopaminergic activity of adult male rats. *Behavioral Brain Research*. 75, 91-98.

- Navarro, M., Fernández-Ruiz, J.J., De Miguel, R., Hernández, M.L., Cebeira, M., Ramos J.A. (1993a). An acute dose of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol affects behavioral and neurochemical indices of mesolimbic dopaminergic activity. *Behavioral Brain Research*. 5, 37-46.
- Navarro, M., Fernández-Ruiz, J.J., De Miguel, R., Hernández, M.L., Cebeira, M., Ramos J.A. (1993b). Motor disturbances induced by an acute dose of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol: possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 45, 291-298.
- Navarro, M., Hernández, E., Muñoz, R.M., Del Arco, I., Villanúa, M.A., Carrera, M.R.A., Rodríguez de Fonseca, F. (1997). Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport*. 8, 491-6.
- Navarro, M., Rodríguez de Fonseca, F., Hernández, M.L., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1994a). Motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity in adult rats perinatally exposed to cannabinoids. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 47, 47-58.
- Navarro, M., Rodríguez de Fonseca, F. (1998b). Early Cannabinoid exposure as a source of vulnerability to opiate addiction. *The Spanish Journal of Psychology*. 1, 39-58.
- Navarro, M., Rubio, P., Rodríguez de Fonseca, F. (1994b). Sex-Dimorphic psychomotor activation after perinatal exposure to Delta-9-hydrocannabinol. An ontogenic study in wistar rats. *Psychopharmacology*. 116, 414-422.
- Navarro, M., Rubio, P., Rodríguez de Fonseca, F. (1995). Behavioral consequences of maternal exposure to natural cannabinoids in rats. *Psychopharmacology*. 122, 1-14.
- Nelson, R. (1996). Conducta reproductora femenina. En Nelson, R. (Ed). *Psicoendocrinología: las bases hormonales de la conducta*. Ariel, 278-343.
- O'Connell, C.M., Fried, P.A. (1991). Prenatal exposure to cannabis: a preliminary report of postnatal consequences in school-age children. *Neurotoxicology and Teratology*. 13, 631-9.
- Ovadia, H., Wohlman, A., Mechoulam, R., Weidenfeld, J. (1995). Characterization of the hypothermic effect of the synthetic cannabinoid HU-210 in the rat: Relation to the adrenergic system and endogenous pyrogens. *Neuropharmacology*. 34, 175-180.
- Parent, A., Hazrati, L.N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Research Reviews*. 20, 128-54.
- Perron, R.R., Tyson, R.L., Sutherland, G.R. (2001). Delta9 -tetrahydrocannabinol increases brain temperature and inverts circadian rhythms. *Neuroreport*. 12, 3791-4.
- Pertwee, R.G., Ross, R.A. (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 66, 101-21.
- Pertwee, R.G., Ross, T.M. (1991). Drugs which stimulate or facilitate central cholinergic transmission interact synergistically with delta-9-tetrahydrocannabinol to produce marked catalepsy in mice. *Neuropharmacology*. 30, 67-71.
- Pertwee, R.G. (1992). In vivo interactions between psychotropic cannabinoids and other drugs involving central and peripheral neurochemical mediators. En Murphy, L., Bartke, A.

- (Ed). Marijuana/Cannabinoids. Neurobiology and Neurophysiology. CRC Press, Boca Raton, Fl. 165-218.
- Pertwee, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoids CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology and Therapeutics*. 74, 129-180.
- Pertwee, R.G. (2001). Cannabinoid receptors and pain. *Progress in Neurobiology*. 63, 569-611.
- Pertwee, R.G., Greentree, S.G., Swiff, P.A. (1988). Drugs which stimulate or facilitate central GABAergic transmission interact synergistically with Δ^9 -tetrahydrocannabinol to produce marked catalepsy in mice. *Neuropharmacology*. 27, 1256-1270.
- Pertwee, R.G., Wickens, A.P. (1991). Enhancement by chlordiazepoxide of catalepsy induced in rats by intravenous or intrapallidal injections of enantiomeric cannabinoids. *Neuropharmacology*. 30, 237-244.
- Piazza, P.V., Barrot, M., Rouge-Pont, F., Marinelli, M., Maccari, S., Abrous, D.N., Simon, H., Le Moal, M. (1996a). Suppression of glucocorticoid secretion and antipsychotic drugs have similar effect on the mesolimbic dopaminergic transmission. *Proceedings National Academy of Sciences USA*. 93, 15445-15450.
- Piazza, P.V., Le Moal, M. (1996a). Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 36, 359-378.
- Piazza, P.V., Marinelli, M., Rouge-Pont, F., Deroche, V., Maccari, S., Simon, H., Le-Moal, M. (1996b). Stress, glucocorticoids, and mesencephalic dopaminergic neurons: a pathophysiological chain determining vulnerability to psychostimulant abuse. *NIDA Research Monographs*. 163, 277-99.
- Picetti, R., Saiardi, A., Abdel Samad, T., Bozzi, Y., Baik, J.H., Borrelli, E. (1997). Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. *Critical Reviews in Neurobiology*. 11, 121-142.
- Piomelli, D., Beltramo, M., Glasnapp, S., Lin, S.Y., Goutopoulos, A., Xie, X.Q., Makriyannis, A. (1999). Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 96, 5802-7.
- Piomelli, D., Beltramo, M., Giuffrida, A., Stella, N. (1998). Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiology of Disease*. 5, 462-73.
- Pistis, M., Ferraro, L., Pira, L., Flore, G., Tanganelli, S., Gessa, G.L., Devoto, P. (2002). Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*. 948, 155-8.
- Pontieri, F.E., Monnazzi, P., Scontrini, A., Buttarelli, F.R., Patacchioli, F.R. (2001). Behavioral sensitization to heroin by cannabinoid pretreatment in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 421, R1-3.
- Pryce, G., Ahmed, Z., Hankey, D.J., Jackson, S.J., Croxford, J.L., Pocock, J.M., Ledent, C., Petzold, A., Thompson, A.J., Giovannoni, G., Cuzner, M.L., Baker, D. (2003). Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain*. 126, 2191-202.

- Querejeta, E., Delgado, A., Valdiosera, R., Erlij, D., Aceves, J. (2001). Intrapallidal D2 dopamine receptors control globus pallidus neuron activity in the rat. *Neuroscience Letters*. 300, 79-82.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Marsani, J., Neliat, G., Caput, D., Ferrara, P., Soubrie, P., Breliere, J.C., Le Fur., G. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Letters*. 350, 240-4.
- Robins, L.N., Mills, J.L. (1993). Effects of in utero exposure to street drugs. *American Journal of Public Health Supplement*. 83, 8-32.
- Rodríguez de Fonseca, F., Carrera, M.R.A., Navarro, M., Koob, G.F., Weiss, F. (1997). Activation of corticotropin releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science*. 276, 2050-2054.
- Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Fernández-Ruiz, J.J., Navarro M., Ramos, J.A. (1991a). Effects of pre and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience*. 43, 713-723.
- Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Hernández, M.L., Ramos, J.A., Martín, M., Fernández-Ruiz, J.J. (1994b). Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle, and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Science*. 54, 159-170.
- Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Hernández M.L., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1990). Changes in the brain dopaminergic indices induced by perinatal exposure to cannabinoids in rats. *Developmental Brain Research*. 51, 237-24.
- Rodríguez de Fonseca, F., del Arco, I., Martín-Calderon, J.L., Gorriti, M.A., Navarro, M.A. (1998). Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiology of Disease*. 5, 483-501.
- Rodríguez de Fonseca, F., Fernández-Ruiz, J.J., Murphy, L.L., Cebeira, M., Steger, R.W., Bartke, A., Ramos, J.A. (1992a). Acute effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol on dopaminergic activity in several rat brain areas. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 42, 269-275.
- Rodríguez de Fonseca, F., Fernández-Ruiz, J.J., Eldridge, J.C., Steger, R.W., Bartke, A., Murphy, L.L. (1991b). Effects of the exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol on the adrenal medullary function: evidence of an acute effect and development of tolerance in chronic treatments. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 40, 593-598.
- Rodríguez de Fonseca, F., Gorriti, M. A. Fernández Ruiz, J.J., Palomo, T., Ramos, J.A. (1994a). Down regulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic Δ^9 -Tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 47, 33-40.
- Rodríguez de Fonseca, F., Hernandez, M.L., De Miguel, R., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A. (1992b). Early changes in the development of dopaminergic neurotransmission after maternal exposure to cannabinoids. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 41, 469-474.
- Rodríguez de Fonseca, F., Martín-Calderón, J.L., Mechoulam, R., Navarro, M. (1994b). Repeated stimulation of D1 dopamine receptors enhances (-)-11-hydroxy- Δ^8 -

- tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl- induced catalepsy in male rats. *Neuroreport*. 5, 761-765.
- Rodríguez de Fonseca, F., Murphy, L.L., Bonnin, A., Eldrige, J.C., Bartke, A., Fernández Ruiz, J.J. (1992c). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol administration affects anterior pituitary, corticoadrenal and adrenomedullary functions in male rats. *Neuroendocrinology*. 11, 147-156.
- Rodríguez de Fonseca, F., Ramos, J.A., Bonnin, A., Fernández-Ruiz, J.J. (1993). Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport*. 4, 135-138.
- Rodríguez de Fonseca, F., Rubio, P., Martín-Calderón, J.L., Caine, S.B., Koob, G.F., Navarro, M. (1995). The dopamine receptor agonist 7-OH-DPAT modulates the acquisition and expression of morphine-induced place preference. *European Journal of Pharmacology*. 274, 47-55.
- Romero, J., Berrendero, F., García-Gil, L., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1999). Cannabinoid receptor and WIN-55,212-2-stimulated [35S]GTPgammaS binding and cannabinoid receptor mRNA levels in several brain structures of adult male rats chronically exposed to R-methanandamide. *Neurochemistry*. 34, 473-82.
- Romero, J., Berrendero, F., Perez-Rosado, A., Manzanares, J., Rojo, A., Fernández-Ruiz, J.J., de Yébenes, J.G., Ramos, J.A. (2000). Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Science*. 66, 485-94.
- Romero, J., Lastres-Becker, I., De Miguel, R., Berrendero, F., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J. (2002). The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacology and Therapeutics*. 95, 137-52.
- Romero, J., De Miguel, R., García-Palomero, E., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A. (1995b). Time course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand, on extrapyramidal function. *Brain Research*. 694, 223-232.
- Romero, J., De Miguel, R., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1998). The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake. *Life Science*. 62, 351-362.
- Romero, J., García, L., Cebeira, M., Zadrozny, D., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A. (1995a). The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Science*. 56, 2033-2040.
- Romero, J., García-Palomero, E., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A. (1996). Involvement of GABA-B receptors in the motor inhibition produced by agonist of brain cannabinoid receptors. *Behavior Pharmacology*. 7, 299-302.
- Rubino, T., Vigano, D., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D. (2000). Loss of cannabinoid-stimulated guanosine 5'-O-(3-[(35)S]Thiotriphosphate) binding without receptor down-regulation in brain regions of anandamide-tolerant rats. *Journal of Neurochemistry*. 75, 2478-84
- Rubio, P., Rodríguez de Fonseca, F., Muñoz, R.M., Ariznavarreta, C., Martín-Calderón, J.L., Navarro, M. (1995). Long term behavioral effects of perinatal exposure to

- Δ^9 tetrahydrocannabinol in rats: possible role of pituitary-adrenal axis. *Life Science*. 56, 2169-2176.
- Rubio, P., Rodríguez de Fonseca, F., Martín-Calderon, J.L., Del Arco, I., Bartolomé, S., Villanúa, M.A., Navarro, M. (1998). Maternal exposure to low doses of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol facilitates morphine-induced place conditioning in adult male offspring. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 61, 229-238.
- Sañudo-Peña, M.C., Tsou, K., Walker, J.M. (1999). Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Science*. 65, 703-13.
- Sañudo-Peña, M.C., Romero, J., Seale, G.E., Fernández-Ruiz, J.J., Walker, J.M. (2000). Activational role of cannabinoids on movement. *European Journal of Pharmacology*. 391, 269-74.
- Sañudo-Peña, M.C., Walker, J.M. (1997). Role of the subthalamic nucleus in cannabinoid actions in the substantia nigra of the rat. *Journal of Neurophysiology*. 77, 1635-1638.
- Schatz, A.R., Lee, M., Condie, R.B., Pulaski, J.T., Kaminski, N.E. (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 142, 278-87.
- Scheel-Kruger, J. (1986). Dopamine-GABA interactions: evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal ganglia and the limbic system. *Acta Neurologica Scandinavica Supplementum*. 107, 1-54.
- Schlicker, E., Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 22, 565-572.
- Schmeling, W.T., Hosko, M.J. (1980). Hypothermic effects of intraventricular and intravenous administration of cannabinoids in intact and brainstem transected cats. *Neuropharmacology*. 19, 567-573.
- Shelton, P.A., Knopman, D.S. (1991). Ideomotor apraxia in Huntington's disease. *Archives of Neurology*. 48, 35-41.
- Shen, M., Piser, T.M., Seybold, V.S., Thayer, S.A. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *Journal of Neuroscience*. 16, 4322-4334.
- Shen, M., Thayer, S.A. (1999). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol acts as a partial agonist to modulate glutamatergic transmission between rat hippocampal neurons in culture. *Molecular Pharmacology*. 55, 8-13.
- Sim, L.J., Hampson, R.E., Deadwyler, S.A., Childers, S.R. (1996a). Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *Journal of Neuroscience*. 16, 8057-66.
- Sim, L.J., Selley, D.E., Xiao, R., Childers, S.R. (1996b). Differences in G-protein activation by mu- and delta-opioid, and cannabinoid, receptors in rat striatum. *European Journal of Pharmacology*. 307, 97-105.
- Sipe, J.C., Chiang, K., Gerber, A.L., Beutler, E., Cravatt, B.F. (2002). A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proceedings of National Academy of Science U.S.A.* 99, 8394-9.

- Smith, P.B., Martin, B.R. (1992). Spinal mechanisms of Δ^9 - tetrahydrocannabinol-induces analgesia. *Brain Research*. 629, 300-304.
- Smith, P.B., Welch, S.P, Martin, B.R. (1994). Interaction between Δ^9 - tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 268, 1382-1387.
- Starke, K., Göthert, M., Kilbinger, H. (1989). Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiological Reviews*. 69, 864-989.
- Steger, R.W., De Paolo, L., Asch, R.H., Silverman, A.Y. (1983). Interactions of Δ^9 - tetrahydrocannabinol (THC) with hypothalamic neurotransmitters controlling luteinizing hormone and prolactine release. *Neuroendocrinology*. 37, 361-370.
- Steiner, H., Bonner, T.I., Zimmer, A.M., Kitai, S.T., Zimmer, A. (1999). Altered gene expression in striatal projection neurons in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 96, 5786-90.
- Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 388, 773-778.
- Suarez, I., Bodega, G., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., Fernández, B. (2000). Neuronal and astroglial response to pre and perinatal exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol in the rat substantia nigra. *Developmental Neuroscience*. 22, 253-263.
- Sugiura, T., Kondo, S., Kishimoto, S., Miyashita, T., Nakane, S., Kodaka, T., Suhara, Y., Takayama, H., Waku, K. (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 605-12.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 215, 89-97.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Tonogawa, T., Nakane, S., Yamashita, A., Waku, K. (1996). Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 218, 113-7.
- Sullivan, R.M., Talangbayan, H., Einat, H., Szechtman, H. (1998). Effects of quinpirole on central dopamine systems in sensitized and non-sensitized rats. *Neuroscience*. 83, 781-9.
- Sullivan, J.M. (2000). Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learning and Memory*. 7, 132-9.
- Szabo, B., Siemes, S., Wallmichrath, I. (2002). Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *European Journal of Neuroscience*. 15, 2057-61.
- Szabo, B., Wallmichrath, I., Mathonia, P., Pfreundtner, C. (2000). Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*. 97, 89-97.

- Szabo, B., Dorner, L., Pfreundtner, C., Noremborg, W., Starke, K. (1998). Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience*. 85, 395-403.
- Szabo, B., Müller, T., Koch, H. (1999). Effects of Cannabinoids on Dopamine Release in the Hábeas Striatum and the Nucleus Accumbens In Vitro. *Journal of Neurochemistry*. 73, 1084-1089.
- Takahashi, K.A., Linden, D.J. (2000). Cannabinoid receptor modulation of synapses received by cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neurophysiology*. 83, 1167-80.
- Tanda, G., Pontieri, F.E., Di Chiara, G. (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common μ_1 opioid receptor mechanism. *Science*. 276, 2048-2050.
- Terranova, J.P., Storme, J.J., Lafor, N., Perio, A., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Soubrie, P. (1996). Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR141716. *Psychopharmacology*. 126, 165-172.
- Tersigni, T.J., Rosenberg, H.C. (1996). Local pressure application of cannabinoid agonists increases spontaneous activity of rat substantia nigra pars reticulata neurons without affecting response to iontophoretically-applied GABA. *Brain Research*. 733, 184-192.
- Thomas, H. (1993). Psychiatric symptoms in cannabis users. *British Journal of Psychiatry*. 163, 141-9.
- Tramer, M.R., Carroll, D., Campbell, F.A., Reynolds, D.J., Moore, R.A., McQuay, H.J. (2001). Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. *British Medical Journal*. 323, 16-21.
- Trojnar, W., Wise, R.A. (1991). Facilitory effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on hypothalamically induced feeding. *Psychopharmacology*. 103, 172-6.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., Walker, J.M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB-1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 83, 393-411.
- Tsou, K., Patrick, S.L., Walker, J.M. (1995). Physical withdrawal in rats tolerant to Δ^9 -tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*. 280, R13-R15.
- Tzavara, E.T., Valjent, E., Firmo, C., Mas, M., Beslot, F., Defer, N., Roques, B.P., Hanoune, J., Maldonado, R. (2000). Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum. *European Journal of Neuroscience*. 12, 1038-46.
- Usiello, A., Baik, J.H., Rouge-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P.V., Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*. 408, 199-203.
- Villanúa, M.A., Gamallo, A. (1985). Radioinmunoanálisis de corticosterona para la valoración de la función adrenal en ratas como índice de estrés. *Endocrinología*. 32, 213-217.
- Vogel, Z., Barg, L., Levy, R., Saya, D., Heldman, E., Mechoulam, R. (1993). Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *Journal of Neurochemistry*. 61, 352-5.

- Wagner, J.A., Varga, K., Ellis, E.F., Rzigalinski, B.A., Martin, B.R., Kunos, G. (1997). Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature*. 390, 518-21.
- Wallmichrath, I., Szabo, B. (2002b). Analysis of the effect of cannabinoids on GABAergic neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 365, 326-34.
- Wallmichrath, I., Szabo, B. (2002a). Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience*. 113, 671-82.
- Walters, D.E., Carr, L.A. (1986). Changes in brain catecholamine mechanisms following perinatal exposure to marihuana. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 25, 763-778.
- Walters, D.E., Carr, L.A. (1988). Perinatal exposure to cannabinoids alter neurochemical development in the rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 29, 213-216.
- Wenger, T., Fragkakis, G., Giannikou, P., Yiannikakis, N. (1997). The effects of prenatally administered endogenous cannabinoid on rat offspring. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 58, 537-44.
- Wenger, T., Ledent, C., Csernus, V., Gerendai, I. (2001). The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 284, 363-8.
- Wenger, T., Croix, D., Tramu, G., Leonardelli, J. (1991). Prenatally administered delta-9-tetrahydrocannabinol temporally inhibits the developing hypothalamo-pituitary system in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 40, 599-602.
- Wenger, T., Toth, B.E., Juaneda, C., Leonardelli, J., Tramu, G. (1999). The effects of cannabinoids on the regulation of reproduction. *Life Science*. 65, 695-701.
- Wenger, T., Toth, B.E., Martin, B.R. (1995). Effects of anandamide (endogenous cannabinoid) on anterior pituitary hormone secretion in adult ovariectomized rats. *Life Science*. 56, 2057-2063.
- Westlake, T.M., Howlett, A.C., Bonner, T.I., Matsuda, L.A., Herkenham, M. (1994). Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience*. 63, 637-52.
- Wickens, A.P., Pertwee, R.G. (1993). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and anadamide enhance the ability of muscimol to induce catalepsy in the globus pallidus of rats. *European Journal of Pharmacology*. 250, 205-208.
- Wilcox, R.E., Severson, J.A., Woodward, J.J., Randall, P.K., Vaughn, D.M., Riffe, W.H. (1990). Behavioral sensitization following a single apomorphine pretreatment--selective effects on the dopamine release process. *Brain Research*. 528, 109-13.
- Wilcox, R.E., Smith, R.V., Anderson, J.A., Riffe, W.H. (1980). Apomorphine-induced stereotypic cage climbing in mice as a model for studying changes in dopamine receptor sensitivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 12, 29-33.
- Williams, C.M., Kirkham, T.C. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*. 143, 315-317.

- Wirz-Justice, A. (1987). Circadian rhythms in mammalian neurotransmitter receptors. *Progress in Neurobiology*. 29, 219-259.
- Zeng, B.Y., Dass, B., Owen, A., Rose, S., Cannizzaro, C., Tel, B.C., Jenner, P. (1999). Chronic L-DOPA treatment increases striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience Letters*. 276, 71-4.
- Zhuang, S., Kittler, J., Grigorenko, E.V., Kirby, M.T., Sim, L.J., Hampson, R.E., Childers, S.R., Deadwyler, S.A. (1998). Effects of long-term exposure to delta9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Brain Research Molecular Brain Research*. 62, 141-9.
- Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., Bonner, T.I. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 96, 5780-5.
- Zuckerman, B. (1991). Drug effects: A search of mechanisms. En Kilbey, M.N., Asghar, K. (Eds.). *Methodological issues in controlled studies on effects of prenatal exposure to drug abuse*. NIDA Research Monograph 114.
- Zuckerman, B., Frank, D.A., Hingson, R., Amaro, H., Levenson, S.M., Kayne, H., Parker, S., Vinci, R., Aboagye, K., Fried, L.E., Cabral, H., Timperi, R., Bauchner, H. (1989). Effects of maternal marijuana and cocaine use on fetal growth. *The New England Journal of Medicine*. 320, 762-768.