

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**IMPLICACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE
ENDÓGENO EN LA DEPENDENCIA A DROGAS DE ABUSO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara González Rodríguez de Castro

Bajo la dirección de los doctores

Javier Fernández Ruiz

José Antonio Ramos Atance

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1828-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE C.C. QUÍMICAS



IMPLICACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN LA DEPENDENCIA A DROGAS DE ABUSO

Sara González Rodríguez de Castro

**Directores: Dr. Javier Fernández Ruiz
Dr. José Antonio Ramos Atance**

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2003

JOSÉ JAVIER FERNÁNDEZ RUIZ, Doctor en Ciencias Biológicas y JOSÉ ANTONIO RAMOS ATANCE, Doctor en Ciencias Químicas, Profesores Titulares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN: Que Sara González Rodríguez de Castro, licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: "Implicación del Sistema Cannabinoide Endógeno en la Dependencia a Drogas de Abuso", que presenta para la obtención del Título de Doctor en Ciencias Químicas.

Consideramos el trabajo realizado satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a 8 de Mayo de dos mil tres.

VºBº

VºBº

Fdo: José Javier Fernández Ruiz

Fdo: José Antonio Ramos Atance

AGRADECIMIENTOS

A José Antonio Ramos Atance y José Javier Fernández Ruiz por haberme ofrecido la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su confianza y por la dirección de esta tesis doctoral

A mis compañeros de laboratorio, a los que están todavía y a los que cambiaron de rumbo. Fernando, Alberto, Isabel, Ana, María, Onintza, Eva, Mariluz, Charo y Maribel muchas gracias a todos por la amistad compartida durante este tiempo y por haber podido contar con vosotros siempre que lo he necesitado.

A Daniela Parolaro y todo el grupo de personas que trabaja con ella en el Instituto de Farmacología de Milán, por hacerme sentir como en casa en mi primera salida al extranjero. No me había ido y ya estaba deseando volver.

A Vincenzo Di Marzo, del Instituto para la química de interés biológico de Nápoles, por abrirme las puertas de su laboratorio y estar siempre pendiente de que durante mi estancia en Nápoles todo fuera bien. A Maria Grazia, Mena, Isabella y Alessia que trabajaron conmigo allí y me ofrecieron su amistad.

A Emilio Ambrosio por su colaboración en algunos experimentos que forman parte de esta tesis y por su amabilidad.

Y, por supuesto, a mi familia y a mis amigos sin cuyo apoyo nunca hubiese llegado aquí.

Mi más sincero agradecimiento a todos ellos

A mi familia, por su amor

ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
AAI	Aminoalquilindoles
AC	Adenilato ciclasa
ACPA	Araquidonilciclopropilamida
ACE	Araquidonil-2-cloroetilamida
ADN	Ácido deoxiribonucleico
AEA	Anandamida
2AG	2-Araquidonilglicerol
AMPc	adenosina-3',5'-monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
BABA	5-β-aminobutirato
BLA	Amígdala basolateral
BSA	albúmina de suero bovino
CA1	Células de la capa 1 del asta de Ammon
CA2	Células de la capa 2 del asta de Ammon
CA3	Células de la capa 3 del asta de Ammon
CB ₁	Receptor para cannabinoides cerebral
CB _{1A}	Variante de <i>splicing</i> del receptor CB ₁
CB ₂	Receptor para cannabinoides periférico
Cpu	Caudado-putamen
CRF	Factor liberador de corticotropinas
cDNA	ADN complementario
cNOS	Óxido Nítrico Sintasa que se expresa constitutivamente en neuronas y células endoteliales
Cpu	Caudado-putamen
DA	Dopamina
DHBA	Dihidroxibencilamina
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DSI	del inglés <i>depolarization-induced suppression of inhibition</i>
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
EDTA	Ácido etileno-diaminotetracético
EEM	Error estándar de la media
FAAH	Amidohidrolasa de ácidos grasos
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GAD	Glutámico descarboxilasa
GD	Giro dentado
GS/MS	Cromatografía de masas/ espectrofotometría de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
iNOS	Óxido nítrico sintasa
i.p	intraperitoneal
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
NA	Núcleo accumbens
N-ArPE	N-araquidonilfosfatidiletanolamina
N Acb	Núcleo accumbens
N entop	Núcleo entopeduncular
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PBS	Tampón fosfato salino
PENK	Proencefalina
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂

PRL	Prolactina
PVH	Núcleo hipotalámico ventromedial
RIA	Radioinmunoensayo
s.c.	Subcutánea
SCE	Sistema Cannabinoide Endógeno
SSC	salino-citrato sódico
SN	Sustancia Nigra
SNC	Sistema nervioso central
TH	Tirosina Hidroxilasa
Δ^9 -THC	(-)- Δ^9 -6a,10a-trans-tetrahidrocannabinol
PAG	Sustancia gris periacueductal
VMN	Núcleo hipotalámico ventromedial
VR1	Receptor vanilloide tipo 1
VTA	Áreas tegmental ventral
WT	del inglés <i>wild type</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

- 1.1. RECEPTORES PARA CANNABINOIDES
 - 1.1.1. Caracterización bioquímica y molecular
 - 1.1.2. Expresión y distribución anatómica
- 1.2. ENDOCANNABINOIDES
 - 1.2.1. Localización cerebral
 - 1.2.2. Características bioquímicas y farmacológicas
- 1.3. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE LOS ENDOCANNABINOIDES
- 1.4. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL
- 1.5. SISTEMA DE INACTIVACIÓN DE LOS ENDOCANNABINOIDES
 - 1.5.1. Transportador de anandamida
 - 1.5.2. Amidohidrolasa de ácidos grasos
- 1.6. CANNABINOIDES SINTÉTICOS
 - 1.6.1. AGONISTAS
 - Cannabinoides clásicos
 - Agonistas bicíclicos y tricíclicos
 - Aminoalquilindoles.
 - Eicosanoides
 - 1.6.2. ANTAGONISTAS
- 1.7. FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO
 - 1.7.1. Control motor
 - 1.7.2. Nocicepción
 - 1.7.3. Aprendizaje y memoria
 - 1.7.4. Neuroprotección
 - 1.7.5. Efectos antiproliferativos
 - 1.7.6. Control del desarrollo cerebral
 - 1.7.7. Regulación neuroendocrina.
 - 1.7.8. Apetito, temperatura corporal y emesis
 - 1.7.9. Reproducción
 - 1.7.10. Regulación de la respuesta inmune
 - 1.7.11. Control del sistema vascular

II. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO: IMPLICACIÓN EN LOS MECANISMOS DE RECOMPENSA CEREBRAL

- 2.1. CANNABINOIDES Y CIRCUITO DE RECOMPENSA CEREBRAL
- 2.2. POTENCIAL ADICTIVO DE LOS CANNABINOIDES
 - 2.2.1. Refuerzo inducido por cannabinoides
 - 2.2.2. Dependencia a cannabinoides

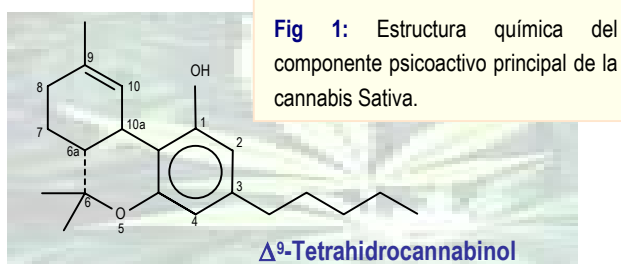
III. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO Y DEPENDENCIA A DROGAS DE ABUSO

- 3.1. ALCOHOL Y SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO.
- 3.2. COCAÍNA Y SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO.

- 3.3. OPIOIDES Y SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO.
- 3.4. NICOTINA Y SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

INTRODUCCIÓN

Las preparaciones obtenidas a partir de la planta de la *Cannabis Sativa* se han utilizado a lo largo de la historia con fines industriales, medicinales y recreativos (cuadro 1). Sin embargo, la investigación sobre sus principios activos es relativamente reciente. La planta del cannabis contiene alrededor de 400 compuestos químicos. Aproximadamente 60 de ellos son cannabinoides, pertenecen a la clase química de los terpenofenoles y son los responsables del poder psicoactivo de los diversos preparados de la planta. Están formados, generalmente, por tres anillos de los que el central suele ser tetrahidropirano. El término cannabinoide se refiere a los compuestos de 21 carbonos presentes en la planta e incluyen sus productos de transformación y análogos relacionados. El descubrimiento de los principales constituyentes psicoactivos de la planta permitió el estudio específico de los efectos farmacológicos y comportamentales de estos compuestos. En los años 60, Gaoni y Mechoulam aislaron el componente psicoactivo principal de la *Cannabis sativa*: el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Fig.1) (Gaoni y Mechoulam, 1964). El metabolismo de este compuesto se produce fundamentalmente en el hígado donde se oxida rápidamente a 11-OH- Δ^9 -THC (Cuadro 2). Este metabolito es más potente que el Δ^9 -THC y atraviesa la barrera hematoencefálica más fácilmente (Huestis et al., 1992). El resto de cannabinoides presentes en la planta son inactivos o ligeramente activos. No obstante, interaccionan con el Δ^9 -THC incrementando o disminuyendo su potencia farmacológica. Por otra parte, cuando se fuma marihuana se producen cientos de compuestos por pirólisis que contribuyen a los efectos agudos sobre el sistema nervioso central que tienen las preparaciones de la planta así como a la toxicidad a largo plazo. No es posible evaluar de modo experimental los efectos farmacológicos y toxicológicos de la exposición a cientos de compuestos simultáneamente. En consecuencia, la comunidad científica ha focalizado su interés en el Δ^9 -THC. Esta aproximación experimental es adecuada cuando se estudian los mecanismos moleculares y bioquímicos que subyacen a la actuación de los cannabinoides. Desafortunadamente, se trata de una estrategia menos adecuada para evaluar las consecuencias a largo plazo del consumo de marihuana.



Inicialmente, debido a la naturaleza lipofílica de la molécula, se pensó que el Δ^9 -THC ejercía su acción a través de interacciones inespecíficas con las membranas celulares que darían lugar a modificaciones en el equilibrio lípido-proteína y que podrían afectar a la funcionalidad de diversas proteínas de membrana. Sin embargo, estudios detallados de relación estructura-actividad sugirieron un mecanismo mediado por receptor como el responsable de su actividad psicoactiva. Hasta el momento, se han clonado dos subtipos de receptor para cannabinoides que se han denominado CB₁ y CB₂ (Devane et al., 1988; Matsuda et al. 1990; Munro et al., 1993). El receptor CB₁ se expresa fundamentalmente en el sistema nervioso central (Herkenham et al., 1991; Matsuda et al., 1993) mientras que el receptor CB₂ se localiza principalmente en el sistema inmune. El descubrimiento de los receptores para cannabinoides llevó a los investigadores a emprender la búsqueda de los ligandos endógenos que actúan sobre los mismos. En la actualidad se considera a la anandamida (AEA) y al 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995) como los dos endocannabinoides más importantes. La elucidación de los elementos que constituyen el sistema cannabinoide endógeno ha permitido demostrar la existencia de un nuevo sistema de neurotransmisión o neuromodulación en el cerebro. Los principios psicoactivos de los preparados de la *Cannabis Sativa* actúan a través de este sistema de modo que los cannabinoides disponen de numerosos sitios de actuación que se relacionan con sus propiedades farmacológicas y sus efectos comportamentales.



Cuadro 1: Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos psicoactivos presentes fundamentalmente en la brácteas y brotes florecidos de planta del cáñamo índico, científicamente conocida como *Cannabis Sativa*. La concentración más alta de estos compuestos se localiza en los brotes florecidos. El contenido de cannabinoides de cada planta varía en función del clima, las condiciones de cultivo, etc...Las propiedades medicinales de la planta se reconocieron en China hace 4000 años. La civilización romana introdujo su cultivo en Europa. El uso del *Cannabis* con fines tanto terapéuticos fue desvaneciéndose en Europa al inicio de la Era Moderna. La utilización terapéutica se reintrodujo en el siglo XIX en el Reino Unido. Sin embargo, en el siglo XX se retiró de la práctica médica y se consideró una sustancia ilegal

En la actualidad, se dispone de agentes farmacológicos (agonistas, antagonistas, inhibidores del proceso de finalización de la señal biológica...) que nos permiten interferir sobre el sistema endocannabinoide y constituyen una herramienta fundamental para el estudio de la funcionalidad de este sistema de señalización.

Cuadro 2: Absorción y metabolismo de los cannabinoides

La vía de administración del cannabis es generalmente inhalatoria. El rango de dosis de Δ^9 -THC que es necesario fumar para producir efectos farmacológicos en humanos oscila entre los 2 y los 22 mg (Martin, 1986). Cuando se fuma, solo pasa a la circulación entre un 10 y un 25% del Δ^9 -THC de manera que la dosis en sangre debe situarse entre 0,2 y 4,4 mg para producir efectos farmacológicos.

Cuando se estudiaron animales de experimentación, el nivel del Δ^9 -THC que alcanza el cerebro es apenas de un 1% (Aguirell y cols., 1986). Si en el cerebro humano ocurriera lo mismo significaría que sólo de 2 a 44 μ g pueden penetrar en el cerebro.

Tras la inhalación, el Δ^9 -THC se absorbe rápidamente en la sangre y se redistribuye. El metabolismo inicial tiene lugar en el hígado donde el Δ^9 -THC se transforma en 11-OH- Δ^9 -THC que es más potente que el Δ^9 -THC y atraviesa más fácilmente la barrera hematoencefálica. Posteriormente, diferentes reacciones metabólicas en el hígado transforman el 11-OH- Δ^9 -THC en un serie de metabolitos inactivos como el 11-nor-carboxi- Δ^9 -THC que es el más abundante en plasma y en orina. La liberación del Δ^9 -THC de los tejidos ricos en lípidos se produce lentamente, lo que origina que el tiempo medio de liberación sea elevado.

I. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

1.1. RECEPTORES PARA CANNABINOIDES

Como hemos mencionado anteriormente, los cannabinoides ejercen su acción farmacológica mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta el momento se han identificado dos receptores para cannabinoides denominados CB₁ y CB₂. Además, se ha descrito una variante del receptor CB₁, denominado CB_{1A}, que resulta de un "splicing" alternativo y que posee un modelo de distribución similar al del receptor CB₁ (Shire et al., 1995).

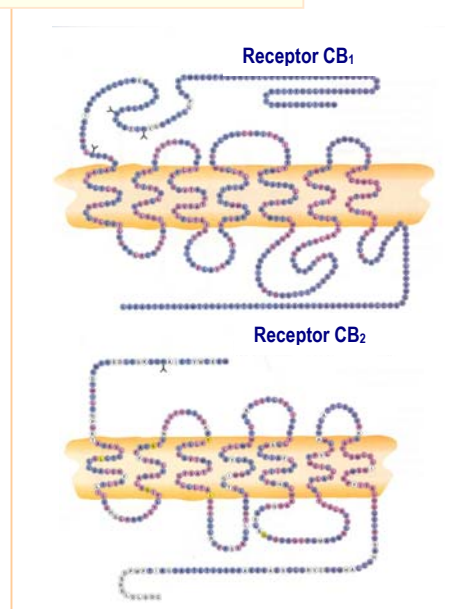
1.1.1. Caracterización bioquímica y molecular

El primer receptor para cannabinoides que se caracterizó mediante métodos radiométricos fue el receptor CB₁ (Devane et al., 1988). Este receptor se clonó en 1990 a partir de una librería de cDNA de corteza cerebral de cerebro de rata (Matsuda et al., 1990) y en 1991 se caracterizó en el

ser humano a partir de tronco cerebral (Gerard et al., 1991). El receptor CB₁ contiene 472-473 aminoácidos organizados en una secuencia típica muy conservada entre las especies que se han estudiado. De hecho, el receptor CB₁ humano presenta una homología del 93% de en la secuencia nucleotídica y del 98% en a secuencia de aminoácidos con respecto al de rata. El receptor para cannabinoides se expresan fundamentalmente en neuronas de cerebro de mamífero donde se les atribuye una papel importante en la modulación de la liberación de distintos neurotransmisores. La variante CB_{1A} presenta 61 aminoácidos menos que CB₁ y 28 residuos aminoácídicos diferentes en el extremo amino terminal (Shire et al., 1995).

En 1993 se caracterizó un nuevo receptor para cannabinoides a partir de células mieloides de bazo de rata (Munro et al., 1993). Este receptor presenta un 44% de homología en su secuencia de aminoácidos con el CB₁ y se denominó CB₂. La estructura secundaria de ambos receptores comparte los motivos estructurales que definen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Esto es, un dominio amino-terminal extracelular, un dominio carboxi-terminal intracelular y siete dominios transmembrana (Fig. 2).

Fig 2: Predicción estructural para los receptores CB₁ y CB₂ humano.



Por otra parte, se ha sugerido la existencia de un nuevo subtipo de receptor cannabinoide diferente de CB₁ y CB₂ en células gliales de rata (Berrendero et al., 1998). De hecho, se ha observado que animales *knock out* para CB₁ poseen sitios de fijación con perfil cannabimimético que no son CB₁

ni CB₂ (Breivogel et al. 2001). Sin embargo, la existencia de receptores para cannabinoides diferentes de CB₁, CB₂ y CB_{1A} en cerebro hasta el momento no ha sido confirmada.

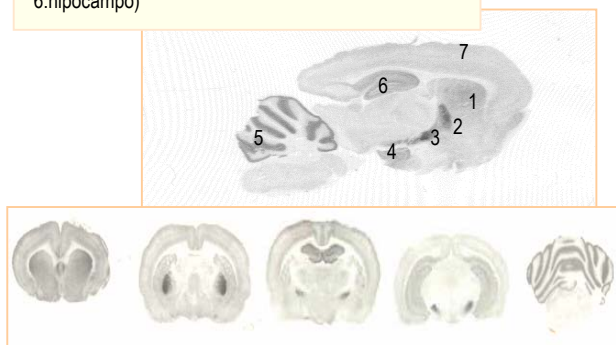
1.1.2. Expresión y distribución anatómica

El receptor CB₁ se expresa abundantemente en el sistema nervioso central, mientras que, el receptor CB₂ se encuentra en células y tejidos que forman parte del sistema inmune (Herkenhan et al., 1991a; Mailloux y Vanderhaeghen, 1992). Estudios autorradiográficos mostraron niveles elevados de unión específica a receptor CB₁ en los ganglios basales (caudado-putamen lateral, globo pálido, núcleo entopeduncular y sustancia nigra *pars reticulata*), capa molecular del cerebelo e hipocampo (capa molecular del giro dentado y región CA₃) (Herkenhan et al., 1991a) (Fig. 3). Por otro lado, se detecta densidad moderada de este receptor en la corteza cerebral y niveles bajos en el hipotálamo, tallo cerebral y médula espinal. Además de en el sistema nervioso central (SNC), existen receptores CB₁ a nivel periférico. Así, el receptor CB₁ está presente en la adenohipófisis (González et al., 1999) el bazo y las amígdalas, corazón, próstata, útero y ovario. Por otra parte, determinados terminales nerviosos periféricos contienen este receptor a nivel presináptico (Galieque et al. 1995, Ishac et al., 1996). En general, existe concordancia entre los lugares de expresión del ARNm para CB₁ y los sitios de unión para agonistas cannabinoides (Herkenham et al., 1991b; Mailloux y Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 1993). No obstante, existen algunas discrepancias atribuibles a que el ARNm se expresa en los cuerpos celulares de las neuronas mientras que los receptores se localizan en los terminales axónicos. En cuanto a la localización celular, se detecta inmunoreactividad frente al receptor CB₁ en neuronas tanto en los axones como en el soma y las dendritas (Tsou et al., 1998). También se detecta este receptor en otras células nerviosas como son astrocitos, oligodendrocitos y microglia (Sánchez et al., 1998; Molina-Holgado, 2002; Cabral et al., 2001)

La distribución de los receptores CB₁ se correlaciona con los efectos farmacológicos que inducen los cannabinoides. Así, la localización del receptor CB₁ en áreas cerebrales hipocámpales y corticales proporciona la base para la interpretación de los efectos de los cannabinoides en el aprendizaje y la memoria y en el estado cognitivo respectivamente. Mientras que, la distribución en el cerebelo y ganglios basales se relaciona con su papel en el control del movimiento. Por otro lado, los efectos antiémeticos, hipotérmicos u orexígenos de los cannabinoides se basan en la presencia de este receptor en regiones como el área

postrema y en grupos de neuronas hipotalámicas a pesar de que la densidad del receptor CB₁ en estas regiones es considerablemente menor que en otras áreas cerebrales. Finalmente, la acción analgésica de los cannabinoides se relaciona con la localización de CB₁ en regiones supraespinales (PAG, ciertos núcleos talámicos y tallo cerebral) y/o espinales (neuronas del asta dorsal a nivel lumbar) (Hohmann et al., 2002).

Fig 3: Distribución del receptor CB₁ en cerebro de rata (1: Cpu, 2:Nab, 3: GP, 4:SN, 5:cerebelo, 6:hipocampo)



La distribución del receptor CB₂ difiere de la del subtipo CB₁. Los receptores CB₂ se localizan fundamentalmente en bazo, amígdala y en células del sistema inmune (linfocitos B, monocitos y linfocitos T) (Galieque et al., 1995; Shatz et al., 1997). El receptor CB₁ también se encuentra en estas células pero a niveles muy inferiores. Kaminski et al., 1992 encontraron expresión de CB₁ en esplenocitos y se ha encontrado ARNm del receptor CB₁ en leucocitos (Bouaboulou et al., 1993; Daeke et al., 1995). Los niveles de este receptor se incrementan durante la activación de las células inmunes (Kaminski et al., 1992).

Por otra parte, existen diversos factores que condicionan el número de receptores para cannabinoides. En este sentido, se sabe que la edad, el sexo y la exposición a agonistas cannabinoides modifican el número de receptores con un patrón de cambio que es variable en función de la región cerebral (Romero et al., 1998; Rodríguez de Fonseca et al., 1994).

1.2. ENDOCANNABINOIDES

El descubrimiento de los receptores para cannabinoides impulsó la búsqueda de los ligandos endógenos que actúan sobre ellos en condiciones fisiológicas. En 1992, se aisló el primer endocannabinoide conocido a partir de un extracto

lipídico de cerebro de cerdo. Se trataba de una amida del ácido araquidónico y se denominó Anandamida (que proviene del sánscrito *ananda* que significa deleite y del carácter amida de la molécula) (AEA) (Devane et al., 1992). Otras moléculas endógenas con actividad cannabimimética que también son etanolamidas de ácidos grasos poliinsaturados son la homo- γ -linoleniletanolamida y la docosatetraeniletanolamida (Hanus et al., 1993). Ambas se unen a los receptores CB₁ y CB₂ *in vitro*, no obstante, estos ligandos son específicos de CB₁ *in vivo* puesto que, hasta el momento, sólo se ha observado su síntesis en cerebro donde únicamente se localiza este subtipo de receptor. Otro miembro de esta familia de lípidos, la palmitoiletanolamina presenta un perfil farmacológico cannabimimético aunque no se une a ninguno de los receptores para cannabinoides descritos hasta el momento (Sugiura et al., 2000).

Posteriormente, se aisló el 2-araquidonilglicerol (2-AG) en intestino de perro, bazo y páncreas (Mechoulam et al., 1995) de modo que se pensó que se trataba de un ligando periférico. Sin embargo, poco tiempo después se detectó también en cerebro (Sugiura et al., 1995). Su estructura química es la de un éster de ácido graso poliinsaturado. Recientemente se ha descrito dos nuevos endocannabinoides el 2-araquidonilglicerileter (denominado noladin eter) (Hanus et al., 2001) y la O-araquidonioiletanolamina (virodhamina) (Porter et al., 2002). En términos generales y desde un punto de vista estructural, los endocannabinoides son moléculas derivadas de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, que forman enlace amida, éster o eter con un grupo polar pequeño (Fig 8).

1.2.1. Localización cerebral de los endocannabinoides

Las concentraciones de AEA en el cerebro son muy bajas. Esto se debe fundamentalmente a que este endocanabinoide no se almacena en las células en su forma activa sino que se sintetiza en respuesta a un determinado estímulo a partir de un precursor lipídico que se encuentra localizado en la cara interna de la membrana celular. Esta realidad dificulta su estudio *in vivo* ya que aún no se dispone de ensayos con suficiente sensibilidad y selectividad para la determinación de endocannabinoides. Devane et al. estimaban la concentración de AEA en cerebro porcino en unos 384 pmol/g de tejido cerebral. Los datos obtenidos a partir de cerebro de rata presentan algunas discrepancias, unos la estiman en 4 pmol/g de tejido (Sugiura et al., 1996) mientras que otros encuentran valores de entre 20 y 40 pmol/g de tejido (Felder et al., 1996). Es posible que las concentraciones de AEA dependan del

método utilizado en la preparación del tejido puesto que una variable muy importante a tener en cuenta en la determinación de los niveles de AEA es el tiempo transcurrido desde la muerte del animal, ya que, la concentración de AEA en cerebro de rata aumenta más de 125 veces transcurridas 28 horas a temperatura ambiente (Kempe et al., 1996) y aproximadamente 14 veces en cerebro humano (Felder et al., 1996). En líneas generales, los niveles más elevados de AEA se localizan en áreas que a su vez presentan densidades importantes de receptor CB₁. Así, los niveles más altos de AEA se encuentran en hipocampo, corteza y estriado. No obstante, no existe una correlación completa puesto que otras áreas cerebrales como el tálamo o el tallo cerebral presentan niveles altos de AEA y, sin embargo, expresan pocos receptores CB₁ (Felder et al., 1996, Bisogno et al., 1999).

Por otra parte, es importante destacar que la concentración de 2-AG en el cerebro es mucho mayor que la de AEA (Stella et al., 1997; Sugiura et al., 1995), por lo que se ha especulado acerca de un papel más relevante para el 2-AG como ligando endógeno del receptor CB₁. Este endocanabinoide presenta las máximas concentraciones en el tronco cerebral, estriado e hipocampo y las más bajas en corteza, diencefalo y cerebelo (Bisogno et al., 1999) y al igual que sucede con la AEA los niveles de 2-AG se incrementan desde los primeros instantes post-mortem.

1.2.2. Características bioquímicas y farmacológicas de los endocannabinoides

La AEA se une tanto a CB₁ como a CB₂ aunque exhibe mayor afinidad por el subtipo CB₁ y se identificó como un regulador de los canales de calcio tipo L (Johnson et al., 1993). La AEA inhibe la actividad AC previamente estimulada con forskolina en células N18TG2 (Vogel et al., 1993), en células de ovario de hamster chino que expresan el receptor CB₁ humano y también en membranas de cerebelo (Childers et al., 1994). Sin embargo, en estos estudios la AEA presenta menor eficacia que otros agentes cannabimiméticos de alta afinidad como el WIN 55212-2 y el CP-55,940. Por otro lado, la AEA es capaz de inhibir los canales de Ca²⁺ tanto en células N18 de neuroblastoma (Felder et al., 1993; Mackie et al., 1993) como en células ATT20 (Felder et al., 1995) que expresan el receptor CB₁ humano.

En cuanto a la farmacología de la AEA se sabe que cuando se administra a dosis altas mimetiza determinados efectos comportamentales que producen los cannabinoides sintéticos y vegetales cuando se administran *in vivo* como

son la catalepsia, la disminución de la actividad motora en el test de campo abierto, la antinocicepción, la hipotermia (Fride et al., 1993; Crawley et al., 1993; Smith et al., 1994) así como la capacidad de los cannabinoides para inhibir la contracción estimulada eléctricamente del vaso deferente de ratón (Devane et al., 1992) y disminuir la presión intraocular en conejos (Pate et al., 1995; Merritt et al., 1980, 1998). Sin embargo, dosis muy bajas de AEA (<0,1 mg/ml) antagonizan algunos efectos del Δ^9 -THC (Welch et al., 1995; Fride et al., 1995). Estos resultados se podrían explicar sobre la base de que la AEA actúa como un agonista parcial del receptor CB₁, lo que explicaría también que presente menor eficacia que otros cannabinoides *in vitro* (Vogel et al., 1993; Childers et al., 1994). La AEA es menos potente que el Δ^9 -THC y los cambios comportamentales que produce son de menor duración debido a su inestabilidad metabólica ya que como detallaremos más adelante, la AEA se degrada rápidamente por acción de una amidohidrolasa a sus dos compuestos esenciales AA y etanolamina. Esta hipótesis se sustenta en que un derivado de la AEA, la R-metanandamida, que es más resistente a la hidrólisis, produce modificaciones más duraderas sobre el comportamiento motor (Romero et al., 1996).

Los estudios de tolerancia han servido para corroborar la hipótesis de que el Δ^9 -THC y la AEA interactúan con el mismo receptor. Así, el pretratamiento con Δ^9 -THC *in vivo* a ratones, produce tolerancia a los efectos inhibitorios del Δ^9 -THC y AEA sobre la contracción del vaso deferente (Pertwee et al., 1993) y sobre la hipotermia que induce Δ^9 -THC aunque no sobre la que produce la AEA. Además, el tratamiento crónico con dosis altas de AEA en ratones produce tolerancia a AEA y tolerancia cruzada al Δ^9 -THC en lo que se refiere a la actividad motora, hipotermia y analgesia (Fride, 1995).

A pesar de que la AEA comparte con el Δ^9 -THC y otros cannabinoides la mayoría de sus propiedades farmacológicas, en algunos de los efectos de la AEA median mecanismos diferentes de los receptores para cannabinoides descritos hasta el momento. De hecho, la AEA activa a los receptores vanilloides de tipo 1 (VR1) (Zygmunt et al., 1999). VR1 es un canal catiónico no selectivo que se activa por capsaicina. Mediante la interacción con este receptor la AEA puede promover la entrada de Ca²⁺ en la célula ya que este efecto se bloquea con la capsacepina, un antagonista de VR1 (Olah et al., 2001).

El 2-AG se une tanto al receptor CB₁ como al CB₂ e inhibe la actividad de la adenilato ciclasa casi con la misma potencia

que el Δ^9 -THC. Su administración intravenosa en ratones provoca los mismos efectos que el Δ^9 -THC: analgesia, disminución de la actividad motora, hipotermia e inhibición de la contracción inducida eléctricamente del vaso deferente de ratón (Mechoulam et al., 1995). Además, inhibe la potenciación a largo plazo en hipocampo de rata (Stella et al., 1997). y podría participar en las respuestas proliferativas de los linfocitos T y los mitógenos B y T (Lee et al., 1995).

El noladin eter inhibe la unión específica del ligando cannabinoide [³H]-HU243 de forma competitiva y exhibe baja afinidad por el receptor CB₂ pero aún se desconocen las funciones de este compuesto en el organismo (Hanus et al., 2001). La virodhamina actúa como agonista total del receptor CB₂. Sin embargo, se comporta como antagonista en presencia de AEA e inhibe el transporte de la misma (Porter et al., 2002).

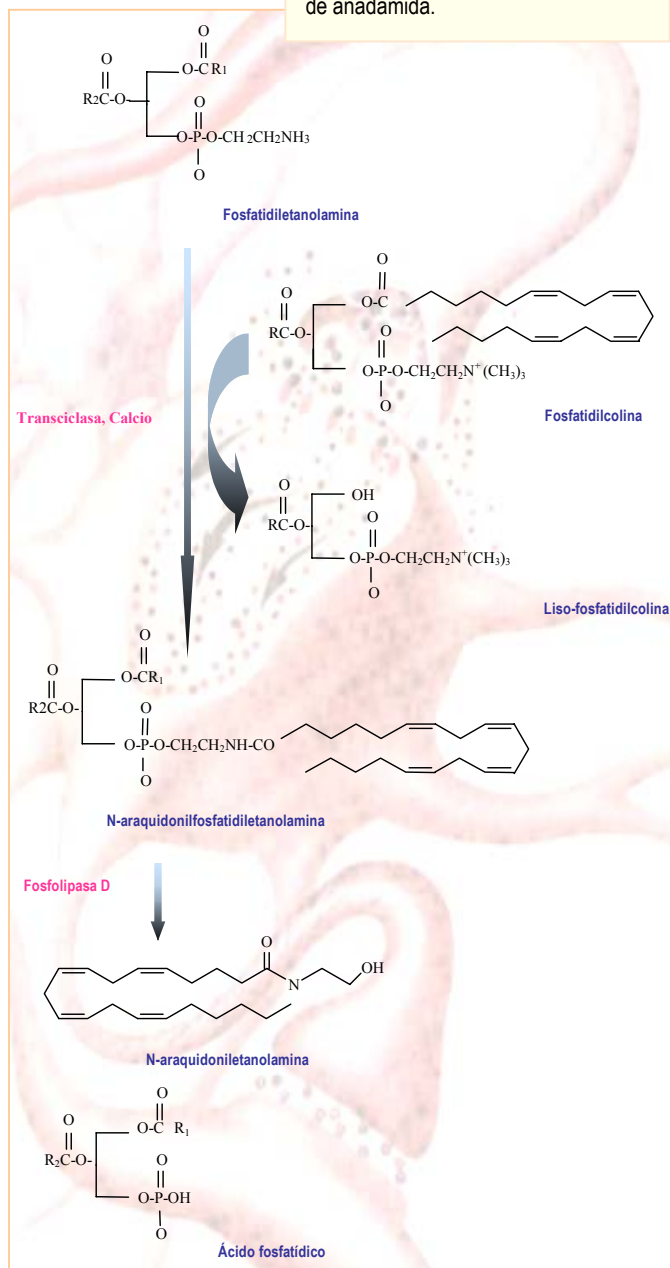
Como ya hemos mencionado, la palmitoiletanolamida comparte con los cannabinoides una acción antiinflamatoria en mastocitos y basófilos (Facci et al., 1995) así como un efecto neuroprotector en células granulares del cerebelo (Skaper et al., 1995). Sin embargo, dado que no es capaz de unirse con alta afinidad a ninguno de los dos subtipos de receptores de cannabinoides conocidos hasta el momento (Sheskin et al., 1997; Showalter et al., 1996) no se le considera como un endocannabinoide sino como un compuesto con ciertas acciones cannabinomiméticas que se manifiestan en determinados diseños experimentales. La cis-9-octadecenoamida (oleamida) tampoco se une a los receptores de cannabinoides (Boring et al., 1996) pero comparte con el Δ^9 -THC y la AEA algunas propiedades farmacológicas. Se ha sugerido que las acciones que realiza este compuesto (analgesia, inhibición de la actividad motora, hipotermia) se deben a un incremento de los niveles endógenos de AEA (Mechoulam et al., 1997). De hecho, la oleamida provoca un aumento en la unión de AEA a receptores CB₁ y, a dosis bajas, potencia la acción antiproliferativa de la AEA sobre células cancerosas de mama (Bisogno et al., 1998).

1.3. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE LOS ENDOCANNABINOIDES

Los endocannabinoides comparten con otros neurotransmisores clásicos algunas características ya que se sintetizan y liberan por las neuronas, tienen la capacidad de unirse y activar receptores de membrana y finalmente son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior celular. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con otros neurotransmisores, dada la naturaleza lipofílica de

estas moléculas, los endocannabinoides no se almacenan en el interior de vesículas sinápticas sino que, como hemos mencionado anteriormente, se sintetizan en respuesta a un estímulo a partir de precursores lipídicos presentes en la membrana plasmática.

Fig 4: Esquema de la síntesis celular de anandamida.



La ruta biosintética para AEA (Fig. 4), así como la de otras N-aciletanolaminas, más concluyente desde el punto de vista fisiológico en el sistema nervioso central requiere la formación de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular, la N-araquidonilfosfatidiletanolamina (N-ArPE) (Di Marzo et al., 1994). Este compuesto se forma

mediante la transesterificación de fosfatidiletanolamina en una reacción catalizada por una N-aciltransferasa dependiente de Ca^{2+} . N-ArPE sirve como depósito de almacenaje para la AEA que se sintetiza y libera en función de los requerimientos celulares. N-ArPE se hidroliza por acción de una fosfolipasa D dependiente de Ca^{2+} dando lugar a ácido fosfatídico y AEA. Esta ruta biosintética no es específica para la AEA ya la fosfatidiletanolamina no sólo está N-acilada por el ácido araquidónico sino que también puede estar asociada a otros ácidos como el γ -linolénico, linoleico, oleico, palmítico y esteárico. De modo que la acción de la fosfolipasa D, daría lugar a los diferentes tipos de N-acil-etanolaminas tanto saturadas como insaturadas. Se estima que la AEA constituye únicamente el 1-2% de la N-aciletanolaminas que se encuentran en el cerebro (Sugiura et al. 1996). Por lo tanto, la elevación de Ca^{2+} que se produce en condiciones despolarizantes en neuronas promueve la síntesis y liberación de AEA.

En cuanto al 2-AG, se ha descrito su síntesis en neuronas de la corteza cerebral (Stella et al., 1997). Una diacilglicerol lipasa o la fosfolipasa C actúan sobre el diacilglicerol, liberando la molécula de ácido graso de la posición sn 1 del glicerol. La enzima se activa al despolarizarse la membrana vía canales de calcio dependientes de voltaje (Stella et al., 1997).

1.4. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL

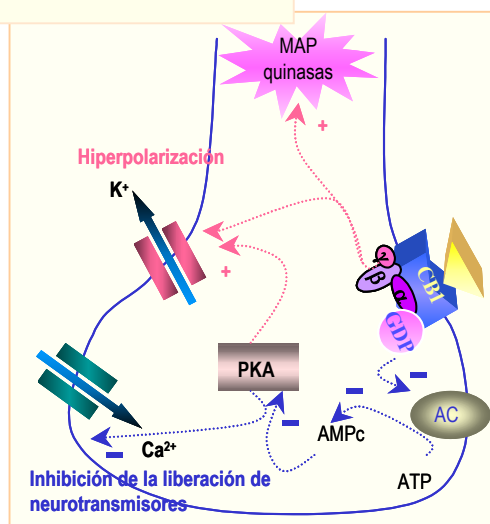
1.4.1. Modulación de adenil ciclasas

Los receptores para cannabinoides descritos hasta el momento pertenecen a la familia de receptores acoplados a efectores a través de proteínas G. En la mayor parte de los tejidos analizados, los receptores CB_1 se acoplan a proteínas $G_{i/o}$ aunque también se ha descrito acoplamiento a G_s . (Childers et al., 1993). El receptor para cannabinoides, a través de la subunidad α de $G_{i/o}$, inhibe la adenilato ciclasa (AC) y da lugar a una disminución de la concentración de AMPc intracelular (Childers et al., 1996) (Fig.5). En ocasiones, el receptor interacciona con proteínas G_s y estimula la actividad AC (Bohhaus et al., 1998). La interacción de los cannabinoides con el receptor CB_2 inhibe la actividad de la AC disminuyendo los niveles celulares de AMPc (Bayewitch et al., 1995; Slipetz et al., 1995; Felder et al., 1995). En este proceso media, al igual que para el receptor CB_1 , una proteína $G_{i/o}$. Sin embargo, la interacción de los cannabinoides con el receptor CB_2 no modifica la actuación de los canales iónicos de Ca^{2+} y K^+ (Felder et al., 1995).

1.4.2. Modulación de canales iónicos

El receptor CB₁ también puede acoplarse, a través del dímero G_i/o , a otros efectores como son los canales de calcio sensibles a voltaje y canales de potasio. Existen gran variedad de canales de calcio sensibles a voltaje que se clasifican mediante criterios farmacológicos. Los cannabinoides, a través del dímero G_i inhiben los canales de Calcio tipo N- y P/Q- que se localizan en la neurona presináptica (Mackie y Hille, 1992; Felder et al., 1993). Esto posibilita la liberación de neurotransmisores por los cannabinoides.

Fig 5: Mecanismos de actuación de los cannabinoides.



Por otro lado, los cannabinoides se acoplan a canales de potasio dependientes de voltaje encargados de rectificar la concentración de K⁺ basal de la célula (K_{ir}) y a canales de potasio activados por proteínas G (GIRK). Así, los cannabinoides activan los canales de K⁺ que contribuyen a facilitar la salida de potasio de la célula dificultando la restauración del nivel basal. El efecto combinado sobre estos dos tipos de canales podría reforzar la inhibición producida por los cannabinoides sobre la liberación de neurotransmisores. Los cannabinoides también pueden inhibir canales de calcio de tipo L en la musculatura lisa de las arterias lo que se relaciona con el papel vasodilatador que pueden tener estos compuestos. No todos los efectos de los cannabinoides son de tipo inhibitorio. Los cannabinoides pueden disminuir la salida de K⁺ en la célula postsináptica. Esta corriente se opone a la despolarización de la membrana y por tanto, las sustancias que la inhiben aumentan la excitabilidad de la membrana.

1.4.3. Incremento de los niveles de ceramida

En algunos tipos celulares el receptor para cannabinoides se acopla mediante un mecanismo independiente de proteínas G a una esfingomielinasa a través de la proteína adaptadora FAN. Esta esfingomielinasa hidroliza la esfingomielina y produce ceramida. Además, los cannabinoides inducen la generación de ceramida a largo plazo mediante el incremento de la síntesis *de novo* de este compuesto y de este modo participan en la regulación de diferentes cascadas implicadas en el crecimiento, diferenciación celular y muerte (Sánchez et al., 2001).

1.4.3. Vías MAPK y PI3K

La activación de la cascada de proteína quinazas activada por mitógenos (MAPK) se ha observado en multitud de tipos celulares. Los cannabinoides a través de proteínas G en la mayor parte de los casos pueden activar tanto la cascada MAPK activada por señales extracelulares como las activadas por estrés (Guzmán et al., 2001). Además, la activación del receptor para cannabinoides puede activar la vía de las quinazas PI3K/ PDK/ PKB (Gómez del Pulgar et al., 2000). Mediante estos mecanismos los cannabinoides pueden controlar la supervivencia, muerte o proliferación celular

1.4.4. Producción de óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que se forma por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) que puede actuar como segundo mensajero. Existen dos subtipos de NOS: la que se expresa constitutivamente en neuronas y células endoteliales (cNOS) y la enzima inducible (iNOS) que se genera en respuesta a estímulos relacionados generalmente con la inflamación. Los cannabinoides aumentan la producción de NO a través de la activación de cNos (Fimiani et al., 1999). La enzima cNOS produce NO en cantidades pequeñas que puede mediar la relajación de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos actuando como vasodilatador, intervenir en la neurotransmisión como neurotransmisor retrógrado, en la plasticidad sináptica y en la morfogénesis neuronal. En algunos casos, los cannabinoides pueden atenuar la inducción de iNOS ejercida por estímulos inflamatorios lo que podría atribuir un papel antiinflamatorio a estas sustancias.

1.4.5. Fosfolipasa D y fosfolipasas A2 con producción de ácido araquidónico.

Los cannabinoides pueden activar a la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂) o a la enzima fosfolipasa D en función del tipo celular. Esta activación incrementa la concentración de ácido araquidónico libre en distintos sistemas celulares (Burstein et al., 1994). Otros mecanismos inducidos por los cannabinoides como la cascada de MAP quinasa, el incremento de calcio intracelular o la activación de PKC también pueden estimular a PLA₂. El ácido araquidónico se puede metabolizar en la célula dando lugar a prostaciclina, tromboxano e hidroperoxiácidos lo que amplía el rango de actividades biológicas de los cannabinoides. Además el ácido araquidónico puede activar enzimas, canales y receptores nucleares.

1.4.6. Regulación de la expresión de genes

A través de las vías que acabamos de mencionar los cannabinoides pueden modular la actividad de diferentes factores de transcripción. Así, una vez que los cannabinoides se unen a su receptor, se activan o inhiben una serie de cascadas de quinasas que fosforilan diversos factores de transcripción produciendo la activación o inhibición de los mismos. Uno de los factores constitutivos que modulan los cannabinoides es la familia de factores CREB/ ATF. Además, los cannabinoides inducen la expresión del factor de transcripción temprano Knox-24 por una vía independiente de adenilato ciclasa (Bouaboula et al., 1995a) y en la que parece estar implicada la ruta de las MAP quinasas (Bouaboula et al., 1995b) y modula los factores Fos/ Jun y NFκB (Kaminski et al., 1998).

1.5. SISTEMA DE INACTIVACIÓN DE LOS ENDOCANNABINOIDES

Del mismo modo que neurotransmisores clásicos y las moléculas endógenas que funcionan como neuromoduladores, los endocannabinoides poseen un sistema específico que se encarga de su inactivación. Así, una vez que la AEA se libera al espacio intersináptico presenta una vida media corta ya que es recaptada rápidamente. Una vez que la AEA se encuentra dentro de la célula se degrada por la acción de una amidohidrolasa dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina. El araquidónico se reincorpora a los fosfolípidos de membrana y la etanolamina se libera parcialmente al exterior o se reincorpora a los fosfolípidos. (Di Marzo et al., 1998). Para el 2-AG parece funcionar el mismo sistema de recaptación y una vez dentro de la célula se degrada a ácido araquidónico

y glicerol por la actuación de una monoacilglicerol lipasa que se localiza en tejidos cerebrales (Stella et al., 1997). Para el resto de los endocannabinoides hasta el momento no se ha descrito como funciona el mecanismo de inactivación.

1.5.1. Transportador de anandamida

Debido a la hidrofobicidad de la estructura de los endocannabinoides, inicialmente se consideró su transporte a través de las membranas celulares como un fenómeno pasivo de modo que se suponía que los endocannabinoides eran capaces de atravesar la bicapa lipídica por difusión simple. Sin embargo, diferentes evidencias experimentales descartaron esta hipótesis a favor de un mecanismo de recaptación mediado por un transportador selectivo, saturable y dependiente de temperatura. No obstante, hasta el momento esta proteína transportadora no se ha aislado ni clonado y existe una gran controversia sobre su existencia (Glaser et al., 2002).

El transporte facilitado de AEA se ha descrito en neuronas corticales (Di Marzo et al., 1994; Beltramo et al., 1997), basófilos RBL-2H3 (Bisogno et al., 1997b), neuronas granulares de cerebelo (Hillard et al., 1997) y astrocitos (Beltramo et al., 1997). Se han realizado estudios de marcaje radioactivo con AM404 (un inhibidor del transporte de AEA) sobre secciones cerebrales de rata y se ha observado señal intensa en la corteza somatosensorial, motora y límbica así como en el estriado, hipocampo, tálamo, núcleos del septo, sustancia nigra, amígdala e hipotálamo. Este patrón de distribución coincide en gran medida con el del receptor CB₁. Este sistema de captación de endocannabinoides también se encuentra a nivel periférico en macrófagos y células endoteliales aunque difieren de los que se producen a nivel central (Giufreda et al., 2001).

1.5.2. Amidohidrolasa de ácidos grasos

Los endocannabinoides se degradan por la acción de una amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Dicha enzima se identificó en hígado y cerebro por Schmid y colaboradores (Natarajan et al., 1984; Schmid et al., 1985). Esta enzima se encuentra asociada a membrana y presenta actividad específica alta en preparaciones microsomales de cerebro (Desarnaud et al., 1995). La actividad FAAH se ha determinado en células intactas y en preparaciones de membrana de células en cultivo. Las células en cultivo de neuroblastoma (NT18TG2) y de glioma C6 captan AEA del medio y lo transforman en ácido araquidónico y etanolamina mediante la acción de FAAH (Deutsch et al., 1993). Además de la AEA, muchos otros compuestos insaturados de cadena

larga son susceptibles de hidrólisis por esta enzima como las etanolaminas de los ácidos grasos 18:3 y 20:3 (Desarnaud et al., 1995). Las anandamidas monoinsaturadas o saturadas, por el contrario, no constituyen buenos sustratos para la FAAH cerebral (Schmid et al., 1985). Los inhibidores de la serinproteasa tales como el palmitilsulfonilfluoruro (PMSF) inhiben la FAAH en cerebro (Desarnaud et al., 1995; Deutsch et al., 1993; Hillard et al., 1995). El hecho de que sólo los inhibidores altamente lipofílicos inhiban de modo eficaz a FAAH sugiere que el sitio activo de la enzima es hidrofóbico (Hillard et al., 1995). También se han identificado otros inhibidores de la enzima que son derivados de la AEA y cuya acción se basa en que los carbonilos polarizados mimetizan el compuesto intermediario, que se forma durante la hidrólisis de la AEA (Koutek et al., 1994).

La inhibición de FAAH reduce el transporte de AEA por lo que es posible que esta enzima trabaje junto con otras proteínas de membrana para facilitar el transporte de AEA. La importancia de FAAH en la degradación de endocannabinoides se manifiesta en ratones FAAH^{-/-} en los que la capacidad para degradar AEA se encuentra muy deteriorada y tienen los niveles de este endocanabinoide incrementados 15 veces (Deutsch et al., 2002).

El patrón de distribución de FAAH difiere en función de la especie estudiada. Esta enzima ha sido objeto de estudios exhaustivos en rata y se sabe que se encuentra en neuronas de gran tamaño (piramidales de corteza e hipocampo, células de Purkinje en el cerebelo...). Además, la presencia de FAAH transcurre en paralelo a la del receptor CB₁ (Ueda et al., 2000). En humanos se localiza fundamentalmente en cerebro, páncreas, riñón y músculo esquelético. En cerebro humano FAAH se encuentra en neuronas y en glia. En tejidos periféricos FAAH se localiza en células endoteliales de rata (Deutsch et al., 1997) y también en el sistema inmune (Bisogno et al. 1997, Maccarrone et al., 1998, Di Marzo et al., 1999)

1.6. CANNABINOIDES SINTÉTICOS

Desde el aislamiento y caracterización de los cannabinoides naturales se han realizado importantes esfuerzos con objeto de desarrollar análogos sintéticos que carezcan de los efectos psicoactivos indeseables y mantengan características farmacológicas de interés. Así, estudios de relación estructura-actividad han originado compuestos cannabinomiméticos con mayor afinidad y especificidad. Estas moléculas constituyen una herramienta fundamental

para la elucidación de los mecanismos bioquímicos y moleculares de actuación de los cannabinoides.

1.6.1. AGONISTAS

Los agonistas cannabinoides se pueden clasificar en: clásicos (derivados de la cannabis sativa y compuestos de síntesis con estructura análoga), agonistas bicíclicos y tricíclicos y aminoalquilindoles

Cannabinoides clásicos

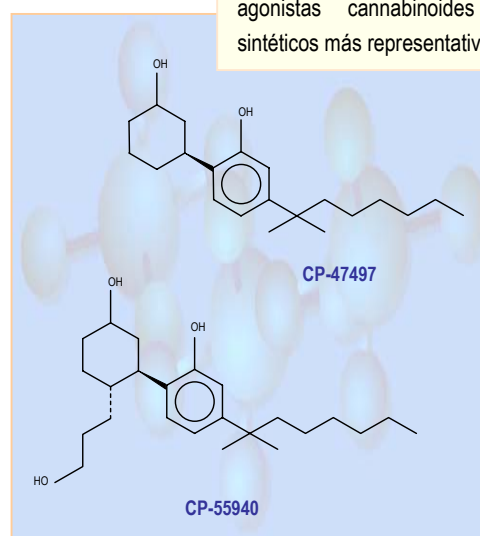
En este grupo se encuentran los cannabinoides presentes en la Cannabis Sativa y sus análogos. Estas moléculas son derivados de dibenzopirano con diferentes sustituyentes laterales y grados de insaturación.

Agonistas bicíclicos y tricíclicos

Estudios sobre la relación estructura-actividad llevados a cabo en los laboratorios de la compañía Pfizer, Inc. permitieron el desarrollo de una serie de modelos de interacción de los agonistas cannabinomiméticos con su receptor en los que se utilizó la antinocicepción como índice de la actividad biológica de este tipo de sustancias (Johnson et al., 1986; Melvin et al., 1987). En la estructura del Δ^9 -THC se localizan 3 puntos principales de asociación entre el agonista y el receptor para cannabinoides, éstos son:

- 1.- El C₃ de la cadena hidrofóbica alquílica.
- 2.- El C₉ del anillo carbocíclico.
- 3.- El hidroxilo fenólico.

Fig 6: Estructura química de los agonistas cannabinoides bicíclicos sintéticos más representativos.

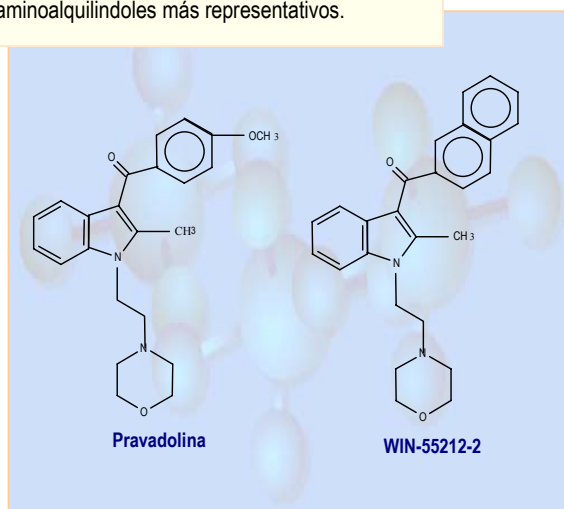


En base a estas premisas, se desarrolló el CP-47497 (Fig. 6). Esta molécula posee una estructura bicíclica y es, al menos, cinco veces más potente que el Δ^9 -THC (Compton et al., 1992). El derivado hidroxipropilo (CP-55940) es de dos a cinco veces más potente que el CP-47497 e incrementa en 100 veces la inhibición de la adenilato ciclasa y la actividad antinociceptiva (Howlett et al., 1988; Melvin et al., 1993). Estas estructuras bicíclicas poseen la mayoría de las características estructurales del Δ^9 -THC. En la actualidad el CP-55940 marcado radiactivamente es uno de los cannabinoides más utilizados para el análisis de la unión al receptor para cannabinoides. Dentro de los cannabinoides tricíclicos cabe destacar el 11-hidroxi- Δ^9 -THC-DMH (HU-210), se trata del compuesto cannabinomimético más potente desarrollado hasta el momento (Mechoulam et al., 1988).

Aminoalquilindoles

Investigaciones en los laboratorios de Sterlig Research Institute demostraron que una serie de análogos derivados de la Pravadolina, los aminoalquilindoles (AAI), mimetizaban los efectos farmacológicos de los cannabinoides. (Bell et al., 1991; D'Ambra et al., 1992). Estas moléculas presentan una estructura química muy diferente a la del Δ^9 -THC. Así, el prototipo de estos de agonistas es el WIN 55212-2 (Fig. 7) que presenta una potencia igual o mayor que el Δ^9 -THC *in vivo*. Los AAI activos presentan el mismo espectro de actividades biológicas que los cannabinoides clásicos: poseen actividad antinociceptiva en roedores, producen inhibición de la AC mediada por proteínas G_i en membranas de estriado y cerebelo de rata e inhiben las contracciones del vaso deferente de ratón estimuladas eléctricamente (Pacheco et al., 1991).

Fig.7: Estructura química de los aminoalquilindoles más representativos.



Eicosanoides

Tras el descubrimiento de la AEA (Fig.8) como ligando cannabinoide endógeno (Devane et al., 1992) se inició el desarrollo de una serie de compuestos con estructura química semejante y que producen efectos farmacológicos similares a los del Δ^9 -THC. En este grupo cabe destacar a la (R)-(+)-araquidonil-1'-hidroxi-2'-propilamida, conocida como R-metanandamida. Este compuesto es significativamente más resistente a la degradación metabólica que la AEA (Abadji et al., 1994) y está permitiendo avanzar en el conocimiento de los efectos fisiológicos de los endocannabinoides. En este grupo se encuentran también la araquidonilciclopropilamina (ACPA) y araquidonil-2-cloroetilamina (ACE) que se han revelado como los primeros agonistas selectivos del receptor CB_1 ya que apenas presentan afinidad por el receptor CB_2 (Hillard et al., 1999).

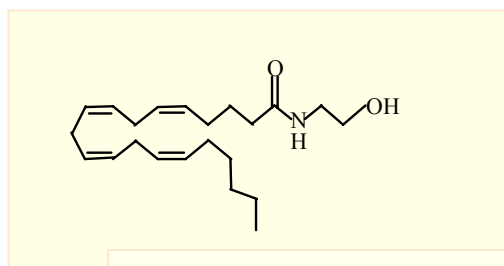


Fig.8: Estructura química de la AEA

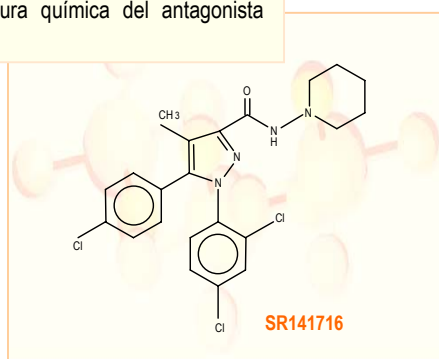
1.6.2. ANTAGONISTAS

El desarrollo de antagonistas del receptor CB_1 constituyó un paso fundamental en el estudio de la farmacología del sistema cannabinoide endógeno. Diversas investigaciones realizadas en los laboratorios de Sanofi Recherche permitieron el desarrollo del antagonista SR141716 (Fig. 9) que presenta una afinidad dentro del rango nanomolar para el receptor CB_1 y en el entorno micromolar para el receptor CB_2 (Rinaldi-Carmona et al., 1994). El SR141716 antagoniza los efectos de los agonistas cannabinoides en la inhibición de la contracción del vaso deferente de ratón y su efecto *in vitro* sobre la AC. Sin embargo, en algunos casos el SR141716 produce efectos contrarios a los que inducen los agonistas del receptor CB_1 lo que sugiere que pudiera tratarse de un agonista inverso (Compton et al., 1996). En cualquier caso, a partir de la estructura del SR141716 se han desarrollado otros antagonistas del receptor CB_1 , como el AM630 o el AM251 (Gatley et al., 1996; Pertwee et al., 1995). Además, en los laboratorios Lilly se ha sintetizado y

caracterizado otro compuesto antagonista de CB₁, el LY 320135 (Felder et al., 1998).

En 1998 se describió el primer antagonista para el receptor CB₂, el SR144528 (Rinaldi-Carmona et al., 1998). La afinidad que presenta este compuesto por el receptor CB₂ es 700 veces superior que la presentada por el CB₁. Estudios *in vitro* han permitido demostrar que el SR144528 antagoniza el efecto inhibitorio del CP55,940 sobre la actividad AC previamente estimulada por forskolina, en líneas celulares que expresan al receptor CB₂ mientras que el antagonista no es efectivo a concentraciones de 10 μ M en células que expresan el receptor CB₁.

Fig 9: Estructura química del antagonista CB₁ SR141716



1.7. FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Se han realizado multitud de estudios sobre la actividad farmacológica de los cannabinoides, tanto endógenos como los obtenidos a partir de la *Cannabis Sativa* y los cannabinoides sintéticos. Sin embargo, el papel fisiológico del sistema cannabinoide endógeno aún permanece sin aclarar. Los endocannabinoides se degradan muy rápidamente con lo que resulta difícil comprobar en estos compuestos las acciones farmacológicas que se atribuyen al Δ^9 -THC y a los cannabinoides sintéticos. En este sentido, la utilización de derivados de la AEA más estables como la R-metanadamina está permitiendo contrastar las acciones de los endocannabinoides con las de los cannabinoides clásicos. Otros compuestos, como los inhibidores de la recaptación de AEA, AM404, VDM11 y el UCM707 (Giuffrida et al. 2000, De Petrocellis et al., 2000, De Lago et al., 2002) permiten profundizar en el papel fisiológico del sistema cannabinoide endógeno. Además, la obtención de ratones modificados genéticamente en los que se ha suprimido la expresión de receptores CB₁ y/o CB₂ (Cuadro 3) está permitiendo clarificar las funciones en las que median estos receptores

El receptor CB₁ se encuentra en los terminales axónicos presinápticos (Tsou et al., 1998). Esta localización permite a CB₁ funcionar como modulador de la neurotransmisión. En términos generales, la activación de estos receptores presinápticos inhibe la neurotransmisión (Wilson y Nicoll, 2001) aunque también podrían tener efectos moduladores de los procesos de recaptación de neurotransmisores (Maneuf et al., 1996, Romero et al., 1998)

Cuadro 3: Ratones *Knock-out* para los receptores de cannabinoides

Hasta el momento se han obtenido dos cepas diferentes de ratones *knock-out* para el receptor CB₁. Ambas se desarrollaron en 1999 por dos grupos diferentes de investigación (Zimmer y cols., 1999; Ledent y cols., 1999). Los ratones CB₁^{-/-} nacen en menor proporción a lo esperado según la genética mendeliana y presentan un fenotipo externo normal. En estos ratones el Δ^9 -THC no ejerce la mayoría de los efectos farmacológicos que están descritos en animales *wild type*.

El *knock-out* para el receptor CB₂ apareció en 2000 y no presenta alteraciones fenotípicas incluso la funcionalidad de su sistema inmune es normal (Buckey y cols., 2000).

A principios de los 90 se describió la supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI del inglés *depolarization-induced suppression of inhibition*) en neuronas cerebelares de Purkinje y en neuronas piramidales de hipocampo (Llano et al., 1991; Pitler y Alger, 1992). En este fenómeno, cuando una neurona sufre una despolarización se produce una supresión transitoria de las sinapsis GABAérgicas inhibitorias que modulan estas neuronas. De este modo, se promueve la liberación de un mensajero retrógrado que actúa de forma específica sobre la neurona presináptica impidiendo la liberación de neurotransmisores. En la DSI que se produce en hipocampo y cerebelo ese mensajero retrógrado es un endocannabinoide puesto que se bloquea con el antagonista SR141716 y se puede mimetizar utilizando agonistas CB₁ (Wilson y Nicoll, 2001; Diana et al., 2002). Dada la localización mayoritaria de este receptor a nivel presináptico en neuronas del SNC, es posible que los endocannabinoides sean capaces de inducir DSI en otras localizaciones cerebrales.

1.7.1. Control motor

La elevada densidad de receptores CB₁ en las zonas cerebrales que se encuentran estrechamente relacionadas con el control motor como el estriado, globo pálido, sustancia

nigra y cerebelo, permite relacionar al sistema cannabinoide endógeno con el control del movimiento. Los cannabinoides producen inhibición motora de forma dosis-dependiente (Dewey, 1986). A dosis bajas producen un descenso de la actividad espontánea mientras que a dosis más elevadas producen catalepsia en ratones (Little et al., 1988). La administración de SR141716 revierte, en general, estos efectos y produce por sí mismo cierto grado de hiperlocomoción (ya hemos comentado anteriormente que SR141716 se comporta en ocasiones como un agonista inverso) (Compton y cols., 1996). La implicación del receptor CB₁ en el control del movimiento se corrobora mediante el estudio de la actividad motora en animales CB₁^{-/-} aunque existe cierta controversia de resultados. Así, los animales knock-out obtenidos en el laboratorio del Dr. Zimmer presentan hipomotilidad (Zimmer et al., 1999), mientras que la cepa CB₁^{-/-} que se desarrolló en el laboratorio del Dr. Parmentier exhiben mayor actividad espontánea (Ledent et al., 1999).

Desde un punto de vista neuroquímico, la administración de AEA a ratas disminuye la actividad de la tirosina hidroxilasa que produce una hipoactividad dopaminérgica nigroestriatal que explicaría la disminución de la actividad motora que se observa en estos animales. Este efecto parece ser indirecto, ya que la AEA actúa sobre las neuronas GABAérgicas estriatofugales, en las que estarían localizados los receptores para cannabinoides (Herkenham et al., 1991b). La activación de estos receptores por la AEA provocaría una disminución de la recaptación de GABA (Romero et al., 1998b) que incrementaría la actividad de este neurotransmisor actuando a través de receptores GABA-B (Romero et al., 1996). Además, se han descrito efectos de los cannabinoides sobre la liberación de GABA (Miller et al., 1996, 1998). Así, la interacción de los cannabinoides con los diferentes neurotransmisores implicados en el circuito de los ganglios basales y por tanto en la coordinación motora, ha permitido postular la utilidad de moléculas con actividad cannabimimética para el tratamiento sintomático de desórdenes del movimiento (Fernández-Ruiz et al., 2002).

1.7.2. Nocicepción

Los cannabinoides presentan propiedades antinociceptivas. La administración intraperitoneal de levonandrol, Δ⁹-THC, 11-OH-Δ⁹-THC y CP 55,940 produce analgesia (Lichtman y Martin, 1991; Welch y Stevens, 1992). Este efecto se produciría a través de la activación de receptores CB₁ que CB₁ se localizan en áreas que controlan la sensibilidad al dolor, tanto a nivel espinal como supraespinal (Manzanares et al., 1999a). No obstante, parece existir una cierta relación

del sistema cannabinoide endógeno con la activación de elementos opioides (Manzanares et al., 1999a). De nuevo, en la evaluación de la implicación del receptor CB₁ en la antinocicepción, los ratones *knock-out* nos proporcionan resultados controvertidos. La cepa del Dr Zimmer presenta menor sensibilidad al dolor que los animales *wild type* (WT) mientras que, los animales generados en el laboratorio del Dr. Parmentier no tienen alterada su respuesta basal al dolor.

Una posible justificación de los efectos antinociceptivos de los cannabinoides podría encontrarse en el hecho de que los endocannabinoides se incrementan en el tronco cerebral en respuesta a un estímulo doloroso (Walker et al., 1999). Además, el tratamiento con WIN 55,212-2 en esta región cerebral inhibe la liberación de GABA de las terminales que expresan CB₁. Esta situación produce una desinhibición de los centros del tronco cerebral implicados en la supresión del dolor. Además, el SCE participa en la percepción del dolor a nivel espinal y en los terminales nerviosos periféricos.

1.7.3. Aprendizaje y memoria

La AEA y el 2-AG podrían participar en procesos de formación de la memoria (Stella et al., 1997). Ambos compuestos inhiben la "potenciación a largo plazo" en hipocampo mediante un mecanismo dependiente del receptor CB₁. En esta región cerebral existe una alta proporción de receptores para cannabinoides que se expresan en subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas y FAAH (Tsou et al., 1998; Mailloux y Vanderhaeghen, 1992). El sistema colinérgico septo-hipocampal, que es muy importante en los procesos de aprendizaje y memoria, podría encontrarse inhibido de modo tónico por los cannabinoides endógenos. Esta hipótesis se sustenta en que los cannabinoides exógenos inhiben la liberación de acetilcolina y el antagonista SR141716 es capaz de revertir esta inhibición e incluso, a concentraciones altas, incrementa la liberación de acetilcolina (Gifford y Ashby, 1996). Esto podría sentar las bases para la posible utilización de SR141716 o de algún otro antagonista del receptor CB₁ como agente terapéutico en el tratamiento de algunos déficits cognitivos.

1.7.4. Neuroprotección

Los agonistas cannabinoides pueden actuar como neuroprotectores en modelos de isquemia, excitotoxicidad y trauma cerebral (Mechoulam et al., 2002a; 2002b; van der Stelt et al., 2002). Además, los cannabinoides podrían ser útiles en el tratamiento de determinadas patologías que

cursan con excitotoxicidad como el Parkinson, Huntington y la esclerosis múltiple (Fernández-Ruiz et al., 2002). Por otro lado, los cannabinoides evitan la muerte de astrocitos y oligodendrocitos lo que podría redundar en el efecto neuroprotector de estos compuestos (Gómez del Pulgar et al., 2002; Molina-Holgado et al., 2002)

Los mecanismos que justifican las propiedades protectoras de los cannabinoides pueden ser diversos. Los daños cerebrales agudos pueden provocar la liberación de aminoácidos excitatorios como el glutamato que mediante su interacción con receptores NMDA inducen la entrada masiva de Ca^{2+} a la célula y con ello desencadenan la muerte neuronal por excitotoxicidad. En ese contexto, los endocannabinoides se liberarían en respuesta a esta entrada masiva de Ca^{2+} en la célula activando a los receptores CB_1 presinápticos de modo que disminuiría la liberación de glutamato y por ende el daño celular. De hecho se sabe que distintas situaciones de daño celular inducen un incremento en los niveles de endocannabinoides en diferentes órganos y tejidos (Hansen et al., 2000). Así, este incremento a nivel cerebral podría desempeñar un papel neuroprotector. El mecanismo protector podría deberse a la activación de la cascada PI3K (Molina-Holgado et al., 2002; Galve-Roperh et al., 2002; Gómez del Pulgar et al., 2002). Además, la presencia en los cannabinoides clásicos de grupos fenol les confiere propiedades antioxidantes que son independientes del receptor CB_1 (Marsicano et al., 2002).

En la actualidad se utiliza un cannabinoide que no se une a CB_1 , el dexanabinol (HU-211) en un ensayo clínico para el tratamiento del daño cerebral por traumatismos mecánicos y accidentes cardiovasculares (Knoller et al., 2002).

1.7.5. Efectos antiproliferativos

En contraste con su capacidad protectora de células no transformadas los cannabinoides son capaces de producir apoptosis en células transformadas en cultivo y promover la regresión de gliomas *in vivo* a través de un mecanismo que implica la acumulación de ceramida y la activación de quinasas (Galve-Roperh et al., 2000). Además, los cannabinoides inhiben la angiogénesis un proceso fundamental para el desarrollo de un tumor (Blázquez et al., 2003). Este efecto contribuiría a la acción antiproliferativa de los cannabinoides *in vivo* (Casanova et al., 2003). La acción antitumoral de los cannabinoides también se produce en células y tumores de órganos periféricos (mama, próstata, piel...) (Bifulco y Di Marzo, 2002; Ruiz et al., 1999; Casanova et al., 2003)

1.7.6. Control del desarrollo cerebral

La exposición a cannabinoides exógenos durante el desarrollo modifica la maduración de algunos sistema de neurotransmisión (Fernández-Ruiz et al., 1999). Por otro lado, el patrón de distribución de los diferentes elementos que constituyen el sistema cannabinoide endógeno como son el receptor CB_1 , AEA, 2-AG y la expresión de FAAH evoluciona a lo largo del desarrollo cerebral hasta su localización definitiva en el cerebro adulto (Berrendero et al., 1999). En el desarrollo se detecta de manera transitoria ARNm para CB_1 en regiones de proliferación de precursores neuronales y gliales. Esto sugiere que el SCE podría controlar la proliferación, migración, elongación axonal y la sinaptogénesis durante el desarrollo (Fernández-Ruiz et al., 2000)

1.7.7. Regulación neuroendocrina

Los cannabinoides modifican la secreción de hormonas adenohipofisarias. Así, la administración a roedores de Δ^9 -THC y otros cannabinoides naturales o sintéticos, disminuye la secreción de prolactina y gonadotropinas e incrementa la liberación de hormona adrenocorticotropa (Murphy et al., 1990a; Murphy et al., 1990b; Rodríguez de Fonseca et al., 1992; Manzanares et al., 1999b)

1.7.8. Aparito, temperatura corporal y emesis

Los receptores para cannabinoides y sus ligandos endógenos se encuentran localizados en regiones implicadas en el control de la temperatura corporal, aparato y la ingesta de comida (Di Marzo y cols., 2002). Así se ha propuesto que las capacidades hipotérmicas, antieméticas y orexígenas que exhiben los cannabinoides se basan en la capacidad de activar a los receptores CB_1 presentes en estas áreas (Di Marzo et al., 2001; Van Sickle et al., 2001). En la actualidad Sanofi Synthelabo realiza un ensayo clínico en humanos para el tratamiento de la obesidad con el antagonista SR141716 con resultados preliminares prometedores (Le Fur, 2003)

1.7.9. Reproducción

A la acción de los cannabinoides sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada a nivel hipotalámico cabe añadir una acción directa sobre los tejidos gonadales. De hecho, los receptores para cannabinoides se localizan en algunos órganos del sistema reproductor como los testículos y el útero, que además poseen la capacidad de sintetizar o degradar AEA. (Gérard et al., 1991; Galiègue et al., 1995, Paria y cols., 1996). La AEA que se sintetiza en el útero podría dirigir la elección del momento de la implantación del embrión ya que

los niveles de AEA con bajos cuando el útero es más receptivo a la implantación mientras que se encuentran elevados cuando el útero es menos receptivo a la implantación (Schmid et al., 1997). Además, el sistema cannabinoide endógeno podría regular la comunicación química entre el útero y el embrión, ya que en este último aparecen receptores CB₁ y CB₂ desde estados muy tempranos del desarrollo (Paria y cols., 2002; Fride y cols., 2002). Por otro lado, el sistema endocannabinoide se ha relacionado con el control de la espermatogénesis y la fertilidad masculina (Sugiura et al., 1996; Schuel et al., 2002). Así, la supresión de la función reproductiva por el tratamiento crónico con cannabinoides (Nahas et al., 2002) puede deberse a la acción de estos compuestos tanto a nivel hipotalámico como gonadal (Wenger et al., 2002; Maccarrone y cols., 2002; Schuel et al., 2002).

1.7.10. Regulación de la respuesta inmune

Distintas células del sistema inmune, como por ejemplo los linfocitos B, expresan los dos tipos de receptores para cannabinoides si bien los niveles de CB₁ son mucho menores que las de CB₂. El ARNm para CB₁ se ha detectado en esplenocitos, amígdala, en células mononucleares sanguíneas y en leucocitos polimorfonucleares (Klein et al., 1998).

La supresión en la producción de anticuerpos constituye el efecto más consistente que producen los cannabinoides sobre el sistema inmune. La AEA inhibe la proliferación de estas células e inducen su apoptosis. De hecho, los linfocitos B parecen ser más sensibles a la supresión por cannabinoides que los linfocitos T (Klein et al., 1985). La acción de los cannabinoides sobre la proliferación de linfocitos T no siempre produce la supresión de los mismos, por lo que parece que los cannabinoides actúan como inmunomoduladores (Luo et al., 1992; Pross et al., 1992). Por otro lado, los cannabinoides disminuyen la resistencia del huésped a la infección (Klein et al., 1993, 1994). Los ratones *knock-out* para el receptor CB₂ han permitido demostrar que la ausencia de este receptor no altera el desarrollo y diferenciación de los tejidos linfoides. Sin embargo, los cannabinoides no poseen propiedades inmunomoduladoras cuando se administran a estos animales lo que sugiere que el receptor CB₂ se encuentra implicado en el mecanismo de actuación de estos compuestos sobre el sistema inmune (Buckley et al., 2000).

Se ha descrito el posible papel regulador de la palmitoiletanolamida sobre la funcionalidad de los mastocitos (Facci et al., 1995). Estas células expresan el gen para el

receptor periférico CB₂, por lo que se ha postulado que la palmitoiletanolamida podría actuar como agonista endógeno para dicho receptor, produciendo efectos reguladores negativos sobre la activación de estas células aunque esta posibilidad aún no se ha confirmado. Este hecho justificaría la observación de que esta amida disminuye la inflamación tisular. Esta capacidad de regulación podría ser particularmente importante en las interacciones neuroinmunes, dado que los mastocitos son células que juegan un papel crítico en la regulación de la comunicación entre los sistemas nervioso e inmune (Leon et al., 1994). También se conoce la presencia de palmitoiletanolamida y de araquidoniletanolamida en macrófagos de ratón (Di Marzo et al., 1996). Estas amidas podrían actuar en estas células o salir al exterior para actuar sobre linfocitos y mastocitos vecinos, con lo que los macrófagos jugarían un papel coordinador en la comunicación química y la funcionalidad de las células sanguíneas durante las respuestas antiinflamatoria e inmune.

1.7.11. Control del sistema vascular

La AEA y algunos agonistas cannabinoides sintéticos inducen hipotensión (Högestätt et al., 2002). El receptor CB₁ parece estar implicado en acción hipotensora de la AEA (Varga et al., 1995), ya que este efecto se revertía por el antagonista SR141716 y desaparece en ratones *knock out* para CB₁. Sin embargo el mecanismo por el que la AEA induce sus efectos a nivel cardiovascular parece implicar también al receptor VR1 (Zygmunt et al., 1999). Además, se ha sugerido que la AEA induce hipotensión mediante la inhibición de la liberación de noradrenalina de los terminales nerviosos simpáticos en las vasos sanguíneos (Varga y cols., 1995; Wagner y cols., 1996). Por otra parte, el tratamiento con el endocannabinoide 2-AG también induce hipotensión aunque mediante un mecanismo independiente de receptor CB₁ (Jarai et al., 2000)

Se ha sugerido que el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), cuya estructura es una incógnita desde su descubrimiento (Mombouli y Vanhoutte, 1997), podría ser un endocannabinoide. La relajación inducida por el EDHF de la arteria mesentérica de la rata se bloquea por el SR141716. Además, se ha observado que la AEA es capaz de relajar esta arteria a través de un mecanismo hiperpolarizante (Randall et al., 1996). No obstante, existe controversia a este respecto (Plane y cols., 1998) y estudios llevados a cabo en arterias hepáticas y mesentéricas de rata (White y Hiley, 1997; Zygmunt et al., 1997) han puesto de manifiesto tanto diferencias como acciones farmacológicas comunes en los efectos hipotensores de la AEA y del EDHF.

II. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO: IMPLICACIÓN EN LOS MECANISMOS DE RECOMPENSA CEREBRAL

Los derivados del *Cannabis* se encuentran entre las drogas de abuso cuyo consumo está más extendido entre la población humana. Sin embargo, la capacidad de estas sustancias para producir dependencia en humanos es un tema controvertido. En la actualidad se dispone de modelos experimentales en animales para determinar su capacidad adictiva y evaluar el desarrollo de dependencia a cannabinoides. Los estudios de autoadministración de drogas nos proporcionan información sobre el poder reforzante de este tipo de compuestos. El Δ^9 -THC no se autoadministra por los animales de experimentación. Sin embargo, los roedores se autoadministran cannabinoides sintéticos que presentan características farmacocinéticas particulares. Por otro lado, los cannabinoides producen aversión en estudios de condicionamiento preferencial al sitio aunque algunas condiciones experimentales permiten evidenciar comportamientos de preferencia de plaza. Estos modelos han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos neurobiológicos que subyacen a los efectos farmacológicos de los cannabinoides en los que el SCE parece tener una implicación importante.

2.1. CANNABINOIDES Y CIRCUITO DE RECOMPENSA CEREBRAL

La historia de la Psicología está repleta de elucubraciones acerca de los sustratos cerebrales en los que residen los sistemas de recompensa y placer. Los conocimientos en este campo avanzaron considerablemente con el descubrimiento de Olds y Milner de la autoestimulación eléctrica cerebral (Olds y Milner, 1954) y con las ulteriores investigaciones neurofisiológicas, anatómicas y neuroquímicas. Las áreas que constituyen el sistema límbico son las zonas donde el estímulo eléctrico produce este tipo de comportamiento más fácilmente. En rata, por ejemplo, las áreas cuya activación produce fenómenos de autoestimulación son las siguientes: bulbo olfatorio, septum, amígdala, núcleo accumbens, hipocampo, corteza entorrinal y prefrontal, hipotálamo lateral y, en general, todo el fascículo medial desde la banda diagonal de Broca hasta el área ventrotegmental de Tsai. Las neuronas de estas áreas están interconectadas entre sí formando circuitos específicos de recompensa (Fig. 10). Estos circuitos cerebrales que codifican el placer y la recompensa son indispensables para la supervivencia del individuo y de su especie. De hecho, la satisfacción de ciertas necesidades biológicas, como la ingesta de alimentos y de agua y la actividad sexual, se

encuentran ligadas íntimamente a la consecución de recompensas.

El área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens son los denominados centros de recompensa. La dopamina se considera el neurotransmisor principal de las respuestas del sistema de recompensa aunque también se encuentran implicados otros neurotransmisores como la serotonina, el glutamato, la acetilcolina y los péptidos opiodes (Koob et al., 1992; Koob et al., 1998). En lo que se refiere al sistema cannabinoide endógeno, determinados estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* evidencian niveles bajos e incluso ausencia del receptor CB₁ en el núcleo accumbens y en VTA. Sin embargo, otras regiones cerebrales como la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala, que inervan de manera importante al núcleo accumbens, presentan niveles de moderados a altos del receptor CB₁. Esto sugiere al menos una implicación indirecta del sistema cannabinoide endógeno en la modulación de la ruta dopaminérgica mesocorticolímbica que podría ser la responsable de las acciones de los cannabinoides en los procesos de refuerzo y otras respuestas motivacionales.

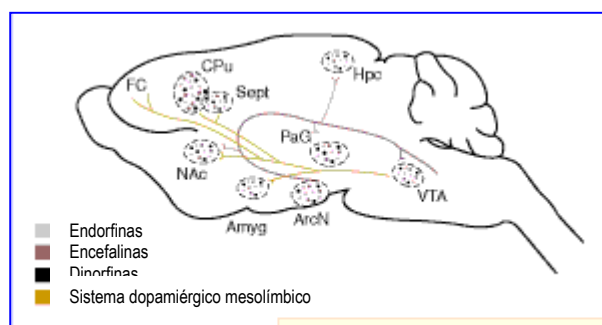


Fig. 10: Principales circuitos neuronales implicados en los fenómenos de recompensa

La mayoría de las drogas de abuso activan la neuronas dopaminérgicas de la VTA. Esta activación es parte del proceso neuroadaptativo que engloba los cambios que se producen en el sistema nervioso central (regulación de receptores, alteraciones en los canales de calcio voltaje-dependientes, modificaciones en la expresión de determinados genes, etc.) como resultado del consumo de una droga. El tratamiento agudo con cannabinoides produce la activación de este sistema dopaminérgico (Gardner et al., 1988; Tanda et al., 1997; French et al., 1997). Este efecto no se debe a la activación directa de las neuronas dopaminérgicas ya que estas neuronas no expresan receptor CB₁, sino a la acción de los cannabinoides sobre los terminales glutamatérgicos y/o GABAérgicos que inervan al núcleo accumbens y al VTA. Estos terminales contienen

receptores CB₁ presinápticos cuya activación por cannabinoides conduce a la regulación de la liberación de glutamato y/o GABA (Schlicker et al., 2001).

Durante la abstinencia, la falta de la sustancia conduce al sistema nervioso central a una nueva neuroadaptación que produce efectos contrarios a los que se producen con el tratamiento agudo con la droga (Koob et al., 1996). El síndrome de abstinencia a diferentes drogas produce aumentos en los niveles extracelulares de CRF (Rodríguez de Fonseca et al., 1997) en diversos núcleos del sistema límbico junto con una inhibición de la actividad dopaminérgica mesolímbica (Diana et al., 1998). La abstinencia a cannabinoides incrementa la liberación de CRF y la inmunoreactividad de Fos en el núcleo central de la amígdala (Rodríguez de Fonseca et al., 1997). Por otra parte, la dopamina disminuye en la corteza del núcleo accumbens (Diana et al., 1998). Además, la abstinencia a cannabinoides se relaciona con cambios compensatorios en la ruta del AMPc (Hutchinson et al., 1998).

2.2. POTENCIAL ADICTIVO DE LOS CANNABINOIDES

La adicción es un fenómeno biológico y psicosocial propio de los seres humanos. Sin embargo, los animales de experimentación también son susceptibles de sufrir adicción. El estudio de la dependencia física o psicológica a un compuesto en humanos no es una tarea sencilla. Existen una serie de fenómenos sociales y legales que influyen en el consumidor y además, la mayoría de los consumidores no se autoadministran una única droga (Staines et al., 2001). Por este motivo, es muy importante el desarrollo de modelos animales que nos permitan evaluar este tipo de conductas. Los conceptos de recompensa, motivación y refuerzo son difíciles de estudiar desde una perspectiva neurobiológica ya que estos términos se definen de modo operativo. Un refuerzo se podría definir como cualquier suceso que incrementa la probabilidad de respuesta. Los fenómenos de recompensa se definen frecuentemente de modo similar pero se introducen matices afectivos positivos como por ejemplo el placer. (citas)

2.2.1. Refuerzo inducido por cannabinoides

Los animales se autoadministran drogas de modo oral o intravenoso. Además, los compuestos que se autoadministran los animales se correlacionan con aquellos que presentan un elevado potencial de abuso en humanos (Deneau et al., 1964). Por otro lado, el comportamiento de autoadministración de drogas sigue las mismas pautas que se dan con otros reforzantes como la comida, el agua o el

sexo. Las propiedades reforzantes de una droga se manifiestan por el esfuerzo que desarrollan los animales de experimentación para conseguirla, como por ejemplo, presionando varias veces una palanca para conseguir una inyección intravenosa de la droga. De este modo, parece lógico que la autoadministración de drogas se considere un índice de la capacidad potencial de un determinado compuesto para producir dependencia psicológica y por lo tanto, de susceptibilidad para producir abuso en humanos. No existen demasiados trabajos en los que se evidencien claramente comportamientos de autoadministración de cannabinoides. Los animales de experimentación no se autoadministran Δ^9 -THC, salvo que previamente se autoadministran cocaína (Mansbach et al., 1994). Estos resultados sugieren que, al menos este cannabinoide, posee una capacidad limitada para producir dependencia. A este respecto existen diferencias entre los cannabinoides naturales y sintéticos. De hecho, los roedores si adquieren pautas de autoadministración de WIN 55,512-2 (Martellota et al., 1998) y CP55,940 (Baird et al., 2001) aunque estos compuestos poseen características farmacocinéticas o potenciales farmacológicos diferentes a los del Δ^9 -THC.

Otro paradigma experimental que se utiliza para el estudio del refuerzo inducido por cannabinoides es el condicionamiento preferencial al sitio (Schechter et al., 1993). En este modelo se establecen asociaciones entre determinados ambientes y las acciones motivacionales agudas de una droga. Los animales de experimentación reciben una droga repetidamente en un compartimento de una caja de dos compartimentos que se comunican entre sí. Posteriormente, se sitúa a la rata sin droga en la caja y se determina el tiempo que pasa en el compartimento de la droga respecto al compartimento control que es del mismo tamaño pero con características diferentes de textura y color. Normalmente las ratas prefieren el compartimento de droga frente al comportamiento control cuando se ensayan compuestos a los que los seres humanos se vuelven adictos. El Δ^9 -THC y agonistas cannabinoides sintéticos producen aversión de plaza (Sañudo-Peña et al., 1997; Chaperon et al., 1998). Las propiedades aversivas de estos compuestos se manifiesta de modo más evidente cuando se utilizan dosis altas (Lepore et al., 1995). En cambio, cuando las dosis son bajas, se consigue eliminar este componente aversivo cuando los animales se someten a una exposición a la droga previa al condicionamiento (Valjent et al., 2000). Los estudios de preferencia de plaza presentan la ventaja de poner a prueba a los sujetos sin droga lo que significa que no se confunde la medida del valor del incentivo de un compuesto con otros efectos que la droga pudiera tener sobre la conducta.

Las propiedades reforzantes del Δ^9 -THC se manifiestan cuando se administra de forma aguda ya que disminuye la autoestimulación eléctrica intracraneal (Gardner et al., 1988; Lepore et al., 1996). Aunque existen diferencias entre las distintas cepas estudiadas en los que se refiere a la magnitud del efecto reforzante de los cannabinoides.

2.2.2. Dependencia a cannabinoides

Para muchas de las drogas de abuso el desarrollo de tolerancia transcurre en paralelo al desarrollo de dependencia. Esto significa que la tolerancia nos podría proporcionar una evidencia indirecta sobre la capacidad de una sustancia para producir abstinencia cuando se deja de consumir. En algunos casos la severidad del síndrome de abstinencia se correlaciona bien con el grado de desarrollo de tolerancia. La administración crónica de cannabinoides conduce al desarrollo de tolerancia para la mayor parte de sus respuestas farmacológicas (Hutchenson et al., 1998; Martin et al., 1985; Abood et al., 1992). Estos fenómenos de tolerancia tienen una base fundamentalmente farmacodinámica, como refleja la reducción significativa, aunque variable según regiones cerebrales, de la densidad, afinidad y/o eficacia de los receptores CB₁ tras un tratamiento crónico con agonistas cannabinoides (Oviedo et al., 1993; Rodríguez de Fonseca et al., 1994; Romero et al., 1995, Romero et al., 1997). Existen algunas variaciones en el grado, tiempo de inicio y distribución regional de estas reducciones que son atribuibles al empleo de diferentes tipos de cannabinoides (con diferentes afinidades y /o potenciales farmacológicos), dosis y tipos de tratamiento. A pesar de la capacidad de los cannabinoides para producir tolerancia, la capacidad de los derivados del cannabis para producir dependencia en humanos es un tema que genera controversia. Algunos autores apoyan la tesis de que los derivados del cannabis no son capaces de producir dependencia física ni, por lo tanto, la aparición de un síndrome de abstinencia en humanos, mientras otros describen algunos síntomas de abstinencia en consumidores de preparaciones concentradas de cannabinoides como irritabilidad, insomnio, anorexia, náuseas y otros aunque fueron de menor intensidad si las comparamos con la sintomatología de la abstinencia a otras drogas de abuso (Budney et al., 2001). La dificultad para evaluar estos fenómenos radica en los problemas para encontrar modelos experimentales en animales validados tanto en lo referente al fenómeno de refuerzo inducido por cannabinoides como al posible desarrollo de dependencia física. Esto se debe, entre otras razones, a las características farmacocinéticas de este tipo de moléculas.

Existen diferentes estrategias para evidenciar la capacidad de un determinado compuesto para producir dependencia. Probablemente, el procedimiento que reproduce mejor los fenómenos que tienen lugar durante el consumo humano consiste en una exposición continuada a la droga e interrupción del tratamiento seguido de observación en el animal de pautas comportamentales asociadas a fenómenos de abstinencia. Los estudios llevados a cabo en animales de experimentación con Δ^9 -THC no proporcionan evidencias sólidas en lo que se refiere a la capacidad de los cannabinoides para producir dependencia. De hecho, no se observan síntomas de abstinencia física de modo espontáneo cuando se interrumpe un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (Diana et al., 1998; Aceto et al., 1996). Únicamente cuando se utilizan dosis extremadamente altas del cannabinoide y se interrumpe el tratamiento se producen una serie de pautas somáticas y/o neurovegetativas que podrían ser atribuibles al desarrollo de un síndrome de abstinencia. Sin embargo, no está claro que éste se deba realmente a la presencia de un síndrome de abstinencia a cannabinoides porque el tratamiento con Δ^9 -THC no es capaz de revertir completamente estas pautas (Abood et al., 1992). Uno de los problemas a la hora de evaluar el síndrome de abstinencia a cannabinoides consiste en que realmente las pautas comportamentales en animales no son reproducibles totalmente entre laboratorios. Así, mientras que como hemos apuntado anteriormente, algunos autores describen la dependencia a Δ^9 -THC otros no observan pautas propias de abstinencia cuando los roedores dejan de recibir una dosis diaria de este cannabinoide (Maldonado, 2002).

Como ya hemos comentado anteriormente, desde el aislamiento y caracterización de los cannabinoides naturales se ha abordado el desarrollo de análogos cannabinomiméticos que carezcan de los efectos psicoactivos indeseables y mantengan características farmacológicas potencialmente útiles para el tratamiento de diversas patologías en las que podría estar implicado el sistema cannabinoide endógeno. Sin embargo, algunos de ellos evidencian mayor capacidad para producir adicción que los cannabinoides naturales. Por lo tanto, los cannabinoides sintéticos nos sirven como herramienta farmacológica para el estudio de la dependencia a cannabinoides. En general, la interrupción de un tratamiento crónico con agonistas sintéticos como el WIN 55,512-2 produce un síndrome de abstinencia espontáneo (Aceto et al., 2001; Oliva et al 2003). Las diferencias en la farmacocinética entre análogos sintéticos y los cannabinoides naturales podrían explicar las diferencias en cuanto a su capacidad para producir

abstinencia. De hecho, la vida media del WIN 55,512-2 es menor que la del Δ^9 -THC lo que podría producir una disminución rápida en los niveles plasmáticos de WIN 55,512-2 cuando se interrumpe el tratamiento que no tiene lugar en el caso de la administración crónica de Δ^9 -THC ya que se trata de un compuesto cuyas características lipofílicas le hacen permanecer por más tiempo en el organismo almacenado en tejido adiposo.

Por otro lado, el desarrollo del antagonista específico para el receptor CB₁, el SR141716 (Rinaldi-Carmona et al., 1994), ha permitido el desarrollo de modelos experimentales en animales para el estudio del síndrome de abstinencia a cannabinoides (mimetizando lo que ocurre tras la administración de naloxona a animales tolerantes a morfina (Frenois et al., 2002)). El bloqueo de los receptores CB₁ por la administración aguda de SR141716 en animales sometidos a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC es capaz de producir alteraciones comportamentales relacionadas con una situación de "abstinencia farmacológica" (Aceto et al., 1996; Tsou et al., 1995). En roedores este síndrome se caracteriza por la presencia de un gran número de manifestaciones somáticas principalmente pautas motoras (Lichtman et al., 1998). Las dosis que se requieren para inducir dependencia en roedores son muy altas (van de los 10 a los 100 mg/kg) (Hutcheson et al., 1998; Aceto et al., 1996; Aceto et al., 2001) y en ningún caso comparables con las dosis consumidas por los humanos. Además, las manifestaciones somáticas que se producen en este modelo experimental podrían ser debidas a un efecto del SR141716 *per se* más que a una sintomatología derivada de la dependencia a cannabinoides dadas las propiedades de esta molécula como agonista inverso (Pertwee y cols., 1997). En cualquier caso, este es el modelo más utilizado para el estudio del posible desarrollo de abstinencia a cannabinoides en animales de experimentación.

Como ya hemos comentado, disponemos de animales modificados genéticamente que carecen de determinados genes. De hecho, los ratones mutantes que carecen del receptor CB₁ constituyen una herramienta fundamental en el estudio de las funciones fisiológicas en las que se encuentra implicado este receptor (Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 1999) (Cuadro 3). Los estudios realizados en animales *knock-out* para el receptor CB₁ implican a este receptor en las manifestaciones somáticas de la abstinencia ya que el antagonista SR141716 no es capaz de inducir abstinencia en estos animales (Ledent et al., 1999). Además, estudios recientes en los que se utilizan ratones *knock out* implican al sistema opioide endógeno en la expresión somática de la abstinencia a cannabinoides. Así, el síndrome de abstinencia

a cannabinoides inducido por SR141716 es menos severo en ratos *knock out* para el gen de preproencefalina (Valverde et al., 2000). Además, se ha estudiado la abstinencia producida por SR141716 en animales tratados de forma crónica con THC en ratones *knock out* para distintos receptores opioides (Zimmer et al., 2001).

III. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO Y DEPENDENCIA A DROGAS DE ABUSO

El SCE podría funcionar como modulador de los sistemas de recompensa cerebral. De este modo, la actividad endocannabinoide además de verse afectada por el consumo crónico de cannabinoides también lo podría ser por el de otras drogas. A continuación, analizaremos lo que se sabe acerca de las interacciones de diferentes drogas de abuso, cuyo consumo se encuentra muy extendido entre la población humana, con diferentes elementos del SCE.

3.1. ALCOHOL Y SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Determinados procesos neuroadaptativos a diferentes niveles dentro de la neurotransmisión endocannabinoide podrían ser relevantes en el desarrollo de tolerancia y dependencia a etanol (Basavarajappa et al., 2002). De hecho, la distribución anatómica de los diferentes elementos que constituyen el sistema cannabinoide endógeno es consistente con algunos de los efectos comportamentales que induce el etanol. Se ha descrito la presencia de neurotransmisión endocannabinoide en tálamo, hipocampo y corteza, así como, en el estriado, sustancia nigra y cerebelo. Este hecho, apoya la participación del sistema cannabinoide endógeno en procesos cognitivos y en respuestas motoras. Por otra parte, el consumo de etanol produce alteraciones motoras y en la memoria, así como antinocicepción e hipotermia. Además, se ha descrito la existencia de tolerancia cruzada entre el Δ^9 -THC y el etanol (Da Silva et al., 2001). Ambas drogas poseen características comunes en lo referente a su farmacología: a dosis bajas producen euforia y estimulación, mientras que a dosis altas tienen efectos sedantes.

En los últimos años, se ha profundizado en el estudio de la implicación del sistema endocannabinoide en los efectos del etanol. La exposición crónica a este compuesto en mamíferos induce la acumulación de esteroides de ácidos grasos en varios órganos y tejidos, entre ellos el cerebro (Hungund et al., 1988). El descubrimiento de la AEA impulsó a los investigadores a examinar el efecto del tratamiento con etanol en su síntesis. En estudios *in vitro* utilizando células SK-N-SH o neuronas granulares de cerebelo se demostró

que la exposición crónica a etanol da lugar a un incremento en la acumulación de AEA y 2-AG (Basavarajappa et al., 1999). En ratones, la exposición crónica a etanol disminuye el número de receptores CB₁ sin producir cambios en la afinidad (Basavarajappa et al., 1998a). El consumo crónico de etanol afecta también a la funcionalidad del receptor ya que se produce una disminución de la unión de GTP inducida por el agonista cannabinoide CP55,940 en membranas de ratón (Basavarajappa et al., 1999). Esta disminución es similar a la que se produce después de un tratamiento crónico con Δ^9 -THC, CP55,540 y AEA. Este conjunto de resultados experimentales sugiere que la disminución en la densidad de receptor CB₁ que se produce después del tratamiento crónico con etanol puede deberse a una sobreestimulación de los receptores a través de un incremento en la síntesis de AEA. Si bien cabe la posibilidad de que el etanol altere la densidad y función del receptor CB₁ debido al efecto directo que este compuesto ejerce sobre los lípidos de membrana.

Otro aspecto importante que hay que tener en cuenta en los estudios sobre adicción es el papel que juegan los factores genéticos en la predisposición hacia el consumo excesivo de una droga. Se han desarrollado diferentes cepas de roedores que presentan preferencia o aversión por el etanol. Estas cepas constituyen una herramienta muy interesante para el estudio de las bases bioquímicas de la adicción alcohólica a nivel del sistema nervioso central. La cepa de ratones C57BL/6 presenta preferencia por el etanol mientras que el etanol genera aversión en la cepa DBA/2. En los ratones con alta preferencia por el etanol se observa menor número de receptores CB₁ que los que se dan en animales para los que el etanol tiene propiedades aversivas (Hungund et al., 2000). Además, los receptores CB₁ presentes en animales que no consumen etanol son menos eficaces que los que tienen animales que prefieren etanol (Basavarajappa et al., 2001). En el ser humano también se ha evidenciado una relación entre la genética y el alcoholismo que implica a elementos del SCE. En concreto, existe una frecuencia mayor de aparición de un polimorfismo para el receptor CB₁, en particular en alcohólicos con abstinencia severa (Schmidt et al., 2002) o en aquellos que tenían antecedentes de síndrome infantil de déficit de atención/hiperactividad (Ponce et al., 2003). Estas observaciones son compatibles con la idea de que los humanos portadores de este polimorfismo podrían resultar más vulnerables al alcohol y a otras drogas de abuso como han sugerido Comings y colaboradores (Comings et al., 1997)

Por otro lado, estudios farmacológicos sugieren que el sistema cannabinoide endógeno podría participar en el

mecanismo de refuerzo positivo inducido por el etanol. En este sentido, se sabe que el tratamiento con el antagonista SR141716 disminuye la ingesta voluntaria de etanol en ratones C57BL/6 (Arnone et al., 1997) y también en ratas con preferencia por el consumo de etanol (Colombo et al., 1998). La eficacia del SR141716 se evidencia también cuando se evalúa en cepas de rata sin predisposición genética por etanol (Lallemant et al., 2001). Además, de estos estudios se deduce que la implicación del receptor CB₁ en la preferencia por etanol podría ser diferente en función de la fase del proceso de alcoholización en la que se encuentre el animal. Así, si el SR141716 se administra durante el proceso de alcoholización crónica se produce un incremento en la preferencia por el etanol mientras que, si se administra después de la alcoholización, la preferencia por etanol se ve disminuida. (Lallemant et al., 2001). Por otro lado, la administración de un agonista cannabinoide el CP55,940 incrementa la motivación por el consumo de alcohol en rata (Gallate et al., 1999). Este conjunto de evidencias experimentales sugieren que el mecanismo de señalización constituido por AEA-receptor CB₁ se encuentra implicado en los efectos farmacológicos y comportamentales que induce el etanol.

3.2. COCAÍNA Y SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Existen pocos estudios moleculares en los que se hayan caracterizado las interacciones que se producen entre la cocaína y los cannabinoides pero si disponemos de algunos estudios farmacológicos que evidencian esta interacción. En humanos, el consumo de una dosis de marihuana previa a la autoadministración de cocaína incrementa la sensación de euforia y eleva los niveles plasmáticos de cocaína sobre los que se alcanzan en ausencia de marihuana (Lukas et al., 1994). La inyección aguda de HU210, uno de los agonistas cannabinoides más potentes produce una inhibición dosis-dependiente de la actividad locomotora inducida por la administración aguda o subcrónica de cocaína, en ratas (Ferrari et al., 1999). Además, cuando se inyecta de modo crónico CP55,940, un agonista cannabinoide menos potente que el HU210, la cocaína es incapaz de producir la hiperactividad locomotora que caracteriza al tratamiento con esta droga (Arnold et al., 1998). Cuando la cocaína y el CP55,940 se administran a la vez, se reduce significativamente la hiperactividad locomotora producida por la cocaína pero, sin embargo, no se bloquea la sensibilización a este comportamiento que se produce tras la administración continua de cocaína (Arnold et al., 1998). Estos resultados sugieren que los cannabinoides modulan los efectos psicomotores que induce la cocaína aunque no

participarían en los mecanismos que conducen a la sensibilización del animal.

Por otro lado, los cannabinoides podrían estar implicados en el establecimiento de la conducta de condicionamiento preferente, ya que el antagonista cannabinoide SR141716 bloquea la adquisición de la denominada "localización preferencial" que la cocaína induce en ratas (Chaperon et al., 1998) de modo que la neurotransmisión endocannabinoide podría estar asociada al circuito de recompensa a cocaína. Esta hipótesis se corrobora por el hecho de que el pretratamiento con WIN 55,212-2 produce una disminución forma dosis-dependiente la autoadministración de cocaína en ratas. Este efecto, además, se revierte con el tratamiento con SR141716 lo que evidencia, de nuevo, la participación del receptor CB₁ en el proceso (Fattore et al., 1999). No obstante, estudios llevados a cabo en ratones CB₁^{-/-} nos proporcionan resultados contradictorios puesto que la cocaína es capaz de inducir condicionamiento de plaza en estos animales (Martin et al., 2000)

En otro orden de cosas, la adicción a drogas transcurre a través de ciclos recurrentes de remisión y recaída que se disparan cuando los adictos abstinentes se enfrentan a recuerdos sobre sus hábitos de abuso o a situaciones de estrés. A este respecto, se sabe que el tratamiento con HU210 conduce a la recaída en el comportamiento de búsqueda compulsiva de cocaína después de periodos prolongados de abstinencia mientras que, el SR141716 atenúa las recaídas asociadas a hábitos de consumo pero no aquellas asociadas a estrés (De Vries et al., 2001).

3.3. OPIOIDES Y SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Las interacciones farmacológicas entre los sistemas opioide y cannabinoide han sido estudiadas ampliamente (Manzanares et al., 1999a). Sin embargo, los mecanismos que subyacen a estas interacciones aún no están claros. Algunos autores defienden la hipótesis de que cannabinoides y opioides comparten mecanismos moleculares de acción, y en esa coincidencia residirían sus interacciones farmacológicas. Para muchos de estos efectos farmacológicos, se han observado fenómenos de tolerancia cruzada y potenciación entre opioides y cannabinoides. Esto ha suscitado en los últimos años un interés creciente por conocer las posibles interacciones entre ambos sistemas, especialmente a nivel de antinocicepción y fenómenos de refuerzo (Manzanares et al., 1999).

Se ha propuesto que el consumo crónico de cannabinoides podría alterar el estado basal del sistema opioide endógeno,

aumentando así la susceptibilidad a la adicción opiácea. Los cannabinoides activan al sistema dopaminérgico mesolímbico, componente importante del llamado sistema de recompensa (Tanda et al., 1997). Este efecto, es común al de otras drogas de abuso de tipo opioide como la heroína y podría estar mediado por una vía común en ambos casos, en la que estaría implicado el receptor μ_1 . Esta hipótesis concuerda con el hecho de que antagonistas opioides, a dosis que no tienen efectos *per se*, pueden bloquear, al menos parcialmente, algunos de los efectos de Δ^9 -THC sobre el sistema de recompensa (Chen et al., 1990; Gardner et al., 1991). Sin embargo, otros autores no han sido capaces de revertir la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA utilizando antagonistas opioides como naloxona (French et al., 1997), aunque sí utilizando antagonistas para el receptor CB₁ como SR141716.

Ya hemos mencionado que la administración de SR141716 a animales tolerantes a Δ^9 -THC, desencadena síntomas de abstinencia (Tsou et al., 1995; Aceto et al., 1995; Hutchenson et al., 1998), de modo similar a los que produce naloxona sobre animales dependientes de morfina, pero de menor magnitud. Pero mucho más llamativo es el hecho de que animales tolerantes a Δ^9 -THC, desarrollen síntomas de abstinencia tipo opioide tras la administración aguda de naloxona (Kaymakcanlan et al., 1977). Esto sugiere que el consumo crónico de cannabinoides puede alterar significativamente la neurotransmisión opioidérgica.

Los efectos de los cannabinoides sobre el sistema opioide endógeno, se han constatado también en modelos de desarrollo. Ratas expuestas a Δ^9 -THC durante periodos críticos de su desarrollo cerebral, mostraron también síndrome de abstinencia inducido por naloxona a edades inmaduras (Vela et al., 1995). Cuando estos mismos animales alcanzaban la edad adulta, se observaba mayor susceptibilidad a las propiedades reforzantes de la morfina, puestas de manifiesto mediante test de autoadministración o de preferencia de lugar (Vela et al., 1998; Rubio et al., 1998). Este efecto reforzante era diferente en función del sexo de los animales y sólo se observaba en modelos de refuerzo de baja exigencia (razón fija en modelos de autoadministración) ya que desaparecía cuando se obligaba al animal a trabajar más para obtener la droga (razón progresiva) (González et al., 2003). Además, se observó una mayor densidad de receptor opioide μ en áreas relacionadas con refuerzo de drogas (Vela et al., 1998). En cuanto a los niveles de expresión de péptidos opioides endógenos se produce una reducción de la expresión de proencefalina tras la exposición a Δ^9 -THC en ciertas regiones cerebrales (Corchero et al., 1998).

Los ratones *knock-out* para el receptor CB₁ han servido de herramienta para el estudio de las interacciones de las interacciones de los opioides con el SCE. Así, la ausencia del receptor CB₁ no afecta a la aparición de los síntomas agudos de morfina, pero sí algunos derivados de su uso crónico como son la tolerancia, dependencia y severidad del síndrome de abstinencia, que tienden a disminuir (Ledent et al., 1999). Por otro lado, en ratones dependientes de morfina, ya se había visto atenuación del síndrome de abstinencia mediante tratamiento con Δ^9 -THC o agonistas cannabinoides endógenos como la AEA (Vela et al., 1995). Esto puede tener implicaciones clínicas en el sentido de que la manipulación farmacológica del SCE podría atenuar el síndrome de abstinencia en algunos drogodependientes (Hollister et al., 1986)

3.4. NICOTINA Y SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Los efectos farmacológicos y comportamentales tanto del Δ^9 -THC como de la nicotina se conocen bastante bien. Sin embargo, a pesar de la costumbre, ampliamente extendida de consumir marihuana mezclada con tabaco, las posibles interacciones entre ambas no han sido muy estudiadas. La nicotina y los cannabinoides afectan a determinadas funciones del sistema nervioso central aunque habitualmente

lo hacen en sentido opuesto. Además, algunas áreas cerebrales con elevada densidad de receptor CB₁ contienen receptores nicotínicos de forma que se podrían producir interacciones funcionales entre ambos sistemas. Se han evaluado las consecuencias de la administración de nicotina sobre las respuestas bioquímicas y comportamentales del tratamiento con agudo Δ^9 -THC y sobre la tolerancia y la abstinencia (Valjent et al., 2002). En lo que se refiere a los efectos agudos; la nicotina potencia la hipotermia, antinocicepción e hipolocomoción inducida por la administración aguda de Δ^9 -THC. Por otro lado, animales tratados con nicotina y Δ^9 -THC simultáneamente presentan una atenuación de la tolerancia a Δ^9 -THC y un incremento en las manifestaciones somáticas de la abstinencia inducida por el antagonista SR141716. Además, Δ^9 -THC y nicotina incrementan la expresión de c-fos en diferentes estructuras cerebrales. En ratones *knock-out* para el receptor CB₁ también se ha estudiado la respuesta a nicotina (Castañé et al., 2002). El efecto reforzante de la nicotina evaluado mediante el test de preferencia de plaza desaparece en estos animales. Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto a la magnitud del síndrome de abstinencia a nicotina.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Considerando todos los antecedentes descritos a lo largo de la Introducción, esta tesis doctoral pretende, como objetivo global, evaluar el papel que desempeña el sistema cannabinoide endógeno en la adicción a drogas de abuso. Para ello nos planteamos dos objetivos básicos. El primero consiste en **evaluar la posible existencia de mecanismos de dependencia a cannabinoides similares a los descritos para otras drogas de abuso**. El interés que generan los cannabinoides en relación a su posible uso terapéutico en determinadas patologías ha incrementado el debate acerca de los problemas de salud resultantes del su consumo prolongado. En este sentido, es importante determinar si el consumo crónico de cannabinoides induce el desarrollo de fenómenos de tolerancia. La relevancia de este tipo de análisis radica en que ha de tenerse en cuenta a la hora de diseñar los protocolos de tratamiento que deberían seguir los pacientes si, finalmente, los cannabinoides se utilizan como agentes terapéuticos en ensayos clínicos. Además, es necesario determinar en que medida el desarrollo de tolerancia a cannabinoides conlleva la aparición de dependencia física con manifestaciones de abstinencia comparables a las que producen otras drogas cuando se abandona su consumo crónico, con objeto de evaluar tanto las consecuencias de la interrupción del tratamiento a largo plazo con agentes cannabinomiméticos de una patología, como los peligros de salud reales derivados del uso lúdico. A este respecto y como se ha comentado a lo largo de la introducción, los cannabinoides naturales no inducen un síndrome de abstinencia espontáneo cuando se interrumpe su consumo crónico en animales de experimentación. Sin embargo, si se han descrito pautas comportamentales indicativas de abstinencia tras el tratamiento crónico con algunos agonistas sintéticos. Por este motivo, es necesario realizar este tipo de análisis en modelos animales de abstinencia farmacológica, de modo que un objetivo adicional sería proporcionar herramientas para el estudio de estas funciones en animales de experimentación. Otro de los focos de estudio que ha generado una gran controversia es la posibilidad de que el consumo de cannabinoides favorezca el consumo de drogas con mayor poder adictivo. A ese respecto, existen evidencias de que el consumo de heroína, tabaco y alcohol es más habitual en individuos consumidores de cannabis. Sin embargo, las conclusiones que se obtienen en estos trabajos se basan en estudios de correlación y no en causación por lo que son necesarias ulteriores investigaciones en este ámbito. Para abordar este primer objetivo se propusieron los siguientes objetivos parciales:

- Utilizar un modelo de tratamiento crónico con Δ^9 -THC que produzca tolerancia farmacológica.
- Confirmar la disminución de la densidad de receptor CB_1 en diversas regiones cerebrales y evaluar los niveles de ligandos endógenos.
- Inducir un síndrome de abstinencia experimental mediante una dosis aguda del antagonista SR141716 tras este tratamiento crónico con Δ^9 -THC y examinar las consecuencias comportamentales, endocrinas y/o moleculares que pudieran producirse para evaluar similitudes con el síndrome de abstinencia a otras drogas de abuso.
- Examinar en animales tolerantes a Δ^9 -THC la capacidad reforzante de la morfina en estudios de autoadministración y eventualmente, determinar la relación con cambios en la neurotransmisión dopaminérgica en regiones implicadas en el refuerzo.

El segundo objetivo básico de esta tesis doctoral consiste en **establecer desde un punto de vista bioquímico y/o farmacológico la implicación del sistema cannabinoide endógeno en la dependencia a drogas de abuso diferentes del cannabis**. El papel de la ruta mesocorticolímbica en el consumo compulsivo de drogas se comprende sólo parcialmente. En este sentido, la elucidación de los sistemas de neurotransmisión que interaccionan con esta vía dopaminérgica constituye una cuestión clave para la comprensión de los mecanismos de refuerzo y la búsqueda de futuras dianas farmacológicas para el tratamiento de la drogadicción. Ya hemos comentado que la localización anatómica del receptor CB_1 sugiere una implicación indirecta del sistema cannabinoide endógeno en la modulación de la ruta dopaminérgica mesocorticolímbica que podría ser la responsable de las acciones de los cannabinoides en los procesos de refuerzo y respuestas motivacionales pero que también podría afectar a la capacidad reforzante de otras drogas de abuso. Si esto es así, cabría esperar que la exposición crónica a diferentes drogas de abuso afectara a la actividad endocannabinoide sobre todo en las regiones cerebrales implicadas en la adicción. Asimismo, la manipulación farmacológica del sistema cannabinoide endógeno podría ser efectiva en lo que se refiere a la atenuación del comportamiento de búsqueda compulsiva de una droga como sugieren algunos estudios.

Para la consecución de este segundo objetivo básico se plantearon los siguientes objetivos parciales.

- Desarrollar modelos descritos en la literatura para la generación de dependencia a alcohol, cocaína, morfina y nicotina.
- Analizar los cambios en los receptores CB_1 y en los niveles de endocannabinoides que se producen en

estos modelos en regiones cerebrales directa o indirectamente relacionados con la adicción a drogas.

- Examinar en el caso de la dependencia alcohólica los cambios del SCE a lo largo del proceso adictivo para esta droga, esto es: alcoholización, abstinencia y preferencia.
- Evaluar el efecto de la manipulación farmacológica del SCE en la ingesta de alcohol.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

2. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

- 2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL I: Estudio de las modificaciones en la neurotransmisión endocannabinoide tras la exposición prolongada a cannabinoides
- 2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL II: Análisis de las alteraciones bioquímicas, endocrinas y moleculares que se producen en un modelo de abstinencia experimental a cannabinoides
- 2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL III: Estudio del posible papel iniciador de los cannabinoides en el consumo de otras drogas de abuso
- 2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL IV: Estudio comparativo de los cambios que produce la exposición prolongada a drogas de abuso sobre la neurotransmisión cannabinoide
- 2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL V: Estudio del sistema cannabinoide endógeno durante el proceso de alcoholización en rata
- 2.6. DISEÑO EXPERIMENTAL VI: Estudio de las repercusiones de la manipulación farmacológica del SCE sobre la ingesta de alcohol.

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

- 3.1. **Determinación de parámetros comportamentales**
 - 3.1.1. Análisis de actividad locomotora: prueba del campo abierto
 - 3.1.2. Autoadministración de morfina
- 3.2. **Determinación de parámetros bioquímicos mediante HPLC**
 - 3.2.1. Preparación de los tejidos
 - 3.2.2. Valoración de contenidos de DA y DOPAC
 - 3.2.3. Valoración de actividad TH
 - 3.2.4. Valoración de contenidos de GABA
 - 3.2.5. Valoración de actividad GAD
- 3.3. **Determinación de unión específica al receptor CB1 mediante autorradiografía**
- 3.4. **Determinación de unión específica al receptor CB₁ en fracción de membrana**
 - 3.4.1. Obtención de la fracciones de membrana
 - 3.4.2. Ensayo de unión a receptor CB₁ con [³H]-CP 55,940
- 3.5. **Análisis de la funcionalidad del receptor CB1 mediante la cuantificación de la unión de [³⁵S]GTPγS estimulada por WIN 55,212-2**
- 3.6. **Determinación de los niveles de endocannabinoides mediante GS/ MS**
 - 3.6.1. Metodología del laboratorio del Dr. Di Marzo
 - 3.6.2. Metodología del laboratorio del Dr. Smith
- 3.7. **Cuantificación de ARNm mediante hibridación *in situ***
 - 3.71. Determinación de los niveles de ARNm del receptor CB₁
 - 3.72. Determinación de los niveles de ARNm de PENK, CRF y c-fos
- 3.8. **Determinación de los niveles de PRL mediante RIA**
- 3.9. **Determinación de los niveles de corticosterona mediante RIA**

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En todos los experimentos realizados se utilizaron ratas adultas (> 8 semanas, 250 ± 25 g de peso) de la cepa Wistar. Los animales se mantuvieron siempre bajo condiciones constantes de fotoperíodo, temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad. En todo momento tuvieron libre acceso a comida estándar (Panlab) y agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo la normativa europea (directiva 86/609/EEC)

2. DISEÑOS EXPERIMENTALES

2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL I: Estudio de las modificaciones en la neurotransmisión endocannabinoide tras la exposición prolongada a cannabinoides.

Como hemos mencionado anteriormente, la administración crónica de cannabinoides conduce al desarrollo de tolerancia a la mayor parte de sus respuestas farmacológicas. Se ha propuesto que la tolerancia podría ser metabólica. En este sentido, se sabe que los niveles plasmáticos de Δ^9 -THC determinados en animales sometidos a un tratamiento crónico con este cannabinoide se reducen de forma significativa comparados con los niveles de Δ^9 -THC evaluados tras una administración aguda (Rodríguez de Fonseca et al., 1991). Además, Δ^9 -THC induce la actividad del citocromo P450 hepático, un complejo multienzimático implicado en el metabolismo de diferentes xenobióticos entre ellos las drogas de abuso (Borheim et al., 1994; Costa et al., 1996)

Sin embargo, en la actualidad se considera que la tolerancia farmacológica a los cannabinoides tiene una base fundamentalmente farmacodinámica. De hecho, el tratamiento crónico con cannabinoides induce la reducción de la densidad, afinidad y/o eficacia de los receptores para cannabinoides presentes en las regiones cerebrales implicadas en los efectos farmacológicas de los cannabinoides (Oviedo et al., 1993; Romero et al., 1995, 1997). A este respecto, existen algunas variaciones en el grado, tiempo de inicio y distribución regional de estas modificaciones que son atribuibles al empleo de diferentes tipos de cannabinoides (con diferentes afinidades y/o potenciales farmacológicos), dosis y tipos de tratamiento, pero en todos los casos la evidencia apunta a una pérdida significativa, aunque variable según regiones cerebrales, de los receptores CB_1 .

En cualquier caso, los estudios encaminados a evaluar las alteraciones que produce el consumo crónico de cannabinoides se han focalizado en los receptores, fundamentalmente el subtipo CB_1 (Maldonado et al., 2002). Sin embargo, las modificaciones que el tratamiento crónico con cannabinoides podría inducir en los ligandos endógenos que activan estos receptores, no se habían estudiado. Por lo tanto, en nuestro grupo de investigación nos propusimos evaluar las posibles alteraciones en los niveles de ligandos endógenos, concretamente AEA y 2-AG que se pudieran producir como consecuencia del tratamiento crónico con cannabinoides. Para ello, se diseñó un experimento en el que se desarrollaron animales tolerantes a Δ^9 -THC (según el protocolo descrito en Romero et al., 1998).

Dosis: 10 mg/kg de peso del animal
Vehículo: Tween 80-salino
Vía de administración: i.p.
Duración del tratamiento: 8 días

Los animales se sacrificaron por decapitación transcurridas 2 horas de la última inyección. Se extrajeron sus cerebros y se diseccionaron las siguientes áreas cerebrales: cerebelo, tallo cerebral, diencefalo, hipocampo, caudado-putamen, Límbico anterior (que contiene tubérculos olfatorios, núcleos límbicos rostrales, núcleo accumbens, núcleos del septo, y parte de los núcleos amigdaloides anteriores) y corteza cerebral. Inmediatamente las muestras se sometieron a un proceso de extracción lipídica tal y como se detalla en el apartado de *metodología experimental* para proceder a la determinación de los niveles de AEA y 2-AG mediante GS/MS. Las muestras para el análisis del unión específica CB_1 y funcionalidad del receptor en fracción de membrana se congelaron a -70°C hasta su análisis.

2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL II: Análisis de las alteraciones bioquímicas, endocrinas y moleculares que se producen en un modelo de abstinencia experimental a cannabinoides.

Ya hemos comentado como la interrupción de la exposición crónica una droga de abuso produce una serie de respuestas derivadas de las adaptaciones neuroquímicas en distintos sistemas de neurotransmisión dentro del circuito de refuerzo mesocorticolímbico y en otras regiones implicadas en la adicción. Sin embargo, en el caso de los cannabinoides, a pesar de la capacidad de estas sustancias para producir tolerancia, la capacidad de los derivados del *cannabis* para producir dependencia en humanos es un tema que genera controversia (Maldonado y Rodríguez de Fonseca., 2002; Budney et al., 2002).

En nuestro caso nos planteamos profundizar en el estudio de las características de la abstinencia a cannabinoides en animales de experimentación utilizando un modelo en el que evaluar la aparición de signos indicativos de la misma. Para ello, examinamos parámetros bioquímicos, comportamentales y moleculares que se relacionan con el desarrollo del síndrome de abstinencia a otras drogas de abuso (Koob, 1999; Hyman y Malenka, 2001). La exposición continuada a drogas de abuso puede producir adaptaciones neuronales en sistemas neuronales implicados en la respuesta de estrés incluidos el CRF hipotalámico y extrahipotalámico (Koob, 1999). De hecho, el síndrome de abstinencia a distintas drogas, como opioides, psicoestimulantes y etanol produce un aumento importante en los niveles extracelulares de CRF en el sistema mesocorticolímbico (Sarnyai et al., 2001). Por este motivo evaluamos en nuestro modelo los niveles de expresión de CRF mediante hibridación *in situ*. Existe abundante bibliografía que relaciona al sistema opioide en la dependencia a cannabinoides (Martin et al., 2000; Gohazlan et al., 2002; Castañé et al., 2003) motivo por el cual determinamos la expresión del gen de proencefalina en nuestro modelo experimental mediante hibridación *in situ*. Además, se analizó la expresión de c-fos que puede servir como marcador de la activación neuronal. Por otro lado, se sabe que las hormonas de estrés se ven alteradas por el abuso de drogas de modo que evaluamos los niveles plasmáticos de PRL y corticosterona (Pickworth et al., 1998; Zorrilla et al., 2001). Por otro lado, se evaluó el comportamiento de los animales mediante una prueba de campo abierto que nos permite determinar la actividad locomotora y las conductas estereotipadas puesto que la abstinencia a cannabinoides se caracteriza por alteraciones comportamentales fundamentalmente de naturaleza motora (Aceto et al., 1995; Tsou et al., 1995; Hutchenson et al., 1998; Cook et al., 1998; Rubino et al., 1998).

El síndrome de abstinencia a cannabinoides se induce de forma experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ en ratas tolerantes a Δ^9 -THC. Así, ratas macho adultas de 250 g de peso se sometieron a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC igual al descrito en el apartado 2.1. El 8º día de tratamiento una parte de los animales se sacrificaron por decapitación transcurridos 20 minutos de la última inyección. Se extrajeron sus cerebros y se mantuvieron a -70°C hasta su análisis. En secciones cerebrales procedentes de dichas muestras se determinaron los niveles de unión específica a receptor CB₁ utilizando una técnica autorradiográfica con [³H]-CP55,940 a fin de corroborar el desarrollo de tolerancia en nuestro modelo. El resto de los animales recibieron 10 minutos después de la dosis de Δ^9 -THC del 8º día una

inyección del antagonista CB₁ SR141716A (10mg/kg) o vehículo (Tween 80-.salino). Transcurridos 10 minutos de este tratamiento se analizó el comportamiento motor de estos animales en un test de campo abierto para evaluar su comportamiento. La prueba comportamental se prolongó durante 10 minutos. A continuación, los animales se sacrificaron por decapitación y se recogieron las siguientes muestras:

- a. Sangre que se recogió en tubos con EDTA al 6% y se centrifugaron para extraer y congelar el plasma sanguíneo. Se mantuvieron a -40°C hasta su utilización en la determinación de los niveles de prolactina y corticosterona mediante RIA.
- b. Cerebros: En una parte se diseccionaron diferentes áreas cerebrales (cerebelo, tallo cerebral, diencefalo, hipocampo, caudado-putamen, límbico anterior y corteza cerebral) para la extracción lipídica y posterior valoración de los niveles de endocannabinoides por GS/MS. El resto se congelaron a -70°C hasta la obtención de las secciones sobre las que se realizaron diferentes técnicas autorradiográficas (Unión específica de [³H]-CP55,940 e hibridación *in situ* de ARNm para el receptor CB₁, c-fos y PENK).

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL III: Estudio del posible papel iniciador de los cannabinoides en el consumo de otras drogas de abuso

Otro tema controvertido es la capacidad del consumo crónico de marihuana en humanos como iniciadora en el consumo de otras drogas con mayor poder adictivo. Para examinar esta posibilidad en animales de experimentación nos propusimos evaluar el efecto del tratamiento crónico con Δ^9 -THC en la capacidad de las ratas para apreciar las propiedades reforzantes de la morfina. El protocolo experimental consistió en un tratamiento con Δ^9 -THC (5mg/kg)¹ o vehículo (Tween-salino) por vía i.p. durante una semana. (¹Para este grupo de experimentos se eligió una dosis de 5 mg/kg en lugar de la de 10 mg/kg para minimizar las posibles repercusiones que de la inhibición motora que inducen los cannabinoides pudiera tener en los animales al analizar sus pautas de autoadministración de morfina) Parte de los animales se sacrificaron por decapitación y sus cerebros se mantuvieron a -70°C hasta el análisis de la unión específica a receptor CB₁ para corroborar la regulación a la baja indicativa del desarrollo de tolerancia farmacológica. Asimismo, se evaluaron los contenidos de DA y de su metabolito intraneuronal DOPAC, en áreas límbicas

y motoras que están implicados en la fase incentiva de la adicción a opiáceos. En otro grupo de animales sometidos a este mismo protocolo de tratamiento crónico con Δ^9 -THC se evaluó la autoadministración de morfina en un paradigma de razón progresiva durante un periodo de 15 días. Después de este estudio los animales se sacrificaron por decapitación y sus cerebros se congelaron a -70°C hasta el análisis de los niveles de catecolaminas mediante HPLC en regiones límbicas y motoras mediante HPLC.

2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL IV: Estudio comparativo de los cambios que produce la exposición prolongada a diversas drogas de abuso sobre la neurotransmisión endocannabinoide

Ya hemos mencionado que el SCE podría formar parte de los sustratos neurobiológicos implicados en la adicción a drogas de abuso. Si asumimos esta hipótesis, cabría esperar modificaciones en distintos elementos del sistema cannabinoide endógeno en diversas regiones cerebrales (que se encuentran implicadas especialmente en la adicción) durante la exposición crónica a drogas de abuso. Así, en el siguiente diseño experimental nos propusimos realizar el análisis descriptivo de las modificaciones que induce el tratamiento crónico con distintas drogas sobre el receptor CB_1 (niveles de expresión de ARNm mediante hibridación in situ y unión específica a CB_1 mediante autorradiografía con CP55, 940) y los niveles AEA y 2-AG que se evaluaron mediante GS/MS. El protocolo de tratamiento se detalla a continuación:

COCAÍNA (Giorgetti y Zhdanova, 2000)

Dosis: 15 mg/kg de peso del animal

Vehículo: suero salino

Vía de administración: i.p.

Duración del tratamiento: 2 inyecciones diarias durante 10 días.

Sacrificio: 2 horas tras la última inyección

ALCOHOL (Uzbay et al., 2000)

Los animales de experimentación se colocaron en jaulas individuales en las que los animales disponían de libre acceso a su dieta líquida. En este caso los animales estuvieron en ciclo invertido para evaluar el consumo en el momento de máxima actividad.

Dosis: 7,2 % de etanol en el agua de bebida *ad libitum*. (se cambiaba todos los días a las 10:00 a.m.)

Vehículo: agua

Vía de administración: oral

Duración del tratamiento: 2 semanas.

Sacrificio: día 15 de tratamiento a las 10:00 a.m.

MORFINA (Fuentealba et al., 2000)

Dosis: se aumentan diariamente debido al desarrollo de tolerancia que se produce muy rápidamente, (10 y 10 mg/kg; 20 y 20 mg/kg; 40 y 40 mg/kg, 60 y 60 mg/kg, 80 y 80 mg/kg y día 6 100 mg/kg)

Vehículo: suero salino

Vía de administración: subcutánea.

Duración del tratamiento: 6 días

Sacrificio: 2 horas tras la última inyección.

NICOTINA (Miksys et al., 2000)

Dosis: 1 mg/kg nicotina base (Sigma, Madrid, España)

Vehículo: suero salino

Vía de administración: s.c.

Duración del tratamiento: 7 días

Sacrificio: 2 horas tras la última inyección

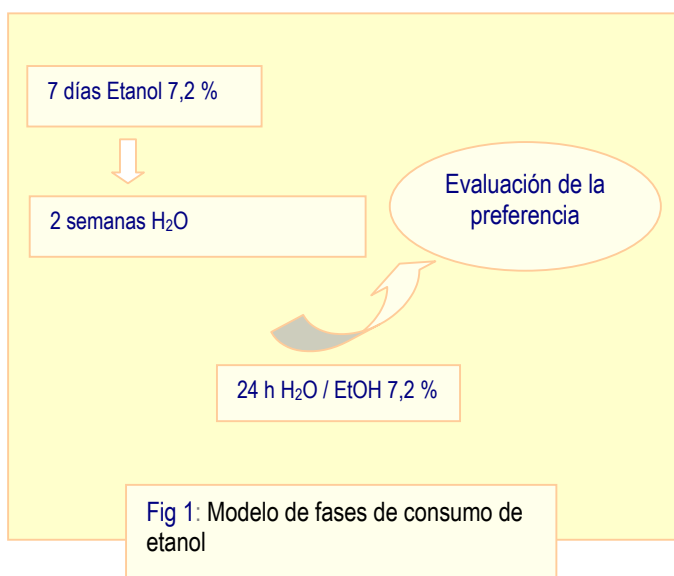
La morfina y la cocaína nos fueron suministradas gratuitamente por el Servicio de Restricción de Estupefacientes, Agencia española del medicamento, Ministerio de Sanidad).

En todos los casos, los animales se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron sus cerebros y se diseccionaron las siguientes áreas cerebrales: cerebelo, tallo cerebral, diencefalo, hipocampo, caudado-putamen, límbico anterior (que contiene tubérculos olfatorios, núcleos límbicos rostrales, núcleo accumbens, núcleos del septo, y parte de los núcleos amigdaloides anteriores) y corteza cerebral. Inmediatamente las muestras se sometieron a un proceso de extracción lipídica tal y como se detalla en el apartado de *metodología experimental* para proceder a la determinación de los niveles de AEA y 2-AG mediante GS/MS¹ (Las muestras procedentes del tratamiento crónico con morfina se analizaron en el laboratorio del Dr. Schmid, el resto fueron valoradas en el laboratorio del Dr. Di Marzo). Las muestras para el análisis del unión específica CB_1 y expresión de ARNm para CB_1 se congelaron a -70°C hasta su análisis.

2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL V: ESTUDIO DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO DURANTE EL PROCESO DE ALCOHOLIZACIÓN EN RATA

Como se ha mencionado en la introducción, existen diversos estudios farmacológicos que sugieren que el bloqueo de los receptores CB_1 con el antagonista SR141716 es capaz de disminuir la ingesta de alcohol (Colombo et al., 1998), lo que podría tener mucho interés de cara al tratamiento del alcoholismo. Sin embargo, un estudio reciente de Lallermand

y colaboradores (2001) demostró que los efectos sobre la ingesta de etanol del SR141716 varían en función de la fase de la adicción alcohólica (alcoholización forzada, abstinencia, libre preferencia o consumo voluntario) en la que se administre. Por este motivo, nos planteamos realizar un estudio complementario al realizado en el modelo de exposición crónica a etanol que se detalla en el apartado anterior. En este estudio evaluamos el estado de la transmisión endocannabinoide mediante el análisis de los receptores receptor CB_1 (niveles de expresión de ARNm mediante hibridación *in situ* y unión específica a CB_1 mediante autorradiografía con $[^3H]$ -CP55,940) y los niveles endocannabinoides a lo largo de las diferentes fases del proceso de alcoholización. El protocolo experimental (Fig. 1) consistió en un periodo de 7 días en los que los animales sólo disponían para beber de una disolución de 7,2% de etanol en agua *ad libitum*. Una vez transcurrido este tiempo los animales se sometieron a un periodo de abstinencia en el que únicamente disponían de agua para beber. La abstinencia se prolongó durante 2 semanas. A continuación, los animales pasaron a una situación de consumo voluntario en la que podían elegir para beber entre agua y una disolución que contenía 7,2% de etanol. A las 24 horas de iniciada esta última etapa se evaluó la preferencia por el etanol que presentaba cada animal. Los animales controles para las 3 fases tuvieron acceso sólo a agua en su dieta líquida y se presentan escogidos de modo aleatorio como un único grupo control.



Los tiempos a los que se sacrificaron los animales se resumen a continuación:

- Animales sujetos a un consumo forzado de etanol: Se sacrificaron tras 7 días en los que dispone para

beber de una disolución que contenía 7,2% de etanol

- Animales abstinentes a etanol: Se sacrificaron transcurridas 48 h desde la sustitución de la disolución de etanol por agua.
- Animales con consumo voluntario de etanol: después de dos semanas de abstinencia a los animales se les permite elegir para beber entre agua y una disolución con etanol al 7,2%. A las 24 horas se evalúa la preferencia y los animales se sacrifican.

Los animales se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron sus cerebros y se diseccionaron el mesencéfalo y el límbico anterior (que contiene tubérculos olfatorios, núcleos límbicos rostrales, núcleo accumbens, núcleos del septo, y parte de los núcleos amigdaloides anteriores) y corteza cerebral. Inmediatamente las muestras se sometieron a un proceso de extracción lipídica tal y como se detalla en el apartado de *metodología experimental* para proceder a la determinación de los niveles de AEA y 2-AG mediante GS/MS. Las muestras para el análisis de unión específica CB_1 y expresión de ARNm para CB_1 se congelaron a $-70^{\circ}C$ hasta su análisis.

2.6. DISEÑO EXPERIMENTAL VI: Estudio de las repercusiones de la manipulación farmacológica del SCE sobre la ingesta de alcohol.

Ya hemos comentado que la localización anatómica del receptor CB_1 sugiere una implicación del SCE en la modulación de la ruta dopaminérgica mesocorticolímbica que podría ser la responsable de las acciones de los cannabinoides en los procesos de refuerzo y respuestas motivacionales. De modo que la manipulación farmacológica del SCE podría modificar el comportamiento de búsqueda compulsiva de una droga. En este sentido quisimos determinar las consecuencias del tratamiento con agonistas y antagonistas de este sistema sobre la ingesta de etanol. Para ello utilizamos un protocolo de trabajo similar al descrito en el diseño experimental V. Los animales se sometieron a un proceso de alcoholización y abstinencia. A continuación se les permitió elegir entre agua o una disolución de etanol al 7,2% para beber. La preferencia por etanol (% volumen de disolución de etanol consumida respecto al consumo total de dieta líquida) se determinó a las 24 horas. Los animales se agruparon en los diferentes grupos experimentales de modo que la variabilidad individual en cuanto a la preferencia por etanol no afectara al experimento.

En ese momento recibieron una única dosis de los siguientes compuestos.

Vehículo: Tween 80-salino vía i.p.
 Δ^9 -THC: Dosis: 3mg/kg, vía i.p.
 Δ^9 -THC: Dosis: 3mg/kg + **SR141716** Dosis: 3mg/kg; vía i.p.
SR141716: Dosis: 3 mg/kg, vía i.p.
CP55,940: Dosis: 0,1 mg/kg; vía i.p.
CP55,940: Dosis: 0,1 mg/kg + **SR 141716** Dosis: 3 mg/kg; vía i.p.

El consumo de dieta líquida se determinó a la 6 horas del tratamiento farmacológico y los animales se sacrificaron en ese momento. Los cerebros de estos animales se extrajeron y se mantuvieron a -70 °C. En estas muestras se determinaron, mediante HPLC, los niveles de catecolaminas y GABA así como la valoración de las enzimas limitantes de la síntesis de estos neurotransmisores: actividad tiroxina hidroxilasa y actividad glutámico descarboxilasa.

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.1.DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS COMPORTAMENTALES

3.1.1. Análisis de actividad locomotora: prueba del campo abierto

La actividad locomotora se evalúa en un tablero de agujeros mediante la prueba del campo abierto. Esta prueba permite la evaluación simultánea de la actividad locomotora y las conductas estereotipadas. Consiste en un recinto compuesto de una base (50 x 50 cm) rodeada de una barrera de 40 cm de altura. El tablero se divide en 25 recuadros (10 x 10 cm). En el centro del tablero existen 4 agujeros de 25mm de diámetro que se permite que los animales introduzcan en ellos su cabeza para explorar. Los animales se colocan en el centro del recinto y su conducta se grabó con una videocámara para su análisis posterior. Cada vez que se analiza un animal se procede a la limpieza del recinto con una solución de ácido acético diluido para hacer constante la influencia olfativa en el siguiente animal.

Mediante la visualización de las grabaciones se llevó a cabo la cuantificación de los siguientes parámetros comportamentales por investigadores que no tenían conocimiento del tratamiento al que había sido sometido el animal.:

- i. Actividad locomotora espontánea (ambulación) que se define como el número de cruces de un sector a otro. Se consideró como cruce el hecho de que la rata colocase las cuatro patas en un sector adyacente al que estuviese anteriormente.
- ii. Frecuencia de comportamientos estereotipados que incluyen (autoacicalamiento, oteo, sacudidas...)
- iii. Tiempo de inactividad del animal

3.1.2. Autoadministración de morfina

Los estudios de autoadministración se realizaron en colaboración con el grupo del Dr Emilio Ambrosio en el Departamento de Psicobiología de la UNED siguiendo el procedimiento descrito previamente por estos investigadores (Ambrosio et al., 1999). Estos estudios se llevaron a cabo en cámaras operantes (Coulburn Instruments, USA) que se caracterizan por tener dos palancas alejadas 14 cm de la parte frontal de la cámara y que están diseñadas para registrar una respuesta si se aplican sobre ellas al menos 3.0 g de fuerza. Para el suministro de la droga o solución salina vía i.v se utilizó una bomba de inyección microlitométrica (Harvard 22, USA). Tanto el control de suministro de droga o comida como la recogida y almacenamiento de los datos se realizó mediante el acoplamiento de un sistema informático de IBM (Med Associates, USA)

Adquisición del comportamiento de autoadministración de morfina

En primer lugar a los animales se les implanta un catéter i.v. en la vena yugular mediante cirugía. Para ello, tras anestesiarse al animal con Ketamina y diazepam se les introdujo un tubo de polivinilcloruro (0,064 mm de diámetro interno) en la vena yugular derecha aproximadamente a la altura del atro. El otro extremo del catéter se introdujo subcutáneamente haciéndole salir por la región escapular media y pasar a través de un dispositivo (Alice King Chatham, USA) que a su vez se fijó sobre el cráneo de la rata con cemento dental. Tras implantar el catéter, los animales se estabulan individualmente y se les permite al menos una semana de recuperación.

El análisis de la adquisición de la conducta de autoadministración de morfina se realizó mediante un sistema de razón progresiva (RP) se llevó a cabo del siguiente modo: Se coloca al animal en una cámara operante durante un período de 15 días. En este protocolo, el número de presiones sobre la palanca de la cámara que se requieren

para obtener un refuerzo se incrementa sucesivamente. Cuando el animal completaba la demanda de la RP ejerciendo presión sobre la palanca del lado izquierdo de la cámara producía, por un lado, la aparición de un estímulo luminoso sobre dicha palanca y, por otro, la administración a la rata de una dosis de 1 mg/kg de sulfato de morfina. Las presiones sobre la palanca derecha se registraban pero no tenían programada ninguna consecuencia. El suministro de la droga se realizaba en un volumen de inyección de 90-115 μ l, dependiendo del peso del animal, y durante un intervalo de tiempo de 15 s. Tras la administración de la droga se dejaban 30 segundos de descanso durante los cuales las respuestas del animal no tenían consecuencias (PF1: a 30s). Las ratas tuvieron acceso a la droga 12 horas al día durante el ciclo de oscuridad del fotoperíodo. La comida y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* y se mantuvo un ciclo constante de 12 horas luz blanca /oscuridad.

3.2.DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS NEUROQUÍMICOS MEDIANTE HPLC

La concentración de catecolaminas y GABA así como la actividad enzimática de las respectivas enzimas limitantes de su formación se determinaron mediante HPLC acoplado a detección electroquímica (cuadros 1 y 2)

3.2.1. Preparación de los tejidos

Se extraen los cerebros inmediatamente después del sacrificio del animal y se almacenan a -70°C hasta su análisis.

El día del análisis se diseccionan las siguientes áreas cerebrales: Caudado-putamen (Cpu), N. Accumbens (NA), área tegmental ventral (VTA) y Sustancia Nigra (SN).

Las muestras correspondientes a las diferentes áreas se homogeneizan en frío por sonicación en tampón fosfato potásico 150 mM, pH 6.8. El volumen de resuspensión varía en función del área estudiada según la tabla siguiente:

Tejido	Volumen (μ l)
CPu	1300
NA	190
VTA	215
SN	190

3.2.2. Valoración de contenidos de DA y DOPAC

Una alícuota de los homogeneizados se diluye (1/2) con una disolución de ácido perclórico 0,4 N que contiene bisulfito sódico 0.5 mM, EDTA 0.45 mM y una concentración conocida de dihidroxibencilamina (DHBA) (50 ng/ml) como estándar interno para la determinación de catecolaminas y β -aminobutirato (BABA) 10 μ g/ml que servirá como estándar interno para la determinación de GABA. Las muestras así preparadas se centrifugaron durante 2 minutos a 10000g y el sobrenadante se inyecta en el sistema de HPLC. Para calibrar el sistema previamente se inyectó un estándar externo constituido por NE/ DHBA/ DA/ DOPAC 25 ng/ml en PCA 0.2 N. La concentración de DA y DOPAC en las muestras se calculó por comparación con el área correspondiente al estándar interno (DHBA) considerando a la vez la diferencia de respuesta de cada molécula en el detector electroquímico.

3.2.3. Valoración de la actividad TH

La actividad de TH se determinó según el procedimiento descrito por Nagatsu et al., 1979, con algunas modificaciones introducidas en el laboratorio (González et al., 1999). Una alícuota del homogenizado de tejido se incubó a 37°C durante 30 minutos en 0.1 M acetato sódico conteniendo 6-metil-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina 1 nM (preparada en una solución 1M de β -mercaptoetanol), catalasa 0.1 mg/ml y L-tirosina 0.2 mM. El blanco de incubación se realizó sustituyendo la L-tirosina por D-tirosina. Además, se preparó un estándar interno para cada muestra que contenía L-DOPA 1 mM en un tubo con los mismos componentes que el blanco de incubación.

En resumen, para cada tejido se prepararon los siguientes tubos:

Test: con L-tirosina, en el que se determinó la producción total de L-DOPA

Blanco: con D-tirosina en el que se evaluó la producción de L-DOPA a partir de la L-tirosina endógena

Estándar interno. Con D-tirosina y L-DOPA en el que se determina la recuperación del producto enzimático

La reacción se detiene con una solución de ácido perclórico 0.4N que contenía bisulfito sódico 0.5 mM y EDTA 0.45 mM. Además se añade una concentración conocida de DHBA (50 ng/ml) que se utilizó como estándar interno en el proceso de determinación de la concentración de L-DOPA formado en cada muestra. Los tubos se centrifugan durante 2 minutos a 10000 g. A continuación, las muestras se someten a un procedimiento de extracción con alúmina activada según el

procedimiento descrito por Anton y Sayre (1962). Este procedimiento se basa en la capacidad de la alúmina para retener de modo específico las catecolaminas por interacciones con los dos grupos hidroxilos en posición 3 y 4 del anillo bencénico de éstas. De este modo se eliminan las interferencias que produce la L-tirosina en exceso de la reacción enzimática en la detección electroquímica del L-DOPA. Después de la extracción, las muestras se almacenan a -40°C hasta su inyección en el sistema de HPLC.

Cuadro 1: Elementos del sistema de HPLC para la determinación de catecolaminas y actividad TH

El sistema de HPLC para la determinación de catecolaminas y actividad TH presenta los siguientes elementos

1. Bomba isocrática (Spectra-Physics modelo 8700 XR) acoplada a un inyector para 20 μl de muestra.
2. Columna de fase reversa (RP-18) de 12,5 cm de longitud, 4mm de diámetro y 5 μm de tamaño de partículas (Spherisorb ODS2)
3. Fase móvil: Ácido Cítrico (100mM), Acetato sódico (100mM), EDTA (1 mM), Metanol 6-8%, Sulfonato de heptano (1.2 mM) pH 3,9. Esta fase móvil se prepara con H_2O milliQ y se filtra (a través de filtro de 0,22 μm). El flujo de trabajo es 0,8 ml/min.
4. El eluyente se monitoriza mediante un sistema analítico de detección coulométrica (ESA Coulochem, modelo 5100 A) utilizando un procedimiento de oxidación-reducción (célula previa: +360 mV; célula analítica 1: + 50 mV; célula analítica 2: - 340 mV)
5. la señal procedente de la célula analítica 2 se recoge y analiza con ayuda de un integrador-registrador (spectra-Physic, modelo 4290)

La concentración de L-DOPA en las diferentes muestras se calculó por comparación con el área correspondiente a su estándar interno (DHBA) considerando a su vez la diferencia de respuesta de cada molécula en el detector.

3.2.4. Valoración de contenidos de GABA

Para el análisis de GABA una alícuota del sobrenadante que se utiliza para la determinación de catecolaminas se neutraliza con NaOH 0.1 N. Dado que los aminoácidos no dan señal en el detector electroquímico para el análisis de GABA se requiere una reacción previa de derivatización. Cualquier molécula que posea grupos amino primarios es susceptible de sufrir esta reacción de derivatización (Jacobs et al., 1987). La derivatización se realiza mediante la adición a cada una de las muestras de reactivo OPA-sulfito (1/10). Este reactivo está compuesto por o-ftaldehído 14.9 mM, sulfito sódico 45.4 mM y etanol 4.5% en tampón borato 0.327 M, pH 10,4. Transcurridos 10 minutos, se inyectan 20 μl de la mezcla de reacción en el HPLC. Para calibrar el sistema previamente se inyectó un estándar externo constituido por GABA 5 $\mu\text{g/ml}$ y BABA $\mu\text{g/ml}$ en PCA 0.2 N.

3.2.5. Valoración de la actividad glutámico descarboxilasa

El protocolo seguido es el descrito por Nicoletti et al. (1985). Una alícuota del homogeneizado se diluye con tampón fosfato potásico 150 mM, pH 6,8 (dil. $\frac{1}{4}$ para NA y SN; dil. $\frac{1}{2}$ para Cpu y VTA). La preparación de la mezcla de reacción se realizó en frío la siguiente forma.

Blancos: a 50 μl de homogeneizado diluido se añaden 50 μl de PCA 0,4 N con 15 $\mu\text{g/ml}$ de BABA y 50 μl de una disolución que contiene L-glutamato 32 mM y piridoxal fosfato 1,5 mM en tampón fosfato potásico.

Test: a 50 μl de homogeneizado diluido se añaden 50 μl de la solución de L-glutamato 32 mM y piridoxal fosfato 1,5 mM en tampón fosfato potásico.

La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C . La reacción se detiene mediante la precipitación de proteínas por la adición a los tubos test de 50 μl de PCA 0,5 N con 15 $\mu\text{g/ml}$ de BABA como estándar interno. A continuación se centrifugan todos los tubos durante 2 minutos a 6000g. Para la derivatización del GABA las muestras se neutralizaron con NaOH 0.065N. Las muestras se derivatizan con reactivo OPA sulfito, tal y como se detalla en el apartado anterior, para su valoración en el sistema de HPLC.

El sistema de HPLC para la determinación de GABA y actividad GAD presenta los siguientes elementos

1. bomba isocrática (Spectra-Physics modelo 8700 XR) acoplada a un inyector para 20 μ l de muestra.
2. Columna de fase reversa (RP-18) de 12,5 cm de longitud, 4,6 mm de diámetro y 5 μ m de tamaño de partículas (Spherisorb ODS 2)
3. Fase móvil: NaH_2PO_4 0,06 M; EDTA 0,06 mM y metanol 20-30% pH 4,4. flujo de trabajo es 0,8 ml/min.
4. El eluyente se monitoriza mediante un sistema analítico de detección amperométrica (Metrohm, modelo 641 VA) utilizando un procedimiento de oxidación (voltaje: 850 mV; sensibilidad: 50 nA)
5. la señal procedente de la célula analítica se recoge y analiza con ayuda de un integrador-registrador (spectra-Physic, modelo 4290)

La concentración de GABA se determina mediante la comparación con el área correspondiente a un estándar interno (BABA) teniendo en cuenta diferencia de respuesta de cada molécula en el detector.

Cuadro 2. Elementos del sistema de HPLC para la determinación de GABA y actividad GAD

3.3. DETERMINACIÓN DE UNIÓN ESPECÍFICA PARA EL RECEPTOR CB_1 MEDIANTE AUTORADIOGRAFÍA.

Se cortaron secciones cerebrales transversales de 20 μ m de espesor a -20°C y se montaron mediante descongelación sobre portaobjetos previamente gelatinizados y libres de ARNasas. Se secaron a 30°C y se mantienen a -80°C hasta el momento del análisis. Las secciones cerebrales correspondieron a los niveles 12, 21, 25, 28, 38 y 58 según el atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1986). Secciones adyacentes a las utilizadas en estos estudios se tiñeron con violeta de cresilo para una mejor localización de las estructuras a analizar.

El método empleado es básicamente el descrito por Herkenham et al., (1991). Las secciones utilizadas para determinar la unión total se cubren con tampón Tris-HCl 50 mM pH=7,4, albúmina al 5% que contiene además [^3H]-CP55,940 10 nM (DuPont, NEN, España). Para determinar la unión inespecífica se cubrieron secciones adyacentes con

el mismo tampón de incubación en presencia del ligando CP55,940 10 mM (RBI, USA).

Todas las secciones se incubaron durante 2 horas 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda a fin de evitar la evaporación. Seguidamente, se elimina el exceso de ligando no unido a receptor mediante 2 lavados de 2 horas 30 min a 4°C en Tris-HCl 50 mM pH=7,4, albúmina 1%. Por último, se realizó una breve inmersión de los tejidos en H_2O desionizada a 4°C y se secaron bajo una corriente de aire frío. Los tejidos se exponen a una película sensible a la emisión producida por el tritio [^3H]-Hyperfilm (Amersham Ibérica, España) durante un período de 3 a 4 semanas. La exposición en cada película, junto a los tejidos, de estándares comerciales (^3H -Microscales, Amersham) de niveles de radiactividad conocida, permite la elaboración de una curva entre los valores de densidad óptica y de concentración de radiactividad que, junto al dato de la actividad específica del ligando marcado, permite la transformación de los valores de densidad óptica en fmol /mg de tejido.

Las películas se analizan en un analizador de imagen (Molecular Dynamics) con software adecuado para este tipo de análisis (Image Quant 3.3). Las determinaciones de densidad óptica se llevan a cabo sobre, al menos, tres secciones de tejido para cada área y cada cerebro.

3.4. DETERMINACIÓN DE UNIÓN ESPECÍFICA A RECEPTOR CB_1 EN FRACCIÓN DE MEMBRANA

3.4.1. Obtención de las fracciones de membrana

Los tejidos se homogenizaron en 5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4. Los homogeneizados se centrifugaron a 40000g durante 10 minutos a 4°C . A continuación, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y el precipitado se resuspendió en 20 volúmenes del tampón anterior para alcanzar la concentración de proteína deseada (aprox. 2 mg/ml). Se utilizó una alícuota de la fracción de membrana para determinar la concentración de proteína mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951)

3.4.2. Ensayo de unión a receptor CB_1 con [^3H]-CP55, 940

El protocolo se basa en el descrito previamente por Houston et al., 1991 con alguna modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (Romero et al., 1995a) El ensayo se realizó en tubos siliconizados con Sigmacote (Sigma, St. Louis, MO, USA). Se utilizó como radioligando [^3H]CP 55,940 de 104 Ci/mmol (NEN, Boston, MO, USA). en un rango de

concentraciones 0.125-2,5 nM. Para determinar la unión no específica se utilizó Δ^9 -THC (5 μ M). Ambos ligandos se diluyen a la concentración adecuada a partir de disoluciones madre en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, EDTA 1mM, MgCl₂ 3 mM; 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos). La fracción de membrana se diluyó en el mismo tampón a concentración 0.2-0.3 mg/ml. El volumen final en el ensayo fue de 0.5 ml. La incubación se realizó durante 60 min a 30°C. Transcurrido ese tiempo se procedió a una filtración rápida a través de filtros Whatman GF/C (prelavados con BSA 1 mg/ml). Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con 1 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos. La radioactividad unida a membranas se evaluó en un contador de centelleo. La unión específica de [³H]-CP55,940 se calculó como la diferencia entre la unión en ausencia y presencia de Δ^9 -THC (5 μ M). Los datos se analizaron mediante la transformación de Scatchard.

3.5. ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD DEL RECEPTOR CB₁ MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DE LA UNIÓN DE [³⁵S]-GTP γ S ESTIMULADA POR WIN 55,212-2

El protocolo seguido fue el descrito previamente por Traynor y Nahorski, 1995. Las fracciones de membrana (en torno a 200 μ g de proteína) obtenidas tal y como se describe en el apartado 3.4.1. se incubaron en tampón de incubación (HEPES 20 mM pH 7.0, MgCl₂ 10 mM; NaCl 100 mM, [³⁵S]-GTP γ S, GDP 5 μ M y WIN55,212-2 5 μ M) durante 60 minutos a 30°C (el volumen final en la incubación fue 1 ml). De este modo se evaluó la unión de [³⁵S]-GTP γ S estimulada por la presencia de un agonista del receptor de cannabinoides. La unión basal se determinó en las mismas condiciones pero en ausencia del agonista WIN55,212-2. Además, se evaluó la unión inespecífica en presencia de un exceso (10 μ M) de GTP γ S no marcado. Fracciones de membrana adicionales se incubaron en presencia del antagonista del receptor de cannabinoides SR141716 (2 μ M) junto con [³⁵S]-GTP γ S 0.05 nM; GDP 5 μ M y WIN 55,212-2 5 μ M con objeto de corroborar que el aumento en la unión de [³⁵S]-GTP γ S en presencia de WIN 55,212-2 se debía efectivamente a la activación del receptor CB₁.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la filtración a vacío a través de filtros Whatman GF/C. Los filtros con las membranas se unieron al líquido de centelleo y la radioactividad retenida en los mismos se determinó a las 24 horas en un contador de centelleo. La unión específica de [³⁵S]-GTP γ S en las tres situaciones experimentales (basal, estimulada por WIN55,212-2 y antagonizada por SR141716)

se determinó como la diferencia entre la unión en presencia o ausencia de GTP γ S no marcado.

3.6.DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CANNABINOIDES ENDÓGENOS MEDIANTE GC-MS

3.6.1. Metodología del laboratorio de Dr. Di Marzo

En primer lugar, se realizó una extracción de los lípidos presentes en las distintas áreas cerebrales analizadas. Para ello, se homogeneizaron una mezcla de las áreas cerebrales de dos animales en 5 volúmenes de cloroformo/metanol (2:1) inmediatamente después del sacrificio para evitar el aumento postmortem en las concentraciones de N-aciletanolaminas de cadena larga (Schmid et al., 1995). Los homogeneizados se centrifugaron a 13000g durante 16 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y los precipitados se resuspendieron en 5 volúmenes de cloroformo/metanol (2:1) procediéndose nuevamente a su centrifugación. Este procedimiento se repitió tres veces más. Posteriormente, los sobrenadantes recogidos en las 5 centrifugaciones consecutivas de cada conjunto de muestras se unieron y liofilizaron en un evaporador. Las muestras liofilizadas se almacenaron a -80°C bajo atmósfera de nitrógeno hasta su posterior análisis.

Los extractos liofilizados se resuspendieron en cloroformo/metanol (99:1), añadiéndose 10 nmoles de anandamida y 2-AG deuterados o 5000 cpm de (³H)-N-palmitoilfosfatidiletanolamina (NPPE). Los estándares deuterados se sintetizaron a partir de ácido araquidónico (d⁸) y etanolamina o glicerol como se ha descrito respectivamente en Devane et al. (1992) y Bisogno et al. (1997a). NPPE radiomarcado (5mCi/mmol) se sintetizó siguiendo un procedimiento descrito para N-araquidonilfosfatidiletanolamina por Fontana et al. (1995).

Las soluciones resultantes se purificaron a continuación mediante cromatografía en columna de sílica gel como han descrito Fontana et al. (1995). Las fracciones se eluyeron con 2 volúmenes de cloroformo/metanol 9:1 (esta fracción contenía anandamida y 2-AG) y posteriormente con otros 2 volúmenes de cloroformo/metanol 1:1 (esta fracción contenía NAPE). A continuación el exceso de disolvente se evaporó mediante un rotavapor.

Las muestras que contenían AEA y 2-AG se fraccionaron mediante NP-HPLC con una columna de sílice semipreparativa (Spherisorb S5W), siendo la fase móvil un gradiente lineal de 40 minutos desde 9:1 a 8:2 de n-hexano/isopropanol (flujo de 2 ml/minuto). Estas condiciones

de elución permiten separar 1(3)- y 2 acil-gliceroles (tiempo de retención de 18 y 20 minutos respectivamente) de N-aciletanolaminas (tiempo de retención de 26-27 minutos). Las fracciones obtenidas desde los 17 a los 22 minutos y desde los 24 a los 28 minutos se mezclaron y los solventes se evaporaron en un evaporador. Estas muestras procedentes del HPLC fueron posteriormente derivatizadas añadiendo 20 μ l de N-metil-N-trimetilxilil trifluoroacetamida (MSTFA), durante 2 horas a temperatura ambiente y analizadas mediante GC/MS según las condiciones descritas previamente por Bisogno et al. (1997).

La relación en el área entre las señales de anandamida deuterada y no deuterada variaba linealmente con diversos contenidos de anandamida no deuterada (20 pmoles-20 nmoles). Lo mismo podía aplicarse a las relaciones en el área entre señales de 2-AG deuterado y no deuterado en el intervalo 100 pmoles-20 nmoles. Los niveles de AEA y 2-AG en las muestras desconocidas se calcularon a través de la relación de su área con las señales de las áreas correspondientes a los estándares deuterados internos.

Las fracciones de cloroformo/metanol 1:1 obtenidas mediante la cromatografía en columna de sílica gel se resuspendieron en éter etílico y fueron digeridas posteriormente con fosfolipasa D (suspendida en Tris-HCl 50 mM pH 7.5) durante 2 horas a 37°C, como previamente describen Di Marzo et al. (1996). Estas muestras digeridas se purificaron mediante NP-HPLC y las fracciones eluidas entre los 24 y los 28 minutos (que contienen AEA gracias a la hidrólisis del N-araquidonilfosfatidiletanolamina) fueron mezcladas. El rendimiento en la purificación e hidrólisis del NAPE se calculó a partir de los contenidos de radiactividad encontrados en esta fracción mezclada. La AEA liberada a partir de la digestión del NAPE se derivatizó y cuantificó mediante GC/MS como hemos descrito anteriormente. Los contenidos de endocannabinoides se expresan como pmoles o nmoles por gramo de tejido fresco extraído.

3.6.2. Metodología del laboratorio de Dr. Schmid

El análisis de AEA y 2-AG en el modelo de consumo crónico de morfina se realizó en colaboración con el laboratorio de P. Schmid. El protocolo utilizado es el descrito previamente por estos autores (Schmid et al., 2000). La fracción lipídica se extrajo de 8 regiones cerebrales diferentes (Folch et al., 1957) y los extractos se disolvieron en cloroformo con d_4 NAE (N-acil-[1,1,2,2,- 2 H $_4$]etanolamina) y d_5 2-MAG (2-acil-[1,1,2,3,3,- 2 H $_5$]glicerol como estándares internos). NAEs y 2-MAGs se eluyeron de una columna de extracción de fase sólida de 100 mg (Alltech, Deefield, IL, USA) con cloroformo:metanol (98: 2). Las muestras se transformaron

en sus *tert*-butildimetilsilil-derivados. Los derivados de NAE y 2MAG se monitorizan por separado como iones [M57] (representando la pérdida del grupo *tert*-butilo). Para la cuantificación, se determinaron las áreas a los picos [M-57] para cada compuesto marcado y sin marcar. De este modo se calculó la relación entre el compuesto sin marcar y el compuesto marcado. Los resultados se expresaron como pmol de AEA / g de tejido)

3.7. CUANTIFICACIÓN DE ARNm MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

3.7.1. Determinación de los niveles de ARNm del receptor CB $_1$

El método utilizado es el descrito anteriormente por Rubino et al. (1994) con pequeñas modificaciones. La sonda utilizada es una mezcla de 3 oligonucleótidos complementarios a las bases 4-51, 349-396 y 952-999 del gen del receptor CB $_1$ de rata en una proporción 1:1:1 (DuPont, Madrid). El marcaje de estos oligonucleótidos se llevó a cabo mediante una reacción de incorporación de [α 35 -S]dATP (Amersham Ibérica, España) a su extremo 3' catalizado por la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal (Boehringer Mannheim, Barcelona, España).

La purificación de los oligonucleótidos marcados se realiza mediante una extracción en fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitación en etanol. Para cuantificar la actividad específica (cpm/ μ l) de la sonda marcada se utilizó una alícuota y el resto se almacenó a -20°C.

Las secciones cerebrales se colocaron a temperatura ambiente y se sometieron a un pretratamiento consistente en:

- 1- Fijación mediante inmersión de los tejidos en paraformaldehído al 4% en solución de salino tamponado con fosfato (PBS) (PBS: NaCl 137mM, KCl 2,5 mM, Na $_2$ HPO $_4$ 10mM, KH $_2$ PO $_4$ 1,76mM pH=7.4).
- 2- Acetilación: 2 lavados en tampón fosfato salino (PBS) e inmersión en una solución de anhídrido acético al 0,25% en trietanolamina 0,1M/NaCl al 0,9% a pH=8.
- 3- Lavados en 2x salino-citrato sódico (SSC) (20x SSC: NaCl 3M, Citrato sódico 300 mM pH=7,0)
- 4- Deshidratación mediante inmersión en solución de etanol a concentraciones crecientes.
- 5- Deslipidificación de los tejidos mediante inmersión en cloroformo.

Las secciones se secaron a temperatura ambiente y se sometieron a la reacción de hibridación extendiendo sobre

ellas 25 μ l /sección de solución de hibridación constituida por:

- Formamida.
50%
- SSC
4x
- DNA de esperma de salmón desnaturalizado
500 μ g/ml
- ARN transferente
250 μ g/ml
- Solución Denhardt's
1x
- Sulfato de dextrano.
10%
- Ditioneitol (DTT)
10 mM
- Sonda marcada
10⁴ cpm/ μ l

Las secciones se incuban a 43°C en una cámara húmeda durante toda la noche. Posteriormente se lavan las secciones en SSC 1x a 55°C para eliminar el exceso de sonda, se aclaran en H₂O bidestilada, se secan los tejidos y se exponen a películas (Kodak BIOMAX™ MR) durante una semana. El tiempo de exposición se determina de forma que la intensidad de la señal autorradiográfica se encuentre dentro del rango lineal de una curva estándar preparada con sonda marcada. Las películas se analizaron en un analizador de imagen (Molecular Dynamics, Image Quant 3.2). Para determinar la especificidad de la señal secciones cerebrales adyacentes se incuban con exceso de sonda fría o en presencia de RNAsa.

3.7.2. Determinación de los niveles de RNAm de PENK, CRF y c-fos

El protocolo para la valoración de los niveles de expresión de estos genes es básicamente el mismo que el utilizado para determinar la expresión del gen para el receptor CB₁. Para la hibridación in situ de PENK se utiliza como sonda un oligonucleótico sintético comercial (NEN-Du Pont, ITISA, Madrid, España) de 48 bases complementario al gen de proencefalina. En el caso de CRF se utilizó también una sonda comercial (NEN-Du Pont, ITISA, Madrid, España). La secuencia utilizada para c-fos fue: c-fos (nt 570-615) TGC-TCT-ACT-TTG-CCC-CTT-CTG-CCG-ATG-CTC-TGC-GCT-CTG-CCG-CCG (Currant et al., 1987)

3.8. Determinación de los niveles de PRL mediante RIA.

Se utilizó un kit comercial (Amersham ref.RPA 553) en un rango de curva estándar entre 0,08 y 5 ng/tubo. El ensayo se basa en una competición entre la prolactina presente en la muestra y la [¹²⁵I] prolactina por un 1^{er} anticuerpo específico. Así, la cantidad de ligando marcado unido a este anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de PRL de la muestra. Para la separación del exceso de [¹²⁵I]-PRL unida al 1^{er} anticuerpo se utiliza un 2^o anticuerpo y el complejo (Amerlex-M). Se separa por centrifugación y decantación del sobrenadante. Cuando el precipitado este perfectamente seco se cuentan los tubos en un contador γ .

3.9. Determinación de los niveles de Corticosterona mediante RIA

Se utilizó un kit comercial (Amersham ref. RPA 548) con un rango de curva estándar de 0,078 a 20 ng/tubo. Previamente al ensayo es necesario desplazar la corticosterona de la globulina que une corticosterona en el plasma. Para ello se calientan las muestras diluidas (las muestras tienen que diluirse debido a las elevadas concentraciones de cortisona presentes en plasma) a 60 °C durante 30 minutos. El ensayo se basa en una competición entre la corticosterona presente en la muestra y la [¹²⁵I]-corticosterona por un 1^{er} anticuerpo específico. Así, la cantidad de ligando marcado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de corticosterona presente en la muestra. Para la separación del exceso de [¹²⁵I]-corticosterona unida al 1^{er} anticuerpo se utiliza un 2^o anticuerpo y el complejo (Amerlex-M). Se separa por centrifugación y decantación del sobrenadante. Cuando el precipitado este perfectamente seco se cuentan los tubos en un contador γ .

4. ESTADÍSTICA

Los resultados experimentales se analizan mediante diferentes test estadísticos.

- **Test de Student:** Se utiliza para comparaciones entre 2 grupos exclusivamente.
- **Análisis de varianza:** Se utiliza para comparaciones múltiples de grupos organizados en 1 sola variables (**ANOVA de 1 vía**) o de 2 variables (**ANOVA de 2 vías**). En ambos casos, las diferencias entre grupos tomados dos a dos se analizaron mediante test post-hoc (**Student-Newman-Keuls o Bonferroni**)

RESULTADOS

RESULTADOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL I: Estudio de las modificaciones en la neurotransmisión endocannabinoide tras la exposición prolongada a cannabinoides
 - 1.1. Densidad de receptor CB₁ y su funcionalidad
 - 1.2. Niveles de endocannabinoides
 - 1.3. Discusión parcial

2. DISEÑO EXPERIMENTAL II: Análisis de las alteraciones bioquímicas, endocrinas y moleculares que se producen en un modelo de abstinencia experimental a cannabinoides
 - 2.1. Validación de la aparición de tolerancia farmacológica
 - 2.2. Caracterización de un modelo de abstinencia experimental en animales tolerantes Δ^9 -THC
 - 2.2.1. Parámetros comportamentales
 - 2.2.2. Cambios a nivel endocrino
 - 2.2.3. Cambios en la expresión de determinados genes
 - 2.2.4. Niveles de endocannabinoides
 - 2.3. Discusión parcial

3. DISEÑO EXPERIMENTAL III: Estudio del posible papel iniciador de los cannabinoides en el consumo de otras drogas de abuso
 - 3.1. Discusión parcial

4. DISEÑO EXPERIMENTAL IV: Estudio comparativo de los cambios que produce la exposición prolongada a diversas drogas de abuso sobre la neurotransmisión endocannabinoide.
 - 4.1. Exposición crónica a morfina
 - 4.1.1. Receptor CB₁
 - 4.1.2. Endocannabinoides
 - 4.2. Exposición crónica a cocaína
 - 4.2.1. Receptor CB₁
 - 4.2.2. Endocannabinoides
 - 4.3. Exposición crónica a etanol
 - 4.3.1. Receptor CB₁
 - 4.3.2. Endocannabinoides
 - 4.4. Exposición crónica a nicotina
 - 4.4.1. Receptor CB₁
 - 4.4.2. Endocannabinoides
 - 4.5. Discusión parcial
 - 4.5.1. Morfina
 - 4.5.2. Cocaína
 - 4.5.3. Alcohol
 - 4.5.4. Nicotina

5. DISEÑO EXPERIMENTAL V: Estudio del sistema cannabioide endógeno durante el proceso de alcoholización en rata
 - 5.1. Receptor CB₁
 - 5.2. Endocannabinoides
 - 5.3. Discusión parcial

6. DISEÑO EXPERIMENTAL VI: Estudio de las repercusiones del tratamiento farmacológico del SCE sobre la ingesta de alcohol.
 - 6.1. Análisis comportamental y tratamientos farmacológicos
 - 6.2. Neuroquímica
 - 6.3. Discusión parcial

RESULTADOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL I: Estudio de las modificaciones en la neurotransmisión endocannabinoide tras la exposición prolongada a cannabinoides

Con este conjunto de experimentos nos propusimos confirmar la aparición de tolerancia farmacológica tras la exposición crónica a cannabinoides y evaluar en que modo el tratamiento crónico Δ^9 -THC modifica los niveles de ligandos endógenos en distintas áreas cerebrales.

1.1. Densidad de receptor CB₁ y su funcionalidad

Como se esperaba el tratamiento crónico con Δ^9 -THC disminuye la densidad de receptor CB₁ en la mayor parte de las áreas cerebrales analizadas (Tabla 1) que, en la mayor parte de los casos, se acompaña de una disminución del acoplamiento de este receptor a proteína G (Tabla 2). Sin embargo, en el hipocampo y la corteza cerebral, que exhiben una disminución en la densidad del receptor CB₁, no se afecta la funcionalidad de forma importante. Esto puede relacionarse con la diferencias en cuanto al acoplamiento a proteínas G en distintas áreas del cerebro que se han visto para este receptor (Breivogel y cols., 1997).

UNIÓN ESPECÍFICA A RECEPTOR CB ₁ (fmol/mg de proteína)		
ÁREA CEREBRAL	CONTROLES	Δ^9 -THC CRÓNICO
Cerebelo	518.1 ± 65.2	345.4 ± 66.7*
Estriado	716.3 ± 133.4	402.4 ± 108.0*
Hipocampo	533.8 ± 118.0	262.1 ± 44.2*
Límbico Anterior	507.3 ± 132.3	410.5 ± 123.7
Corteza cerebral	329.6 ± 50.5	110.5 ± 15.1 **
Tallo cerebral	660.7 ± 76.6	382.8 ± 98.5 *

Tabla 1: Unión específica a receptor CB₁ (fmol/mg de proteína) determinada en diferentes áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de Student (*p<0.05; **p<0.005)

Unión de GTP γ S estimulada por WIN55,212-2 (% de estimulación)		
ÁREA CEREBRAL	CONTROLES	Δ^9 -THC CRÓNICO
Cerebelo	166.2 ± 25.7	112.0 ± 17.1*
Estriado	163.3 ± 11.6	107.7 ± 21.2 *
Hipocampo	167.6 ± 15.3	123.3 ± 40.5
Límbico Anterior	147.9 ± 25.9	159.5 ± 19.6
Corteza cerebral	112.4 ± 12.5	95.0 ± 10.3
Tallo cerebral	94.8 ± 14.7	50.6 ± 7.4 *

Tabla 2: Unión específica de GTP γ S estimulada por el agonista WIN55,212-2 (% de estimulación) determinada en diferentes áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de Student (*p<0.05)

1.2. Niveles de endocannabinoides

El tratamiento crónico con Δ^9 -THC modifica los niveles de endocannabinoides fundamentalmente en regiones límbicas y motoras (Fig. 1 y Fig. 2). Esto podría relacionarse con una posible participación del SCE en los circuitos cerebrales implicados en el fenómeno de adicción a drogas de abuso. En nuestro estudio, la administración crónica de Δ^9 -THC durante 8 días produjo la esperada reducción de la densidad de los receptores CB₁ y de la estimulación por WIN-55,212-2 de la unión de [³⁵S]-GTP γ S en la mayor parte de las regiones estudiadas. La única región que no presentó cambios en ambos parámetros fue el área límbica anterior, pero lo más interesante fue que, en esta región, se observó un marcado incremento en el contenido de AEA en los animales tolerantes Δ^9 -THC. Además, los contenidos de AEA disminuyeron en el cuerpo estriado, mientras que no se encontraron cambios en el resto de las regiones (Fig. 1). Los contenidos de 2-AG no variaron en la mayor parte de las estructuras del cerebro de los animales tolerantes a Δ^9 -THC, salvo en el estriado donde se produce una disminución de aproximadamente un 50% (Fig. 2).

Por otro lado, quisimos evaluar en que medida estas diferencias en cuanto a los contenidos de AEA se correlacionaban con diferencias en la cantidad del precursor sintético de la AEA, el NArPE. Los contenidos de este precursor tienden a disminuir en el límbico anterior de las ratas tolerantes a Δ^9 -THC (477.4 ± 54.1 pmol / g de tejido vs 350.3 ± 67.0 pmol/g de tejido (n=4)). Esta disminución de aproximadamente 127 pmol/g de tejido corresponde con el incremento de entorno a 147 pmol/g de tejido que se produce en el límbico anterior. Esto sugiere que el tratamiento crónico con Δ^9 -THC estimula la hidrólisis de

NArPE pero no su síntesis en el área límbica anterior. El incremento de este precursor lipídico explicaría el aumento de los niveles de AEA que se observan en animales tolerantes a Δ^9 -THC. Por el contrario los niveles de NArPE en el estriado no se modifican por el tratamiento (429.9 ± 121.8 pmol/g de tejido vs 476.3 ± 189.7 pmol/g de tejido ($n=4$))

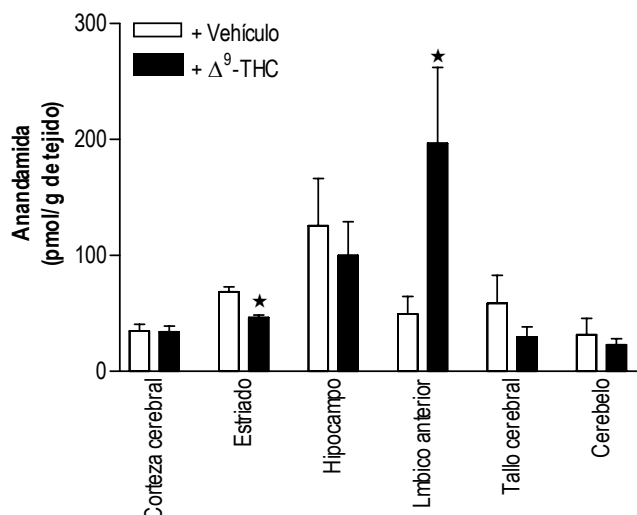


Fig. 1: Contenidos de AEA determinados mediante cromatografía de GS/MS en diferentes regiones cerebrales de ratas adultas sometida a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM con el número de determinaciones entre paréntesis. Los datos se analizaron mediante el test de Student (* $p < 0.05$)

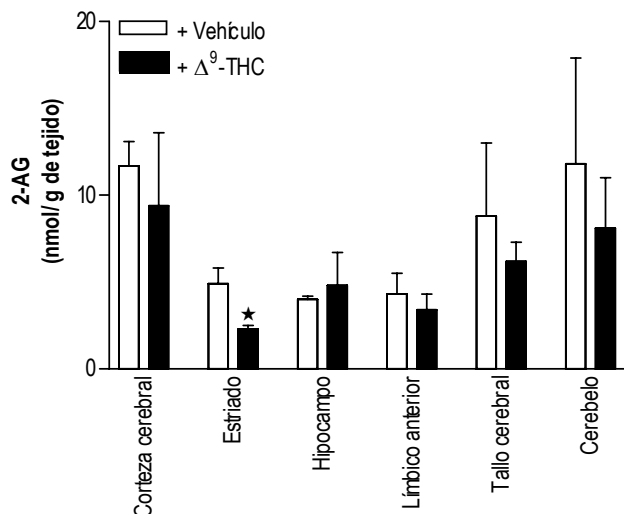


Fig. 2: Contenidos de 2-AG determinados mediante cromatografía de GS/MS en diferentes regiones cerebrales de ratas adultas sometida a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM con el número de determinaciones entre paréntesis. Los datos se analizaron mediante el test de Student (* $p < 0.005$)

1.3. Discusión parcial

Este conjunto de resultados muestra una vez más que la tolerancia farmacológica provocada por la activación prolongada de los receptores CB_1 se basa en la disminución en la densidad de este receptor (**Tabla 1**). Estos receptores no únicamente se encuentran en menor proporción sino que, además, son menos eficaces en la transmisión de la señal endocannabinoide al interior de la célula, al menos en lo que se refiere a la actividad de las proteínas G (**Tabla 2**). Estos resultados corroboran los obtenidos por otros autores (Oviedo et al., 1993, Romero et al. 1997; Romero et al., 1998), con la particularidad de que en nuestro caso hemos utilizado para demostrar el fenómeno de regulación a la baja provocado por una activación prolongada, las mismas preparaciones en las que se han medido los niveles de endocannabinoides. De hecho, este ha sido el primer estudio en el que se ha planteado determinar los niveles de endocannabinoide *in vivo* después de un tratamiento crónico con Δ^9 -THC. Así, la disminución de los contenidos de AEA y 2-AG que indujo el tratamiento corrobora la idea de que el sistema endocannabinoide se encuentra implicado en el control tónico del movimiento en los ganglios basales. Por otro lado, el incremento en los niveles de AEA que se observa en el límbico anterior (área en la que no se modifican los receptores) podría ser un efecto en cuyo mecanismo participe la dopamina. En este sentido se sabe que el tratamiento con Δ^9 -THC estimula la síntesis de DA en el núcleo accumbens (Tanda et al., 1997; French et al., 1997). La DA podría actuar sobre los receptores D2 e incrementar así la síntesis de AEA en un mecanismo similar al descrito en el estriado dorsal en el que la administración de quinpirole incrementa la síntesis de AEA (Giuffrida et al., 1999). El incremento que nosotros observamos se debe a un incremento en la hidrólisis de NArPE el precursor biosintético de la AEA.

En resumen, la activación prolongada de los receptores para cannabinoides conlleva un descenso de los contenidos de endocannabinoides y de sus receptores en el estriado, así como un incremento de la formación de anandamida sin cambios en sus receptores en los núcleos del sistema límbico. Estas observaciones tienen interés a la vista del papel sugerido para los endocannabinoides y sus receptores en el control de la conducta motora y del estado emocional respectivamente. Así como su posible relación con los procesos de adicción a drogas de abuso.

2.DISEÑO EXPERIMENTAL II: Análisis de las alteraciones bioquímicas, endocrinas y moleculares que se producen en un modelo de abstinencia experimental a cannabinoides

2.1. Validación de la aparición de tolerancia farmacológica

Inicialmente se analizó la densidad de receptor CB₁ en los animales sometidos a un tratamiento crónico con Δ⁹-THC (10 mg/kg, i.p., 8 días) a fin de corroborar el desarrollo de tolerancia farmacológica con este tratamiento como ya se había descrito ampliamente en la literatura (Oviedo et al., 1993; Romero et al., 1995, 1997). Para ello se utilizó una técnica autorradiográfica con [³H]-CP55,940 en secciones cerebrales. Se pudo demostrar que en los animales tolerantes a Δ⁹-THC se producía la esperada pérdida de receptores CB₁ de diversas regiones cerebrales. Las modificaciones en la densidad de receptores CB₁ inducidas por este tratamiento variaban en función del área estudiada. Los resultados se muestran en la **Tabla 3** y en los correspondientes autorradiogramas (**Fig. 3**).

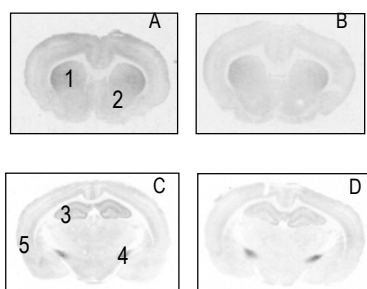


Fig. 3: Autorradiogramas representativos de la densidad de receptor CB₁ obtenidos mediante autorradiografía con [³H]CP55,940 en secciones cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con Δ⁹-THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) (fig B y D) o vehículo (Tween 80-salino) (fig A y C). (1: caudado-putamen; 2: núcleo accumbens; 3: hipocampo; 4: sustancia nigra; 5: corteza cerebral)

UNIÓN ESPECÍFICA A RECEPTOR CB ₁				
(fmol/ mg de proteína)				
Regiones Cerebrales		CONTROL	Δ ⁹ -THC CRÓNICO	% de cambio
Corteza	(i-ii)	75.0 ± 9.0	44.0 ± 12.3*	-41.3
	(v-vi)	71.5 ± 6.3	45.7 ± 9.1*	-36.1
Ganglios basales	CPu lat	105.7 ± 7.5	79.2 ± 8.7*	-25.1
	CPu med	84.8 ± 2.5	62.1 ± 7.1 **	-26.8
	N Entop	135.4 ± 5.5	111.5 ± 6.8 *	-17.7
E. límbicas	N Acb	71.9 ± 4.1	51.3 ± 4.6 **	-28.7
Hipocampo	CA1	102.0 ± 3.9	67.0 ± 8.6 ***	-34.3
	CA2	93.0 ± 14.6	64.1 ± 7.6 *	-31.3
	CA3	103.2 ± 4.8	58.9 ± 6.6 ***	-42.9
	GD	106.1 ± 3.1	71.3 ± 6.1 ***	-32.8

Tabla 3: Densidad de receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) analizados mediante autorradiografía con [³H]-CP55,940 en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con Δ⁹-THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (*p<0.05; **p<0.005, ***p<0.0005)

2.2. Caracterización de un modelo de abstinencia experimental en animales tolerantes a Δ⁹-THC

El 8º día de tratamiento con Δ⁹-THC los animales recibieron una dosis aguda del antagonista SR141716 para bloquear los receptores CB₁ y con ello generar un síndrome de abstinencia experimental a cannabinoides, de acuerdo a lo que han publicado otros autores (Aceto et al., 1995, 1996; Tsou y cols 1995).

2.2.1 Parámetros comportamentales

En términos generales, los datos más sólidos acerca de las manifestaciones de abstinencia inducida con SR141716 en animales tolerantes a cannabinoides sintéticos señalan que predominan las alteraciones motoras (Aceto et al., 1995; Tsou et al., 1995; Hutchenson et al., 1998; Cook et al., 1998; Rubino et al., 1998). En nuestro estudio valoramos estas alteraciones mediante la prueba del campo abierto (**Tabla 4**).

En animales tolerantes a Δ⁹-THC el tratamiento con SR141716 tiende a incrementar la ambulación (+ 52,8%) y las esterotipias (+ 47,6%) y reduce significativamente la inactividad (+ 85.9 %; F=3.47, p<0.05). Sin embargo en animales controles (aquellos a los que se inyectó vehículo durante 8 días), el tratamiento con el antagonista reduce la actividad ambulatoria (-29.3 % F=4.24; p<0.05). Además, el tratamiento con SR141716 en animales tolerantes a Δ⁹-THC incrementa respuestas como el "scratching" (F=34.83,

$p < 0.00005$), "turning" ($F=5.93$; $p < 0.05$), temblor ($F=9.31$, $p < 0.05$) y retropulsión ($F=4.57$; $p < 0.05$). La frecuencia de *scratching* es menor cuando el SR141716 se administra a animales tolerantes a Δ^9 -THC que cuando se administra a

animales controles. Esto se ha observado también en ratones (Cook y cols., 1998).

Parámetro	Tratamiento	Ratas control	Ratas tolerantes a Δ^9 -THC
Ambulación	+ vehículo	202.5 \pm 17.8	105.4 \pm 42.0 #
	+ SR 141716	143.1 \pm 22.8*	161.1 \pm 18.5
Tiempo de inactividad	+ vehículo	8.8 \pm 4.6	101.5 \pm 47.7 #
	+ SR 141716	6.0 \pm 3.7	14.3 \pm 5.0 *
Esterotipias (frecuencia)1 autoacicalamiento+ oteo+shaking	+ vehículo	20.6 \pm 1.9	12.6 \pm 4.5
	+ SR 141716	20.3 \pm 2.5	18.6 \pm 4.7
<i>scratching</i> (frecuencia)	+ vehículo	0.7 \pm 0.3	1.8 \pm 0.5
	+ SR 141716	21.3 \pm 3.9 ***	14.5 \pm 4.0 **
Temblor (frecuencia)	+ vehículo	ND	ND
	+ SR 141716	0.5 \pm 0.3*	1.3 \pm 0.5 **
Turning	+ vehículo	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2
	+ SR 141716	0.8 \pm 0.3	1.0 \pm 0.4 *
Retropulsión (frecuencia)	+ vehículo	ND	ND
	+ SR 141716	0.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.6 *

Tabla 4: Respuesta comportamental en la prueba del campo abierto de ratas en las que se ha generado un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716 (10 mg/kg) a los 10 min de la última inyección de un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (tratamiento con Δ^9 -THC x desafío con SR141716) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ vs el vehículo correspondiente; # $p < 0,05$ vs controles)

2.2.2. Cambios a nivel endocrino

En nuestro modelo también hemos analizado los niveles de algunas hormonas adenohipofisarias cuyos niveles plasmáticos se modifican por el consumo de drogas de abuso ya que se trata de hormonas afectadas por el estrés y/o la ansiedad (Pickworkth et al., 1998, Zorrilla et al., 2001). El interés de este análisis es que es fácil realizarlo en humanos y por lo tanto podría funcionar como marcador de vulnerabilidad o predisposición al consumo o a la recidiva en pacientes desintoxicados. Según nuestros resultado, el bloqueo de los receptores CB₁ incrementa los niveles plasmáticos de corticosterona en los animales controles (+91.1%; $F= 5.83$, $p<0.05$) pero este efecto no fue significativo en los animales tolerantes a Δ^9 -THC debido a la alta variabilidad de respuesta en estos animales (Fig 4). En cuanto a los niveles plasmáticos de PRL sólo se produce un incremento en los animales no tolerantes a Δ^9 -THC (+142.1%) (Fig.5). En definitiva, el análisis de las hormonas hipofisarias no indica la aparición de manifestaciones específicas de abstinencia a cannabinoides.

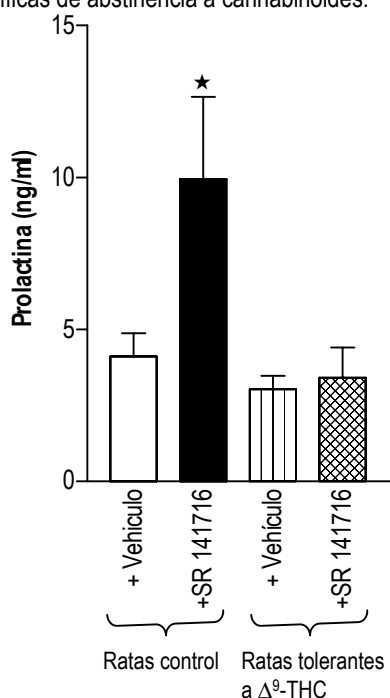


Fig. 5: Niveles plasmáticos de prolactina de ratas en las que se ha generado un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716 (10 mg/kg) a los 10 minutos de la última inyección de un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (tratamiento con Δ^9 -THC x desafío con SR141716) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (* $p<0.05$ vs el vehículo correspondiente)

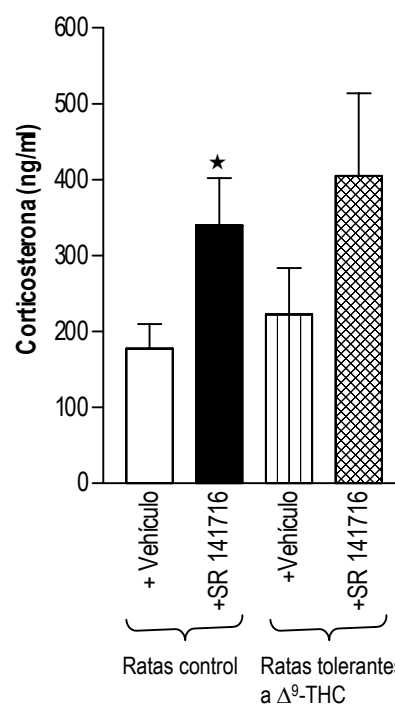


Fig. 4: Niveles plasmáticos de corticosterona de ratas en las que se ha generado un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716 (10 mg/kg) a los 10 minutos de la última inyección de un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (tratamiento con Δ^9 -THC x desafío con SR141716) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (* $p<0.05$ vs el vehículo correspondiente)

2.2.3. Cambios en la expresión de determinados genes

Por otro lado, la exposición continuada a drogas de abuso puede producir modificaciones adaptativas en los sistemas neuronales implicados en las respuesta de estrés (Sarnyai et al., 2001). En este sentido, el síndrome de abstinencia a diferentes drogas incrementa los niveles extracelulares de CRF en regiones límbicas (cita). Se han observado incrementos de la concentración extracelular de CRF en el núcleo central de la amígdala en un modelo de abstinencia experimental a cannabinoides generado tras un tratamiento crónico con HU 210 (Rodríguez de Fonseca et al., 1997).

Esta alteración en la funcionalidad de CRF en el sistema límbico parece tener un papel motivacional en el estrés y los efectos negativos que produce la abstinencia a cannabinoides. Los máximos incrementos en la liberación de CRF corresponden con el momento en el que se observan signos comportamentales de abstinencia mas severos (sacudidas de cabeza, acicalamiento y supresión de la exploración en *defensive withdrawal test*)

En la **Fig 6** se recogen los resultados del análisis mediante hibridación *in situ* de los niveles de ARNm para CRF en el núcleo paraventricular hipotalámico. El tratamiento con SR141716 a animales tolerantes a Δ^9 -THC incrementa la expresión del gen para CRF (+ 45.9% $F=11.58$, $p<0,005$) en este área cerebral mientras que, en animales controles, disminuye la expresión de CRF (- 32.1%) lo que puede asociarse con la respuesta de liberación de CRF que se observa en la abstinencia a otras drogas de abuso.

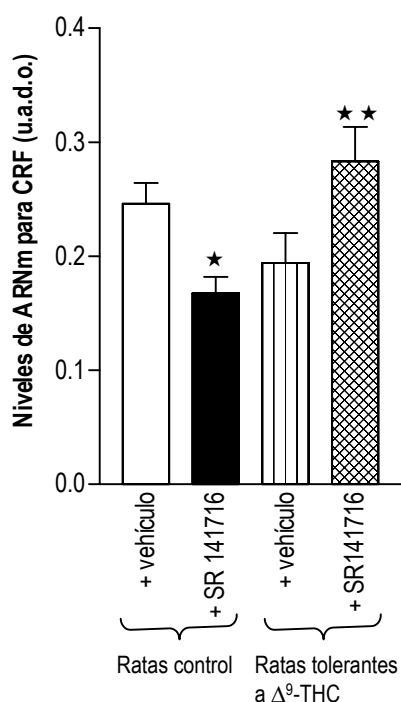


Fig. 6 : Nivel de ARNm para CRF en el núcleo hipotalámico ventromedial evaluado mediante hibridación *in situ* en ratas en las que se ha generado un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716 (10 mg/kg) a los 10 minutos de la última inyección de un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (tratamiento con Δ^9 -THC x desafío con SR141716) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (* $p<0.05$, ** $p<0.005$ vs el vehículo correspondiente)

Durante la abstinencia a cannabinoides también se ha evidenciado un aumento de la inmunoreactividad de Fos en la amígdala central (Rodríguez de Fonseca et al., 1997). Se trata de un marcador de activación neuronal que podría aparecer alterado en situaciones de abstinencia a drogas de abuso. Sin embargo, en nuestro modelo no encontramos variaciones en la expresión de c-fos ni en la amígdala ni en el resto de regiones cerebrales analizadas (**Tabla 5**).

Niveles de ARNm para c-fos (u.a.d.o.)			
ÁREA CEREBRAL	Tratamiento	Ratas control	Ratas tolerantes a Δ^9 -THC
Habénula	+ vehículo	0.118 \pm 0.022	0.140 \pm 0.013
	+ SR 141716	0.134 \pm 0.013	0.124 \pm 0.008
CA1	+ vehículo	0.087 \pm 0.006	0.092 \pm 0.005
	+ SR 141716	0.093 \pm 0.008	0.087 \pm 0.008
CA2	+ vehículo	0.098 \pm 0.010	0.114 \pm 0.005
	+ SR 141716	0.128 \pm 0.020	0.112 \pm 0.010
CA3	+ vehículo	0.114 \pm 0.012	0.092 \pm 0.021
	+ SR 141716	0.123 \pm 0.023	0.110 \pm 0.011
GD	+ vehículo	0.144 \pm 0.019	0.142 \pm 0.007
	+ SR 141716	0.138 \pm 0.010	0.143 \pm 0.007
PVH	+ vehículo	0.086 \pm 0.008	0.083 \pm 0.008
	+ SR 141716	0.103 \pm 0.011	0.108 \pm 0.005
VMN	+ vehículo	0.089 \pm 0.005	0.101 \pm 0.012
	+ SR 141716	0.087 \pm 0.009	0.089 \pm 0.012
BLA	+ vehículo	0.082 \pm 0.004	0.083 \pm 0.007
	+ SR 141716	0.081 \pm 0.007	0.073 \pm 0.007

Tabla 5 : Niveles de ARNm para c-fos determinados mediante hibridación *in situ* en ratas en las que se ha generado un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716 (10 mg/kg) a los 10 minutos de la última inyección de un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (tratamiento con Δ^9 -THC x desafío con SR141716) seguido de un test de Student-Newman-Keuls

Respecto a la expresión de otros genes afectados durante la abstinencia a otras drogas de abuso, el análisis de niveles de expresión de PENK en diferentes áreas cerebrales tampoco reveló ninguna respuesta específica de abstinencia (**Tabla 6 y Fig.7**). La administración del antagonista a animales controles disminuyó la expresión del gen de PENK en el núcleo accumbens (-29.1 %; $F=9.01$; $p<0.05$) y en el caudado-putamen (-18.3%; $F=5.70$; $p<0.05$). Sin embargo, en estas áreas no se produjeron modificaciones por el bloqueo del receptor CB₁ en animales tolerantes a Δ^9 -THC. Por el contrario, en la corteza piriforme el SR141716 induce la disminución de la expresión de PENK en animales tolerantes Δ^9 -THC (-16.9%; $F(5.05)$, $p<0.05$) pero en ratas controles no afecta a la expresión de este gen.

Niveles de ARNm para PENK (u.a.d.o.)			
Área cerebral	Tratamiento	Ratas control	Ratas tolerantes a Δ^9 -THC
N Acb	+ vehículo	0.309 ± 0.020	0.294 ± 0.013
	+ SR 141716	0.219 ± 0.027*	0.249 ± 0.029
CPu	+ vehículo	0.409 ± 0.017	0.394 ± 0.018
	+ SR 141716	0.334 ± 0.026 *	0.374 ± 0.017
Corteza piriforme	+ vehículo	0.339 ± 0.035	0.311 ± 0.012
	+ SR 141716	0.286 ± 0.033	0.275 ± 0.010 **
Amígdala	+ vehículo	0.267 ± 0.017	0.289 ± 0.022
	+ SR 141716	0.296 ± 0.052	0.326 ± 0.053
PVH	+ vehículo	0.306 ± 0.019	0.321 ± 0.033
	+ SR 141716	0.322 ± 0.023	0.291 ± 0.015
VMN	+ vehículo	0.405 ± 0.045	0.365 ± 0.017
	+ SR 141716	0.366 ± 0.027	0.415 ± 0.038

Tabla 6: Niveles de ARNm para proencefalina (PENK) determinados mediante hibridación *in situ* en ratas en las que se ha generado un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716 (10 mg/kg) a los 10 minutos de la última inyección de un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (tratamiento con Δ^9 -THC x desafío con SR141716) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (* p <0.05, ** p <0.005 vs el vehículo correspondiente)

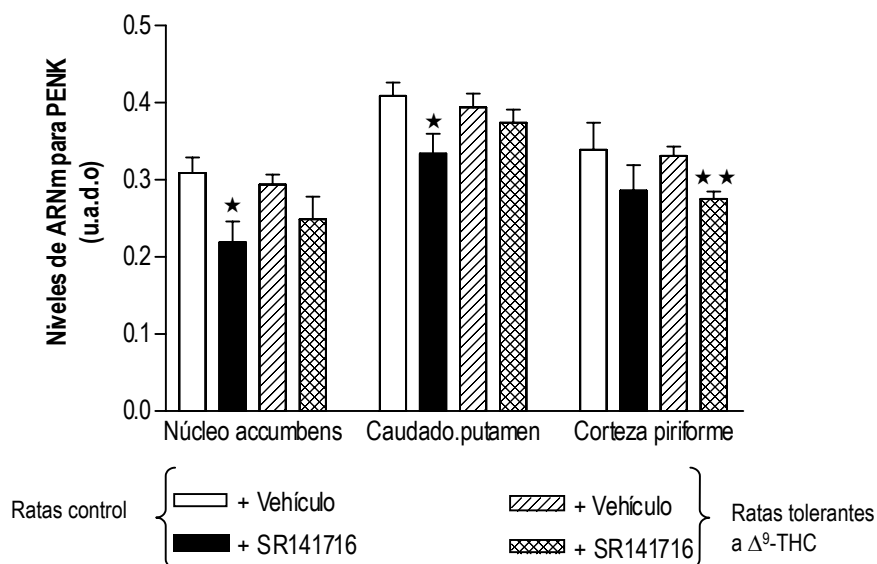


Fig. 7: Niveles de ARNm para proencefalina (PENK) determinados mediante hibridación *in situ* en ratas en las que se ha generado un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716 (10 mg/kg) a los 10 min de la última inyección de un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (tratamiento con Δ^9 -THC x desafío con SR141716) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (* p <0.05, ** p <0.005 vs el vehículo correspondiente)

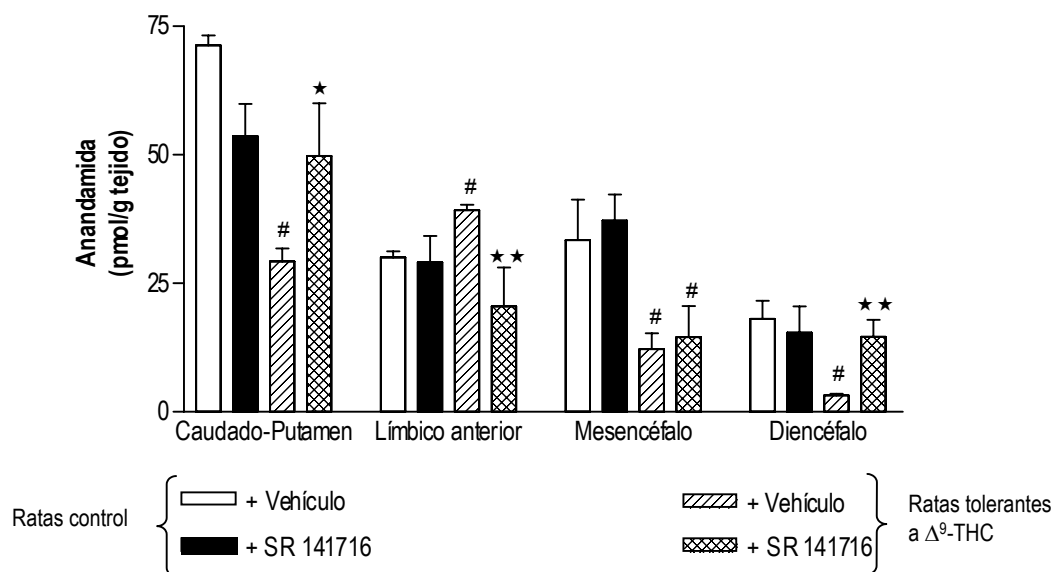


Fig. 8: Niveles de AEA en diferentes áreas cerebrales determinados mediante cromatografía GS/MS en ratas en las que se ha generado un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716 (10 mg/kg) a los 10 minutos de la última inyección de un tratamiento crónico con Δ⁹-THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron un análisis de varianza de dos vías (tratamiento con Δ⁹-THC x desafío con SR141716) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (*p<0.05, **p<0.005, vs el vehículo correspondiente; # p<0.05 vs controles)

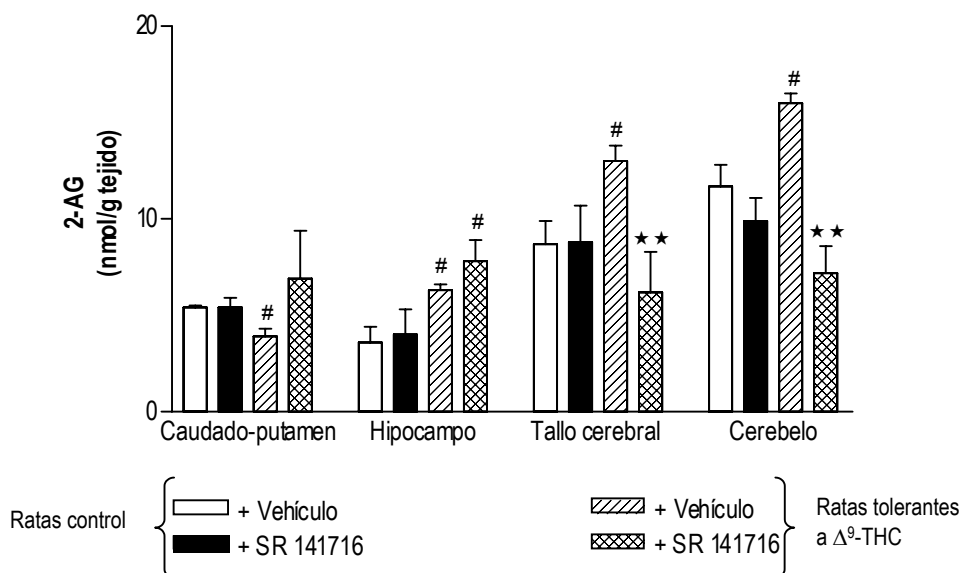


Fig. 9: Niveles de 2-AG en diferentes áreas cerebrales determinados mediante cromatografía de GS/MS en ratas en las que se ha generado un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB₁ con el antagonista SR141716 (10 mg/kg) a los 10 minutos de la última inyección de un tratamiento crónico con Δ⁹-THC (10 mg/kg de peso del animal, i.p., 8 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (tratamiento con Δ⁹-THC x desafío con SR141716) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (**p<0.005 vs el vehículo correspondiente; # p<0.05 vs controles)

2.2.4. Niveles de endocannabinoides

Al igual que en el primer diseño experimental, los contenidos de endocannabinoides (**Fig. 8 y Fig. 9**) se modifican por el tratamiento crónico con Δ^9 -THC fundamentalmente en regiones límbicas y motoras. Así, los niveles de AEA se incrementaron en el límbico anterior ($F=40.8$, $p<0.0005$) y disminuyeron en el estriado ($F=16.12$, $p<0.055$), mesencéfalo ($F=19.95$; $p<0.05$) y diencefalo ($F=23.45$, $p<0.005$) (**Fig 8**). En cuanto a los niveles de 2-AG se observaron incrementos en cerebelo ($F=17.84$; $p<0.052$), tallo cerebral ($F=10.72$; $p<0.05$) e hipocampo ($F=8.63$; $p<0.05$) y disminuciones en el estriado ($F=18.27$, $p<0.05$) (**Fig. 9**).

En general la administración de SR141716 no afecta a los niveles de endocannabinoides en los animales controles. Sin embargo este antagonista revierte los cambios que induce el tratamiento crónico con Δ^9 -THC en los niveles de AEA y 2-AG en el estriado, límbico anterior, diencefalo, cerebelo y tallo cerebral. Esta reversión del efectos no se produce en todas las áreas estudiadas ya que en el mesencéfalo e hipocampo, el SR141716 no modificó las alteraciones en los niveles de AEA y 2-AG que se producen en las ratas tolerantes a Δ^9 -THC.

2.3. Discusión parcial

Uno de los problemas fundamentales a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en animales de experimentación en cuanto a la aparición de abstinencia a cannabinoides, a lo que ocurriría en el consumo humano es la utilización, en los modelos estudiados, de ligandos cannabinoides sintéticos cuyas características farmacocinéticas o farmacodinámicas (Rodríguez de Fonseca et al., 1997; Aceto et al., 2001; Oliva et al., 2003) facilitarían el desarrollo de procesos de dependencia que podrían ser diferentes a los que se producen por el consumo de derivados de la *Cannabis sativa*. En nuestro modelo utilizamos Δ^9 -THC para generar dependencia ya que, el consumo de derivados de la *Cannabis sativa* implica en definitiva el consumo de Δ^9 -THC. Además utilizamos una dosis y tiempo de tratamiento más equiparable a la que se produce durante el consumo humano a diferencia de lo que se ha realizado en otros estudios (ver revisión en Maldonado, 2002)

El síndrome de abstinencia a cannabinoides según algunos autores aparece como un conjunto de alteraciones comportamentales que se caracterizan fundamentalmente por alteraciones en el comportamiento motor (Tsou et al.,

1995). En nuestro caso, la respuesta comportamental de estos animales también implica algunas alteraciones motoras. El temblor y la repulsión son las dos pautas más sensibles y que aparecen incrementados al igual que ocurre en otros estudios (Tsou y cols 1995; Aceto y cols 1996) mientras que *scratching* se atenúa en estos animales como se ha visto también que ocurre en ratones (Cook et al., 1998). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la mayor parte de las modificaciones comportamentales que induce en tratamiento con SR141716 en animales tolerantes a Δ^9 -THC se producen también en animales controles. De modo que estos efectos podrían estar más relacionados con un efecto inhibitorio del antagonista sobre el tono cannabinoide endógeno que con una respuesta específica de abstinencia.

Los niveles de endocannabinoides se modifican en nuestro modelo. Así, la mayoría de los cambios que se producen en ratas tolerantes a excepción de los niveles de AEA en el mesencéfalo y 2-AG en el hipocampo, se revierten por el tratamiento con el antagonista SR141716 mientras que SR141716 no afecta a los niveles de endocannabinoides en ratas controles. Las áreas estudiadas en ratas tolerantes a Δ^9 -THC responden de modo diferente al tratamiento con SR141716 que las de animales controles lo que podría relacionarse con la selectividad de las modificaciones comportamentales.

La modificación en la expresión de CRF hipotalámico que se evidenció en nuestros animales es quizá el dato más consistente que avale el desarrollo de abstinencia farmacológica a cannabinoides. Así, la funcionalidad de CRF se modificaría de modo similar a como lo hacen otras drogas de abuso (Sarnyai et al., 2001). Sin embargo, estas modificaciones en CRF no transcurren en paralelo con modificaciones en los niveles plasmáticos de hormonas de estrés.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL III: Estudio del posible papel iniciador de los cannabinoides en el consumo de otras drogas de abuso

Con el fin de clarificar la hipótesis del posible papel iniciador de los cannabinoides en el consumo de otras drogas de abuso con mayor poder adictivo, en nuestro estudio nos propusimos evaluar, en animales de experimentación, el efecto del consumo crónico de Δ^9 -THC sobre la capacidad reforzante de la morfina. El tratamiento crónico con este cannabinoide (5 mg/kg, i.p., 7 días) siguió produciendo la disminución esperada de densidad de receptor CB_1 en la mayor parte de las regiones estudiadas (Tabla 7), si bien los efectos fueron menos intensos que los que se producen con una dosis de 10 mg/kg. De hecho, de acuerdo con observaciones previas de otros autores (Romero y cols., 1998; Di Marzo y cols. 2000) las regiones límbicas y motoras fueron más refractarias a la disminución de receptor CB_1 . Sin embargo, a pesar del desarrollo de tolerancia farmacológica en estos animales no se modifica su vulnerabilidad a la morfina (Fig. 10). De hecho, en términos generales, el número de refuerzos fue levemente mayor en animales controles que en ratas sometidas a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC ($F=3.56$, $p<0.05$) aunque si se analizan los datos día a día sólo aparecen diferencias significativas el 4º día de autoadministración.

Por lo tanto, el tratamiento con cannabinoides no parece afectar a las propiedades reforzantes de la morfina. En concordancia con estos resultados, la actividad dopaminérgica (evaluada como la relación DOPAC/DA) no se modifica en regiones límbicas ni en regiones motoras (Tabla 8)

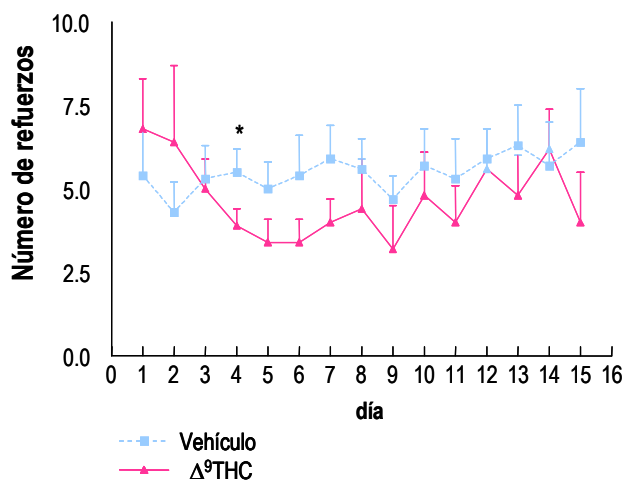


Fig. 10: Comportamiento de autoadministración de morfina (número de refuerzos) de ratas sometidas a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (5 mg/kg de peso del animal, i.p., 7 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de 2 vías (tratamiento con Δ^9 -THC x autoadministración de morfina) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (* $p<0.05$)

3.1. Discusión Parcial

En general, nuestros resultados indican que la capacidad reforzante que tiene la morfina en rata no se modifica por el consumo crónico de cannabinoides. Esto se corrobora con resultados obtenidos por otros autores en los que la administración de Δ^9 -THC no altera las propiedades reforzantes de la morfina en estudios de preferencia de plaza (Valverde et al., 2001) y se contrarresta a lo que algunos estudios epidemiológicos en humanos han concluido en relación a la teoría de es "escalada" en el consumo de drogas (Kande et al 1997, Fergusson and Horwood, 2000; Degenhardt et al., 2001, Von Sydow et al 2001). En cualquier caso este es un tema controvertido y existen estudios también de tipo epidemiológico que refutan los anteriores (Hammer y Vaglum, 1990; Chem and Kandel, 1998). En nuestro estudio, de acuerdo con el resultado comportamental no se observaron modificaciones en la relación DOPAC/DA, que nos sirve como índice de la actividad dopaminérgica, a nivel de las regiones límbicas implicadas en los fenómenos de recompensa cerebral. No obstante, existen datos en la literatura que avalan un posible papel del cannabis como iniciador al consumo de otras drogas en animales de experimentación. Así, el pretratamiento con cannabinoides induce sensibilización comportamental a heroína (Lamarque et al., 2001; Pontieri y cols, 2001), induce recaídas en el consumo de cocaína (De Vries et al., 2001) e incrementa la motivación por el consumo de alcohol (Gallate et al., 1998). Incluso el tratamiento con agonistas cannabinoides reinstaura el comportamiento de búsqueda compulsiva de droga después de la extinción del comportamiento de autoadministración de heroína (De Vries et al., 2003). Si bien hay que tener en cuenta que estos autores utilizan un cannabinoide sintético muy potente el HU210 de modo que este resultado no sería completamente extrapolable a lo que ocurriría en el consumo humanos.

UNIÓN ESPECÍFICA A RECEPTOR CB ₁ (fmol/ mg de proteína)				
Regiones Cerebrales		CONTROLES	Δ ⁹ -THC CRÓNICO	% de cambio
Corteza cerebral	Externa (i-ii)	39.774 ± 4.039	26.236 ± 3.773 *	-39.3
	Interna (v-vi)	43.069 ± 5.559	34.029 ± 4.317	-
Ganglios basales	CPu lateral	78.631 ± 8.603	76.610 ± 7.667	-
	CPu medial	65.983 ± 7.044	59.230 ± 6.122	-
	n. entopeduncular	108.956 ± 7.442	108.392 ± 6.649	-
Estructuras límbicas	Núcleo accumbens	51.670 ± 6.475	46.151 ± 4.826	-
	BLA	57.965 ± 3.625	40.938 ± 6.649 **	- 29.4
Hipocampo	CA1	93.097 ± 4.451	67.745 ± 1.241 ***	-27.3
	CA2	85.414 ± 3.853	64.635 ± 1.397 ***	-24.4
	CA3	73.573 ± 4.683	53.672 ± 2.297 **	-29.0
	Giro dentado	83.092 ± 7.178	64.255 ± 1.360 *	-22.6

Tabla 7: Densidad de receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) determinada mediante autorradiografía con [³H]CP55,940 en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con Δ⁹-THC (5 mg/kg de peso del animal, i.p., 7 días) o vehículo (Tween 80-salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de Student (*p<0.05; **p<0.005, ***p<0.0005)

Regiones Cerebrales			CONTROLES	Ratas tolerantes a Δ ⁹ -THC
Ganglios basales	CPu	Antes de autoadministración	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.01
		Después de autoadministración	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.01
	Sustancia nigra	Antes de autoadministración	0.25 ± 0.06	0.23 ± 0.05
		Después de autoadministración	0.31 ± 0.02	0.28 ± 0.05
Estructuras límbicas	Núcleo accumbens	Antes de autoadministración	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.02
		Después de autoadministración	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03
	VTA	Antes de autoadministración	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.05
		Después de autoadministración	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.01

Tabla 8: Relación entre las concentraciones de DA y su metabolito DOPAC (DOPAC/ DA) determinados mediante HPLC en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con Δ⁹-THC (5 mg/kg de peso del animal, i.p., 7 días) o vehículo (Tween 80-salino). La concentración de catecolaminas se determinó previa y posteriormente al ensayo de autoadministración de morfina. Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de 2 vías (tratamiento con Δ⁹-THC x administración de morfina) seguido de un test de Student-Newman-Keuls (*p<0.05)

4. DISEÑO EXPERIMENTAL IV: Estudio comparativo de los cambios que produce la exposición prolongada a diversas drogas de abuso sobre la neurotransmisión endocannabinoide

Con este conjunto de experimentos nos planteamos evaluar la implicación del sistema cannabinoide endógeno en la dependencia a drogas de abuso diferentes del *Cannabis*

4.1. Exposición crónica a morfina

El objetivo de este estudio era describir los cambios en elementos del sistema cannabinoide endógeno en el cerebro de animales que han sido sometidos a un tratamiento crónico con morfina tal y como se describe en Materiales y Métodos. El tratamiento utilizado es suficiente para producir dependencia en estos animales. De hecho, el tratamiento con el antagonista opioide naloxona de modo agudo después del mismo induce una serie de comportamientos

indicativos de abstinencia. Esto es, ptosis, piloerección, lacrimo, diarrea... (datos no mostrados)

4.1.1. Receptor CB₁

El tratamiento crónico con morfina incrementa la densidad de receptor CB₁ en el caudado-putamen medial pero produce una disminución en los niveles de ARNm en esta región y también en el caudado-putamen lateral y cerebelo (Fig 11 y Fig 12). En lo que se refiere a estructuras límbicas, y por tanto más relacionadas con los mecanismos de adicción a drogas, el tratamiento con morfina produce un aumento en la expresión del gen para el receptor CB₁ en los núcleos del septo pero no en la BLA. Además, la densidad de receptor se incrementa en el septo y en el núcleo accumbens mientras que la unión específica a este receptor disminuye en BLA. En áreas hipocampales la densidad de receptor CB₁ disminuye en el giro dentado y aumenta la expresión de CB₁ en CA2 (Tabla 9 y Tabla 10).

UNIÓN ESPECÍFICA A RECEPTOR CB ₁ (fmol/ mg de proteína)				
Regiones Cerebrales		CONTROLES	MORFINA CRÓNICO	% de cambio
Corteza cerebral	Externa (i-ii)	92.310 ± 5.380	98.240 ± 2.4	-
	Interna (v-vi)	79.210 ± 4.620	88.300 ± 3.140	-
Ganglios basales	CPu lateral	110.100 ± 4.040	119.900 ± 5.000	-
	CPu medial	89.860 ± 3.275	101.000 ± 3.080 *	+ 12.3
	Globo pálido	159.700 ± 3.420	158.900 ± 7.200	-
	n. entopeduncular	107.500 ± 17.470	85.980 ± 4.566	-
	Sustancia nigra	138.900 ± 9.050	140.500 ± 3.030	-
Estructuras límbicas	Núcleo accumbens	72.550 ± 4.12	88.460 ± 3.020 *	+ 21.9
	septum	107.700 ± 5.990	123.200 ± 4.700 *	+ 14.4
	BLA	72.500 ± 4.600	55.600 ± 6.100 *	- 23.3
Hipocampo	CA1	140.300 ± 4.210	122.400 ± 11.630	-
	CA2	143.700 ± 4.340	125.500 ± 10.640	-
	CA3	127.800 ± 3.600	111.300 ± 9.260	-
	Giro dentado	140.200 ± 3.860	114.000 ± 10.210 *	- 18.7
	Cerebelo	149.200 ± 3.370	147.400 ± 8.120	-

Tabla 9: Densidad de receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) analizados mediante autorradiografía con [³H]CP55,940 en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con morfina s.c durante 6 días (1^{er} día: 10 and 10 mg/kg; 2^o día: 20 y 20 mg/kg; 3^{er} día: 40 y 40 mg/kg; 4^o día: 60 y 60 mg/kg; 5^o día: 80 y 80 mg/kg y 6^o día: 100 mg/kg) o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de Student (*p<0.05)

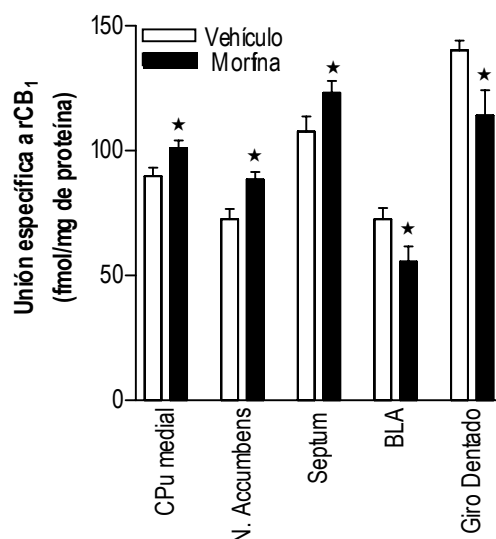


Fig. 11: Densidad de receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) evaluada mediante autorradiografía con [³H]CP55,940 en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con morfina s.c durante 6 días (1^{er} día: 10 and 10 mg/kg; 2^o día: 20 y 20 mg/kg; 3^{er} día: 40 y 40 mg/kg; 4^o día: 60 y 60 mg/kg; 5^o día: 80 y 80 mg/kg y 6^o día: 100 mg/kg) o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (*p<0.05;)

NIVELES DE ARNm PARA RECEPTOR CB ₁ (u.a.d.o.)				
Regiones Cerebrales		CONTROLES	MORFINA CRÓNICO	% de cambio
Corteza cerebral	Externa (ii-iii)	0.132 ± 0.009	0.116 ± 0.005	-
	Interna (v-vi)	0.122 ± 0.009	0.106 ± 0.006	-
Ganglios basales	CPu lateral	0.294 ± 0.017	0.220 ± 0.009 **	- 25.2
	CPu medial	0.171 ± 0.011	0.129 ± 0.012 *	- 24.6
Estructuras límbicas	septum	0.188 ± 0.010	0.224 ± 0.002 *	+ 19.1
	BLA	0.203 ± 0.018	0.174 ± 0.011	-
Hipocampo	CA1	0.166 ± 0.017	0.154 ± 0.008	-
	CA2	0.189 ± 0.013	0.229 ± 0.013	-
	CA3	0.249 ± 0.013	0.247 ± 0.016	-
	Giro dentado	0.247 ± 0.013	0.250 ± 0.009	-
Hipotálamo	VMN	0.200 ± 0.013	0.177 ± 0.010	-
	Cerebelo	0.534 ± 0.019	0.458 ± 0.023 *	- 14.2

Tabla 10 : Niveles de ARNm para el receptor CB₁ (u.a.d.o.) analizados mediante hibridación *in situ* en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con morfina s.c durante 6 días (1^{er} día: 10 and 10 mg/kg; 2^o día: 20 y 20 mg/kg; 3^{er} día: 40 y 40 mg/kg; 4^o día: 60 y 60 mg/kg; 5^o día: 80 y 80 mg/kg y 6^o día: 100 mg/kg) o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de Student (*p<0.05;**p<0.005)

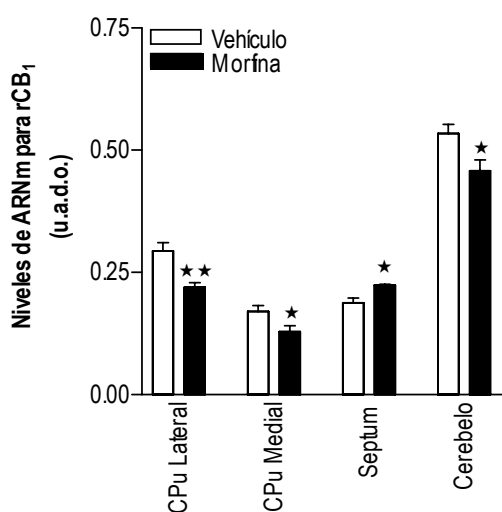


Fig. 12: Niveles de ARNm para el receptor CB₁ (u.a.d.o.) determinados mediante hibridación *in situ* en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con morfina s.c durante 6 días (1^{er} día: 10 and 10 mg/kg; 2^o día: 20 y 20 mg/kg; 3^{er} día: 40 y 40 mg/kg; 4^o día: 60 y 60 mg/kg; 5^o día: 80 y 80 mg/kg y 6^o día: 100 mg/kg) o vehículo (suero salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante el test de Student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$)

4.1.2. Endocannabinoides

Los niveles de AEA no se modifican con el consumo crónico de morfina.

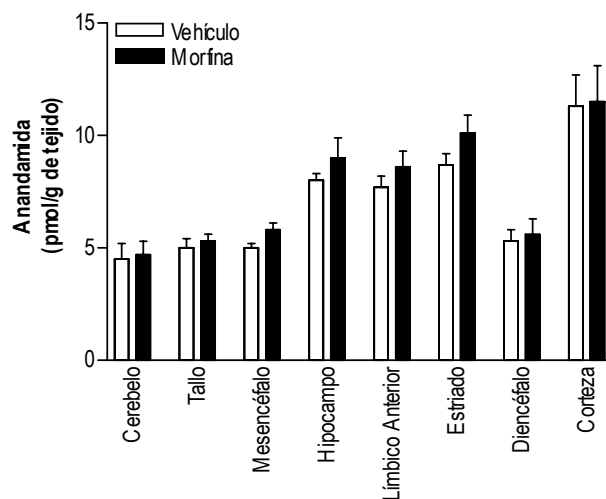


Fig. 13 : Niveles AEA (pmol/ mg de tejido) determinados mediante cromatografía de GS/MS en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con morfina s.c durante 6 días (1^{er} día: 10 and 10 mg/kg; 2^o día: 20 y 20 mg/kg; 3^{er} día: 40 y 40 mg/kg; 4^o día: 60 y 60 mg/kg; 5^o día: 80 y 80 mg/kg y 6^o día: 100 mg/kg) o vehículo (suero salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante el test de Student.

4.2. Exposición crónica a cocaína

Para profundizar en el estudio de las modificaciones que induce el consumo crónico de drogas de abuso sobre el SCE, evaluamos el impacto del tratamiento crónico con un psicoestimulante. Así, llevamos a cabo un tratamiento crónico con cocaína que produce dependencia. La cocaína ejerce sus efectos en el cerebro por mecanismos diferentes a los que subyacen a las acciones de los opioides. De este modo, quisimos determinar en que medida las alteraciones dentro del SCE constituían o no un mecanismo común en la actuación de drogas con distintos efectos farmacológicos y mecanismos de actuación.

4.2.1. Receptor CB₁

La exposición crónica a cocaína no modifica la densidad de receptor CB₁ en ninguna de las regiones cerebrales

estudiadas (**Tabla 11**) Sin embargo, la cocaína afecta de modo específico a la expresión del receptor CB₁ en determinadas regiones cerebrales. En general estas áreas se encuentra involucradas de forma directa o indirecta con los mecanismo de refuerzo inducidos por las drogas lo que significa que el receptor CB₁ podría estar implicado en el circuito de recompensa a cocaína. Así encontramos disminución en la expresión de CB₁ en la corteza cerebral, tanto en la capa superficial como en la interna. Además, se producen disminuciones en los niveles de ARNm para CB₁ en el núcleo hipotalámico ventromedial que forma parte del eje de estrés y por lo tanto es importante en la evaluación de los mecanismos de refuerzo a cocaína. Los receptores CB₁ localizados en áreas relacionadas con el control motor (ganglios basales) y los relacionados con la memoria (hipocampo) no se modificaron (**Tabla 11 y tabla 12**).

UNIÓN ESPECÍFICA A RECEPTOR CB ₁ (fmol/ mg de proteína)			
Regiones Cerebrales		CONTROLES	COCAÍNA CRÓNICO
Corteza cerebral	Externa (i-ii)	53.130 ± 4.390	54.870 ± 3.070
	Interna (v-vi)	40.550 ± 4.450	43.700 ± 3.280
Ganglios basales	CPu lateral	79.450 ± 10.870	88.550 ± 4.280
	CPu medial	64.530 ± 9.440	73.500 ± 3.260
	Globo pálido	140.800 ± 9.900	146.400 ± 9.470
	n. entopeduncular	112.900 ± 9.810	115.700 ± 9.329
	Sustancia nigra	154.400 ± 17.600	158.800 ± 15.430
Estructuras límbicas	Núcleo accumbens	56.360 ± 6.520	60.390 ± 1.954
	Septum	62.630 ± 10.750	71.180 ± 6.139
	BLA	37.760 ± 6.781	35.590 ± 5.710
Hipocampo	CA1	80.340 ± 5.590	80.940 ± 5.960
	CA2	76.820 ± 8.630	79.930 ± 8.073
	CA3	68.930 ± 6.350	73.440 ± 6.050
	Giro dentado	94.590 ± 5.090	93.340 ± 5.000
	Cerebelo	102.400 ± 4.706	110.300 ± 5.971

Tabla 11: Densidad de receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) determinados mediante autorradiografía con [³H]CP55,940 en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con cocaína 15 mg/kg de peso del animal 2 inyecciones diarias durante 10 días; i.p. o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student.

NIVELES DE ARNm PARA RECEPTOR CB ₁ (u.a.d.o.)				
Regiones Cerebrales		CONTROLES	COCAÍNA CRÓNICO	% de cambio
Corteza cerebral	Externa (ii-iii)	0.184 ± 0.013	0.139 ± 0.008 *	- 24.5
	Interna (v-vi)	0.172 ± 0.001	0.138 ± 0.008 *	- 19.8
Ganglios basales	CPu lateral	0.328 ± 0.023	0.311 ± 0.023	-
	CPu medial	0.216 ± 0.016	0.193 ± 0.011	-
Estructuras límbicas	Septum	0.238 ± 0.019	0.216 ± 0.017	-
	BLA	0.262 ± 0.010	0.240 ± 0.012	-
Hipocampo	CA1	0.235 ± 0.017	0.216 ± 0.014	-
	CA2	0.254 ± 0.02	0.266 ± 0.015	-
	CA3	0.293 ± 0.016	0.268 ± 0.016	-
	Giro dentado	0.296 ± 0.018	0.282 ± 0.016	-
Hipotálamo	VMN	0.298 ± 0.012	0.238 ± 0.012 *	- 20.1
	Cerebelo	0.743 ± 0.03	0.738 ± 0.015	-

Tabla 12: Niveles de ARNm para receptor CB₁ (u.a.d.o.) determinados mediante hibridación *in situ* en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con cocaína 15 mg/kg de peso del animal 2 inyecciones diarias durante 10 días; i.p. o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (*p < 0.05)

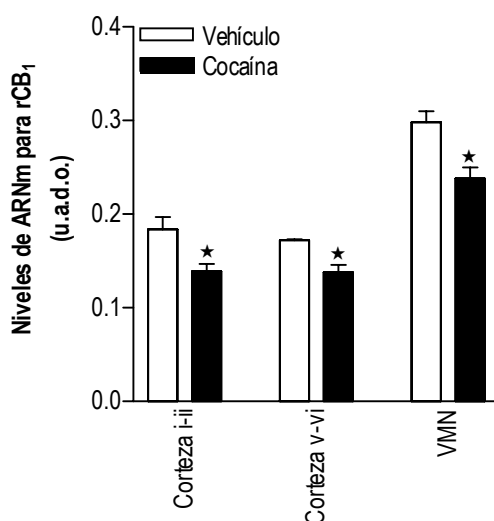


Fig. 14: Niveles de ARNm para receptor CB₁ (u.a.d.o.) determinados mediante hibridación *in situ* en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con cocaína 15 mg/kg de peso del animal 2 inyecciones diarias durante 10 días; i.p. o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (*p < 0.05)

4.2.2. Endocannabinoides

El tratamiento crónico con cocaína tiene escasas repercusiones sobre los niveles de endocannabinoides. De hecho, los niveles de AEA no se modifican por el tratamiento

en ninguna de las áreas estudiadas (Fig. 15). En cuanto a 2-AG únicamente encontramos un ligero descenso en los niveles de este endocannabinoide en el área límbica anterior (Fig. 16).

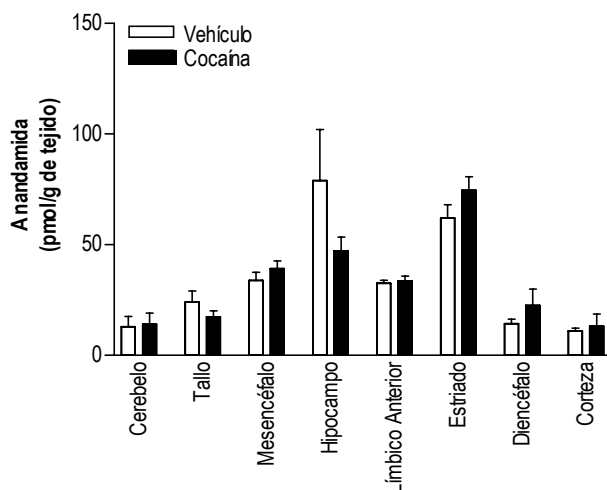


Fig. 15: Niveles de AEA (pmol/mg de tejido) analizados mediante cromatografía de GS/MS en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con cocaína 15 mg/kg de peso del animal 2 inyecciones diarias durante 10 días; i.p. o vehículo (suero salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student.

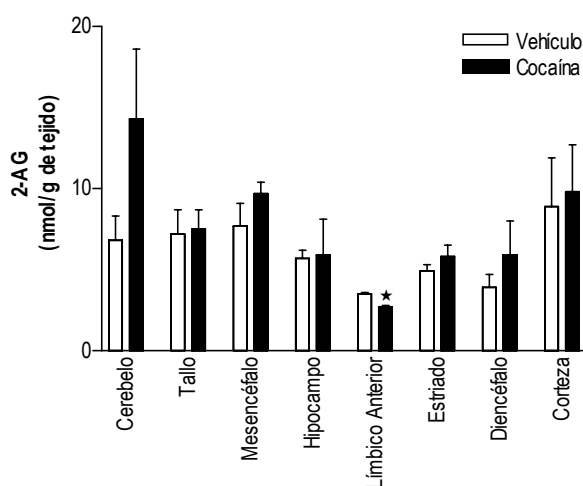


Fig. 16: Niveles de 2-AG (nmol/mg de tejido) analizados mediante cromatografía de GS/MS en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con cocaína 15 mg/kg de peso del animal 2 inyecciones diarias durante 10 días; i.p. o vehículo (suero salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (* $p < 0.05$).

4.3. Exposición crónica a etanol

Otra de las drogas cuyos efectos sobre el SCE quisimos evaluar fue el alcohol. En nuestro modelo experimental los animales consumen una disolución que contiene un 7,2% de etanol en el agua de bebida de forma forzada durante 2 semanas. Durante todo este tiempo se evaluó el consumo de dieta líquida para corroborar que efectivamente consumían el etanol. Los resultados se muestran en la figura 17. En general, el consumo de dieta líquida de los animales los controles no difiere del de los animales tratados con etanol. De modo que podemos afirmar que nuestros animales consumen alcohol a pesar de las propiedades aversivas que presenta este compuesto para las ratas laboratorias (Koob et al., 2000). Incluso, al final del tratamiento los animales que consumen alcohol beben más que los que beben agua (Fig. 17).

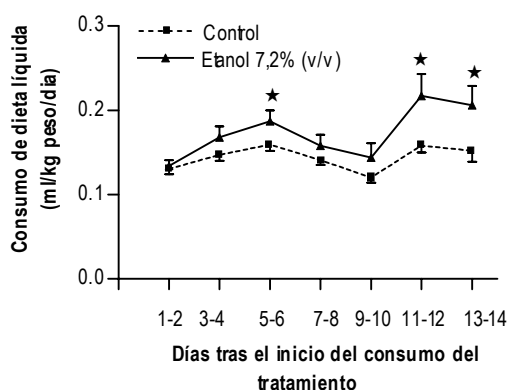


Fig. 17: Consumo de dieta líquida durante las dos semanas de tratamiento con etanol en el agua de bebida. Los valores son las medias + EEM agrupados en intervalos de 2 días. Los datos se analizaron mediante un test de Student (* $p < 0.05$)

4.3.1. Receptor CB₁

Como se ha comentado en la Introducción algunos autores habían encontrado una disminución en los receptores CB₁ tras el tratamiento con etanol. En esos estudios se utilizaban membranas procedentes de cerebro entero (Basavarajappa et al., 1997), nosotros nos propusimos un estudio más pormenorizado utilizando una técnica autorradiográfica utilizando el cannabinoide radiactivo CP55,940 que permite determinar la localización anatómica precisa del receptor CB₁. Al igual que ocurría cuando tratábamos con cocaína el tratamiento crónico con etanol no modificaba la densidad de receptor CB₁ en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas (Tabla 13). Además, la expresión del gen para el receptor CB₁ tampoco se modifica por el tratamiento crónico con etanol en nuestro modelo experimental en ninguna región cerebral de las analizadas (Tabla 14).

UNIÓN ESPECÍFICA A RECEPTOR CB ₁ (fmol/ mg de proteína)			
Regiones Cerebrales		CONTROLES	ETANOL CRÓNICO
Corteza cerebral	Externa (i-ii)	79.060 ± 3.180	84.090 ± 1.830
	Interna (v-vi)	82.780 ± 2.420	86.990 ± 1.420
Ganglios basales	CPu lateral	94.300 ± 2.770	98.240 ± 1.580
	CPu medial	86.860 ± 2.220	90.810 ± 1.270
	Globo pálido	95.920 ± 2.910	98.560 ± 3.780
	n. entopeduncular	84.080 ± 4.070	78.390 ± 6.250
	Sustancia nigra	206.300 ± 1.310	208.000 ± 0.760
Estructuras límbicas	N Acb	78.840 ± 7.450	88.160 ± 4.910
	septum	93.440 ± 4.730	91.080 ± 2.640
	BLA	84.760 ± 10.850	84.020 ± 11.520
Hipocampo	CA1	77.860 ± 3.190	68.800 ± 6890
	CA2	76.730 ± 3.930	69.050 ± 7.720
	CA3	72.240 ± 3.720	64.900 ± 6.570
	Giro dentado	81.600 ± 3.300	73.920 ± 6.250
	Cerebelo	175.600 ± 7.020	178.800 ± 6.420

Tabla 13: Densidad de receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) analizados mediante autorradiografía con [³H]CP55,940 en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con etanol *ad libitum* (7,2 %) en la dieta líquida diaria durante 2 semanas o vehículo (agua). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student.

NIVELES DE ARNm PARA RECEPTORCB ₁ (u.a.d.o.)			
Regiones Cerebrales		CONTROLES	ETANOL CRÓNICO
Corteza cerebral	Externa (ii-iii)	0.219 ± 0.024	0.195 ± 0.027
	Interna (v-vi)	0.219 ± 0.025	0.178 ± 0.026
Ganglios basales	CPu lateral	0.495 ± 0.051	0.428 ± 0.050
	CPu medial	0.295 ± 0.029	0.550 ± 0.023
Estructuras límbicas	septum	0.274 ± 0.032	0.296 ± 0.044
	BLA	0.282 ± 0.0250	0.265 ± 0.017
Hipocampo	CA1	0.274 ± 0.024	0.257 ± 0.024
	CA2	0.352 ± 0.029	0.327 ± 0.029
	CA3	0.351 ± 0.031	0.349 ± 0.021
	Giro dentado	0.414 ± 0.035	0.406 ± 0.023
Hipotálamo	VMN	0.309 ± 0.042	0.281 ± 0.032
	Cerebelo	0.172 ± 0.021	0.169 ± 0.012

Tabla 14: Niveles de ARNm para el receptor CB₁ (u.a.d.o.) analizados mediante hibridación *in situ* en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con etanol *ad libitum* (7,2 %) en la dieta líquida diaria durante 2 semanas o vehículo (agua). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student.

4.3.2. Endocannabinoides

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre a nivel del receptor CB₁, el tratamiento crónico con etanol modificó los niveles de endocannabinoides. Así, en nuestro modelo se incrementaban los niveles de AEA en el límbico anterior (que contienen, entre otros, al núcleo accumbens y la amígdala) (Fig.18). Es importante señalar que un aumento similar en los niveles de AEA se produce también en esta región tras un tratamiento crónico con Δ^9 -THC (ver diseño I). De modo que el aumento de este cannabinoide podría considerarse un cambio adaptativo a la presencia de determinadas drogas de abuso. En el caso del alcohol este incremento es particularmente interesante ya que podría explicar porque determinados compuestos que bloquean la neurotransmisión endocannabinoide son eficaces en la atenuación de las propiedades reforzantes del alcohol reduciendo la

preferencia por esta droga en roedores (Colombo et al 1998).

Además del aumento de AEA en el límbico anterior, se produjo una disminución de los contenidos de la propia AEA y de 2-AG en el mesencéfalo (Fig. 18 y Fig.19) (el área donde se localizan los cuerpos celulares de la neuronas que constituyen el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y que es crítico en los fenómenos de refuerzo). De modo que los endocannabinoides aumentaban en los terminales y disminuían en la zona de los cuerpos celulares de estas neuronas. Así, es posible que esa reducción de la neurotransmisión endocannabinoide constituya una respuesta compensatoria (*feed back* negativo del límbico anterior a la VTA). Esta hipótesis podría justificar la diferencia en los efectos del SR141716 en función del momento en el que se administra (Lallemant et al., 2001).

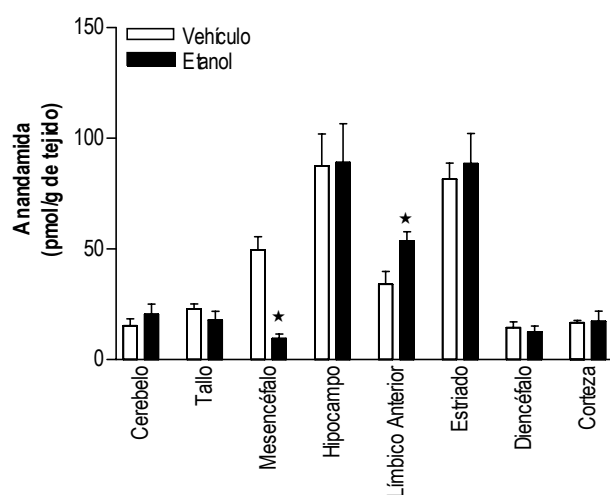


Fig. 18: Niveles de AEA (pmol/ mg de tejido) analizados mediante cromatografía de GS/MS en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con etanol *ad libitum* (7,2 %) en la dieta líquida diaria durante 2 semanas o vehículo (agua). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (* $p < 0.05$).

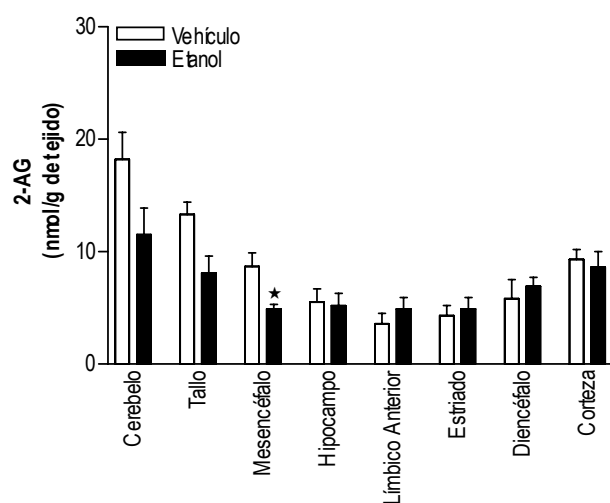


Fig. 19: Niveles de 2-AG (nmol/ mg de tejido) analizados mediante cromatografía de GS/MS en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con etanol *ad libitum* (7,2 %) en la dieta líquida diaria durante 2 semanas o vehículo (agua). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (* $p < 0.05$).

4.4. Exposición crónica a nicotina

El Cannabis suele fumarse mezclado con tabaco. Algunas áreas cerebrales con alta densidad de receptores CB₁ también presentan cantidades importantes de receptores nicotínicos (Clementi et al., 2001) de modo que podrían existir relaciones funcionales entre ambos sistemas. De hecho, algunos estudios farmacológicos evidencian la existencia de una interacción nicotina-cannabinoides (Valjent et al., 2002; Castane et al., 2002). Nosotros quisimos determinar en que medida el consumo prolongado de nicotina afecta al estado de la neurotransmisión cannabinoide.

4.4.1. Receptor CB₁

Las únicas modificaciones que produjo el tratamiento crónico con nicotina sobre el receptor CB₁ consisten en un incremento de la densidad en la capa interna de la corteza cerebral (Tabla 15, Fig 20) y una disminución de la expresión del receptor en el septo (Tabla 16, Fig 21).

UNIÓN ESPECÍFICA A RECEPTOR CB ₁ (fmol/ mg de proteína)				
Regiones Cerebrales		CONTROLES	NICOTINA CRÓNICO	% de cambio
Corteza cerebral	Externa (i-ii)	135.800 ± 7.196	153.700 ± 8.535	-
	Interna (v-vi)	179.300 ± 10.100	211.200 ± 9.400 *	- 17.8
Ganglios basales	CPu lateral	244.100 ± 13.660	260.700 ± 9.919	-
	CPu medial	228.600 ± 13.160	236.900 ± 8.408	-
	Globo pálido	355.800 ± 23.420	344.200 ± 36.710	-
	n. entopeduncular	155.200 ± 8.469	169.100 ± 11.730	-
	Sustancia nigra	245.900 ± 15.720	243.700 ± 16.970	-
Estructuras límbicas	Núcleo accumbens	200.300 ± 13.910	206.900 ± 8.866	-
	septum	204.700 ± 8.038	201.600 ± 9.130	-
Hipocampo	CA1	145.600 ± 9.019	154.800 ± 7.062	-
	CA2	141.400 ± 7.589	150.400 ± 6.050	-
	CA3	130.500 ± 7.730	138.200 ± 5.952	-
	Giro dentado	151.100 ± 10.770	160.000 ± 7.872	-
	Cerebelo	196.100 ± 16.540	182.600 ± 19.120	-

Tabla 15: Densidad de receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) analizada mediante autorradiografía con [³H]CP55,940 en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con nicotina 1 mg/kg de peso del animal durante 7 días; s.c. o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante test de Student (*p < 0.05).

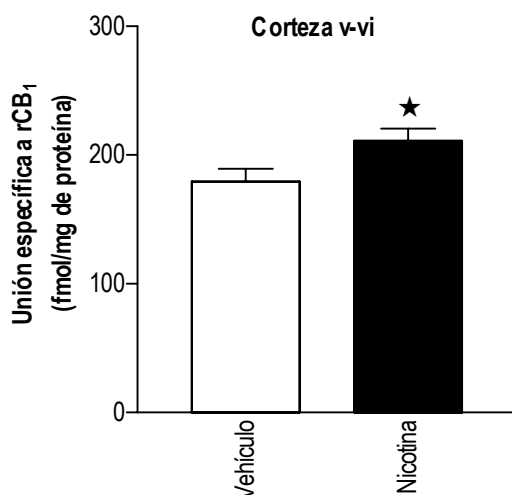


Fig. 20: Densidad de receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) analizados mediante autorradiografía con [³H]CP55,940 en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con nicotina 1 mg/kg de peso del animal durante 7 días; s.c. o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (*p < 0.05).

NIVELES DE ARNm PARA RECEPTOR CB ₁ (u.a.d.o.)				
Regiones Cerebrales		CONTROLES	NICOTINA CRÓNICO	% de cambio
Corteza cerebral	Externa (ii-iii)	0.250 ± 0.023	0.240 ± 0.010	-
	Interna (v-vi)	0.304 ± 0.025	0.243 ± 0.012	-
Ganglios basales	CPu lateral	0.494 ± 0.056	0.486 ± 0.033	-
	CPu medial	0.343 ± 0.027	0.325 ± 0.019	-
Estructuras límbicas	septum	0.506 ± 0.018	0.436 ± 0.002 *	- 13.8
	BLA	0.409 ± 0.025	0.387 ± 0.06	-
Hipocampo	CA1	0.386 ± 0.037	0.392 ± 0.03	-
	CA2	0.488 ± 0.032	0.451 ± 0.035	-
	CA3	0.466 ± 0.027	0.445 ± 0.013	-
	Giro dentado	0.431 ± 0.019	0.453 ± 0.019	-
Hipotálamo	VMN	0.390 ± 0.016	0.433 ± 0.021	-
	Cerebelo	0.878 ± 0.038	0.946 ± 0.03	-

Tabla 16: Niveles de ARNm para receptor CB₁ (u.a.d.o.) analizados mediante hibridación *in situ* en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con nicotina 1 mg/kg de peso del animal durante 7 días; s.c. o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (*p < 0.05)

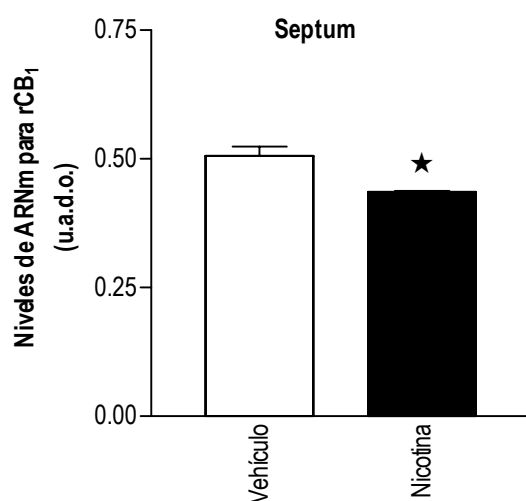


Fig. 21: Niveles de ARNm para receptor CB₁ (u.a.d.o.) analizados mediante hibridación *in situ* en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con nicotina 1 mg/kg de peso del animal durante 7 días; s.c. o vehículo (suero salino). Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (*p < 0.05)

4.4.2. Endocannabinoides

Frente a la relativa falta de efectos sobre los receptores CB₁, el tratamiento crónico con nicotina produce un incremento en AEA y 2-AG en el tallo cerebral (región que contiene el locus coeruleus que se encuentra implicado en la sintomatología de la abstinencia). Lo más relevante quizá sea el incremento que se produce en los contenidos de AEA en el límbico anterior (Fig. 22) que como ocurre con el etanol podría ser compatible con una estrategia farmacológica que utilice antagonistas para el tratamiento de la dependencia a nicotina. De hecho, la compañía Sanofi-Synthelabo se encuentra en la actualidad realizando un ensayo en fase III para la utilización de SR141716 (rimonabant) en el tratamiento de la adicción al tabaco (Le Fur et al., 2003). Los endocannabinoides también disminuyen en el hipocampo, estriado (sólo AEA) y corteza cerebral (Fig. 22 y Fig. 23) lo que podría relacionarse con efectos cognitivos (sobre la memoria) y motores de la nicotina.

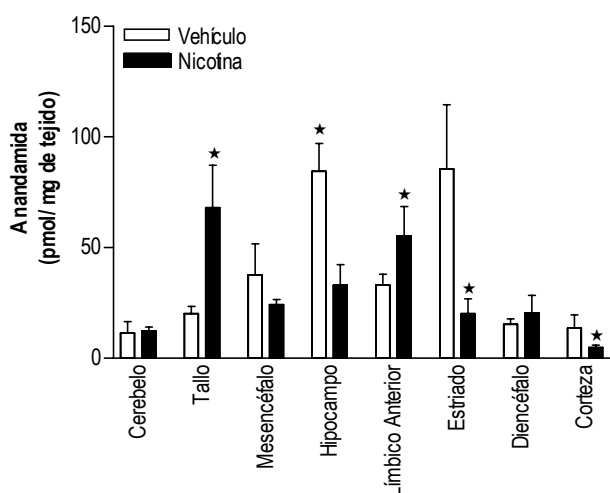


Fig. 22: Niveles de AEA (pmol/mg de tejido) analizados mediante cromatografía de GS/MS en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con nicotina 1 mg/kg de peso del animal durante 7 días; s.c. o vehículo (suero salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (* $p < 0.05$)

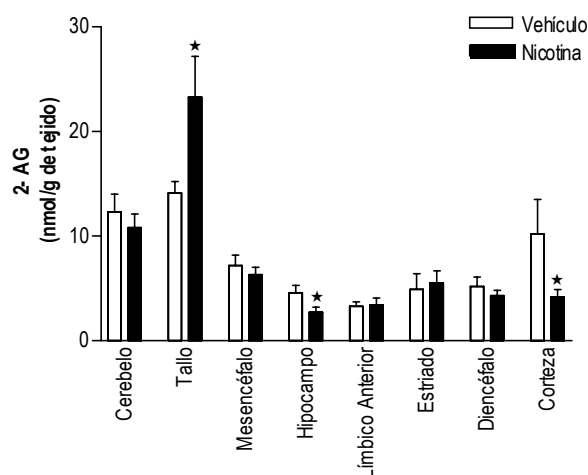


Fig. 23: Niveles de 2-AG (nmol/mg de tejido) analizados mediante cromatografía de GS/MS en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un tratamiento crónico con nicotina 1 mg/kg de peso del animal durante 7 días; s.c. o vehículo (suero salino). Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante un test de Student (* $p < 0.05$)

4.5. Discusión parcial

4.5.1. Morfina

El tratamiento crónico con morfina afecta fundamentalmente a regiones de los ganglios basales y estructuras límbicas e hipocampales. Así, en regiones motoras encontramos una disminución de la expresión de CB₁ en el caudado-putamen y en el cerebelo. Sin embargo, cuando analizamos la densidad de receptor encontramos incrementos en el caudado-putamen medial. En estructuras límbicas la exposición crónica a morfina induce incrementos en la densidad de receptor CB₁ en el septo y en el núcleo accumbens y disminuye en la amígdala basolateral. En estructuras hipocampales el tratamiento con morfina disminuye la densidad de CB₁ en el giro dentado y lo incrementa en la subcapa CA2 del Asta de Ammon. Sin embargo, en resultados obtenidos en otros laboratorios el tratamiento con morfina no modificaba la densidad de receptor CB₁ o afectaba únicamente al caudado-putamen (Rubino et al., 1997). El empleo de procedimientos diferentes para generar dependencia a opioides podría explicar estas diferencias. Esta controversia de resultados se manifiesta también en estudios farmacológicos. Así, si bien algunos autores describen el desarrollo de un síndrome de abstinencia al tratar animales tolerantes a morfina con el antagonista SR141716 similar al que se induce con el bloqueo de los receptores opioides con naloxona (Navarro et

al., 1998) otros autores sugieren la utilidad del bloqueo farmacológico de los receptores CB₁ en el tratamiento de la dependencia a morfina (Ledent et al., 1999, Rubino et al., 2000). En este sentido, se sabe que las propiedades reforzantes de la morfina se atenúan en animales *knock out* para CB₁ (Ledent et al., 1999). Además, el tratamiento con este opioide no es capaz de producir la estimulación de la liberación de dopamina en estructuras límbicas un hecho que si ocurre en animales WT (Mascia et al., 1999) Esto concuerda además con el hecho de que el tratamiento prolongado con el antagonista SR141716 reduzca la intensidad del síndrome de abstinencia en ratas tolerantes a morfina (Rubino et al., 2000). Sin embargo otros autores sugieren la utilidad de los agonistas cannabinoides en el tratamiento de la dependencia a morfina (Vela et al., 1995).

En definitiva, los datos observados a nivel bioquímico y/o farmacológico en relación a la interacción entre cannabinoides y opioides controvertidos. Los motivos de esta controversia pueden relacionarse con el empleo de diferentes aproximaciones experimentales así como con otros factores como las posibles diferencias en la localización celular de los receptores de ambos sistemas de neurotransmisión en cada una de las regiones cerebrales

4.5.2. Cocaína

En lo que se refiere a animales que se han tratado de modo crónico con cocaína no se observan modificaciones en la densidad de receptor CB₁ pero si en los niveles de ARNm para CB₁. Así, el tratamiento con cocaína disminuye la expresión del receptor CB₁ en el núcleo hipotalámico ventromedial componente del eje de estrés y por lo tanto muy importante en los fenómenos de adicción a drogas. En la corteza cerebral tanto superficial como profunda se produce también una disminución de la expresión del gen para el receptor CB₁. Que las modificaciones a nivel de receptor se reduzcan a la expresión el receptor y no a la densidad del mismo puede indicar que el tratamiento con cocaína no afecta a la actividad basal del sistema endocannabinoide pero si afecte a la capacidad de respuesta del sistema, en tanto en cuanto no es capaz de responder con la misma eficacia ante un requerimiento de síntesis de receptor. Por otro lado es posible que la cocaína afecte a la estabilidad del ARNm para CB₁ y de ahí su disminución. En lo referente a los niveles de endocannabinoides se produjo una disminución de 2-AG en el límbico anterior. Existen estudios farmacológicos que sugieren que el SCE está implicado en el circuito de recompensa a cocaína. Así, los agonistas cannabinoides reducen la autoadministración de cocaína (Fattore et al.,

1999) y antagonistas del receptor CB₁ bloquean la adquisición de preferencia de plaza en ratas (Chaperon et al., 1998) y atenúa la recaída a cocaína (De Vries et al., 2001). Sin embargo, en nuestro estudio la cocaína no induce modificaciones en los niveles de AEA que tradicionalmente se ha considerado el endocannabinoide principal para el receptor CB₁ en el cerebro. De este modo el receptor CB₁ no estaría implicado en el circuito de recompensa a cocaína. Estudios en animales modificados genéticamente corroboran esta idea ya que la autoadministración de cocaína no se modifica en ratones *knock out* para el receptor CB₁ (Cossu et al., 2001).

4.5.3. Alcohol

Estudios previos relacionaban el consumo de alcohol con la neurotransmisión endocannabinoide (Colombo et al., 1998, Gallate et al., 1999; Serra et al., 2002). Como se ha comentado en la Introducción algunos autores habían encontrado una disminución en los receptores CB₁ tras el tratamiento con etanol (Basavarajappa et al, 1998). Ellos utilizaban fracciones de membranas procedentes de cerebro entero, nosotros no propusimos un estudio más pormenorizado utilizando una técnica autorradiográfica utilizando el cannabinoide radiactivo CP55,940 que nos permite determinar la localización anatómica precisa del receptor CB₁. Sin embargo, contrariamente a lo esperado no se observaron modificaciones en este receptor tras el tratamiento crónico con etanol. No obstante, el consumo crónico de etanol incrementa los niveles de AEA en el límbico como habían encontrado otros autores en la síntesis de endocannabinoides en estudios *in vitro* en células de neuroblastoma (Basavarajappa et al., 1999). Este incremento parece suficiente para estimular los receptores en esas regiones dando lugar a una hiperactividad de la neurotransmisión endocannabinoide que podría ser la responsable, al menos en parte, de la propiedades adictivas del alcohol. Esta hipótesis proporciona una explicación a los efectos del SR141716 en la reducción de la ingesta de etanol y el bloqueo de la alcoholización mientras que agonistas del receptor CB₁ producen los efectos contrarios. El momento de la administración de SR141716 es crítico para obtener los efectos deseados sobre el consumo de etanol de modo que si se administra durante la alcoholización se produce un incremento en la preferencia por etanol (Lallemant et al., 2001). Además, del incremento de AEA el etanol produce una disminución de AEA y 2-AG en el mesencéfalo, el área que contiene los cuerpos celulares de la ruta dopaminérgica mesocorticolímbica. De este modo, los niveles de endocannabinoides aparecen incrementados en los terminales de las neuronas de dicha

vía (área límbica) y se reducen en la zona de los somas de estas neuronas (mesencéfalo). Es posible que la reducción en la señal endocannabinoide en el mesencéfalo represente una respuesta compensatoria de *feed back* desde el límbico anterior. Esta evidencia proporciona también una explicación ante las diferencias en la respuesta al tratamiento con SR141716 que manifiestan los animales según el momento del proceso de alcoholización en la que se produzca. (Lallemant et al., 2001).

4.5.4. Nicotina

Este incremento en los niveles de AEA en el área límbica anterior sin cambios en el receptor también se produce por el tratamiento crónico con nicotina y se podría relacionar como para el caso del etanol con la posible utilidad terapéutica del tratamiento con antagonistas cannabinoides en la dependencia/ abstinencia a nicotina. A este respecto se conoce que la autoadministración de nicotina no se afecta en ratones *knock out* para el receptor CB₁, sin embargo, como se ha comentado anteriormente, en la actualidad se evalúa la eficacia del tratamiento con parches de SR141716 en el tratamiento de la adicción al tabaco (Le Fur et al., 2003) En cualquier caso es necesario destacar que a pesar del efecto común sobre los niveles de AEA que se produce en el

límbico anterior, el resto de regiones analizadas presentan distintos patrones en las alteraciones en los niveles de endocannabinoides. El tratamiento con nicotina induce el incremento de AEA y 2-AG en el tallo cerebral. Este área contiene al Locus coeruleus que es un núcleo que se relaciona con la sintomatología de abstinencia a drogas de abuso. Además el tratamiento con nicotina induce disminuciones en los niveles de AEA en el hipocampo, estriado y corteza cerebral. Estas regiones presentan una elevada densidad de receptores nicotínicos (Clementi et al., 2000) y podría reflejar una acción en las rutas bioquímicas que controlan la producción de endocannabinoides que se encuentran bajo el control de una serie de receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Se podría decir que la inhibición de la señalización endocannabinoide que se produce en los núcleos cerebrales que controlan los procesos cognitivos (corteza) y el aprendizaje (hipocampo) podría contribuir a la propiedades de la nicotina en esos procesos (Rezvani et al., 2001). En la misma línea de razonamiento, la disminución de los contenidos estriatales de AEA y 2-AG podrían contribuir a la activación de la actividad locomotora que induce la nicotina en roedores (Clementi et al., 2000)

5. DISEÑO EXPERIMENTAL V: Estudio del sistema cannabinoide endógeno durante el proceso de alcoholización en rata

Con este diseño nos planteamos evaluar el estado de la neurotransmisión cannabinoide durante del proceso de alcoholización de la rata a fin de evaluar si los diferentes efectos farmacológicos que se han descrito para el SR141716 según el momento en el que se administre (Lallemad et al. 2001), se pueden relacionar con modificaciones a este nivel. A continuación presentamos los resultados del análisis del patrón de cambios en los endocannabinoides y sus receptores durante tres fases consecutivas de la adicción alcohólica en ratas. Esto es, consumo crónico forzado, abstinencia y consumo voluntario.

5.1 Receptor CB₁

El análisis de la unión específica a receptor CB₁ (Tabla 17) y de la expresión del ARNm para este receptor (Tabla 18; Fig 24) evidenció escasas modificaciones a lo largo del

proceso de adicción alcohólica. Así la unión específica a receptor CB₁ se modificó en la capa superficial de la corteza (F(3,23)=3.982, p<0.05) de modo que la densidad de receptor se incrementa en la fase de preferencia del animal respecto de la abstinencia. La expresión del gen para el receptor CB₁ se modificó en la corteza cerebral tanto en las capas superficial (F(2,23)= 5.025, p< 0.01) y profunda (F(3,23)= 6.946, p< 0.05), en el caudado putamen medial (F(3,23)=7.086, p<0.005), en el núcleo hipotalámico ventromedial (F(3,23)=4.933, p<0.01) y en hipocampo (CA1: F(3,23)=10.94, p<0.0005; giro dentado: F(3,23)=19.46, p<0.0001). En la mayor parte de estas regiones los niveles de ARNm más elevados se encuentran en la fase de consumo voluntario. A excepción del VMN y el caudado putamen donde el valor máximo apareció en la fase de abstinencia.

UNIÓN ESPECÍFICA A RECEPTOR CB ₁ (fmol/ mg de proteína)				
	Vehículo	Etanol Crónico	Abstinencia	Preferencia
Corteza (i-ii)	75.300 ± 6.035	49.119 ± 10.876	76.231 ± 9.547	83.892 ± 5.465 #
Corteza (v-vi)	85.754 ± 8.407	75.811 ± 7.531	75.481 ± 7.200	86.382 ± 2.747
CPu Lateral	159.379 ± 9.198	148.046 ± 8.765	137.165 ± 10.984	164.512 ± 11.157
CPu medial	119.488 ± 7.971	108.763 ± 10.298	107.021 ± 8.215	111.765 ± 12.936
N. Accumbens	85.870 ± 8.141	74.998 ± 11.012	80.334 ± 8.469	65.854 ± 8.703
Globo pálido	136.647 ± 11.596	165.232 ± 24.152	146.883 ± 8.844	145.695 ± 9.740
CA1	91.507 ± 4.911	95.897 ± 7.996	83.982 ± 9.095	87.369 ± 2.600
CA2	90.304 ± 4.098	90.633 ± 6.897	79.168 ± 10.076	87.861 ± 2.100
CA3	76.751 ± 1.746	79.429 ± 6.112	72.764 ± 7.336	73.095 ± 3.060
Giro dentado	111.892 ± 8.269	117.188 ± 5.642	101.929 ± 9.733	114.523 ± 2.114
N. Entopeduncular	179.184 ± 20.414	191.587 ± 16.521	173.323 ± 10.594	136.919 ± 28.713
Sustancia nigra	214.959 ± 26.231	203.403 ± 17.641	195.101 ± 22.833	217.668 ± 14.881
Cerebelo	269.028 ± 9.347	267.127 ± 17.174	251.038 ± 19.532	286.335 ± 11.876

Tabla 17: Densidad de receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) analizados mediante autorradiografía con [³H]CP55,940 en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un proceso de alcoholización tal y como se detalla en materiales y métodos. Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante ANOVA de 1 vía seguido por un test de Bonferroni (*p< 0.05 vs vehículo, # p<0.05 vs etanol crónico, § p<0.05 vs abstinencia)

NIVELES DE ARNm PARA RECEPTOR CB ₁ (u.a.d.o.)				
	Vehículo	Etanol Crónico	Abstinencia	Preferencia
Corteza (ii-iii)	0.246 ± 0.008	0.292 ± 0.054	0.379 ± 0.046	0.412 ± 0.031*
Corteza (v-vi)	0.267 ± 0.017	0.267 ± 0.034	0.375 ± 0.045* #	0.394 ± 0.024* #
CPu Lateral	0.534 ± 0.042	0.480 ± 0.015	0.599 ± 0.099	0.569 ± 0.023
CPu medial	0.306 ± 0.016	0.311 ± 0.029	0.418 ± 0.022* #	0.401 ± 0.027*
CA1	0.576 ± 0.019	0.548 ± 0.022	0.514 ± 0.019	0.639 ± 0.018 # # \$\$\$
CA2	0.704 ± 0.044	0.592 ± 0.036	0.582 ± 0.051	0.707 ± 0.045
CA3	0.600 ± 0.025	0.596 ± 0.037	0.586 ± 0.020	0.633 ± 0.045
Giro dentado	0.547 ± 0.013	0.554 ± 0.021	0.594 ± 0.020	0.686 ± 0.015 *** ### \$\$
Habénula	0.543 ± 0.032	0.548 ± 0.047	0.597 ± 0.048	0.591 ± 0.045
BLA	0.581 ± 0.108	0.522 ± 0.029	0.605 ± 0.028	0.654 ± 0.048
VMN	0.571 ± 0.056	0.619 ± 0.047	0.725 ± 0.015*	0.683 ± 0.018
Cerebelo	1.151 ± 0.052	1.049 ± 0.043	1.173 ± 0.038	1.020 ± 0.047

Tabla 18: Niveles de ARNm para el receptor CB₁ (u.a.d.o.) analizados mediante hibridación *in situ* en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un proceso de alcoholización tal y como se detalla en materiales y métodos. Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante ANOVA de 1 vía seguido por un test de Bonferroni (*p< 0.05 vs vehículo, # p<0.05 vs etanol crónico, \$ p<0.05 vs abstinencia)

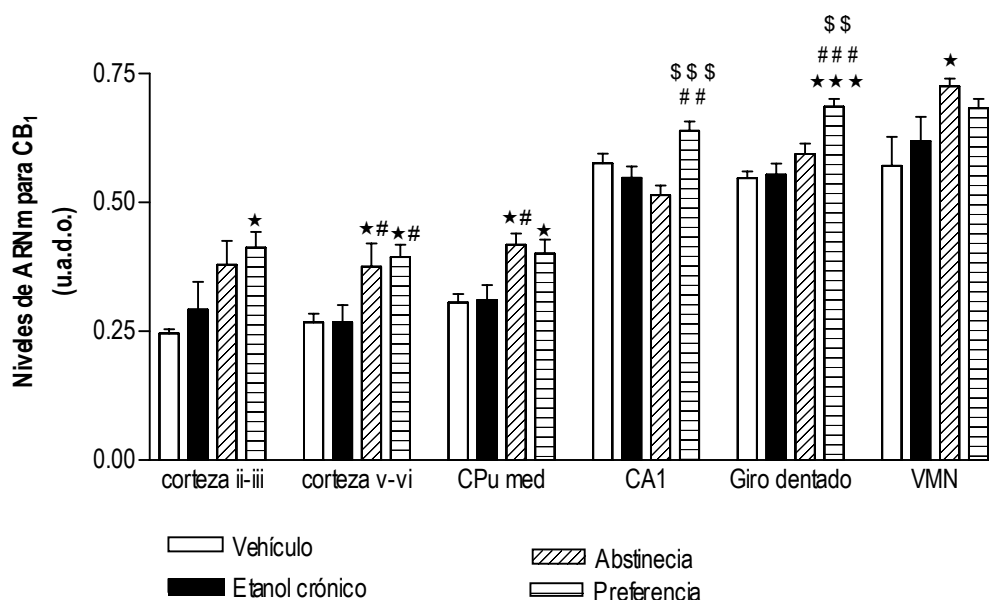


Fig. 24: Niveles de ARNm para el receptor CB₁ (u.a.d.o.) analizados mediante hibridación *in situ* en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un proceso de alcoholización tal y como se detalla en materiales y métodos. Los valores son medias ± EEM. Los datos se analizaron mediante ANOVA de 1 vía seguido por un test de Bonferroni (*p< 0.05 vs vehículo, # p<0.05 vs etanol crónico, \$ p<0.05 vs abstinencia)

5.2 Endocannabinoides

En contraposición con las escasas modificaciones que se producen a nivel de receptor, durante el proceso de alcoholización se produjeron modificaciones marcadas en los niveles de endocannabinoides en dos regiones cerebrales relacionadas con el refuerzo: el área límbica anterior y el mesencéfalo. En el límbico anterior (**Fig. 25, y Fig 26**) los niveles de tanto AEA como 2-AG se incrementaron después de 7 días de tratamiento forzado con etanol mientras que los contenidos de ambos endocannabinoides disminuyen de forma dramática después de 48 horas de abstinencia y esas reducciones se acentuaron cuando los animales pasan a una situación experimental en la que se les permite elegir entre agua y una disolución de etanol para beber. Por el contrario en el mesencéfalo disminuyeron los niveles de AEA tras 7 días de tratamiento forzado con etanol. (**Fig 25**) Esta disminución no se alteró durante la fase de abstinencia pero los niveles de AEA y 2-AG se redujeron en el consumo voluntario de etanol (**Fig 25 y Fig 26**)

5.3 Discusión parcial

Al igual que en el diseño experimental anterior se pudo observar que las concentraciones de AEA y 2-AG se modifican tras la exposición crónica a etanol (incremento en el área límbica anterior y disminuciones (solo AEA) en el mesencéfalo). Sin embargo, lo más interesante de este estudio fue que la interrupción del proceso de alcoholización

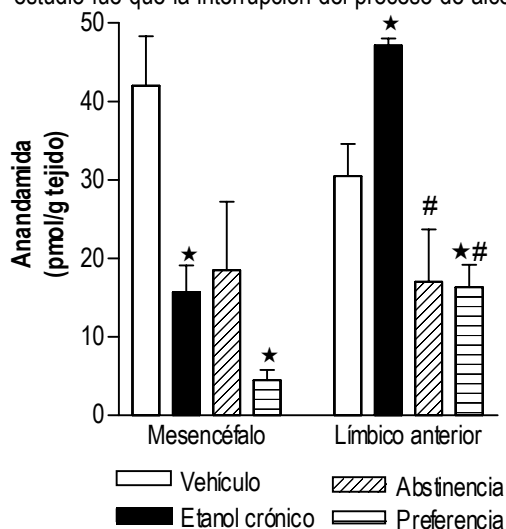


Fig. 25: Niveles de AEA (pmol/mg de tejido) analizados mediante cromatografía de GS/MS en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un proceso de alcoholización tal y como se detalla en materiales y métodos. Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante ANOVA de 1 vía seguido por un test de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs vehículo; # $p < 0,05$ vs etanol crónico)

forzada produjo un el área límbica anterior una reducción muy marcada de los niveles de endocannabinoides. De hecho los niveles de endocannabinoides durante la abstinencia se encuentran incluso más bajos que en los controles. Esto no ocurrió en el mesencéfalo. Es posible que esta disminución indique que, frente al posible papel que la elevación de los niveles de endocannabinoides podría tener en lo que se refiere a las propiedades reforzantes del alcohol, durante la abstinencia, parte de la sintomatología somática y neurovegetativa pudiera estar asociada a una pérdida del tono endocannabinoide. Esta hipótesis podría justificar el incremento en la ansiedad, hiperlocomoción u otros trastornos cognitivos que se producen durante la abstinencia a alcohol. Sin embargo, el paso a una fase de consumo voluntario de agua y/o etanol se acompaña de una reducción aún más marcada del tono endocannabinoide que afecta especialmente al área mesencefálica.

Independientemente de la relación que se pueda establecer entre el tono endocannabinoide y las características fisiológicas y comportamentales de cada una de las fases del proceso de adicción a alcohol, el estado de la transmisión endocannabinoide en regiones implicadas en el refuerzo a drogas fluctúa durante el proceso de adicción a alcohol. Estos resultados sugieren que el sistema cannabinoide endógeno podría ser susceptible de manipulación farmacológica tanto para disminuir las propiedades incentivadas del alcohol como para atenuar los síntomas de la abstinencia

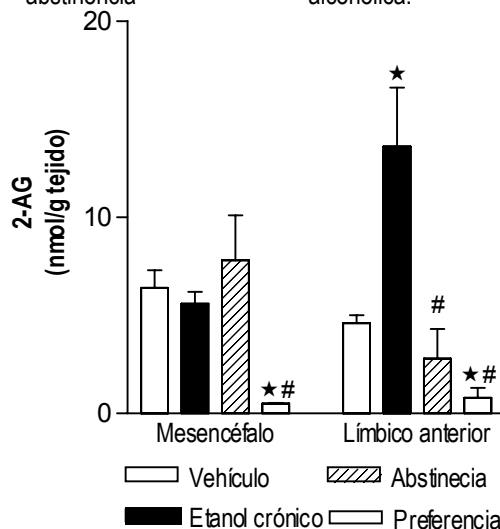


Fig. 26: Niveles de 2-AG (nmol/mg de tejido) determinados mediante cromatografía de GS/MS en distintas áreas cerebrales de ratas sometidas a un proceso de alcoholización tal y como se detalla en materiales y métodos. Los valores son medias \pm EEM. Los datos se analizaron mediante ANOVA de 1 vía seguido por un test de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs vehículo; # $p < 0,05$ vs etanol crónico)

6. DISEÑO EXPERIMENTAL VI: Estudio de las repercusiones del tratamiento farmacológico del SCE sobre la ingesta de alcohol

Con este grupo de experimentos pretendíamos evaluar la eficacia de la manipulación farmacológica del SCE en adicción alcohólica. Dado que, como acabamos de detallar en el diseño 5 los cambios en el tono endocannabinoide durante el consumo voluntario de etanol y durante la abstinencia son opuestos (incremento durante el consumo crónico vs disminución durante la abstinencia) el tipo de estrategia a elegir debe de ser diferente. En función del punto del proceso de alcoholización donde queramos incidir.

6.1 Análisis comportamental y tratamientos farmacológicos

En este grupo de experimentos hemos determinado en que modo la activación o el bloqueo de la neurotransmisión endocannabinoide puede influir en la ingesta y/o preferencia por el etanol en un modelo de consumo voluntario de etanol o agua. (Fig 27) Así, el tratamiento con Δ^9 -THC y con CP55,940 reduce tanto la ingesta total de líquido ($F(5,67)=5.224$, $p<0.0005$) como la de etanol ($F(5,66)=2.53$, $p<0.05$) pero no afecta a la preferencia por etanol

($F(5,67)=0.773$, ns) Estos efectos sobre el consumo de líquido no se deben indirectamente a la capacidad de ambos agonistas cannabinoideos para producir inhibición motora. En el caso del CP55,940 hemos utilizado una dosis (0,1 mg/kg de peso del animal) que ya había sido ensayada en nuestro laboratorio y que no altera la respuesta motora en el test de campo abierto (Lastres-Becker et al., 2003) y, en el caso del Δ^9 -THC observamos que a la dosis utilizada no altera ni la ambulación ni la inactividad en test de campo abierto Ambulación: (+ vehículo: 102.0 ± 10.3 ; + Δ^9 -THC: 76.8 ± 20.5 , no significativo) e inactividad (+ vehículo: 10.6 ± 7.1 ; + Δ^9 -THC: 24.286 ± 13.82 , no significativo). El pretratamiento con el antagonista selectivo SR141716 produce una disminución en la ingesta total de líquido y no afecta a la preferencia por el etanol. Sin embargo, si se “re-analizan” los datos experimentales de preferencia extrayendo de la muestra aquellos animales que, en general, prefieren beber de la botella de agua en vez de la que contienen etanol (preferencia por etanol >50%) se observa que la co-administración de Δ^9 -THC y SR141716 produjo una marcada reducción de la preferencia por el alcohol ($F(5,41)=2.73$, $p<0.05$). El resto de fármacos siguen sin afectar a la preferencia.

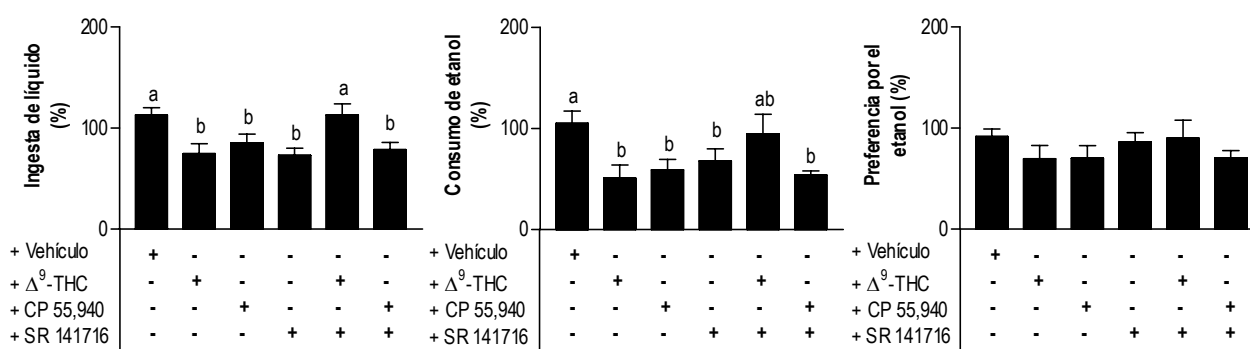


Fig 27: Porcentaje de ingesta total de líquido (A), consumo de etanol (B) y preferencia por el etanol (C) de ratas a las que se ha administrado Δ^9 -THC, CP55,940, SR141716 solos o en combinación en un modelo de alcoholización tal y como se detalla en el apartado 2.6 de materiales y métodos. Los datos se expresan como medias \pm EEM. Los resultados se analizan mediante un ANOVA de 1 vía seguido de un test de Student-Newman-Keuls. (las barras identificadas con diferente letra presentan significación estadística $p<0.05$)

6.2 Neuroquímica

Finalmente quisimos valorar en que medida las acciones de los cannabinoides sobre la ingesta de alcohol se podían basar en modificaciones en la neurotransmisión GABAérgica y dopaminérgica. En nuestro modelo, para ninguno de estos parámetros neuroquímicos se observaron modificaciones estadísticamente significativas en ninguna de las áreas estudiadas aunque existen algunas tendencias. Así, Δ^9 -THC y CP 55,940 tienden a incrementar los contenidos de GABA y la actividad GAD en el núcleo accumbens y estos incrementos se atenúan por el tratamiento con SR141716. Además, Δ^9 -THC muestra una tendencia a incrementar los contenidos de DA y DOPAC y actividad tirosina hidroxilasa

en el núcleo accumbens mientras que el CP55,940 exhibe las tendencias opuestas en la VTA. El SR141716 no tiene efecto por sí mismo en ninguna de las áreas estudiadas (**Tabla 19**). En nuestro modelo, también analizamos estos parámetros neuroquímicos en áreas relacionadas con el control motor a fin de descartar que cualquier efecto del tratamiento con cannabinoides sobre la ingesta de etanol pudiera deberse a acciones relacionadas con los efectos motores de este tipo de compuestos. Así, en los ganglios basales no se observaron modificaciones en la neurotransmisión dopaminérgica y GABAérgica (**Tabla 19**) lo que concuerda, en el caso del THC, con la ausencia de modificaciones a nivel motor que se recoge en el apartado 6.1 de esta sección.

Tabla 19: Contenidos de DA, DOPAC y GABA y actividad TH y actividad GAD determinadas en áreas límbicas y motoras de ratas tratadas con Δ^9 -THC, CP55,940, SR141716 sólo o en combinación en ratas sometidas a un proceso de alcoholización. según se describe en el apartado de materiales y métodos Los datos se expresan como medias \pm EEM.

Región cerebral	NA	VTA	CPu	SN
GABA ($\mu\text{g}/\text{mg}$):				
+ vehículo	2.9 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3	1.4 \pm 0.2	5.7 \pm 0.4
+ Δ^9 -THC	3.8 \pm 0.8	3.0 \pm 0.5	1.6 \pm 0.4	7.7 \pm 1.5
+ CP55,940	4.1 \pm 0.9	2.1 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	6.9 \pm 0.6
+ SR141716	2.8 \pm 0.3	2.1 \pm 0.3	2.1 \pm 0.7	5.8 \pm 0.6
+ SR141716 + Δ^9 -THC	3.1 \pm 0.4	2.3 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2	5.6 \pm 0.3
+ SR141716 + CP55,940	2.7 \pm 0.5	2.5 \pm 0.5	0.9 \pm 0.1	5.0 \pm 0.7
Actividad GAD ($\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$):				
+ vehículo	119.2 \pm 19.9	42.9 \pm 7.3	34.9 \pm 3.7	169.8 \pm 20.3
+ Δ^9 -THC	159.8 \pm 48.1	53.8 \pm 18.8	36.8 \pm 8.8	209.3 \pm 49.8
+ CP55,940	209.4 \pm 59.6	53.1 \pm 12.9	43.1 \pm 6.9	170.1 \pm 30.1
+ SR141716	101.8 \pm 20.3	48.8 \pm 10.3	40.8 \pm 7.0	200.4 \pm 29.3
+ SR141716 + Δ^9 -THC	121.3 \pm 21.0	69.8 \pm 21.9	28.1 \pm 4.9	230.1 \pm 40.0
+ SR141716 + CP55,940	81.7 \pm 20.5	35.2 \pm 9.8	37.0 \pm 8.7	149.9 \pm 49.8
DA (ng/mg):				
+ vehículo	54.3 \pm 6.4	15.1 \pm 1.1	55.9 \pm 3.1	4.0 \pm 0.5
+ Δ^9 -THC	74.5 \pm 13.4	18.7 \pm 2.0	53.9 \pm 6.0	5.0 \pm 0.9
+ CP55,940	51.8 \pm 11.2	10.0 \pm 2.3	68.0 \pm 9.1	6.2 \pm 1.3
+ SR141716	54.3 \pm 9.1	14.8 \pm 1.9	57.5 \pm 7.2	4.2 \pm 0.5
+ SR141716 + Δ^9 -THC	54.9 \pm 8.7	13.0 \pm 1.2	52.9 \pm 4.7	4.3 \pm 0.5
+ SR141716 + CP55,940	53.8 \pm 5.3	14.1 \pm 1.1	63.0 \pm 7.8	5.0 \pm 1.5
DOPAC (ng/mg):				
+ vehículo	15.2 \pm 1.7	3.2 \pm 0.3	10.3 \pm 0.8	1.1 \pm 0.2
+ Δ^9 -THC	23.3 \pm 5.2	4.0 \pm 0.7	14.3 \pm 2.1	1.4 \pm 0.3
+ CP55,940	13.9 \pm 3.1	2.1 \pm 0.5	12.1 \pm 1.7	1.7 \pm 0.4
+ SR141716	16.1 \pm 2.0	3.3 \pm 0.7	12.0 \pm 2.2	1.0 \pm 0.3
+ SR141716 + Δ^9 -THC	15.6 \pm 2.5	2.2 \pm 0.3	10.6 \pm 0.8	1.0 \pm 0.2
+ SR141716 + CP55,940	14.6 \pm 2.2	2.6 \pm 0.4	12.4 \pm 2.3	1.4 \pm 0.5
Actividad TH (ng/mg):				
+ vehículo	292.9 \pm 45.3	353.5 \pm 38.1	274.9 \pm 24.6	107.5 \pm 13.8
+ Δ^9 -THC	528.3 \pm 144.3	302.2 \pm 59.5	283.0 \pm 24.7	171.0 \pm 52.2
+ CP55,940	256.5 \pm 52.5	190.0 \pm 55.3	307.1 \pm 71.9	186.0 \pm 34.0
+ SR141716	272.5 \pm 25.9	357.0 \pm 42.4	259.3 \pm 29.4	143.2 \pm 24.7
+ SR141716 + Δ^9 -THC	317.4 \pm 60.9	309.1 \pm 51.7	253.3 \pm 34.8	156.7 \pm 23.0
+ SR141716 + CP55,940	386.5 \pm 43.1	375.0 \pm 105.2	299.6 \pm 43.2	110.8 \pm 21.3

6.3. Discusión Parcial

Contrariamente a lo que cabría esperar si consideramos que varios autores habían demostrado que el bloqueo de los receptores CB₁ reduce la ingesta y/o preferencia a alcohol (Colombo et al., 1998, Serra et al., 2002), mientras que los agonistas producen incrementos en la motivación por el alcohol (Gallate et al., 1999) en nuestro modelo la manipulación farmacología del SCE afecta de ese modo al consumo de etanol. Así, agonistas y antagonistas del receptor CB₁ disminuyen la ingesta de alcohol, con las siguientes particularidades.

1. El efecto de los agonistas y del antagonista se podrían producir por mecanismos diferentes, por ejemplo sobre el receptor CB₁ localizado en diferentes grupos neuronales ya que en ningún caso se observaron efectos aditivos (la combinación de Δ^9 -THC y SR141716 disminuye el efecto mientras que la combinación de CP55,940 y de produjo efectos equivalentes a los de cada compuesto por separado).
2. En ningún caso tuvieron un reflejo sobre la preferencia a alcohol cuyos valores aunque apuntaron una tendencia a bajar no alcanzaron significación estadística. Esto se debió a que tanto los agonistas como el antagonista también redujeron la ingesta total de líquido.
3. La falta de efectos sobre la preferencia y a nivel neuroquímico sobre los sustratos neurobiológicos que median el refuerzo por alcohol apunta a que el efecto de la manipulación del SCE sobre la ingesta de alcohol no tiene una relación, al menos directa, con la modificación de la capacidad del animal para apreciar las

propiedades incentivantes del alcohol. Parece más bien relacionado con algún tipo de efecto metabólico o relacionado con la ingesta. Descartamos que en ello tenga que ver la capacidad hipocinética de los agonistas cannabinoides puesto que en ningún caso observamos disminuciones significativas en los parámetros motores ni de la neurotransmisión dopaminérgica y GABAérgica en los ganglios basales.

En nuestra opinión, se puede pensar que los datos descritos por otros autores en cuanto a la capacidad del SR141716 de disminuir las propiedades reforzantes del alcohol (Colombo et al., 1998; Serra et al., 2002) sólo se observa cuando se utilizan animales seleccionados genéticamente por su elevada preferencia por el etanol ya que la utilización de una población con preferencias por el alcohol variables elimina este efecto. De hecho, cuando en nuestro estudio se extraen los animales para los cuales el alcohol tiende a ser aversivo si observamos como la combinación de Δ^9 -THC y SR141716 disminuye la preferencia por el alcohol.

En relación con la disminución de la ingesta de etanol que producen los agonistas cannabinoides es interesante comentar que se produce en la fase donde los endocannabinoides en las dos regiones estudiadas (Ver diseño 5) son claramente más bajos que en las demás fases del proceso de alcoholización lo que explicaría que una elevación del tono endocannabinoide por la acción del agonista tuviera un efecto sobre el consumo de alcohol. Según esta hipótesis en este momento el tratamiento con un antagonista no afectaría al consumo puesto que el tono endógeno disminuiría aún más.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

A lo largo de esta tesis doctoral hemos pretendido ahondar en el análisis del papel fisiológico de un sistema de neurotransmisión que presenta unas características altamente preservadas a lo largo de la evolución pero con un bajo tono de actividad. Como ya hemos comentado, en términos generales el análisis anatómico de la distribución del receptor para cannabinoides se correlaciona con el perfil farmacológico de los agonistas cannabinoides. Esta localización, sugiere que el SCE podría funcionar como modulador de la ruta dopaminérgica mesocorticolímbica. De este modo, podría participar en los mecanismos de refuerzo no sólo de los derivados del cannabis, sino también de otras drogas de abuso con mecanismos de actuación en los que no se encuentra implicado de forma directa el receptor CB₁. La capacidad de los cannabinoides para producir dependencia en humanos y por lo tanto ser capaces de inducir fenómenos de abstinencia es un tema controvertido.

En animales de laboratorio, esta ampliamente demostrado que el tratamiento crónico con Δ^9 -THC disminuye la unión específica a CB₁, la expresión del gen para receptor CB₁ y la funcionalidad del mismo determinada por la unión de GTP γ S en la mayor parte de las áreas cerebrales estudiadas (Oviedo et al., 1993; Romero et al., 1995 y 1997). La duración del tratamiento así como el tipo de cannabinoide utilizado y su dosis son críticos a la hora de evaluar el desarrollo de tolerancia (Maldonado, 2002). Sin embargo, hasta nuestro estudio no existían evidencias sobre las alteraciones en los niveles de endocannabinoides que pudieran producirse *in vivo* por el tratamiento con Δ^9 -THC de modo crónico. En nuestro modelo, observamos que la tolerancia a cannabinoides también produce modificaciones en los niveles de endocannabinoides, si bien estos cambios no se correlacionan en todos los casos con modificaciones a nivel del receptor CB₁. Esta variabilidad regional se podría relacionar con el amplio abanico de funciones fisiológicas que se otorgan a este tipo de moléculas. En el estriado observamos que el tratamiento crónico con Δ^9 -THC indujo una disminución en los contenidos tanto de AEA como de 2-AG. Estos cambios no se acompañaban de modificaciones en el precursor biosintético de la AEA el NArPE. Este conjunto de datos se correlacionan bien con el desarrollo de tolerancia al efecto hipoquinético producido por los cannabinoides ya que se acompaña de una disminución en la densidad de receptor CB₁ y en la funcionalidad de este receptor en el caudado-putamen y en otros núcleos de los ganglios basales. Por lo tanto, se puede decir que la disminución que se produce en los niveles de endocannabinoides en el estriado apoya la idea de que el

SCE se encuentra implicado en el control del movimiento en los ganglios basales (Guifrida y Piomelli, 2000; Romero et al., 2002) A este respecto, se sabe que tanto los cannabinoides naturales y sintéticos como los endocannabinoides inhiben la actividad locomotora (Fernández- Ruiz et al., 2002) lo que se correlaciona con la elevada densidad de receptor CB₁ y de AEA y 2-AG en los ganglios basales y en el cerebelo (Hernkenhan et al., 1991a; Bisogno et al., 1999). Las modificaciones en el comportamiento motor que inducen los cannabinoides transcurren en paralelo con los modificaciones en las regiones cerebrales implicadas en el control motor. Así, la inhibición motora causada por la administración de AEA se corresponde con un descenso en la actividad TH en el estriado. En este sentido, se sabe que los endocannabinoides inhiben la transmisión dopaminérgica en el estriado (Romero et al., 1995 b) . Sin embargo, la atenuación de la actividad dopaminérgica no es tan marcada como podría esperarse dada la importante inhibición motora que induce el tratamiento agudo con cannabinoides. Presumiblemente y dado que las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales no contienen al receptor CB₁ el mecanismo por el cual los cannabinoides inducen inhibición motora implica a los receptores CB₁ que se localizan presinápticamente en las neuronas GABA estriato-eferentes (Manneuf et al., 1996; Romero et al., 1998a). En nuestro modelo, se podría producir una desinhibición de la transmisión dopaminérgica ya que tanto los niveles de endocannabinoides como la densidad de receptor son muy bajos en el estriado en ratas tolerantes a Δ^9 -THC. Según esta hipótesis se podrían justificar ciertas observaciones experimentales, entre ellas:

- i) la pérdida de inhibición motora que se produce en ratas tolerantes a Δ^9 -THC (Rodríguez de Fonseca et al., 1994; Romero et al., 1997).
- ii) La potenciación de la movilidad inducida por anfetamina en ratas tolerantes a Δ^9 -THC (Gorriti et al., 1999)
- iii) Incremento de la actividad locomotora que se produce tras el bloqueo de los receptores CB₁ con SR141716 en animales tolerantes a Δ^9 -THC (Aceto et al., 1995; Tsou et al., 1995).

Por otro lado, las modificaciones en regiones límbicas de animales sometidos a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC resultaron en cierta forma inesperadas. Así, en el límbico anterior observamos un incremento de los niveles de AEA además, esta es la única región en la que no se producen

cambios en el receptor. El tratamiento crónico con Δ^9 -THC no modificó los niveles de 2-AG en esta área cerebral. Aunque cabe destacar que los valores individuales de este endocannabinoide son muy variables de modo que se podrían enmascarar diferencias sutiles. Por otro lado, también es posible que 2-AG y AEA se sintetizen en las células nerviosas a través de mecanismos diferentes en función de la presencia de ácido araquidónico en la posición *sn-1* y *sn-2* de los fosfolípidos respectivamente. Además, existen diferentes mecanismos de control a nivel cerebral que modulan la síntesis de AEA y 2-AG. Ambos endocannabinoides se liberan de neuronas corticales despolarizadas (Stella et al., 1997) si bien determinados estímulos provocan la liberación selectiva de uno de ellos. Así, la estimulación eléctrica de secciones hipocámpales induce la liberación selectiva de 2-AG (Stella et al., 1997). Mientras que cuando se estimulan los receptores dopaminérgicos D_2 estriatales con quimpirole se induce la liberación de AEA (Giufrida et al., 1999). Así, en el incremento selectivo de AEA que observamos en el límbico anterior tras el tratamiento crónico con THC, podría mediar la DA. De hecho, el tratamiento crónico con Δ^9 -THC estimula la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Tanda et al., 1997). La DA podría actuar sobre los receptores D_2 y de este modo estimular la síntesis de AEA como se ha descrito en el estriado dorsal (Giufrida et al., 1999). En este sentido, nuestros datos sugieren que el incremento de AEA detectado en el límbico se debe a un incremento en la síntesis más que a una disminución en la degradación de la misma. Lo que se deduce del hecho de que en paralelo al incremento de AEA se produce una disminución en las cantidades de NArPE, el precursor biosintético de la AEA. Así, la exposición crónica a Δ^9 -THC induciría la formación de AEA mediante la hidrólisis catalizada por una fosfolipasa D de su precursor (Di Marzo et al., 1994) mientras que no afectaría a la síntesis de NArPE que es un proceso catalizado por una N-aciltransferasa (Schmid et al., 1996). Algunos datos en la bibliografía avalan esta hipótesis aunque se trata de ensayos *in vitro*. Así, el Δ^9 -THC estimula la biosíntesis de AEA en células de neuroblastoma en un efecto mediado por CB_1 con una posible activación de la fosfolipasa D (Burstein et al., 1994) y por otro lado, el Δ^9 -THC aparece como inhibidor de algunas aciltransferasas en microsomas de cobjaya (Badiani et al., 1993) y secciones de corteza cerebral (Reichman et al., 1991). Esto puede ser consistente con la disminución de los contenidos de NArPE aunque falta demostrar que el Δ^9 -THC inhiba la enzima implicada en la síntesis de NArPE.

En lo que se refiere al posible significado fisiopatológico de este incremento de AEA en el límbico, es importante

destacar que se produce también tras el tratamiento crónico con otras drogas de abuso. Basavarajappa y colaboradores demostraron que la exposición prolongada a etanol produce disminución en la densidad de receptor CB_1 e incremento en la formación de AEA y NArPE en células de neuroblastoma humano (Basavarajappa et al., 1998,1999). Nosotros también encontramos incrementos en los niveles de AEA *in vivo* tras el tratamiento crónico con nicotina y con etanol. De modo que este incremento de los niveles de AEA en el límbico anterior podría representar una respuesta adaptativa a las propiedades reforzantes de estas drogas de abuso. Así, la participación del SCE en las rutas neuronales que median el refuerzo podría explicar porque los cannabinoides producen efectos euforizantes (Gardner and Vorel, 1998) y que la incidencia farmacológica sobre el sistema modifique la autoadministración de alcohol o nicotina (Colombo et al 1998., Le Fu et al 2003). Efectos en los que, por otro lado, podría mediar la DA. si bien el tratamiento con AEA no modifica la neurotransmisión dopaminérgica en el límbico anterior (Romero y cols 1995).

Por otro lado, es posible que los endocannabinoides actúen a través de CB_1 en los núcleos límbicos de modo que se bloquea en parte la búsqueda compulsiva de drogas. Por otro lado, se ha demostrado que la AEA puede ser efectiva aliviando la intensidad de los signos de abstinencia en individuos dependientes a opioides (Hollister 1986). Lo que se podría relacionar con un posible efecto ansiolítico de la AEA. Basavarayappa y colaboradores sugieren que el incremento de AEA en células de neuroblastoma tratadas con etanol puede deberse a un mecanismo de adaptación neuronal y podría servir a las células como protección ante el daño que les produce la presencia continua de droga. De hecho se ha sugerido un papel neuroprotector para la AEA y NArPE ya que estos lípidos se incrementan en situaciones de daño neuronal. Sin embargo, no es probable que el tratamiento de nuestro estudio induzca daño neuronal dado que el resto de regiones cerebrales analizadas no presentan incrementos de AEA y en el caso del límbico anterior no se producen incrementos de NArPE.

Como se ha comentado a lo largo de la Introducción, se puede inducir un síndrome de abstinencia experimental mediante el bloqueo de los receptores CB_1 en animales tolerantes a cannabinoides. De hecho, esta estrategia farmacológica se ha utilizado por diferentes grupos de investigación para poner de manifiesto signos de abstinencia a cannabinoides (Aceto et al., 1995, 1996; Tsou y cols 1995, Hutchenson y cols 1998, Cook et al., 1998 Rubino et al., 1998) dado que no se produce abstinencia espontánea si no se utilizan cannabinoides sintéticos de características

farmacocinéticas o farmacodinámicas muy diferentes a las del Δ^9 -THC. El síndrome de abstinencia a cannabinoides según estos autores aparece como un conjunto de alteraciones comportamentales que se caracterizan por secuencias motoras breves que incluyen síntomas como el frotamiento facial, autoacicalamiento, temblor en las patas delanteras y rascado (Aceto et al., 1995, 1996; Tsou et al., 1995). Otros síntomas como ptosis, piloerección y diarrea, sólo se han visto en algunos estudios (Hutchenson y cols 1998). En nuestro estudio quisimos analizar una serie de problemas que aparecen en esos estudios al intentar extrapolar los resultados obtenidos en animales de experimentación a los del consumo humano. En primer lugar, en esos estudios se utilizan agonistas cannabinoides sintéticos con una potencia farmacológica mayor que la del Δ^9 -THC (Rodríguez de Fonseca et al., 1997; Aceto et al., 2001; Oliva et al., 2003). Ya se ha mencionado anteriormente que éste es el compuesto psicoactivo presente en la *Cannabis sativa* de modo que los consumidores de marihuana consumen en definitiva Δ^9 -THC. Además, en estos trabajos las dosis exceden en mucho las del consumo humano y no en todos los casos se han evaluado los efectos del antagonista SR141716 en animales no tolerantes (Diana et al., 1998; Cook et al., 1998). En nuestro modelo evaluamos la respuesta comportamental en la prueba del campo abierto que nos permite analizar la actividad motora y estereotipada de los animales. En nuestro caso la respuesta comportamental es similar a la que han encontrado otros autores con diferentes agonistas cannabinoides. El SR141716 induce alteraciones motoras sin cambios a nivel neurovegetativo (Aceto et al., 1995, 1996; Tsou y cols 1995, Cook et al., 1998; Rubino et al., 1998). El temblor y la repulsión son los dos signos comportamentales que aparecen incrementados en animales en los que se ha generado abstinencia experimental al igual que ocurre en otros estudios (Tsou y cols 1995; Aceto y cols 1996) mientras que el "scratching" se atenúa en estos animales como se ha visto también que ocurre en ratones (Cook et al., 1998). De todos modos es importante destacar que los cambios son siempre pequeños e incluso en ocasiones se producen también en animales no tolerantes a Δ^9 -THC de modo que puede ser un efecto resultante del bloqueo del tono endocannabinoide más que una respuesta específica de abstinencia. En cualquier caso, en nuestro modelo la alteración más clara que avala el desarrollo de abstinencia farmacológica a cannabinoides es la modificación en la expresión del CRF hipotalámico, si bien no fueron acompañadas de variaciones en los niveles plasmáticos de hormonas de eje de estrés.

En nuestro estudio evaluamos los niveles de ligandos endógenos durante la abstinencia a cannabinoides. La mayoría de los cambios que se producen en ratas tolerantes a excepción de los niveles de AEA en el mesencéfalo y 2-AG en el hipocampo, se revierten por el tratamiento con el antagonista SR141716. Sin embargo, SR141716 no afecta a los niveles de endocannabinoides en ratas controles. Las áreas estudiadas en ratas tolerantes a Δ^9 -THC responden de modo diferente al SR141716 lo que podría relacionarse con la selectividad de los parámetros comportamentales que se modifican durante la abstinencia a cannabinoides que, como ya hemos comentado, son fundamentalmente de naturaleza motora.

Otro de los temas que ha generado gran controversia es lo que se refiere al uso lúdico de cannabinoides es su posible papel iniciador en el consumo de otras drogas de abuso de mayor poder adictivo. Obviamente en el caso de los humanos existen una serie de factores psicosociales que van a influir en el consumidor y que son difíciles de evaluar en un modelo animal. Por el contrario, los datos en humanos se obtienen de estudios de tipo epidemiológico controlando variables que pueden afectar al consumo pero no se abordan el análisis de los mecanismos neurobiológicos implicados en el proceso. Teniendo en cuenta esta limitación intentamos evaluar una posible relación neurobiológica entre el consumo de cannabinoides y el de morfina. Para ello como se ha detallado en el apartado de Materiales y Métodos, animales tolerantes a Δ^9 -THC se sometieron a un paradigma de autoadministración de morfina. Según nuestros resultados, las propiedades reforzantes de la morfina son independientes del consumo previo de Δ^9 -THC en tanto en cuanto no se evidenciaron diferencias en la autoadministración de morfina entre los animales que habían consumido Δ^9 -THC de modo crónico y aquellos que recibieron vehículo. Incluso se podría decir que los animales tolerantes a Δ^9 -THC tienden a autoadministrarse menos morfina que los controles. Esto se corrobora con resultados obtenidos por otros autores en los que la administración de Δ^9 -THC no altera las propiedades reforzantes de la morfina en estudios de preferencia de plaza (Valverde et al., 2001). Mediante numerosos estudios neurofarmacológicos, se ha establecido la implicación del sistema dopaminérgico en los efectos reforzantes de las drogas de abuso. Así la magnitud de la recompensa muestra una relación estrecha con el grado de activación de la vía dopaminérgica ascendente mesocorticolímbica (que va de VTA al núcleo accumbens). En nuestro estudio, de acuerdo con el resultado de la prueba comportamental, no se modificó la relación DOPAC/DA que nos sirve como índice de la actividad dopaminérgica.

Para evaluar la implicación de la neurotransmisión endocannabinoide en los circuitos de recompensa, otra de las estrategias de trabajo que hemos utilizado ha sido evaluar el impacto del tratamiento crónico con distintas drogas de abuso sobre el SCE. El fundamento de esta hipótesis estaría en la posibilidad de que el SCE desarrollara un papel equiparable al de la dopamina o los péptidos opioides a nivel de las áreas cerebrales implicadas en el refuerzo. De este modo, se podría especular sobre los efectos beneficiosos en la capacidad reforzante de las drogas de abuso tras la manipulación farmacológica del SCE como algunos estudios empiezan a corroborar.

Sin embargo, como se ha detallado en la discusión parcial de este grupo de experimentos, el efecto sobre el SCE del tratamiento crónico con las distintas drogas fue diferente en cada caso. Esto significa que existe una selectividad en la respuesta del SCE para cada droga de abuso. No obstante, se observaron algunas alteraciones comunes. En este sentido, el dato más relevante es el incremento en la concentración de endocannabinoides que se observa en áreas límbicas de ratas dependientes a alcohol o nicotina que se produce también en animales tolerantes a Δ^9 -THC. Dada la importancia del área límbica en los fenómenos de refuerzo y el hecho de que ese incremento se da en el caso de drogas que se relacionan con el consumo humano de *cannabis* (la marihuana se suele fumar mezclada con tabaco y por otro lado, cannabis y alcohol suelen ser las dos drogas con las que los humanos se inician en el consumo de drogas de abuso) se podría interpretar ese incremento del tono endocannabinoide como una respuesta operativa relacionada con los efectos reforzantes de estas sustancias. De hecho, esta observación explicaría que se haya propuesto el bloqueo de los receptores CB1 pudiera consistir una estrategia farmacológica adecuada para reducir la conducta de búsqueda compulsiva tanto de alcohol como de nicotina. En el caso de esta última droga, ya hemos mencionado que se está realizando un ensayo clínico con el antagonista SR141716 para el tratamiento de la adicción al tabaco (Le Fur et al., 2003). En lo que se refiere a la adicción a alcohol distintos estudios llevados a cabo en animales de experimentación han referido que el bloqueo de los receptores CB₁ disminuye la ingesta/ preferencia de esta sustancia (Colombo et al., 1998; Freedland et al., 2001) Serra et al., 2002). Estos resultados se obtienen en estudios en animales seleccionados genéticamente por su elevada preferencia por el alcohol. Nosotros nos planteamos en esta tesis ahondar en el estudio de la utilidad de la manipulación farmacológica del SCE en el tratamiento de la adicción a alcohol. Para ello, utilizamos una cepa de rata que presenta una mayor pluralidad en la preferencia y que a nuestro juicio,

refleja mejor los que ocurre en la población humana. Sin embargo, nuestros datos no corroboraron los resultados obtenidos por otros autores en animales con alta preferencia por el etanol. En nuestro caso, los efectos del tratamiento farmacológico se producen fundamentalmente sobre la ingesta total de líquido y no sobre la capacidad reforzante del alcohol. De este modo, se podría decir que el bloqueo de los receptores CB1 sólo sería efectivo en población con predisposición hacia el consumo de alcohol. Algunos estudios de polimorfismos del receptor CB1 corroboran esta hipótesis (Schmidt et al., 2002) Además, en nuestro caso tanto el bloqueo del receptor CB1 como su activación conllevan la disminución de la ingesta de líquido o alcohol. No obstante, y dada la ausencia de efectos aditivos, podría deducirse que la actuación de ambos fármacos transcurre por mecanismos diferentes. El efecto común que presentan agonistas y antagonista puede explicarse sobre la base del incremento de los niveles de endocannabinoides que se produce durante la dependencia a alcohol y la reducción endocannabinoides que se produce cuando el animal puede elegir entre consumir agua o etanol. Así se debe elegir entre agonistas o antagonista del SCE dependiendo del momento del proceso de alcoholización sobre el que se pretenda incidir.

En conclusión, a lo largo de esta tesis doctoral:

1. Se han evaluado por primera vez los cambios en los niveles de endocannabinoides *in vivo* tras el tratamiento crónico con Δ^9 -THC. Así la tolerancia a cannabinoides se caracteriza por disminuciones en los niveles de AEA en el estriado e incrementos en el área límbica anterior. Este incremento en el área límbica se produce también tras el tratamiento crónico con etanol y nicotina.
2. Se ha puesto de manifiesto que la administración aguda de SR141716 a ratas tolerantes a Δ^9 -THC produce alteraciones fundamentalmente a nivel comportamental y en cuanto a la expresión de CRF que podría ser indicativos de la aparición de fenómenos de abstinencia física.
3. Durante el proceso de abstinencia se modifican los niveles de endocannabinoides de modo que el tratamiento con el antagonista SR141716 revierte la mayor parte de las alteraciones que induce el tratamiento crónico con Δ^9 -THC.
4. El tratamiento prolongado de cannabinoides no incrementa la vulnerabilidad a la morfina en ratas de laboratorio como tampoco sensibiliza la transmisión dopaminérgica a nivel límbico.

5. La generación de dependencia a diferentes drogas de abuso altera la transmisión endocannabinoide si bien los cambios son diferentes para cada sustancia.
6. En el caso del alcohol, observamos fluctuaciones de la transmisión endocannabinoide a lo largo del consumo crónico, la abstinencia y el consumo voluntario de esta sustancia que podrían ser indicativas de variaciones en los efectos, tras la manipulación farmacológica de del SCE, en la adicción a alcohol.
7. La manipulación farmacológica del SCE afectó a la ingesta de alcohol en ratas que presentan variabilidad en cuanto a su preferencia por etanol. Sin embargo, estos cambios se indujeron tanto por agonistas como por el antagonista SR141716 y aparentemente no afectaron a la capacidad reforzante del alcohol sino a fenómenos relacionados con la ingesta de líquido.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abadji, V., Lin, S., Taha, G., Griffin, G., Stevenson, L.A., Pertwee, R. and Makriyannis, A. (R)-Methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *Journal of Medicinal Chemistry* **37**: 1889-1893, 1994.
- Abood, M. E., Martin, B. R. Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 201-207, 1992.
- Aceto, M. D., Scates, S. M., Lowe, J. A., Martin, B. P. Cannabinoid precipitated withdrawal by the selective cannabinoid receptor antagonist, SR141716A. *Eur J Pharmacol*. **282**(1-3):R1-2, 1995.
- Aceto, M. D., Scates, S. M., Lowe, J. A., Martin, B. P. Dependence on delta 9-tetrahydrocannabinol: studies on precipitated and abrupt withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* **278**, 1290-1295, 1996.
- Aceto, M. D., Scates, S. M., Lowe, J. A., Martin, B. P. Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55,212-2. *Eur J Pharmacol* **416**: 75-81, 2001.
- Ambrosio, E., Goldberg, SR., y Elmer, GI. Behavior genetic investigation of the relationship between spontaneous locomotor activity and the acquisition of the morphine self-administration. *Behavioral Pharmacology* **6**: 229-237, 1995.
- Anton, AH., y Sayre, DF. An study of the factors affecting the aluminium oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **138**: 360-364, 1962.
- Arnold, J.C., Topple, A.N., Hunt G.E., McGregor I.S. Effects of pre-exposure and co-administration of the cannabinoid receptor agonist CP55,940 on behavioral sensitization to cocaine. *European Journal of Pharmacology* **354**: 9-16, 1998.
- Ambrosio, E., Martin, S., García-Lecumberri, C., Crespo, JA. He neurobiology of cannabinoid dependence: sex differences and potential interactions between cannabinoid and opioid systems. *Life Sci* **65**: 687-694, 1999.
- Arnone, M., Maruani, J., Chaperon, F., Thiebot, M., Poncelet, M., Soubrie, P. y Le Fur, G. Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* **132**: 104-106, 1997.
- Basavarajappa, B.S., Cooper, T.B., y Hungund, B.L. Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. *Brain Research* **793**: 212-218, 1998 a.
- Basavarajappa, B.S. and Hungund, B.L. Chronic Ethanol increases the cannabinoid receptor agonist, anandamide and its precursor N-arachidonyl phosphatidyl ethanolamine in SK-N-SH cells. *Journal of Neurochemistry* **72**: 522-528, 1999.
- Basavarajappa, B.S. and Hungund, B.L. Down-regulation of cannabinoid receptor agonist-stimulated [³⁵S] GTPγS binding in synaptic plasma membrane from chronic ethanol exposed mouse. *Brain Research* **815**: 89-97, 1999.
- Basavarajappa, B.S. and Hungund, B.L. Cannabinoid receptor agonist-stimulated [³⁵S]Guanosine TriphosphateγS binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice. *J Neurosci. Res*, **64**: 429-436, 2001.
- Basavarajappa, BS. Y Hungund, BL. Neuromodulatory role of the endocannabinoid signaling system in alcoholism: an overview. *PLEFA* **66**: 287-299, 2002.
- Bayewich M., Avidor-Reiss T., Levy R., Barg J., Mechoulam R., Vogel Z. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Letters* **375**:143-147, 1995.
- Bell MR, D'Ambra TE, Kumar V, Eissentat MA, Hermann JL, et al. Antinociceptive (aminoalkyl)-indoles. *Journal of Medical Chemistry*, **34**: 1099-1110, 1991.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A. and Piomelli, D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* **277**: 1094-1097, 1997.
- Berrendero F., García-Gil, L., Hernández, M., Romero, J., Cebeira, M., De Miguel, R., Ramos, J.A., y Fernández-Ruiz, J.J. Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanism for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development* **125**: 3179-3188, 1998.
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, JA., Di Marzo, V., Fernandez Ruiz, JJ. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* **33**: 181-191, 1999.
- Bifulco, M., Di Marzo, V. Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med*. **8**(6): 547-50, 2002.
- Bisogno T., Sepe N., Melck D., Maurelli S., De Petrocellis L., Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in

- mouse neuroblastoma cells. *Biochemical Journal* **322**: 671-677, 1997a.
- Bisogno, T., Maurelli, S., Melck, D., De Petrocellis, L. and Di Marzo, V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 3315-3323, 1997b.
- Bisogno, T., Katayama, K., Melck, D., Ueda, N., De Petrocellis, S., Yamamoto, V. and Di Marzo, V. Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acids amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells—implications for cell proliferation and differentiation. *European Journal of Biochemistry* **254**: 634-642, 1998.
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz y Di Marzo, V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implication for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**: 377-380, 1999.
- Blázquez, C., Casanova, M.L., Planas, A., Gómez del Pulgar, T., Villanueva, C., Fernández-Acero, M., Aragónés, J., Huffman J.W., Jorcano, J.L. y Guzmán, M., *FASEB J* **17**(3):529-31, 2003.
- Bloch E., Thysen B., Morrill G.A., Gardner E., Fujimoto G. Effect of cannabinoids on reproduction and development. *Vitam. Horm.* **36**: 203-258, 1978.
- Bonhaus, D. W., Chang L.K., Kwan J y Martin, G.R. Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **287**: 884-888, 1998.
- Boring, D.L., Berglund, B.A. and Howlett, A.C. Cerebrodiene, arachidonyl-ethanolamide, and hybrid structures: potential for interaction with cannabinoid receptors. *Prostag. Leuk. Ess. Fatty Acids* **55**: 207-210, 1996.
- Bornheim LM, Everhart ET, Li J, Correia MA. Induction and genetic regulation of mouse hepatic cytochrome P450 by cannabidiol. *Biochem Pharm* **48**: 161-171, 1994.
- Bouaboula M., Rinaldi M., Carayon O., Carillon C., Delpech B., Shire D., Le Fur G., Casellas P. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *European Journal of Biochemistry* **214**: 173-180, 1993.
- Bouaboula, M., Bourrié, B., Rinaldi-Carmona, M., Shire, D., Le Fur, G. and Casellas, P. Stimulation of cannabinoid receptor CB₁ induces Krox-24 expression in human astrocytoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 13973-13980, 1995a.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G. and Casellas, P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid CB₁. *Biochemical Journal* **312**: 637-641, 1995b.
- Buckley, N.E., McCoy, K.L., Mezey, E., Bonner, T., Zimmer, A., Felder, C.C., y Glass, M. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB₂ receptor. *Eur. J. Pharmacol* **396**: 141-149, 2000.
- Braida, D., Pozzi, M., Parolaro, D., Sala, M. Intracerebral self-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the rat: interaction with the opioid system. *Eur J Pharmacol* **413**: 227-234, 2001.
- Breivogel, C., Griffin, G., Di Marzo, V., y Martin, B. Evidence for a new G protein cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.* **60**: 155-163, 2001.
- Budney, A.J, Hughes, J.R., Moore, B.A., Novy, P.L. Marijuana abstinence effects in marijuana smokers maintained in their home environment. *Arch Gen Psychiatry.* Oct;**58**(10): 917-24, 2001.
- Budney, AJ y Moore, BA. Development and consequences of cannabis dependence. *J Clin Pharmacol* **42**: 28-33, 2002
- Burstein, S., Budrow, J., Debatis, M., Hunter, S.A., y Subramanian, A. Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 1253-1264, 1994.
- Cabral, G.A., Harmon, K.N. y Carlisle, S.J. Cannabinoid mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat production by rat microglial cells; evidence for CB₁ receptor participation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **493**: 207-214, 2001.
- Casanova, M.L., Blázquez, C., Martínez-Palacio, J., Villanueva, C., Fernández-Acenero, M.J., Huffman, J.W., Jorcano, J.L., Guzmán, M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin. Invest.* **111**(1): 43-50, 2003
- Castañé, A., Valjent, E., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. Lack of CB₁ cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology* **43**: 857-867, 2002.
- Castañé, A., Robledo, P., Marifa, A., Kieffer, B.L., Maldonado, R. Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in double mu and delta opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci* **17**: 155-9, 2003.

- Chakravarty I., Sheth P.R., Sheth A.R., Ghosh J.J. Delta-9-tetrahydrocannabinol: its effects on the hypothalamo-pituitary system in male rats. *Arch. Androl.* **8**: 25-27, 1982.
- Chaperon, F., Soubrie, P., Puech, A.J., Thiébot, M.H. Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology* **135**: 324-332, 1998.
- Chen, J., Paredes, W., L, J., Smith, D., Lowinson, J., Gardner, E.L. Delta 9-tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology* **102**: 156-162, 1990.
- Chen, K., Kandel, D.B. Predictors of cessation of marijuana use: an event history analysis. *Drug Alcohol Depend* **50**: 109-121, 1998
- Childers S. The anatomical distribution of brain cannabinoid receptors. *Neurobiology disease* **5**: 417-431, 1998.
- Childers S.R., Sexton T., Roy M.B. Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochemical Pharmacology* **47**: 711-715, 1994.
- Childers, S.R., Pachecho, M.A., Bennet, B.A., Edwards T.A., Hampson, R.E., Mu J. y Deadwyler, S.A. Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms. *Biochem. Soc. Symp.* **59**: 27-50, 1993.
- Childers, S.R., y Deadwyler, S.A. Role of Cyclic AMPc in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **52**: 819-827, 1999.
- Clementi, F., Fornasari, D., Gotti, C. Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur J Pharmacol.* **393**: 3-10, 2000
- Colombo, G., Agabio, R., Fa, M., Guano, L., Lobina, C., Loche, A., Reali, R., Gessa, G.L. Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR141716. *Alcohol & Alcoholism* **33**: 126-130, 1998.
- Compton DR., Johnson MR. Melvin LS, Martin BR. Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents. *Journal of Pharmacology Exp. Ther.* **260**: 201-209, 1992.
- Cook, S.A., Lowe, J.A., Martin, B.R. CB1 receptor antagonist precipitates withdrawal in mice exposed to Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**: 1150-1156, 1998.
- Corchero J., García-Gil, L., Manzanares, J., Fernández-Ruiz, J.J., Fuentes, J.A. y Ramos J.A. Perinatal Δ^9 -tetrahydrocannabinol exposure reduces proenkephalin gene expression in the caudate-putamen of adult female rats *Life Sciences* **63**: 843-850, 1998.
- Costa, B., Parolaro, D., Colleoni, M., 1996. Chronic cannabinoid, CP-55,940, administration alters biotransformation in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **313**: 17-24, 1996
- Crawley J-N-, Corwin R.L., Robinson J.K., Felder C.C., Devane W.A., Axelrod J. Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **46**: 967-972, 1993.
- Curran T., Gordon, M.B., Rubino, M.L., Sambucetti, L.C. Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* **2**(1): 79-84, 1987
- D'ambra T.E., Estep K.G, Bell MR., Eissenstat M.A., Josef K.A., et al. Conformationally restrained analogues of pravoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *Journal of Medical Chemistry*, **35**: 124-135, 1992.
- Da Silva, G.E., Morato, G.S., Takahashi, R. Rapid tolerance to Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cross-tolerance between ethanol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in mice. *European Journal of Pharmacology* **431**: 201-207, 2001.
- De Lago, E., Fernandez-Ruiz, J., Ortega-Gutierrez, S., Viso, A., Lopez-Rodríguez ML., Ramos JA. UCM707, a potent and selective inhibitor of endocannabinoid uptake, potentiates hypokinetic and antinociceptive effects of anandamide. *Eur J Pharmacol* **449**: 99-103, 2002.
- De Petrocellis L., Bisogno, T., Davis, J.B., Pertwee RG., Di Marzo, V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett* **483**: 52-56, 2000.
- De Vries, T.J., Shaham, Y., Homberg, J.R., Crombag, H., Schuurman K., Dieben, J., Vanderschuren, L., Schoffelmeer, A. A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nature Medicine* **7**: 10, 2001.
- De Vries T.J., Homberg J.R., Binnekade, R., Raaso, H., Schoffelmeer, AN. Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. *Psychopharmacology* **1**, 2003.

- Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Bennett, B.A., Edwards, T.A., Mu, J., Pacheco, M.A., Ward, S.J. and Childers, S.R. Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Recep. Chan.* **1**: 121-134, 1993.
- Degenhardt, L., Hall, W., Lynskey, M. The relationship between cannabis use and other substance use in the general population. *Drug Alcohol Depend.* **64**: 319-327, 2001
- Deneau, G. A., Yanagita, T., Seevers, M. H. Self-administration of drugs by monkeys. *Bull. Drug Addict Narc* **11**: 3812, 1964.
- Desarnaud F., Cadas H. And Piomelli D. Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. *Journal Biol. Chem.* **270**: 6030-6035, 1995.
- Deutsch D. G. y Chin A.A. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochemical Pharmacology* **46**: 791-796, 1993.
- Deutsch, D.G., Goligorsky, M.S., Schmid, P.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H. Das, S.K., Dey S.K., Arreaza, G., Thorup, C., Stefano, G. y Moore L.C. Production and physiological actions of anandamide in the vaculature of the rat kidney. *J. Clin. Invest.* **100**: 1538-1546, 1997.
- Deusch D.G., Ueda, U., Yakamoto, S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *PLEFA* **66**: 201-210, 2002.
- Devane W. A., Spain J.W., Coscia C.J. and Howlett A.C. An assesment of the role of opioid receptor in the response to cannabimimetic drugs. *Journal of Neurochemistry.* **46**: 1925-1935, 1986.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S., Howlett, A. C. Determination and characterization of cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* **34** : 605-613, 1988.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., and Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258** : 1946-1949, 1992.
- Devane W. A. y Axelrod J. Enzymatic synthesis of anandamide , an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:6698-6701, 1994.
- Dewey W.L. Cannabinoid Pharmacology. *Pharmacological Reviews* **38**: 151-178, 1986.
- Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J-C, and Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**: 686-691, 1994.
- Di Marzo V., De Petrocellis L., Sepe N., and Buono A. Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamines in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem. J.* **316**: 977-984, 1996.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., De Petrocellis, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* **21**: 521-528, 1998.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Melck, D., Orlando, P., Wagner, J.A. y Kunos, G. Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur. J. Biochem.* **264**: 258-267, 1999.
- Di Marzo, V., Berrendero, F., Bisogno, T., González, S., Cavaliere, P., Romero, J., Cebeira, M., Ramos, J.A. and Fernández-Ruiz, J.J. Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Journal of Neurochemistry* **74(4)**: 1627-1635, 2000.
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., Fezza, F., Miura, G.L., Palmiter, R.D., Sugjura, T., y Kunos, G. Leptin regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* **410**: 822-825, 2001.
- Diana, M., Melis, M., Muntoni, A.L., Gessa, G. L. Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10269-10273, 1998.
- Diana, M.A., Levenes, C., Mackie, K., y Marty, A. Short-Term Retrograde Inhibition of GABAergic Synaptic Currents in Rat Purkinje Cell is mediated By endogenous Cannabinoids *J. Neurosci* **22**: 200-208, 2002.
- Facci L., Toso R.D., Romanello S., Buriani A., Skaper S.D., Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **92**: 3376-3380, 1995.
- Fattore, L., Martellotta, M.C., Cossu, G., Mascia, M.S., Fratta, W. CB1 cannabinoid receptor agonist WIN 55,512-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Behavioral Brain Research* **104**: 141-146, 1999.
- Felder, Ch.C., Briley, E.M., Axelrod, J., Simpson, J.T., Mackie, K. and Devane, W.A. Anandamide, an endogenous cannabimimetic

- eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **90**: 7656-7660, 1993.
- Felder C.C., Joyce K.E., Briley E.M., Mansouri J., Mackie K., Blond O., Lai Y., Ma A.L., Mitchell R.L.: Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Molecular Pharmacology* **48**: 443-450, 1995.
- Felder, C.C., Nielsen A., Briley E. M., Palkovits M, Priller J., Axelrod J., Nguyen D.N., Richardson J. M., Riggan R.M., Koppel A., Paul S. M., Becker G.W. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Letters*, **393**: 231-235, 1996.
- 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., Browstein M. LY320135, a novel cannabinoid CB₁ receptor antagonist unmasks coupling CB₁ receptor to stimulation of cAMP accumulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **284**: 291-297, 1998.
- Fergusson, DM., Horwood, LJ. Does cannabis use encourage other forms of illicit drug use? *Addiction* **95**: 505-520, 2000
- Fernández-Ruiz, J.J., Esquifino, A., Steger, RW., Amador AG. Y Bartke. A. Presence of tyrosine hydroxylase activity in anterior pituitary adenomas and ectopic anterior pituitaries in males rats. *Brain Research* **421**: 65-68, 1987.
- Fernández-Ruiz, JJ., Berrendero, F., Hernández, ML., Romero, J., Ramos, JA. Role of endocannabinoids in brain development. *Life Sci* **65**: 725-736, 1999.
- Fernández-Ruiz, J.J., Berrendero, F., Hernández, M.L., y Ramos, J.A. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci* **23** : 14-20, 2000.
- Fernández-Ruiz, JJ., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., González, S., Ramos, JA. Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *PLEFA* **66**: 257-267, 2003.
- Ferrari F., Ottani A y Giuliani D. Influence of the cannabinoid agonist HU210 on cocaine and CGP201-403-induced behavioral effects in rat. *Life Sciences* **65**: 823-831, 1999.
- Fimiani, C., Liberty, T., Aquirre, A.J., Amin, I., Ali, N., Stefano, G.B. Opiate, cannabinoid and eicosanoid signalling converges on common intracellular pathways: nitric oxide coupling. *Prostaglandins and the Lip. Med.* **57**: 23-34, 1999.
- Folch, J., Lee, M., Sloane Stanley GH. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509, 1957
- Fontana A., Di Marzo V., Cadas H., Piomelli D. Analysis of anandamide, an endogenous cannabinoid substance, and other natural N-acyl ethanolamines. *Prostagl. Leukotr. Essent. Fatty Acids* **53**: 301-308, 1995.
- Freedland, CS., Sharpe, AL., Samson, HH., Porrino, LJ. Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration. *Alcohol Clin Exp Res* **25**: 277-82, 2001
- French, E. D. Delta 9-tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB₁ but not opioid receptors. *Neurosci Lett.* **226**: 159-162, 1997.
- French, E. D. Delta 9-tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB₁ but not opioid receptors. *Neurosci Lett* **226**: 159-162, 1997.
- Frenois, F., Cador, M., Caille, S., Stinus, L., Le Moine, C. Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Eur. J. Neurosci.* **16**: 1377-1389, 2002.
- Fride E., Mechoulam R. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *European Journal of Pharmacology* **231**: 313-314, 1993.
- Fride E. Anandamides: tolerance and cross-tolerance to delta-9-tetrahydrocannabinol. *Brain Research* **697** :83-90, 1995.
- Fride E., Barg J., Levy R., Saha D., Heldman E., Mechoulam R., Vogel Z. Low doses of anandamides inhibit pharmacological effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Journal of Pharmacological and Experiments Therapeutics* **272**: 699-707, 1995.
- Fride, E., Shohami, E. The endocannabinoid system: function in survival of the embryo, the newborn and the neuron. *Neuroreport* **28**: 1833-1841, 2002.
- Fuentealba, JA., Forray, ML., Gysling, K., Chronic morphine treatment and withdrawal increase extracellular levels of norepinephrine in the rat bed nucleus stria terminalis. *J. Neurochem.* **75**: 741-748, 2000
- Galiègue S., Mary S., Marchand J., Dussonsoy D., Carriere D., Carayon P., Bouaboula M., Shire D., LeFur G., Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in

- human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European Journal of Biochemistry* **232**: 54-61, 1995.
- Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Cortes, M.L., Gómez del Pulgar, M.T., Izquierdo, M. Y Guzmán, M. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* **6**: 313-319, 2000.
- Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gomez del Pulgar, T., Velasco, G., Guzman, M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol.* **62**(6): 1385-92, 2002.
- Gallate, J.E., Saharov, T., Mallet P.E., McGregor I.S. Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist. *European Journal of Pharmacology* **370**: 233-240, 1999.
- Gaoni and Mechoulam, R.. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society* **86**: 1646-1647, 1964.
- Gardner, EL., Vorel, SR. Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol. Dis.* **5**: 502-533, 1998.
- Gardner, E. L., Paredes, W., Smith, D., Donner, A., Milling, C., Cohen, D., Morrison, D. Facilitation of brain stimulation reward by delta 9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology* **96**: 142-144, 1988.
- Gardner, E. L., Lowinson, J. H. Marijuana's interaction with brain reward system: update 1991. *Pharmacol. Biochem Behav* **40**: 571-580, 1991.
- Gatley, S.J., Gifford, A.N., Volkow, N.D., Lan, R. and Makriyannis, A. ¹²³I-labeled AM 251: a radioiodinated ligand which binds *in vivo* to mouse brain cannabinoid CB₁ receptors. *European Journal of Pharmacology* **307**: 331-338, 1996.
- Gérard C.M., Mollereau C., Vassart G., Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.* **279**: 129-134, 1991.
- Ghozland, S., Matthes, HW., Simonin, F., Filliol, D., Kieffer, BL., Maldonado, R. Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *Neurosci* **22**: 1146-54, 2002.
- Gifford A.N. y Ashby C.R. Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist Win 55212-2 and is potentiated by the cannabinoid receptor antagonist SR 141716A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **277**: 1431-1436, 1996.
- Giorgetti, M., y Zhadanova, IV. Chronic cocaine treatment induces dysregulation in the circadian pattern of rats feeding behavior. *Brain Research* **877**: 170-175, 2000
- Giuffrida, A., Parsons, LH., Kehrr, A., Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signalling in dorsal striatum *Nature Neuroscience* **2**: 358-363, 1999.
- Giuffrida, A., Rodriguez de Fonseca, F., Nava, F., Loubet-Lescoulie, P., Piomelli, D. Elevated circulating levels of anandamide after administration of the transport inhibitor, AM404. *Eur J Pharmacol* **408**: 161-168, 2000.
- Giuffrida A. Y Piomelli D. The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control. *Chem Phys Lipids* **108**: 151-158, 2000
- Giuffrida, A., Beltramo, M., Piomelli, D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol Exp Ther.* **298**: 7-14, 2001.
- Glaser, ST., Abumrad, NA., Fatade, F., Kaczocha, M., Studholme, KM., Deutsch, DG. Evidence against the presence of an anandamide transporter. *PNAS* **100**: 269-4274, 2003.
- Gómez del Pulgar, M.T., Velasco, G. y Guzmán, M. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* **347**: 369-373, 2000.
- Gómez del Pulgar, T., De Ceballos, M.L., Guzmán M. y Velasco, G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* **277**: 36527-33, 2002
- Gonzalez D., Romero, J., Lastres-Becker, MA., Villanua, MA., Makriyannis, A., Ramos, JA., Fernández-Ruiz, JJ. Extrapiramidal and neuroendocrine effects of AM404, an inhibitor of the carrier-mediated transport of anandamide. *Life Sciences* **65**: 327-336, 1999.
- Gonzalez S., Manzanares J., Berrendero F., Wenger T., Corchero J., Bisogno T., Romero J., Fuentes J.A., Di Marzo V., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J. Identification of endocannabinoid CB₁ receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology* **70**(2): 137-145, 1999.

- Gorriti, MA., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Palomo, T. Chronic (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats. *Eur J Pharmacol* **365**: 133-142, 1999.
- Guzmán, M., Sánchez, C. y Gálvez-Roperh, I. Control of cell survival/death decision by cannabinoids. *J. Mol. Med.* **78**: 613-625, 2001.
- Hall, W.D., Carlless. J.M., Hsines, P.J., Flaherty, B.J., Reilly, C.J. The characteristics of cocaine users among young adults living in Sydney. *Med. J Aust.* **155**: 11-14, 1991.
- Hammer, T. Vaglum, P., Initiation, continuation or discontinuation of cannabis use in the general population. *Br J Addict* **85**: 899-909, 1990
- Hanus L., Gopher A., Almog S., Mechoulam R. Two new unsaturated fatty acid ethanolamines in brain that bind to the cannabinoid receptor. *Journal of Medical Chemistry*, **36**: 3032-3034, 1993.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I., y Mechoulam, R. 2-Araquidonyl-glyceril-ether, an endogenous agonist of the cannabinoid cb1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **98**: 3662-3665, 2001.
- Hansen, H.S., Moesgaard, B., Hansen, H.H., y Petersen, G. N-Acylethanolamines and precursor phospholipids-relation to cell injury. *Chem Phys Lipids* **108**: 135-150, 2000.
- Hembree W.C., Zeidenberg P., Nahas G.G. Marijuana effects on human gonadal function. En: *Marijuana: Chemistry, Biochemistry, Biochemistry, and Cellular Effects*. Ed. G.G. Nahas pp. 521-532. Springer-Verlag, New York, 1976.
- Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., DeCosta B.R., Rice K.C. Cannabinoid receptor localization in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1932-1936, 1990.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Costa B.R. and Rice, K.C. Characterization and localization of cannabinoid receptor in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience* **11**: 563-583, 1991a.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., de Costa B.R. and Richfield, E.K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Research* **547**: 267-274, 1991b.
- Hillard C.J., Wilkison D.M., Edgmond W.S., Campbell W.B. Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1257**: 249-256, 1995.
- Hillard, C.J., Edgmond, W.S., Jarrahan, A. and Campbell, W.B. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion". *Journal of Neurochemistry* **69**: 631-638, 1997.
- Hillard, C.J., Manna, S., Greenberg, M.J., Di Camelli, R., Ross, R.A., Stevenson, L.A., Murphy, V., Pertwee, R.G. Campbell, W.B. Synthesis and characterization of potent and selective agonist of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol Exp Ther* **289**: 1427-33, 1999.
- Högestätt, ED., Zygmunt, PM. Cardiovascular pharmacology of anandamide. *PLEFA* **66**: 343-351, 2002
- Hohmann AG. Spinal and peripheral mechanism of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids* **121**: 173-190, 2002.
- Hollister, L.E., Health aspects of cannabis. *Pharmacological reviews* **38**: 1-20, 1986.
- Houston, DB., Evans D.M., Howlett A.C., y Melvin I.S. [3 H]CP 55,940 binding to the cannabinoid receptor *Du Pont Biotech. Update* **6**: 21-27, 1991
- Howlett A.C., Qually J.M., Khachatryan LL. Involvement of G_i in the inhibition of adenylate cyclase by cannabinimetic drugs. *Molecular Pharmacology* **29**: 307-213, 1986.
- Howlett AC. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular Pharmacology* **27**: 429-436, 1985
- Howlett A.C., Johnson M.R., Melvin L.S., Milne G.M. Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Molecular pharmacology*, **33**: 297-302, 1988.
- Hyman, SE., Malenka, RC., Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* **2**: 695-703, 2001.
- Huestis, M.A., Sampson, A.M., Holicky, B.J., Henningfield J.E. and Cone, E.J. Characterization of the absorption phase of marijuana smoking. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **52**: 31-41, 1992.
- Hungund, B.L., Goldstein, D.B., Villegas, F., y Cooper. T.B. Formation of fatty acid ethyl esters during chronic ethanol treatment in mice. *Biochemical Pharmacology* **37**: 3001-3004, 1988.

Hungund BL. And Basavarajappa B.S. Distint diference in the cannabinoid receptor binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption. *J Neurosci. Res.* **60**: 122-128, 2000.

Hutcheson, D. M., Tzavara, E. T., Smadja, C., Valjent, E., Roques, B. P., Hanoune, J., Maldonado, R. Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol* **125**: 1567-1577, 1998.

Ishac, E.J., Jiang, L., Lake, K.D., Varga, K., Abood, M.E. y Kunus, G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 2023-2028, 1996.

Jacobs, WA., o-Phthaldehyde-sulfite derivatization of primary amines for liquid chromatography-electrochemistry. *Journal of Chromatography* **392**: 435-441, 1987.

Jarai, Z., Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice. *Hypertension* **35**: 679-684, 2000.

Johnson M.R., Melvin L.S. The discovery of nonclassical cannabinoid analgetics. En *Cannabinoids as therapeutic Agents*, ed. R Mechoulam pp. 121-145. Boca Raton: CRC Press, 1986.

Jonhson D.E., Heald S.L., Dally R.D., Janis R.A. Isolation, identification and syntesis of an endogenous arachidonic amide. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **48**: 429-437, 1993.

Kaminski, N.E., Abood, M.E., Kessler, F.K., Martin, B.R. and Schatz, A.R. Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation. *Molecular Pharmacology* **42**: 736-742, 1992.

Kaminski, N.E. Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J. Neuroimmunol.* **83**: 124-132, 1998.

Kandel. D., Chen, K. Warner, LA., Kessler, RC., Grant, B., Prevalence and demographic correlates of symptoms of last year dependence on alcohol, nicotine, marijuana and cocaine in the US population. *Drug Alcohol Depend* **44**: 11-29, 1997.

Kaymakcalan S. Tolerance to and dependence on cannabis. *Bull Narc* **25**: 39-47, 1973.

Kaymakcalan, S., Ayhan, I.H., y Tulunay, F.C. Naloxone-induced or postwithdrawal abstinence signs in delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Psychopharmacology* **55**: 243-249, 1977.

Kempe K., Hsu f-f., Bohrer A. Turk J. Isotope dilution mass spectrometric measurements indicate that arachidonyethanolamide, the proposed endogenous ligand of the cannabinoid receptor, accumulates in rat brain tissue post mortem. *Journal of Biochemical. Chemistry* **271**: 17287-17295, 1996.

Kieffer, B.L. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends in Pharmacological Sciences* **20**: 19-26, 1999.

Kirkham, TC., Williams, CM., Fezza, F., Di Marzo, V. Endocannabinoids levels in rat limbic forebrain ans hypothalamus in relation tto fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachiconoyl glycerol. *Br J Pharmacol* **136**: 550-557, 2002.

Klein T.W., Newton C., Widen R., Friedman H. The effect of delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol on T-Lymphocyte and B-lymphocyte mitogen responses. *Journal of Immunopharmacology* **7**: 451-466, 1985.

Klein, T.W., Newton, C., Widen, R. and Friedman, H. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol injection induces cytokine-mediated mortality of mice infected with *Legionella pneumophila*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **267**: 635-640, 1993.

Klein, T.W., Newton, C. and Friedman, H. Resistance to *Legionella pneumophila* suppressed by the marijuana component, tetrahydrocannabinol. *Journal of Infectious Disease* **169**: 1177-1179, 1994.

Knoller, N., Levi, L., Shoshan, I., Reichenthal, E., Razon, N., Rappaport, Z.H. t Beiegon, A. Dexabinol (HU-210) in the treatment of severe closed head injury: a randomized, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Crit Care Med* **30**: 548-554, 2002.

Koob, G. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 170-177, 1992.

Koob, G. F. Drug addition: The Yin and Yang of hedonic homeostasis. *Neuron* **16**: 893-896, 1996.

Koob, D., Sanna P.P., Bloom F.E. Neuroscience of addiction. *Neuron* **21**: 467-476, 1998.

Koob, G.F. Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. *Ann. NY Acad. Sci.* **897**, 27-45, 1999.

- Koob GF. Animal models of craving for ethanol. *Addiction* **95**: 73-81, 2000
- Koutek B., Prestwich G.D., Howlett A.C., Chin S.A., Salehani D., Akhavan N., Deutsch D.G. Inhibitors of arachidonoyl ethanolamide hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* **37**: 22937-22940, 1994.
- Lallemant, F., Soubri, P.H., De Witte, P.H. Effects of CB1 cannabinoid receptor blockade on ethanol preference after chronic ethanol administration. *Alcohol Clin. Exp. Res* **25**: 1317-1323, 2001.
- Lamarque, S. Taghzouti, K., Simon, H., Chronic treatment with Δ^9 -tetrahydrocannabinol enhances the locomotor response to amphetamine and heroin. Implications for vulnerability to drug addiction. *Neuropharmacol.* **41**: 118-129, 2001.
- Lee, M., Yangm KH., Kaminski, NE. Effects of putative cannabinoid receptor ligands anandamide and 2-arachidonilglycerol, on immune function in B6C3F1 mouse splenocytes *J Pharm, Exp. Ther* **275**: 529-536, 1995.
- Le Fur, G. Cannabinoids and feeding behavior. First European Workshop on Cannabinoid Research., Madrid 2003
- Le Fur, G., Cohen, C., Steinberg, R., Soubrié, P. Effects of rimonabant (SR141716) in smoking cessation. ICRS anual meeting. Canadá 2003.
- Lendent C., Valverde, O., Petitet, F., Aubert, JF., Beslot, F., Bohme, GA., Imperato, A., pedrazzini, T., Roques, BP., Vassart G., Fratta W, Parmentier M. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**: 401-4, 1999.
- Leon, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L. and Levi-Montalcini, R. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **91**, 3739-3743, 1994
- Lepore, M., Vorel, S. R., Lowinson, J., Gardner, E. L. Conditioned place preference induced by delta 9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. *Life Sci* **56**: 2073-2080, 1995.
- Lepore, M., Liu, X., Savage, V., Matalon, D., Gardner, E. L. Genetic differences in delta 9-tetrahydrocannabinol-induced facilitation of brain stimulation reward as measured by a rate-frequency curve-shift electrical brain stimulation paradigm in three different rat strains. *Life Sci* **58**: PL365-PL372, 1996.
- Lichtman AH, Martin BR. Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **258**: 517-523, 1991.
- Lichtman, A. H., Wiley, J. L., Lavecchia, K. L., Neviasser, S. T., Arthur, D. B., Wilson, D. M., Martin, B. R. Effects of SR 141716A after acute or chronic cannabinoid administration in dogs. *Eur J Pharmacol* **357**: 139-148, 1998.
- Lichtman, A.H., Martin, B.R. Marijuana withdrawal syndrome in the animal model. *J. Clin. Pharmacol.* **42**: 20S-27S, 2002.
- Little, P.J., Compton, D.R., Jonshon, M.R. Martin, B.R. Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **247**: 1046-1051, 1988.
- Llano, I., Leresche, N. Y Marty, A. Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* **6**: 565-574, 1991.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. Y Randall, RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275, 1951.
- Lukas S.E., Sholar, M., Kouri, E., Fukuzako, H., y Mendelson, J.H. Marijuana smoking increases plasma cocaine levels and subjective reports of euphoria in male volunteers. *Pharmacol. Biochem. Behavior* **48**: 715-721, 1994.
- Luo, Y.D., Patel, M.K., Wiederhold, M.D. and Ou, D.W. Effects of cannabinoids and cocaine on the mitogen-induced transformations of lymphocytes of human and mouse origins. *International Journal of Immunopharmacology* **14**: 49-56, 1992.
- Maccarrone, M., vean der Stelt, m., Rossi, A., Veldink, G.A., Viegantart, JFG y Finazzi-Agró A. Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain *J.Biol. Chem* **273**: 32332-32339, 1998.
- Maccarrone, M., Falciglia, K., Di Rienzo, M., Finazzi-Agró, A. Endocannabinoids, hormone-cytokine networks and human fertility. *PLEFA* **66**: 309-317, 2002.
- Mackie, K. and Hille, B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **89**: 3825-3829, 1992.

- Mackie K., Devane W.A., Hille B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Molecular Pharmacology* **44**: 498-503, 1993.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., y Mitchell, R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* **15**: 6552-6561, 1995.
- Mailleux P., Vanderhaeghen J.J. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: A comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* **48**: 655-668, 1992.
- Maldonado, R., y Rodríguez de Fonseca, F. Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlation. *J Neurosci.* **22**: 3326-31, 2002.
- Maldonado, R. Study of cannabinoid dependence in animals. *Pharmacol Ther* **95**: 153-64, 2002.
- Maneuf, Y.P., Nash, J.E., Croosman, A.R., Brotchie, J.M., Activation of the cannabinoid receptor by Δ^9 -THC reduces GABA uptake in the globus pallidus. *Eur J. Pharmacol* **308**: 161-164, 1996
- Mansbach, R. S., Nicholson, K. L., Martin, B. R., Balster, R. L. Failure of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and CP 55,940 to maintain intravenous self-administration under a fixed-interval schedule in rhesus monkeys. *Behav Pharmacol* **5**: 210-225, 1994.
- Manzanas J., Corchero J., Romero J., Fernández-Ruiz J.J., Ramos J.A., Fuentes J.A. Pharmacological and biochemical interaction between opioids and cannabinoids. *Trends in Pharmacological Sciences* **20**: 287-293, 1999^a
- Manzanas J., Corchero J., Fuentes J.A. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rats. *Brain research* **839**: 173-179, 1999b
- Marsicano, G., Moosmann, B., Hermann, H., Lutz, B y Behl, C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem* **80**: 448-456, 2002.
- Martellota, M. C., Cossu, G., Gessa, G. L., Fratta, W. Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in drug-naive mice. *Neuroscience* **85**: 327-330, 1998.
- Martin, B. R. Characterisation of the antinociceptive activity of intravenously administered delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. In: Harvey DJ (ed) *Marihuana'84, Proceeding of the Oxford Symposium on Cannabis*. Oxford, IRL Press, 685-692, 1985.
- Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur. J Neurosci.* **12**: 4038-46, 2000.
- Matsuda L. A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C. and Bonner T. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* **346**: 561-564, 1990.
- Matsuda L.A., Bonner T.I., Lolait S.J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *Journal of comparative Neurology* **327**: 535-555, 1993.
- Mechoulam R., Edey H. Structure activity relationships in the cannabinoid series. En *Marijuana Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects*, ed. R Mechoulam, pp.101-36. New York Academic., 1973.
- Mechoulam, R., Feigenbaum, J.J., Lander, N., Segal, M. Jarbe, T.U., Hiltunen, A.J. y Consroe, O.: Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia* **44**:762-764, 1988
- 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. and Vogel, Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* **50**: 83-90, 1995.
- Mechoulam, R., Fride, E., Hanus, L., Sheskin, T., Bisogno, T., Di Marzo, V., Bayewitch, M. and Vogel, Z. Anandamide may mediate sleep induction. *Nature* **389**: 25-26, 1997.
- Mechoulam, R., Spatz, M., Shohami, E. Endocannabinoids and Neuroprotection. *Sci STKE* **23**: 129, 2002.
- Mechoulam, R., Paniskashvili, D., Shohami, E. Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trend Mol Med* **8**: 58-61, 2002.
- Melvin L.S., Johnson M.R. Structure-activity relationships of tricyclic and nonclassical bicyclic cannabinoids. *NIDA Res. Monogr.* **75**: 31-47, 1987.
- Melvin L.S., Milne G.M., Johnson M.R., Subramaniam B., Wilken G.H., et al. Structure-activity relationship for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Molecular pharmacology*, **44**: 1008-1015, 1993.

- Meyerson, B.J., Hormone-dependent sociosexual behaviors and neurotransmitters. En *Progress in Brain Research*. Eds.: De Vries, G.J. Y cols Elsevier Science Publishers **61**: 271-281, 1984.
- Miksys, E., Hoffmann, E., Tydandele R.F. Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment. *Biochem. Pharmacol* **59**: 1501-1511, 2000
- Miller, A., Walker, JM. Electrophysiological effects of a cannabinoid on neural activity in the globus pallidus. *Eur J Pharmacol* **304**: 29-35, 1996
- Miller, A., Walker, JM., Local effects of cannabinoids on spontaneous activity and evoked inhibition in the globus pallidus. *Eur J Pharmacol* **352**: 199-205, 1998
- Miller, N.S., Klahr, A.L., Gold, M.S., Sweeney, K., Cocores, J.A., Sweeney, D.R. Cannabis diagnosis of patients receiving treatment for cocaine dependence. *J. Subs. Abuse*. **2**: 107-111, 1990.
- Molina-Holgado, E., Vela, J.M., Arevalo-Martin, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrel, J. y Guaza, C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/ Akt signalling. *J. Neurosci*. **22**: 9742-9753, 2002.
- Mombouli, J.V. y Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacology Science* **18**: 252-256, 1997.
- Munro, S., Thomas, K. L., Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365** : 61-65, 1993.
- Murphy L.L., Steger R.W., Bartke A. Psychoactive and non-psychoactive cannabinoids and their effects on reproductive neuroendocrine parameters. En: *Biochemistry and physiology of substance Abuse* Ed. R.R. Watson, vl. 2, pp. 73-93. CRC Press, Boca Raton, FL., 1990.
- Murphy L.L., Steger R.W., Smith M.S., Bartke A. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol, alone and in combinations, on luteinizing hormone and prolactin release and on hypothalamic neurotransmitters in the male rat. *Neuroendocrinology* **52**: 316-321, 1990.
- Murphy L.L., Chandrashekar V., Bartke A. Delta-9-tetrahydrocannabinol inhibits pulsatile luteinizing hormone secretion in the male rat. *Neuroendocrinology Letters* **16**: 1-7, 1994.
- Nahas, GG., Frick, HC., Larrimer, JK., Latour, C., Harvey, D. Pharmacokinetics of THC in brain and testis, male gametotoxicity and premature apoptosis of spermatozoa. *Hum Psychopharmacol* **17**: 103-113, 2002.
- Nagatsu, T., Oka, K., y Kato, T. Highly sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **163**: 247-252, 1979.
- Natarajan V., Schmid P.C., Reddy P.V., Zuzarte-Augustin M.L., Schimid H.H.O. Catabolism of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *Journal of Neurochemistry* **42**: 1613-1619, 1984.
- Olah, A., Karai, L. e Iadarola, M.J. Anandamide activates vanilloid receptor 1 VR1 at acidic pH in dorsal root ganglia neurons and cells ectopically expressing VR1. *J Biol Chem* **276**: 31163-70, 2001.
- Olds, J. and Milner, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **47**: 419-427, 1954.
- Oliva, J.M., Ortiz, S., Palomo, T., Manzanares, J. Behavioural and gene transcription alterations induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *J. Neurochem*. **85**: 94-104, 2003.
- Oviedo A., Glowa J., Herkenham M. Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: A quantitative autoradiographic study. *Brain Reseach* **616**: 293-302, 1993.
- Pacheco M., Childers S.R., Arnold R., Casiano F., Ward S.J. Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **257**: 170-183, 1991.
- Paria, B.C., Deutsch, D.D. and Dey, S.K. The uterus is a potential site for anandamide synthesis and hydrolysis: differential profiles of anandamide synthase and hydrolase activities in the mouse uterus during the periimplantation period. *Mol. Repr. Develop.* **45**: 183-192, 1996.
- Paria, BC., Wang, H., Dey, SK. Endocannabinoid signaling in synchronizing embryo development and uterine implantation. *Chem Phys Lipids* **121**: 201-210, 2002.
- Pate D.W., Jarvinen K, Urti A., Jarho P., Jarvinen T. Ophthalmic arachidonylethanolamide decrease intraocular pressure in normotensive rabbits. *Current of Eye Research* **14**: 791-707, 1995.
- Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotactic coordinates. London: Academic Press. 1986.

Pertwee, R.G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* **74**: 129-180, 1997.

Perwee R.G. Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert. Opin. Invest. Drugs* **9**:1553-1571, 2000.

Pickworth, W.B., Fant, R.V. Endocrine effects of nicotine administration, tobacco and other drug withdrawal in humans. *Psychoneuroendocrinol.* **23**: 131-141, 1998.

Pitler, T.A., y Alger, B.E. Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* **12** : 4122-32, 1992.

Poter, AC., sauer, JM., Knierman, MD., Becker, GW., Berna, MJ., Bao, J., Nomikos, GG., Carter, P., Bymaster, F.P., Leese, AB.,Felder, CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 1020-1024, 2002.

Pontieri, FE., Monnazzi, P., Scontrini, A., Buttarelli, F.R. Patacchioli, FR., Behavioral sensitization to heroin by cannabinoid pretreatment in the rat. *Eur J Pharmacol* **41**: R1-R3, 2001

Pross, S.H., Nakano, Y., Widen, R., McHugh, S., Newton, C.A., Klein, T.W. and Friedman, H. Differing effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on murine spleen cell populations dependent upon stimulators. *International Journal of Immunopharmacology* **14**: 1019-1027, 1992.

Randall, M.D., Alexander, S.P.H., Bennett, T., Boyd, E.A., Fry, J.R., Gardiner, S.M., Kemp, P.A., McCulloch, A.I. and Kendall, D.A. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **229**, 114-120, 1996.

Rezvani, AH., Levin, ED. Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry* **49**: 258-267, 2001.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, j., Néliat, G., Caput, D., Ferrara, P., Soubrié, P., Brelière, J.C., and Le Fur, G. SR141716A a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Letters* **350**: 240-244, 1994.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millán, J., Derocq, J.M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Brelière, J.C. and Le Fur, G.: SR144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid

receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **284**: 644-650, 1998.

Rodríguez de Fonseca F, Fernández-Ruiz JJ, Murphy L, Eldridge JC, Steger RW, Bartke A. Effects of delta9-tetrahydrocannabinol exposure on adrenal medullary function. Evidence of an acute effect and development of tolerance in chronic treatments. *Pharmacol Biochem Behav* **40**: 593-598, 1991.

Rodríguez de Fonseca F., Murphy L.L., Bonnin A., Eldridge J.C., Bartke A., Fernández-Ruiz J.J. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol administration affects anterior pituitary, corticoadrenal and adrenomedullary functions in male rats. *Neuroendocrinology (Life Sci. Adv.)* **11**: 147-156, 1992.

Rodríguez de Fonseca, F., Gorriti, M. A., Fernández-Ruiz, J. J., Palomo, T., Ramos, J. A. Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol Biochem Behav* **47**: 33-40, 1994.

Rodríguez de Fonseca, F., Carrera, M. R. A., Navarro, M., Koob, G. F., Weiss, F. Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science* **276**: 2050-2054, 1997.

Romero, J., García, L., Fernández-Ruiz, J. J., Cebeira, M., Ramos, J. A. Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide or to delta-9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav* **51**: 731-737, 1995

Romero, J., García, L., Cebeira, M., Zadrozny, D., Fernández-Ruiz, J. J., y Ramos, J. A. The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behaviour: role of nigrostriatal dopaminergic neurons, *Life Sciences* **56**: 2033-2040, 1995b

Romero J., García-Palomero E., Lin S.Y., Ramos J.A., Makriyannis, Fernández-Ruiz J.J. Extrapiramidal effects of methanandamide, an analog of anandamide the endogenous CB₁ receptor ligand. *Lifes Sciences* **58**: 1249-1257, 1996

Romero, J., García-Palomero, E., Castro, J. G., García-Gil, L., Ramos, R. A., Fernández-Ruiz, J. J. Effects of chronic exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Mol Brain Res* **46**: 100-108, 1997.

Romero, J., Berrendero, F., Manzanares, J., Pérez, A., Corchero, J., Fuentes, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A. Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain

caused by repeated exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Synapse* **30**: 298-308, 1998.

Romero J., de Miguel R., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J. The activation of cannabinoid receptors in striatonigral neurons inhibited GABA uptake. *Life Sciences* **62**: 351-365, 1998

Romero,J., Lastres-Becker, I., de Miguel, R., Berrendero, F., Ramos, JA. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. Biochemical, pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacol Ther* **95**: 137-52, 2002

Rubino T., Massi P., Patrini G., Venier I., Giagnoni G., Parolaro D. Chronic CP-55,940 alters cannabinoid receptor-mRNA in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *Neuroreport* **5**: 2493-2496, 1994.

Rubino, T., Tizzoni, L., Viganó, D., Massi, P., Parolaro, D. Modulation of rat brain cannabinoid receptors after chronic morphine treatment. *Neuroreport* **8**: 3219-3223, 1997.

Rubino, T., Patrini, G., Massi, P., Fuzio, D., Viganó, D., Giagnoni, G., Parolaro, D. Cannabinoid-precipitated withdrawal: a time-course study of the behavioral aspect and its correlation with cannabinoid receptors and G protein expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**, 813-819, 1998.

Rubino,T., Viganó, D., Massi, P., Parolaro, D. Changes in the cannabinoid receptor binding G protein coupling and cyclic AMP cascade in the CNS of rats tolerant to and dependent on the synthetic cannabinoid compound CP-55,940. *J Neurochem* **75**: 2080-2086, 2000

Rubio, P., Rodríguez de Fonseca, F., Martín-Calderon, J.L., Del Arco, I., Bartolome, S., Villamua, M.A., Navarro, M. Maternal exposure to low doses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol facilitates morphine-induced place conditioning in adult male offspring. *Pharmacol. Biochem. Behavior* **61**: 229-238, 1998.

Sánchez, C., Galve-Roperth, I., Canova, C., Brachet, P., y Guzmán, M. Δ^9 -tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* **406**: 6-10, 1998.

Sánchez, C., Galve-Roperth, I., Rueda, D., y Guzmán, M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol. Pharmacol.* **54**: 834-843, 1998.

Sánchez, C., Rueda, D., Ségui, B., Gálvez-Roperth, I., Leade, T., y Guzmán, M. The CB1 cannabinoid receptor of astrocytes is coupled

to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein FAN. *Mol. Pharmacol.* **59**: 955-959, 2001.

Sañudo-Peña, M. C., Tsou, K., Delay, E. R., Hohman, A. G., Force, M., Walker, J. M. Endogenous cannabinoids as an aversive or counter-rewarding system in the rat. *Neurosci Lett* **223**: 125-128, 1997.

Samyay, Z. Neurobiology of stress and cocaine addiction. Studies on corticotropin-releasing factor in rats, monkeys, and humans. *Ann. NY Acad. Sci.* **851**: 371-387, 1998.

Samyay, Z. Shaham, Y., Heinrichs, S.C. The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacol. Rev.* **53**: 209-243, 2001.

Schatz, A.R., Lee, M., Condie, R.B., Pulaski, J.T. y Kaminski, E.N. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**: 278-287, 1997.

Schechter, M. D., Calcagnetti, D. J. Trends in place preference conditioning with a cross-indexed bibliography; 1957-1991. *Neurosci Biobehav Rev* **17**: 21-41, 1993.

Schlicker, E. and Kathmann, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 565-562, 2001.

Schmid P.C., Zuzarte-Augustin and Schmid H.H.O. Properties of rat liver N-acyl ethanolamine amidohydrolase. *Journal Biol. Chem.* **260**: 14145-14149, 1985.

Schmid, P.C., Krebsbach, R.J., Perry, S.R., Dettmer, T.M., Maassen, J.L. y Schmid, H.H.O. Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain N-acyl ethanolamines in mammalian brain. *FEBS Lett.* **375**: 117-120, 1995.

Schmid, H.H.O., Schmid P.C., y Natarajan. The N-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signalling. *Chem. Phys. Lipids* **80**: 133-142, 1996

Schmid, P.C., Paria, B.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H.O. y Dey, S.K. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **94**, 4188-4192, 1997

Schmid, P.C., Schwartz, K.D., Smith, C.N., Krebsbach, R.J., Berdyshev, E.V., Schmid, H.H.O. A sensitive endocannabinoid assay.

- The simultaneous analysis of N-acylethanolamines and 2-monoacylglycerols. *Chem. Phys. Lipids* **104**: 185-191, 2000.
- Schmidt, LG, Samochowiec, J, Finckh, U., Fiszer-Piosik, E., Horodnicki J., Wendel, B., Rommelspacher, H., Hoeche, MR. Association of a CB1 cannabinoid receptor Gene (CNR1) polymorphism with severe alcohol dependence. *Drug and Alcohol Dependence* **65**: 221-224, 2002
- Schuel, H., Burkman, LJ., Lippes, J., Crickard, K., Mahony, MC., Giufrida A., Picone RP, Makriyannis, A. Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol Reprod* **63**: 376-387, 2002
- Selley D.E., Breivogel C.S., Childers SR. Modification of G protein-coupled functions by low-pH pretreatments of membranes from NG108-15 cell: increase in opioid agonist efficacy by decreased inactivation of G proteins. *Molecular Pharmacology* **44**: 731-741, 1993.
- Sheskim, T., Hanus, L., Slager, J., Vogel, Z. and Mechoulam, R. Structural requirements for binding of anandamide-type compounds to the brain cannabinoid receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**: 659-667, 1997.
- Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Caput, D., y Ferrara, P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Biol. Chem* **270**: 3726-3731, 1995.
- Showalter, V.M., Compton, D.R., Martin, B.R. and Abood, M.E. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB₂): Identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **278**: 989-999, 1996.
- Skaper, S.D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L. and Leon, A. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **93**: 3984–3989, 1995.
- Smith PB, Welch SP, Martin BR. Interactions between Δ^9 -tetrahydrocannabinol and Kappa opioids in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **268**: 1381-1387, 1994
- Smith P.B., Compton D.R., Welch S.P., Razdan R.K., Mechoulam R., Martin B.R. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **270**: 219-227, 1994.
- Solinas, M. Panlilio, LV., Antoniou, K. Pappas, LA., Golberg, SR. The cannabinoid CB1 antagonist SR141716 differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous-reinforcement, fixed-ratio and progressive-ratio schedules of drug self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* in press, 2003
- Staines, G.L., Magura, S., Foote, J., Deluca, A., Kosanke, N. Polysubstance use among alcoholics. *J Addict Dis.* **20(4)**:53-69, 2001.
- Steger R.W., Murphy L.L., Bartke A., Smith M.S. Effects of psychoactive and nonpsychoactive cannabinoids on the hypothalamic-pituitary axis of the adult male rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **37**: 299-302, 1990.
- Stella, N., Schweitzer, P. and Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**: 773-778, 1997.
- Sugiura, T., Konso, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. Y Waku, K. 2 Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**: 89-97, 1995.
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Tonegawa T., Nakane S., Yamashita A., Ishima Y. Waku K. Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. *European Journal of Biochemistry*, **240**: 53-62, 1996.
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Tonegawa T., Nakane S., Yamashita A. And Waku K. Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamina pathway in testis: involvement of Ca²⁺-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochemical and Biophysical. Research Communication.* **218**: 113-117, 1996.
- Sugiura, T., Kondo, S., Kishimoto, S., Miyashita, T., Nakane, S., Kodaka, T., Suhara, Y., Takayama, H. Y Waku, K. 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. *J. Biol. Chem.* **275**: 605-612, 2000.

- Swift, W., Hall, W., Copeland, J. Pattern and correlates of cannabis dependence among long term users in Sydney. *Australia NDARC Technical Monograph, Sydney*, 1997.
- Tanda, G., Munzar, P., Goldberg, S. R. Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat Neurosci* **3**: 1073-1074, 2000.
- Tanda, G., Pontieri, F. E., Di Chiara, G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common μ opioid receptor mechanism. *Nature* **276**: 2048-2050, 1997.
- Traynor, JR., y Nahorski, SR., Modulation of μ -opioid agonist of guanosine-5'-O-3-[³⁵S]thio triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular Pharmacology* **47**: 848-854, 1995
- Tsou, K., Patrick, S. L., Walker, J. M. Physical withdrawal in rats tolerant to delta 9-tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **280**, R13-R15, 1995
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., y Walker, J.M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci.* **83**, 393-411, 1998.
- Ueda, N., Puffenbarger, R.A., Yamamoto, S. Y Deutsch, DG. The fatty acid amido hidrolase (FAAH) *Chem. Phis. Lipids* **108**: 107-121, 2000.
- Uzbay, I.T., Usanmaz, SE., Akarsu, ES., Effects of chronic ethaonol administration on serotonin metabolism in various regions of the rat brain. *Neurochem. Res.* **25**. 257-262, 2000
- Valjent, E., Maldonado, R. A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology* **147**: 436-438, 2000.
- Valjent, E., Mitchell, J.M., Besson, M.J., Caboche, J., Maldonado, R. Behavioral and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. *Br Journal of pharmacology* **135**: 564-78, 2002.
- Van der Stelt, M., Veldhuis, WB., Maccarrone, M., Bar, PR., Nicolay, K., Veldink, GA, Di Marzo, V., Vliegenthart, JF. Acute neuronal injury, excitotoxicity an the endocannabinoid system. *Mol Neurobiol* **26**: 317-346, 2002
- Van Sickle, MD., Oland, LD., Ho, W., Hillard, CJ.,, Mackie, K., Davison, JS., Sharkey, KA. Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology* **121**(4): 767-774, 2001.
- Valverde, O., Maldonado, R., Valjent, E., Zimmer A.M, Zimmer, A. Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *J Neurosci.* Dec **15;20(24)**:9284-9, 2000.
- Valverde, O., Noble, F., Beslot, F., Dange, V., Fournic-Zaluski, MC., Δ^9 -Tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome witout change in rewarding effect *Eur J Neurosci* **13**: 1816-1824, 2001.
- Varga K., Lake K., Martin B., Kunos G. Novel antagonist implicates the CB₁ cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *European Journal of Pharmacology* **278**: 279-283, 1995.
- Varga., K., Lake, KD., Huangfu, D., Guyenet, PG. Kunos, G. Mechanism of the hipotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension* **28**: 682-686, 1996.
- Vela, G., Fuentes, J.A., Bonnin, A., Fernández-Ruiz J.J. y Ruiz-Gayo, M. Perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) leads to changes in opioid-related behavioral patterns in rats. *Brain Research* **680**: 142-147, 1995.
- Vela, G., Martín, S., García-Gil, L., Crespo, J.A., Ruiz-Gayo, M., Fernández-Ruiz J.J., García-Lecumberri, C., Pélaprat, D., Fuentes, J.A., Ramos, J.A., Ambrosio, E. Maternal exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol facilitates morphine self-administration behavior and changes regional binding to central μ opioid receptors in adult offspring female rats. *Brain Research* **807**: 101-109, 1998.
- Vogel A., Barg J., Levy R., Saya D., Heldman E., Mechoulam R. Anandamide, a brain endogenous compound, interats specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *Journal of Neurochemistry* **61**: 352-355, 1993.
- Von Sydow, K., Lieb, R., Pfister, H., Hofler, M., Sonntag, H., Wittchen, HU. The natural course of cannabis use, abuse and dependence over four years: a longitudinal community study of adolescents and young adults *Drug Alcohol Depend* **64**: 347-361, 2001
- Wagner, JA., Jarai, A., Batkai, D., Kunos, G. Hemodynamic effectos of cannabinoids: coronary and cerebvril vasodilation mediaed by cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol* **423**: 203-210, 2001.
- Walker, J.M., Huang, S.M., Strangman, N.M., Tsou, K. Y Sañudo-Peña, M.C. Pain modulation by release of the endogenous

cannabinoid anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **96**: 12198-12203, 1999.

Weiss, F., Porrino, L.J. Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. *J. Neurosci.* **22**: 3332-3337, 2002.

Welch SP, Stevens DL.: Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **262**: 10-18, 1992.

Welch S.P., Dunlow L.D., Patrick G.S., Razdan R.K. Characterization of anandamide- and fluoroanandamide - induced antinocicepción and cross-tolerance to delta-9-THC after intrathecal administration to mice: blockade of delta-9-induced analgesia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **273**: 1235-1244, 1995.

Wenger, T., Moldrich, G. The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *PLEFA* **66**: 301-307, 2002

White, R. and Hiley, C.R. A comparison of EDHF-mediated and anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. *Br. J. of Pharmacology* **122**: 1573-1584, 1997.

Wilson, R.I. y Nicoll R.A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* **410**: 588-592, 2001

Zimmer A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., Bonner, T.I. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:5780-5785, 1999.

Zimmer, A., Valjent, E., Koning, M., Zimmer, A. M., Clarke, S., Robledo, P., Chen, C. C., Hahn, H., Valverde, O., Hill, R. G., Kitchen, I., Maldonado, R. Absence of delta-9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. *J Neurosci* **21**:9499-505, 2001.

Zorrilla, E.P., Valdez, G.R., Weiss, F. Changes in levels of regional CRF-like-immunoreactivity and plasma and corticosterone during protracted drug withdrawal in dependent rats. *Psychopharmacol.* **158**: 374-381, 2001.

Zygmunt, P.M., Hogestatt, K., Waldeck, K., Edwards, G., Kirkup, A.J. and Weston, A.H. Studies on the effects of anandamide in rat hepatic artery. *Br. J. of Pharmacology* **122**: 1679-1686, 1997.

Zygmunt, P.M., Peterson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D. Y Hogestatt, E.D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**: 452-457, 1999.

ANEXO

Los resultados experimentales que se recogen en esta tesis doctoral han sido publicados o están en fase de serlo en las siguientes revistas:

Di Marzo, V., Berrendero, F., Bisogno, T., González, S., Cavaliere, P., Romero, J., Cebeira, M., Ramos, JA., Fernández Ruiz, JJ. Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-tolerant-rats. *Journal of Neurochemistry* **74**: 1627-1635, 2000.

González, S., Fernández-Ruiz, J., Sparpaglione, V., Parolaro, D., Ramos, JA. Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB1 receptor binding and mRNA levels. *Drug and Alcohol Dependence* **66**: 77-84, 2002.

González, S., Cascio, MG., Fernández-Ruiz, J., Fezza, F., Di Marzo, V., Ramos, JA. Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Research* **954**: 73-81, 2002.

González, S., Schmid, PC., Fernández-Ruiz, J., Schmid, HHO., Ramos, JA. Region dependent changes in endocannabinoid transmission in the brain of morphine-dependent rats. *Addiction Biology* (en prensa, 2003)

González, S., Fernández-Ruiz, JJ., Di Marzo, V., Hernández, ML., Arévalo, C., Nicanor, C., Cascio, MG., Ambrosio, E., Ramos, JA. Analysis of behavioral and molecular changes elicited by an acute administration of SR141716 to Δ^9 -tetrahydrocannabinol-tolerant rats, an experimental model of cannabinoid abstinence. (enviado, *Neuropharmacology*)

González, S., Fezza, F., de Miguel, R., Cascio, MG., Fernández-Ruiz, Di Marzo, V., Ramos, JA. The effects of chronic exposure, abstinence and voluntary consumption of alcohol on the endocannabinoid transmission in reward-related brain regions: bases for a pharmacological management of this system to reduce alcohol intake (enviado, *Journal of Neurochemistry*)

Enhancement of Anandamide Formation in the Limbic Forebrain and Reduction of Endocannabinoid Contents in the Striatum of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-Tolerant Rats

V. Di Marzo, *F. Berrendero, T. Bisogno, *S. González, P. Cavaliere, *J. Romero, *M. Cebeira, *J. A. Ramos, and *J. J. Fernández-Ruiz

*Istituto per la Chimica di Molecole di Interesse Biologico, CNR, Napoli, Italy; and *Instituto Complutense de Drogodependencias, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain*

Abstract: Recent studies have shown that the pharmacological tolerance observed after prolonged exposure to synthetic or plant-derived cannabinoids in adult rats is accompanied by down-regulation/desensitization of brain cannabinoid receptors. However, no evidence exists on possible changes in the contents of the endogenous ligands of cannabinoid receptors in the brain of cannabinoid-tolerant rats. The present study was designed to elucidate this possibility by measuring, by means of isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry, the contents of both anandamide (arachidonylethanolamide; AEA) and its biosynthetic precursor, *N*-arachidonoylphosphatidylethanolamine (NArPE), and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in several brain regions of adult male rats treated daily with Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) for a period of 8 days. The areas analyzed included cerebellum, striatum, limbic forebrain, hippocampus, cerebral cortex, and brainstem. The same regions were also analyzed for cannabinoid receptor binding and WIN-55,212-2-stimulated guanylyl-5'-O-(γ -[35 S]thio)-triphosphate ([35 S]GTP γ S) binding to test the development of the well known down-regulation/desensitization phenomenon. Results were as follows: As expected, cannabinoid receptor binding and WIN-55,212-2-stimulated [35 S]GTP γ S binding decreased in most of the brain areas of Δ^9 -THC-tolerant rats. The only region exhibiting no changes in both parameters was the limbic forebrain. This same region exhibited a marked (almost fourfold) increase in the content of AEA after 8 days of Δ^9 -THC treatment. By contrast, the striatum exhibited a decrease in AEA contents, whereas no changes were found in the brainstem, hippocampus, cerebellum, or cerebral cortex. The increase in AEA contents observed in the limbic forebrain was accompanied by a tendency of NArPE levels to decrease, whereas in the striatum, no significant change in NArPE contents was found. The contents of 2-AG were unchanged in brain regions from Δ^9 -THC-tolerant rats, except for the striatum where they dropped significantly. In summary, the present results show that prolonged activation of cannabinoid receptors leads to decreased endocannabinoid contents and signaling in the striatum and to increased AEA formation in the limbic forebrain. The pathophysiological implications of these

findings are discussed in view of the proposed roles of endocannabinoids in the control of motor behavior and emotional states. **Key Words:** Endocannabinoids—Anandamide—2-Arachidonoylglycerol—Cannabinoid receptor binding—Tolerance— Δ^9 -Tetrahydrocannabinol.

J. Neurochem. **74**, 1627–1635 (2000).

Recent animal studies (Oviedo et al., 1993; Rodríguez de Fonseca et al., 1994; Rubino et al., 1994; Romero et al., 1995a, 1997, 1998a,b, 1999; Sim et al., 1996; Zhuang et al., 1998) have tried to elucidate the molecular events underlying the pharmacological tolerance observed for a variety of pharmacological effects (motor inhibition, analgesia, hypothermia, hypotension, neuroendocrine effects) after prolonged exposure to cannabinoids in adult rodents (for review, see Dewey, 1986; Pertwee, 1991, 1995). Unlike earlier studies showing no changes in cannabinoid receptor binding or mRNA expression (Westlake et al., 1991; Abood et al., 1993), recent reports from our group (Rodríguez de Fonseca et al., 1994; Romero et al., 1995a, 1997, 1998a,b, 1999) and others (Oviedo et al., 1993; Rubino et al., 1994; Sim et al., 1996; Zhuang et al., 1998) have clearly demon-

Received July 27, 1999; revised manuscript received November 29, 1999; accepted November 29, 1999.

Address correspondence and reprint requests to Dr. J. J. Fernández-Ruiz at Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040-Madrid, Spain. E-mail: jjfr@eucmax.sim.ucm.es

The present address of Dr. J. Romero is Laboratorio de Investigación, Fundación Hospital de Alcorcón, 28922-Madrid, Spain.

Abbreviations used: AEA, anandamide or arachidonylethanolamide; 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; GC/MS, gas chromatography/mass spectrometry; GTP γ S, guanylyl-5'-O-(γ -thio)-triphosphate; NArPE, *N*-arachidonoylphosphatidylethanolamine; NP-HPLC, normal-phase HPLC; NPPE, *N*-palmitoylphosphatidylethanolamine; Δ^9 -THC, Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

strated that pharmacological tolerance appears to be linked more to changes in the availability of cannabinoid receptors rather than to altered metabolism of cannabimimetic agents (for review, see Pertwee, 1995).

Oviedo et al. (1993), using autoradiographic techniques, and our group, using binding of [³H]CP-55,940 to brain membranes (Rodríguez de Fonseca et al., 1994; Romero et al., 1995a) and more recently autoradiography (Romero et al., 1997, 1998a,b), have demonstrated that cannabinoid receptor binding in several brain structures, mainly in the extrapyramidal areas, decreases after a chronic exposure to cannabinoids in rats. These changes are paralleled by a pronounced reduction in the magnitude of motor inhibition caused by acute cannabinoid treatment. Of particular interest is the report from Oviedo et al. (1993), who used regional K_D/B_{max} analysis to clearly demonstrate down-regulation of cannabinoid receptors after chronic cannabinoid exposure. More recently, Sim et al. (1996) also reported the existence of a profound desensitization of cannabinoid-activated signal transduction mechanisms, by using autoradiographic analysis of WIN-55,212-2-stimulated guanylyl-5'-O-(γ -[³⁵S]thio)-triphosphate ([³⁵S]GTP γ S) binding in Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)-tolerant rats. In this study, the regions particularly affected were the basal ganglia and the hippocampus. In addition, Rubino et al. (1994) have also demonstrated that mRNA levels of CB₁ receptor, measured by in situ hybridization, decreased in the caudate-putamen area in parallel with the development of motor tolerance after chronic treatment with CP-55,940. No alterations were observed in other brain areas (Rubino et al., 1994; Romero et al., 1998a). In recent studies, we have characterized the time course of the effects of chronic cannabinoid exposure on CB₁ receptor binding and mRNA expression (Romero et al., 1998a) and WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding (Corchero et al., 1999). We have observed that changes in CB₁ receptor binding precede those in mRNA expression and that the magnitude of the response is always region dependent (Romero et al., 1998a).

Although strong evidence indicates that cannabinoid receptor binding, mRNA expression, and agonist-stimulated G protein activity (see references in the preceding paragraph) decrease in Δ^9 -THC-tolerant animals, no data exist on the possible adaptive changes in the contents of anandamide (arachidonylethanolamide; AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), the two major endogenous ligands for cannabinoid receptors, in these animals. It may be expected that tolerance to cannabinoids is associated with changes not only in receptor binding sites but also in the contents of endogenous ligands for these receptors. The present study was designed to elucidate this possibility by examining the contents of both AEA and 2-AG in several brain regions (cerebellum, striatum, hippocampus, limbic forebrain, cerebral cortex, and brainstem) of adult male rats treated daily with Δ^9 -THC for a period of 8 days. It has been largely demonstrated that this kind of daily treatment with Δ^9 -THC results in behavioral tolerance and decreased

cannabinoid receptor binding and efficiency (Romero et al., 1997, 1998a,b). To confirm this, the same regions analyzed for their endocannabinoid contents were also used for cannabinoid receptor binding and WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding studies. Finally, we also measured the contents of the AEA precursor *N*-arachidonoylphosphatidylethanolamine (NAPE) in those areas where AEA contents were significantly altered following prolonged Δ^9 -THC treatment.

MATERIALS AND METHODS

Animals, treatments, and sampling

Male Wistar rats were housed from birth in a room with controlled photoperiod (08:00–20:00-h light) and temperature (23 ± 1°C). They had free access to standard food (Panlab, Barcelona, Spain) and water and were used for experimental purposes at adult age (8–10 weeks after birth; ~250 g of weight). All experiments with animals conformed to European rules (directive 86/609/EEC). Animals were submitted to a single intraperitoneal administration of Δ^9 -THC (10 mg/kg of weight), kindly supplied by the National Institute on Drug Abuse (Rockville, MD, U.S.A.), or vehicle (Tween–saline solution). Injections were repeated daily for a period of 8 days. Injections were always carried out at 9:00–10:00 h, and the whole experiment was performed during the winter season. On the last day of treatment, animals were killed 2 h after the injection (11:00–12:00 h). This treatment paradigm was chosen according to a previous study (Romero et al., 1998a) that demonstrated that down-regulation of cannabinoid receptors appears in most brain regions at first 2–3 days after the beginning of daily Δ^9 -THC treatment. After the rats were killed, brains were quickly and carefully removed; the following areas, cerebellum, striatum, hippocampus, cerebral cortex, limbic forebrain (that contains olfactory tubercles, rostral limbic nuclei, nucleus accumbens, septum nuclei, and parts of the anterior amygdaloid nuclei), and brainstem, were rapidly dissected on ice. Regions to be used for analysis of cannabinoid receptor binding and WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding were rapidly frozen in dry ice and stored at –70°C until processed (4 animals per experimental group were used for these two analyses), whereas those to be used for analysis of endocannabinoid contents were pooled (32 animals per experimental group were used and randomly assigned to four pools of 8 animals each) and subjected to the extraction procedure described below.

[³H]CP-55,940 binding or WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding assays

Membrane preparation. To obtain membrane fractions from dissected brain regions for binding studies, tissues were homogenized for 20 s with a Polytron at speed 2–3 in 5 ml of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). The homogenates were centrifuged at 40,000 g for 10 min at 4°C. After one wash, the pellets were resuspended in a volume of the same buffer for [³H]CP-55,940 binding or of 50 mM Tris-HCl buffer containing 3 mM MgCl₂ and 1 mM EGTA (pH 7.4) for WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding. In both cases, the resuspension volume varied as a function of the desired protein concentration. An aliquot of membrane fraction was used for determining the protein concentration by the method of Lowry et al. (1951). This was ~2–3 mg/ml for [³H]CP-55,940 binding and 1–2 mg/ml for WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding assays.

[³H]CP-55,940 binding assay. The analysis of cannabinoid binding sites was performed by using the procedure described by Houston et al. (1991) with slight modifications previously published (Romero et al., 1995a). Assays were always performed in borosilicate tubes silanized with Sigmacote (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). The radioactive ligand was [³H]CP-55,940 (104.0 Ci/mmol) purchased from NEN (Boston, MA, U.S.A.). This was used at a range of concentrations of 0.125–2.5 nM (six to seven different concentrations). Δ^9 -THC was used as displacer at a concentration of 5 μ M. Both radioactive ligand and Δ^9 -THC were diluted from stock solutions at the above-mentioned concentrations in incubation buffer. This consisted of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, and 5 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin. The aliquot of membrane fraction was also diluted in the incubation buffer to a final protein concentration of 0.2–0.3 mg/ml. The final incubation volume was 0.5 ml. Incubation was allowed for 60 min at 30°C and terminated by rapid filtration through Whatman GF/C glass fiber filters, presoaked in 1 mg/ml bovine serum albumin. Filters were washed twice with 5 ml of ice-cold Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin. Radioactivity bound to membranes was determined by liquid scintillation counting. Specific [³H]CP-55,940 binding was calculated as the difference between binding in the presence or absence of Δ^9 -THC. Data were analyzed by Scatchard transformations using the LIGAND program. Saturation curves and Scatchard plots obtained using this procedure have been previously published (Rodríguez de Fonseca et al., 1994).

Basal and WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding assay. The protocol used was basically the method described by Traynor and Nahorski (1995). In brief, membrane fractions (200–300 μ g of protein) obtained from the different brain regions were incubated in assay buffer (20 mM HEPES, pH 7.0, containing 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.05 nM [³⁵S]GTP γ S, 5 μ M GDP, and 5 μ M WIN-55,212-2) at 30°C for 60 min in a total volume of 1 ml. Basal binding was assessed in the absence of agonist, whereas nonspecific binding was measured in the presence of 10 μ M unlabeled GTP γ S. Additional membrane fractions were incubated in the presence of the CB₁ receptor antagonist SR141716A (2 μ M; kindly supplied by Sanofi Recherche, Montpellier, France) in addition to 0.05 nM [³⁵S]GTP γ S, 5 μ M GDP, and 5 μ M WIN-55,212-2. This was done to ensure that the WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding increase was caused by activation of cannabinoid CB₁ receptors (data not shown). The reaction was terminated by filtration under vacuum through Whatman GF/C glass fiber filters, followed by a wash with cold buffer. Radioactivity bound to membranes was determined by liquid scintillation counting. Specific WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding was calculated as the difference between binding in the presence or absence of WIN-55,212-2 and always after subtracting the nonspecific binding for both situations obtained in the presence of unlabeled GTP γ S.

Measurement of endocannabinoid contents

Extraction procedure. Pools for each brain region, in amount ranging from 0.5 to 3 g of wet wt, were extracted immediately after the rats were killed to avoid the postmortem rise in the concentrations of long-chain *N*-acylethanolamines. This occurs from ~30 min after the rats are killed, as reported by Schmid et al. (1995). The tissue was homogenized in 5 volumes of chloroform/methanol (2:1) and subjected to lipid extraction. Homogenates were centrifuged at 13,000 g for 16 min (4°C), the supernatants were collected, and the precipitates were re-

suspended in 5 volumes of chloroform/methanol (2:1) and again centrifuged. This procedure was repeated three more times. Then, the supernatants collected in the five consecutive centrifugations for each pool of brain regions were mixed, and the organic solvents were evaporated in a Speed-Vac. Lyophilized samples were stored frozen at –80°C under nitrogen atmosphere until analyzed.

Analysis of endocannabinoid contents by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Lyophilized extracts were resuspended in chloroform/methanol 99:1 by volume and 5 nmol of deuterated AEA and 2-AG or 5,000 cpm of *N*-[³H]palmitoylphosphatidylethanolamine ([³H]NPPE) added to the solution. Deuterated standards were synthesized from *d*₈-arachidonic acid and ethanolamine or glycerol as described, respectively, by Devane et al. (1992) and Bisogno et al. (1997). Radiolabeled NPPE (5 mCi/mmol) was synthesized following a procedure described for NArPE by Fontana et al. (1995). The solutions were then purified by open bed chromatography on silica as described by Fontana et al. (1995). Fractions eluted with chloroform/methanol 9:1 by volume (containing AEA and 2-AG) or 1:1 by volume (containing NArPE) were collected and the excess solvent evaporated with a rotating evaporator. The former fractions were further fractionated by normal-phase HPLC (NP-HPLC) carried out using a semipreparative silica column (Spherisorb S5W; Phase Sep, Queensferry, Clwyd, U.K.) eluted with a 40-min linear gradient from 9:1 to 8:2 by volume of *n*-hexane/2-propanol (flow rate = 2 ml/min). These elution conditions allow the separation of 1(3)- and 2-acylglycerols (retention time of 18 and 20 min, respectively) from *N*-acylethanolamines (retention time = 26–27 min). NP-HPLC fractions from 17 to 22 min and from 24 to 28 min were pooled, the solvent was evaporated in a Speed-Vac, and the components were derivatized with 20 μ l of *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide plus 1% trimethylchlorosilane for 2 h at room temperature and analyzed by GC/MS carried out under conditions described previously (Bisogno et al., 1997), allowing the separation of monoacylglycerols or *N*-acylethanolamines with different fatty acid chains. MS detection was carried out in the selected ion-monitoring mode using *m/z* values of 427 and 419 (molecular ions for deuterated and undeuterated AEA), 412 and 404 (loss of 15 mass units from deuterated and undeuterated AEA), 530 and 522 (molecular ions for deuterated and undeuterated 2-AG), and 515 and 507 (loss of 15 mass units from deuterated and undeuterated 2-AG). The area ratios between signals of deuterated and undeuterated AEA varied linearly with varying amounts of undeuterated AEA (20 pmol to 20 nmol). The same applied to the area ratios between signals of deuterated and undeuterated 2-AG in the interval of 100 pmol to 20 nmol. AEA and 2-AG levels in unknown samples were therefore calculated on the basis of their area ratios with the internal deuterated standard signal areas. Two GC/MS peaks for both deuterated and undeuterated monoarachidonoylglycerol were found, corresponding to 2-AG and 1(3)-AG, in agreement with the previous observation that 2-AG undergoes isomerization during the purification procedure (Stella et al., 1997). Therefore, the amounts of 2-AG were calculated by adding the amounts of the two isomers. The 1:1 fractions from silica column chromatography were resuspended in diethyl ether and digested with *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D as previously described (Di Marzo et al., 1996). The digest was then purified by NP-HPLC, and the fractions eluting between 24 and 28 min (containing AEA produced from NArPE hydrolysis) were pooled. The yield of purification and hydrolysis of NArPE was calculated from the

TABLE 1. Specific binding for cannabinoid receptors (fmol/mg of protein) and WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTPγS binding (% of agonist stimulation) measured in different brain regions of adult male rats exposed daily (8 days) to Δ⁹-THC or vehicle

Brain region	Cannabinoid receptor binding		WIN-55,212-2-stimulated [³⁵ S]GTPγS binding	
	Control	Δ ⁹ -THC-tolerant	Control	Δ ⁹ -THC-tolerant
Cerebellum	518.1 ± 65.2 (4)	345.4 ± 66.7 (4) ^a	166.2 ± 25.7 (4)	112.0 ± 17.1 (4) ^a
Striatum	716.3 ± 133.4 (4)	402.4 ± 108.0 (4) ^a	163.3 ± 11.6 (4)	107.7 ± 21.2 (4) ^a
Hippocampus	533.8 ± 118.0 (4)	262.1 ± 44.2 (4) ^a	167.6 ± 15.3 (4)	123.3 ± 40.5 (4)
Limbic forebrain	507.3 ± 132.3 (4)	410.5 ± 123.7 (4)	147.9 ± 25.9 (4)	159.5 ± 19.6 (4)
Cerebral cortex	329.6 ± 50.5 (4)	110.5 ± 15.1 (4) ^b	112.4 ± 12.5 (4)	95.0 ± 10.3 (4)
Brainstem	660.7 ± 76.6 (4)	382.8 ± 98.5 (4) ^a	94.8 ± 14.7 (4)	50.6 ± 7.4 (4) ^a

Details are in the text. Values are means ± SEM with the number of determinations in parentheses.

Data were analyzed by Student's *t* test (^a *p* < 0.05, ^b *p* < 0.005).

amounts of radioactivity found in this pooled fraction. AEA released from NArPE digestion was then derivatized and quantitated by GC/MS as described above (after adding 2 nmol of deuterated AEA to the pooled HPLC fractions). The amounts of endocannabinoids are expressed as picomoles or nanomoles per gram of wet tissue extracted. Further details on the GC/MS technique, including the detection and quantification limits, have been recently published (De Petrocellis et al., 1999).

Statistics

Data were assessed by the unpaired Student's *t* test.

RESULTS

Assessment of down-regulation/desensitization of cannabinoid receptors in brain of Δ⁹-THC-tolerant rats

CB₁ receptor binding in the six brain regions of vehicle-injected rats was mostly similar to values obtained previously by us (Bisogno et al., 1999a) using [³H]CP-55,940 binding in membrane fractions of naive animals. Binding densities ranged from the lowest values observed in the cerebral cortex up to the highest ones measured in the striatum (see Table 1). In all these regions, the activation of CB₁ receptors with WIN-55,212-2 stimulated [³⁵S]GTPγS binding, yielding percentage of stimulation values that were different for each region, in concordance with the results previously reported by Breivogel et al. (1997), but always >90% of stimulation. The percentage of stimulation ranged from the lowest values found in the brainstem up to the highest measured in the hippocampus (see Table 1). There was a modest statistical correlation between number of binding sites and percentage of agonist stimulation of [³⁵S]GTPγS binding (*r* = 0.78641, *p* = 0.115), in concordance with the regional differences in cannabinoid receptor binding/G protein coupling previously reported by Breivogel et al. (1997).

As expected, both CB₁ receptor binding and WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTPγS binding (Table 1) decreased in most of the brain areas analyzed after 8 days of daily Δ⁹-THC administration, although differences in the magnitude of the decreases were noted. These de-

creases in both CB₁ receptor binding and WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTPγS binding were not due to a competitive effect of the administered Δ⁹-THC prebound to the receptor in the membrane fractions used in both assays, as has been previously reported (Sim et al., 1996; Romero et al., 1997). In these previous studies, it was conclusively demonstrated that repeated Δ⁹-THC administration produced an effect on the number of binding sites rather than on the affinity. In the present study, the areas analyzed included cerebellum, striatum, hippocampus, cerebral cortex, and brainstem. It should be noted, however, that two of these areas, the hippocampus and cerebral cortex, showed statistically significant decreases in receptor binding but only trends in WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTPγS binding, which could be related to the regional differences in cannabinoid receptor binding/G protein coupling previously reported by Breivogel et al. (1997). The only area exhibiting no changes in both parameters in the tolerance situation was the limbic forebrain (Table 1).

Endocannabinoid contents in brain of Δ⁹-THC-tolerant rats

The contents of both endocannabinoids, AEA and 2-AG, measured in the six brain regions of vehicle-injected rats were mostly similar to those reported previously by us (Bisogno et al., 1999a) and others (Felder et al., 1996; Koga et al., 1997; Kondo et al., 1998) in naive animals, allowing for the large standard deviations with which these compounds are usually quantified by the GC/MS technique. In addition, the contents of both endocannabinoids measured in the six different regions were higher than those measured in whole brain by us (see Bisogno et al., 1999a, for a more detailed discussion) and others (Felder et al., 1996; Koga et al., 1997). As discussed previously (Bisogno et al., 1999a), this increase is unlikely to be due to the previously reported postmortem rise in the contents of *N*-acylethanolamines (Schmid et al., 1995; Felder et al., 1996), as this required at least 30 min at room temperature after death, whereas

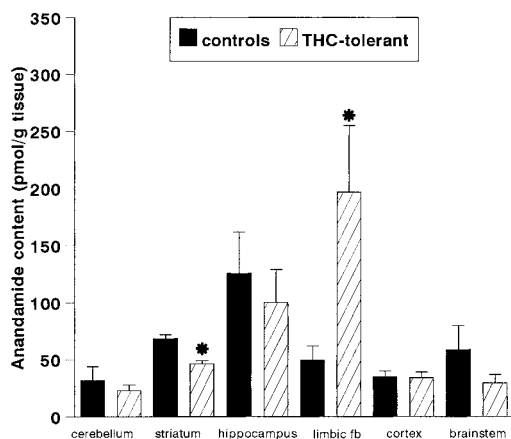


FIG. 1. AEA contents measured in different brain regions of adult male rats exposed daily (8 days) to Δ^9 -THC or vehicle. Details are in the text. Values are means \pm SEM of four determinations (each corresponding to a different pool of eight animals) per group. Data were analyzed by Student's *t* test ($p < 0.05$).

the tissue dissection in our study was finished in <5 min and was carried out on ice.

The highest contents of AEA were found in the hippocampus, whereas the lowest were in the cerebellum and cerebral cortex (see Fig. 1). Intermediate values were found in the striatum, limbic forebrain, and brainstem (see Fig. 1). The contents of 2-AG were ~ 100 -fold higher than AEA contents and more similar among the different regions than in the case of AEA. Highest values were found in the cerebellum and cerebral cortex, whereas lowest ones were measured in the hippocampus (see Fig. 2). There were, however, a few minor differences compared with our previous report (Bisogno et al., 1999a); that is, AEA contents were slightly higher in the present study than in the previous one, with the only exception of the brainstem, whereas 2-AG contents were slightly lower, with the only exception of the cerebellum and the cerebral cortex. These differences could be attributed to methodological reasons (injection-induced stress, subtle effects of handling, storage, extraction or analysis, etc.) or to seasonal variations, particularly for 2-AG whose levels are determined by several biosynthetic pathways (Di Marzo, 1999). Strain- and age-dependent differences have been previously described (Koga et al., 1997; Di Marzo et al., 2000).

Comparison of endocannabinoid contents in control and Δ^9 -THC-tolerant rats showed the existence of statistically significant differences in only two regions. Thus, in the limbic forebrain, the only area exhibiting no changes for CB_1 receptor binding and WIN-55,212-2-stimulated [35 S]GTP γ S binding in Δ^9 -THC-tolerant rats, there was an almost fourfold increase in the amount of AEA (Fig. 1), but not of 2-AG (Fig. 2), after 8 days of daily Δ^9 -THC treatment. The remaining areas showed instead a decrease in AEA contents in the striatum, a trend toward a decrease in the brainstem, or no changes in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum

(Fig. 1). Contents of 2-AG were usually unchanged in the tolerance situation, except, again, for the striatum, where they dropped by $>50\%$ (Fig. 2).

We finally wanted to examine whether the differences in AEA contents found in the limbic forebrain and the striatum of Δ^9 -THC-tolerant rats corresponded to up- or down-regulation, respectively, of the contents of NArPE, the AEA precursor. The procedure of purification and processing of NArPE is extremely time consuming, and therefore, only the two regions where we found changes in AEA contents were examined. Interestingly, the contents of NArPE tended to decrease, although the effect was not statistically significant, in the limbic forebrain of Δ^9 -THC-tolerant rats (means \pm SEM; 350.3 ± 67.0 pmol/g of wet weight, $n = 4$) as compared with vehicle-injected animals (477.4 ± 54.1 pmol/g of wet weight, $n = 4$). This small decrease of ~ 127 pmol/g of wet weight coincided with the increase of ~ 147 pmol/g of wet weight found for AEA contents in the same region, thus indicating that chronic treatment with Δ^9 -THC might stimulate NArPE hydrolysis but not NArPE synthesis, resulting in a release of AEA from its membrane-stored phospholipid precursor. In the striatum, the other brain region analyzed for NArPE contents, no significant change was found in Δ^9 -THC-tolerant rats (476.3 ± 189.7 pmol/g of wet weight, $n = 4$) as compared with vehicle-injected animals (429.9 ± 121.8 pmol/g of wet weight, $n = 4$).

DISCUSSION

This study reports for the first time the occurrence of alterations in the contents of endocannabinoids in the brain of Δ^9 -THC-tolerant rats. It has been conclusively demonstrated that binding (Romero et al., 1997a, 1998a, b), mRNA expression (Rubino et al., 1994; Romero et al., 1998a), and agonist-stimulated G protein activity

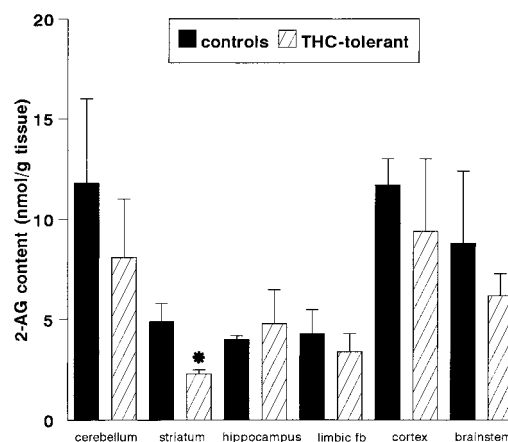


FIG. 2. 2-AG contents measured in different brain regions of adult male rats exposed daily (8 days) to Δ^9 -THC or vehicle. Details are in the text. Values are means \pm SEM of four determinations (each corresponding to a different pool of eight animals) per group. Data were analyzed by Student's *t* test ($p < 0.005$).

(Sim et al., 1996; Manzanares et al., 1999) for the CB₁ receptor decrease in most of the brain structures when the tolerance state is achieved after varied periods of chronic cannabinoid treatment. The duration of the treatment, the dose and the type of cannabinoid agonist used, and other parameters seem to be critical to elicit tolerance to the different acute effects of cannabinoids, but in most cases, this phenomenon is observed and seems to be originated by a progressive loss of cannabinoid receptor binding sites in the brain areas responsible for the different effects. To our knowledge, however, until the present study, no evidence existed about parallel changes in the contents of endogenous ligands for cannabinoid receptors in the areas where down-regulation/desensitization after prolonged CB₁ receptor activation had been demonstrated. Our present data indicate that changes in the contents of these endogenous ligands do occur during tolerance to cannabinoids and that these changes are region dependent and do not necessarily reflect the corresponding change in the status of CB₁ receptors. This regional variability is possibly related to the different proposed roles for endocannabinoids in each brain area (Di Marzo et al., 1998). The changes observed herein will be discussed below region by region.

Changes observed in striatum of Δ^9 -THC-tolerant rats

In the striatum, one of the brain areas more sensitive to the development of tolerance (Romero et al., 1998a), we observed a decrease in the contents of both AEA and 2-AG, with no changes in the AEA precursor, NArPE. This finding was not surprising as tolerance for the motor-depressing effects of cannabinoids and decreased CB₁ receptor binding, mRNA expression, and agonist-stimulated G protein activity in the striatum and other basal ganglia have been reported after prolonged cannabinoid exposure (Oviedo et al., 1993; Rubino et al., 1994; Sim et al., 1996; Romero et al., 1997, 1998a,b). Our finding of decreased endocannabinoid contents in the striatum, however, supports the concept that the endogenous cannabinoid system is involved in the tonic control of movement in the basal ganglia (for reviews, see Glass et al., 1997; Di Marzo et al., 1998). In this line of reasoning, we have reported that endocannabinoids inhibit dopamine transmission in the striatum (Romero et al., 1995b,c), presumably through a GABA-mediated effect (Romero et al., 1998c). Accordingly, the low CB₁ receptor binding and efficiency and in particular the low contents of AEA and 2-AG in the striatum of Δ^9 -THC-tolerant rats might cause a disinhibition of dopamine transmission that might result in the observed (1) loss of cannabinoid-induced motor inhibition in Δ^9 -THC-tolerant rats (Rodríguez de Fonseca et al., 1994; Romero et al., 1997), (2) potentiation of amphetamine-induced motility after interruption of chronic Δ^9 -THC treatment in rats (Gorriti et al., 1999), and (3) increased motor behavior exhibited by Δ^9 -THC-tolerant animals acutely treated with SR141716A (Aceto et al., 1995; Tsou et al.,

1995), as compared with the negligible effects of SR141716A in naive rats.

Changes observed in limbic structures of Δ^9 -THC-tolerant rats

The increase in the contents of AEA observed in the limbic forebrain during Δ^9 -THC tolerance was rather unexpected, although it must be pointed out that this brain region is the only area where we observed no change in CB₁ receptor binding and agonist-stimulated G protein activity. Also in previous reports (Romero et al., 1998a,b, 1999), we found, by using autoradiography, that not all limbic nuclei included in the region dissected in the present study respond to chronic treatment with the expected decreased binding. For example, we found that chronic Δ^9 -THC exposure resulted in decreased binding in the septum nuclei but not in the nucleus accumbens or the basolateral amygdaloid nucleus (Romero et al., 1998a). Furthermore, no down-regulatory effect was seen in different limbic structures using other agonists (Romero et al., 1999).

Another intriguing finding of the present study is that the marked (greater than threefold) increase in the contents of AEA in the limbic forebrain of rats daily treated with Δ^9 -THC for 8 days was not accompanied by a corresponding increase of 2-AG, although it might be possible that the high variation of 2-AG data might mask small differences between control and Δ^9 -THC-treated rats. Alternatively, it might be argued that AEA and 2-AG are biosynthesized in nervous cells through different mechanisms, depending ultimately on the presence of arachidonic acid at the *sn*-1 and *sn*-2 positions of phospholipids, respectively (Di Marzo et al., 1994, 1998; Stella et al., 1997; Bisogno et al., 1999b; for review, see Di Marzo, 1999). Therefore, different regulatory mechanisms should be expected to control AEA and 2-AG biosynthesis in the brain. In fact, although both endocannabinoids are released from depolarized cortical neurons (Di Marzo et al., 1994; Stella et al., 1997), electrically stimulated hippocampal slices and quinpirole-treated striatum have been shown to selectively release 2-AG and AEA, respectively (Stella et al., 1997; Giuffrida et al., 1999). Therefore, it is possible that limbic structures selectively biosynthesize AEA upon chronic treatment with Δ^9 -THC. This response might be dopamine mediated, as chronic Δ^9 -THC stimulates dopamine release in the nucleus accumbens (Tanda et al., 1997), and dopamine in turn, acting through D₂ receptors, might selectively stimulate AEA formation in this region, as previously proposed for the dorsal striatum (Giuffrida et al., 1999). Our present data suggest that the increase of AEA contents in the limbic forebrain is due to increased AEA formation rather than to decreased AEA degradation. In fact, there was a possible correspondence between the increase in AEA contents and the decrease in the amounts of AEA phospholipid precursor, NArPE, in this region (although the decrease in NArPE contents was not statistically significant). This might indicate that chronic Δ^9 -THC exposure stimulates the formation of

AEA by stimulating the hydrolysis of its precursor, which is catalyzed by phospholipase D (Di Marzo et al., 1994), without modifying the synthesis of this compound, which is catalyzed by an *N*-acyltransferase (Schmid et al., 1996). Some reports in the literature support this hypothesis, although the results have been obtained *in vitro* by using cell cultures. For example, Hunter and Burstein (1997) demonstrated that Δ^9 -THC can stimulate AEA biosynthesis in mouse neuroblastoma cells through a CB₁ receptor-mediated effect and possibly through the activation of phospholipase D (Burstein et al., 1994). On the other hand, it has been also shown that Δ^9 -THC could act as inhibitor of some acyltransferases in guinea pig microsomes (Badiani et al., 1993) and cerebral cortex slices (Reichman et al., 1991). This would be consistent with decreased NArPE contents, but it remains to be demonstrated that Δ^9 -THC also inhibits the *N*-acyltransferase responsible for NArPE formation.

The pathophysiological meaning of the increased AEA formation observed in the limbic forebrain of Δ^9 -THC-tolerant rats deserves some additional comments. In recent reports, Basavarajappa and co-workers (1998, 1999) demonstrated that the prolonged exposure to ethanol leads to both down-regulation of CB₁ receptors in mouse brain membranes and increased AEA and NArPE formation in human neuroblastoma cells. Other studies (Arnone et al., 1997), by using the CB₁-selective antagonist SR141716A, suggested that endogenous cannabinoids may be important for reinforcement processes activated by natural rewards such as food. Hence, it could be speculated that ethanol, Δ^9 -THC, or other drugs of abuse, as well as natural rewards like food, may stimulate AEA formation in the limbic forebrain (which includes various nuclei relevant to the phenomena of drug self-administration and dependence), and this might in turn increase the rewarding effects of these drugs. The participation of the endocannabinoid system in the brain pathways mediating the reinforcement processes might also explain why (1) synthetic and plant-derived cannabinoids, by acting through CB₁ receptors, produce euphoric effects (Gardner and Vorel, 1998) and (2) CB₁ knockout mice exhibit a less severe opiate withdrawal syndrome than wild-type mice (Ledent et al., 1999). Such reinforcing actions might be mediated through the above-mentioned stimulation of dopamine transmission in the mesolimbic neurons (Gardner and Vorel, 1998), although we have reported that AEA does not change dopamine transmission in the limbic forebrain (Romero et al., 1995b).

On the other hand, it is also possible that endocannabinoids, acting through CB₁ receptors in the limbic nuclei, are effective in counteracting, rather than potentiating, part of the symptoms of the drug-seeking behavior (for review, see Manzanares et al., 1999). This would be concordant with the observation that in humans, subjective "high" symptoms decreased over the period of smoking marijuana in both light and heavy smokers (Nowlan and Cohen, 1977). It has been also shown that AEA may be effective in alleviating the intensity of

withdrawal signs in opiate-dependent individuals (Hollister, 1986; Vela et al., 1995; for review, see Manzanares et al., 1999). Accordingly, SR141716A has been reported to elicit withdrawal signs not only in Δ^9 -THC-tolerant animals (Aceto et al., 1995; Tsou et al., 1995) but also in opiate-dependent animals (Navarro et al., 1998), analogous to a classic opioid antagonist such as naloxone (for review, see Manzanares et al., 1999). The ameliorating effect of AEA could be related to a possible anxiolytic action exerted by endocannabinoids as SR141716A has been reported to be anxiogenic (Navarro et al., 1997). Following in the same line of thought, Basavarajappa and Hungund (1999) suggested that the increase in AEA contents in neuroblastoma cells treated with ethanol may be a mechanism for neural adaptation and may serve as a compensatory mechanism to protect neurons from an insult due to the continuous presence of the drug. A neuroprotective role for AEA and NArPE has been suggested following the observation that levels of these lipids are increased after neuronal damage (for review, see Hansen et al., 1998). However, it is very unlikely that the increase of AEA contents observed in the present study was a consequence of Δ^9 -THC-induced neuronal damage, because no comparable increase was seen in the other brain regions studied and no enhancement of NArPE levels was found in the limbic forebrain. In summary, behavioral studies aimed at investigating the rewarding/protecting effects observed after chronic treatment with cannabinoids need to be performed to understand the possible pathophysiological role played by the increased endocannabinoid contents observed here in the limbic forebrain of Δ^9 -THC-tolerant rats.

Changes observed in other brain regions of Δ^9 -THC-tolerant rats

In the other brain regions examined in the present study, CB₁ receptor binding and WIN-55,212-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding decreased after 8 days of daily Δ^9 -THC exposure, but these changes did not correlate with statistically significant changes in the contents of AEA or 2-AG, thus indicating that the effects of chronic Δ^9 -THC exposure are region dependent. A nonstatistically significant trend toward a decrease in endocannabinoid contents was observed only in the brainstem, a brain region intriguingly rich in endocannabinoids but not in cannabinoid binding sites (Bisogno et al., 1999a).

Concluding remarks

In conclusion, the present study has shown for the first time that prolonged activation of cannabinoid receptors leads to different changes in endocannabinoid contents depending on the brain region. A high increase in AEA contents was observed in the limbic forebrain, whereas decreased endocannabinoid levels were found in the striatum. The pathophysiological implications of these results have been discussed in view of the proposed roles of endocannabinoids in the control of motor behavior and emotional states.

Acknowledgment: This work has been supported by grants from MURST (3933 to V.D.M.), "Plan Nacional sobre Drogas" (to J.A.R.), and CAM-PRI (08.5/0029/98 to J.J.F.-R.). The authors are indebted to the NIDA and Sanofi Recherche for the gifts of Δ^9 -THC and SR141716A, respectively, and to Gerolmina Ambrosino and Ana Jurado for their technical assistance.

REFERENCES

- Abood M. E., Sauss C., Fan F., Tilton C. L., and Martin B. R. (1993) Development of behavioral tolerance to δ^9 -tetrahydrocannabinol without alteration of cannabinoid receptor binding or mRNA levels in whole brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **46**, 575–579.
- Aceto M. D., Scates S. M., Lowe J. A., and Martin B. R. (1995) Cannabinoid precipitated withdrawal by the selective cannabinoid receptor antagonist, SR141716A. *Eur. J. Pharmacol.* **282**, R1–R2.
- Arnone M., Maruani J., Chaperon F., Thiébot M. H., Poncelet M., Soubrié P., and Le Fur G. (1997) Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* **132**, 104–106.
- Badiani K., Lu X., and Arthur G. (1993) Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and merthiolate on acyltransferase activities in guinea pig liver microsomes. *Lipids* **28**, 299–303.
- Basavarajappa B. S. and Hungund B. L. (1999) Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor *N*-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells. *J. Neurochem.* **72**, 522–528.
- Basavarajappa B. S., Cooper T. B., and Hungund B. L. (1998) Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. *Brain Res.* **793**, 212–218.
- Bisogno T., Sepe N., Melck D., Maurelli S., De Petrocellis L., and Di Marzo V. (1997) Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. J.* **322**, 671–677.
- Bisogno T., Berrendero F., Ambrosino G., Cebeira M., Ramos J. A., Fernández-Ruiz J. J., and Di Marzo V. (1999a) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 377–380.
- Bisogno T., Melck D., De Petrocellis L., and Di Marzo V. (1999b) Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin. *J. Neurochem.* **72**, 2113–2119.
- Breivogel C. S., Sim L. J., and Childers S. R. (1997) Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**, 1632–1642.
- Burstein S., Budrow J., Debatis H., Hunter S. A., and Subramanian A. (1994) Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1253–1264.
- Corchero J., Romero J., Berrendero F., Fernández-Ruiz J. J., Ramos J. A., Fuentes J. A., and Manzanares J. (1999) Time-dependent differences of repeated administration with Δ^9 -tetrahydrocannabinol in proenkephalin and cannabinoid receptor gene expression and G-protein activation by μ -opioid and CB₁-cannabinoid receptors in the caudate-putamen. *Mol. Brain Res.* **67**, 148–157.
- De Petrocellis L., Melck D., Bisogno T., Milone A., and Di Marzo V. (1999) Finding of endocannabinoid signalling system in *Hydra*, a very primitive organism: possible role in the feeding response. *Neuroscience* **92**, 377–387.
- Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., and 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. *Pharmacol. Rev.* **38**, 151–178.
- Di Marzo V. (1999) Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci.* **65**, 645–655.
- Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J. C., and Piomelli D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**, 686–691.
- Di Marzo V., De Petrocellis L., Sugiura T., and Waku K. (1996) Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoylglycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 281–288.
- Di Marzo V., Melck D., Bisogno T., and De Petrocellis L. (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* **21**, 521–528.
- Di Marzo V., Hill M. P., Bisogno T., Crossman A. R., and Brotchie J. M. (2000) 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 J.* (in press).
- 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., and Becker G. W. (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* **393**, 231–235.
- Fontana A., Di Marzo V., Cadas H., and Piomelli D. (1995) Analysis of anandamide, an endogenous cannabinoid substance, and other natural *N*-acylethanolamines. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **53**, 301–308.
- Gardner E. L. and Vorel S. R. (1998) Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol. Dis.* **5**, 502–533.
- Giuffrida A., Parsons L. H., Kerr T. M., Rodríguez de Fonseca F., Navarro M., and Piomelli D. (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signalling in dorsal striatum. *Nat. Neurosci.* **2**, 358–363.
- Glass M., Brotchie J., and Maneuf Y. P. (1997) Modulation of neurotransmitters by cannabinoids in the basal ganglia. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 199–203.
- Gorriti M. A., Rodríguez de Fonseca F., Navarro M., and Palomo T. (1999) Chronic (–) Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **365**, 133–142.
- Hansen H. S., Lautitzen L., Moesgaard B., Strand A. M., and Hansen H. H. (1998) Formation of *N*-acylphosphatidylethanolamines and *N*-acylethanolamines. Proposed role in neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 719–725.
- Hollister L. E. (1986) Health aspects of cannabis. *Pharmacol. Rev.* **38**, 1–20.
- Houston D. B., Evans D. M., Howlett A. C., and Melvin I. S. (1991) [³H]-CP-55,940 binding to the cannabinoid receptor. *Du Pont Biotech. Update* **6**, 21–27.
- Hunter S. A. and Burstein S. H. (1997) Receptor mediation in cannabinoid-stimulated arachidonic acid mobilization and anandamide synthesis. *Life Sci.* **60**, 1563–1573.
- Koga D., Santa T., Fukushima T., Homma H., and Imai K. (1997) Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues. *J. Chromatogr.* **690**, 7–13.
- Kondo S., Kondo H., Nakane S., Kodaka T., Tokumura A., Waku K., and Sugiura T. (1998) 2-Arachidonoyl-glycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, an evidence for its generation through Ca⁺⁺-dependent and independent mechanisms. *FEBS Lett.* **429**, 156–165.
- Ledent C., Valverde O., Cossu G., Petitet F., Aubert J. F., Beslot F., Böhme G. A., Imperato A., Pedrazzini T., Roques B., Vassart G., Fratta W., and Parmentier M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**, 401–404.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Manzanares J., Corchero J., Romero J., Fernández-Ruiz J. J., Ramos J. A., and Fuentes J. A. (1999) Pharmacological and biochemical

- interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 287–294.
- Navarro M., Hernández E., Muñoz R. M., del Arco I., Villanua M. A., Carrera M. R., and Rodríguez de Fonseca F. (1997) Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* **8**, 491–496.
- Navarro M., Chowen J., Rocio A., Carrera M., del Arco I., Villanua M. A., Martín Y., Roberts A. J., Koob G. F., and Rodríguez de Fonseca F. (1998) CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport* **9**, 3397–3402.
- Nowlan R. and Cohen S. (1977) Tolerance to marijuana: heart rats and subjective “high.” *Clin. Pharmacol. Ther.* **22**, 550–556.
- Oviedo A., Glowa J., and Herkenham M. (1993) Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* **616**, 293–302.
- Pertwee R. G. (1991) Tolerance and dependence on psychotropic cannabinoids, in *The Biological Bases of Drug Tolerance and Dependence* (Pratt J., ed), pp. 119–164. Academic Press, San Diego.
- Pertwee R. G. (1995) Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors, in *Cannabinoid Receptors* (Pertwee R. G., ed), pp. 1–34. Academic Press, San Diego.
- Reichman M., Nen W., and Hokin L. E. (1991) Δ^9 -THC inhibits arachidonic acid acylation of phospholipids and triacylglycerols in guinea pig cerebral cortex slices. *Mol. Pharmacol.* **40**, 547–555.
- Rodríguez de Fonseca F., Gorriti M. A., Fernández-Ruiz J. J., Palomo T., and Ramos J. A. (1994) Down-regulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **47**, 33–40.
- Romero J., García L., Fernández-Ruiz J. J., Cebeira M., and Ramos J. A. (1995a) Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, or to Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **51**, 731–737.
- Romero J., García L., Cebeira M., Zdrozny D., Fernández-Ruiz J. J., and Ramos J. A. (1995b) The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci.* **56**, 2033–2040.
- Romero J., de Miguel R., García-Palomero E., Fernández-Ruiz, J. J., and Ramos J. A. (1995c) Time-course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand, on extrapyramidal function. *Brain Res.* **694**, 223–232.
- Romero J., García-Palomero E., Castro J. G., García-Gil L., Ramos J. A., and Fernández-Ruiz J. J. (1997) Effects of chronic exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Mol. Brain Res.* **46**, 100–108.
- Romero J., Berrendero F., Manzanares J., Pérez A., Corchero J., Fuentes J. A., Fernández-Ruiz J. J., and Ramos J. A. (1998a) Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Synapse* **30**, 298–308.
- Romero J., Berrendero F., García-Gil L., Ramos J. A., and Fernández-Ruiz J. J. (1998b) Cannabinoid receptor and WIN-55,212-2-stimulated [35 S]GTP γ S binding and cannabinoid receptor mRNA levels in the basal ganglia and the cerebellum of adult male rats chronically exposed to Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J. Mol. Neurosci.* **11**, 109–119.
- Romero J., de Miguel R., Ramos J. A., and Fernández-Ruiz J. J. (1998c) The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci.* **62**, 351–363.
- Romero J., Berrendero F., García-Gil L., Lin S. Y., Makriyannis A., Ramos J. A., and Fernández-Ruiz J. J. (1999) Cannabinoid receptor and WIN-55,212-2-stimulated [35 S]GTP γ S binding and cannabinoid receptor mRNA levels in several brain structures of adult male rats chronically exposed to *R*-methanandamide. *Neurochem. Int.* **34**, 473–482.
- Rubino T., Massi P., Patrini G., Venier I., Giagnoni G., and Parolaro D. (1994) Chronic CP-55,940 alters cannabinoid receptor-mRNA in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroreport* **5**, 2493–2496.
- Schmid P. C., Krebsbach R. J., Perry S. R., Dettmer T. M., Maasson J. L., and Schmid H. H. O. (1995) Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain *N*-acyl ethanolamines in mammalian brain. *FEBS Lett.* **375**, 117–120.
- Schmid H. H. O., Schmid P. C., and Natarajan V. (1996) The *N*-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signalling. *Chem. Phys. Lipids* **80**, 133–142.
- Sim L. J., Hampson R. E., Deadwyler S. A., and Childers S. R. (1996) Effects of chronic treatment with Δ^9 -tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35 S]GTP γ S autoradiography in rat brain. *J. Neurosci.* **16**, 8057–8066.
- Stella N., Schweitzer P., and Piomelli D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773–778.
- Tanda G., Pontieri F. E., and Di Chiara G. (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common μ_1 opioid receptor mechanism. *Science* **276**, 2048–2050.
- Traynor J. R. and Nahorski S. R. (1995) Modulation of μ -opioid agonists of guanosine-5'-*O*-(3-[35 S]thio)triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Pharmacol.* **47**, 848–854.
- Tsou K., Patrick S. L., and Walker J. M. (1995) Physical withdrawal in rats tolerant to Δ^9 -tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **280**, R13–R15.
- Vela G., Ruiz-Gayo M., and Fuentes J. A. (1995) Anandamide decreases naloxone-precipitated withdrawal signs in mice chronically treated with morphine. *Neuropharmacology* **34**, 665–668.
- Westlake T. M., Howlett A. C., Ali S. F., Paule M. G., Scallet A. C., and Slikker W. Jr. (1991) Chronic exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol fails to irreversibly alter brain cannabinoid receptor. *Brain Res.* **544**, 145–149.
- Zhuang S., Kittler J., Grigorenko F. V., Kirby M. T., Sim L. J., Hampson R. E., Childers S. R., and Deadwyler S. A. (1998) Effects of long-term exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Mol. Brain Res.* **62**, 141–149.



Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB₁ receptor binding and mRNA levels

Sara González^a, Javier Fernández-Ruiz^{a,1*}, Valentina Sparglione^b, Daniela Parolaro^b, José A. Ramos^a

^a *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 2804 Madrid, Spain*

^b *Department of Structural and Functional Biology, Pharmacology Section, University of Insubria, via Vanvitelli 32, 20129 Milan, Italy*

Received 16 March 2001; accepted 14 August 2001

Abstract

Recent evidence suggest that the endocannabinoid system might be a component of the brain reward system and, then, play a role, not only in cannabinoid tolerance/dependence, but also in dependence/withdrawal to other drugs of abuse. However, there are not many studies that compare the changes in endocannabinoid ligands and/or receptors in brain regions (particularly in those areas related to reinforcement processes) during dependence to opiates, cocaine or alcohol. The present study addressed this objective, by examining the changes in CB₁ receptor binding (measured by [³H]-CP55,940 autoradiography) and its mRNA levels (measured by in situ hybridization) in different brain regions of animals chronically exposed to morphine, cocaine or ethanol. The results showed that these three drugs produced different changes in CB₁ receptor binding and mRNA levels, a finding that precludes the existence of a common alteration of the endocannabinoid system during dependence states to these habit-forming drugs. Thus, chronic ethanol exposure was usually ineffective in altering both CB₁ receptor binding and mRNA levels in all regions examined. In contrast, chronic cocaine exposure produced significant changes only at the level of CB₁ receptor mRNA, with decreases of the transcript levels in the ventromedial hypothalamic nucleus and the superficial and deep layers of the cerebral cortex, but no changes in the hippocampal, motor and limbic structures. Finally, chronic morphine exposure increased the density of CB₁ receptors in the medial caudate-putamen, but decreased their mRNA levels in this region and also in the lateral caudate-putamen and the cerebellum. In limbic structures, chronic morphine exposure increased both binding and mRNA levels for CB₁ receptors in the septum nuclei. Binding was also increased in the nucleus accumbens, but reduced in the basolateral amygdala. In hippocampal structures, chronic morphine exposure reduced CB₁ receptor binding in the dentate gyrus, although mRNA levels were unaffected in this region, but increased in the CA2 subfield of the Ammon's horn. The results indicate that mechanisms of dependence for alcohol, cocaine and morphine are different in terms of their impact on the endocannabinoid system. Alcohol did not produce any effects on CB₁ receptor binding and mRNA levels, whereas cocaine only affected transcript levels in selected regions and morphine produced divergent and region-dependent effects. © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cannabinoids; CB₁ receptors; Chronic drug exposure; Cocaine; Morphine; Alcohol

1. Introduction

In addition to the well-known roles played by the endocannabinoid signalling system in the control of

motor behavior, nociception, memory and learning, and brain development, recent evidence suggests that this system might also play a role in reward mechanisms (Arnone et al., 1997; Ledent et al., 1999; Manzanares et al., 1999; Mascia et al., 1999; Hungund and Basavarajappa, 2000a). This assumption might explain, (i) why the chronic consumption of plant-derived cannabinoids produce behavioral and molecular changes that might be equivalent to the states of tolerance/de-

* Corresponding author. Tel.: +34-91-3941450; fax: +34-91-3941691.

E-mail address: jjfr@med.ucm.es (J. Fernández-Ruiz).

¹ <http://www.ucm.es/info/bioqcan>

pendence/withdrawal to other drugs of abuse (for a recent review, see Gardner and Vorel, 1998), despite their difficulties to maintain patterns of self-administration in experimental animals (Martellota et al., 1998; Tanda et al., 2000); (ii) why cannabinoid pretreatment may increase the vulnerability to other drugs of abuse (Lukas et al., 1994; Manzanares et al., 1999; Gallate et al., 1999); and (iii) why compounds that increase or decrease the endocannabinoid transmission may be effective in attenuating drug seeking behavior or other signs of dependence/withdrawal to morphine (Vela et al., 1995; Chaperon et al., 1998; Ledent et al., 1999; for a recent review, see Manzanares et al., 1999), cocaine (Fattore et al., 1999; Arnold et al., 1998) or alcohol (Arnone et al., 1997; Colombo et al., 1998). Several studies have also found that the chronic exposure to these three powerful habit-forming drugs was accompanied by changes in CB₁ receptors in several brain regions, directly or indirectly related to drug reinforcement. However, the results of these studies are controversial. For examples, studies with opiates have shown both an increase (Rubino et al., 1997) and no changes (Romero et al., 1998; Sim-Selley et al., 2000), whereas studies on cocaine and alcohol are either scarce or limited to an analysis of the whole brain (see Hungund and Basavarajappa, 2000a).

The present study aimed to explore the similarities and dissimilarities in changes that chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol produces in CB₁ receptor binding and mRNA levels in several regions of the rat brain. To this end, we chose well-established procedures for chronically exposing animals to these three drugs of abuse (Fumental et al., 2000; Uzbay et al., 2000; Giorgetti and Zhdanova, 2000), that together with tobacco, are among the more highly consumed drugs and are commonly associated with the use of marijuana. CB₁ receptor binding was analyzed by [³H]CP-55,940 autoradiography, and CB₁ receptor mRNA levels were measured by in situ hybridization.

2. Methods

2.1. Animals, treatments and sampling

Male Wistar rats were housed in a room with controlled photoperiod (08:00–20:00 light) and temperature (23 ± 1 °C). The rats had free access to standard food and water and were used at adult age (3 month old; 250–300 g weight) for three different experiments, of which were conducted according to European rules. In the experiment I, rats were injected i.p., twice daily (at 8:00 and 20:00 h), with increasing doses of morphine sulfate (kindly provided by the ‘Servicio de Restricción de Estupefacientes, Ministerio de Sanidad’, Madrid, Spain) or vehicle (saline) over a period of 6 days, based

on the procedure of Fumental et al. (2000). The treatment schedule was: day 1: 10 and 10 mg/kg weight; day 2: 20 and 20 mg/kg; day 3: 40 and 40 mg/kg; day 4: 60 and 60 mg/kg; day 5: 80 and 80 mg/kg; and day 6: 100 mg/kg. The animals were sacrificed 2 h after the last injection, and their brains were quickly and carefully removed and rapidly frozen by immersion in 2-methylbutane in dry ice. All samples were stored at –80 °C until processed for analysis of CB₁ receptor binding and mRNA levels. In the experiment II, rats were i.p. injected, twice daily (8:00 and 20:00 h), with a dose of 15 mg/kg weight of cocaine (kindly provided by the ‘Servicio de Restricción de Estupefacientes, Agencia Española del Medicamento, Ministerio de Sanidad’, Madrid, Spain) or vehicle (saline) over a period of 10 days, according to the procedure described by Giorgetti and Zhdanova (2000). Two hours after the last injection, rats were sacrificed and their brains collected as described for the experiment above. In the experiment III, rats were housed individually and allowed to drink ethanol (7.2% v/v) in the liquid diet for a period of 15 days, according to Uzbay et al. (2000). The liquid diet was prepared daily and presented at the same time of the day (10:00 h). Controls animals were allowed to drink water only. The weight of the rats was recorded every day, and daily liquid intake was measured and expressed as ml/kg weight/day (see Fig. 1). On day 15, animals were sacrificed and their brains collected as described for Experiment I.

2.2. Autoradiographic techniques

2.2.1. Brain slicing

Coronal sections 20 µm-thick were cut in a cryostat, according to the Paxinos and Watson 1986. Sections

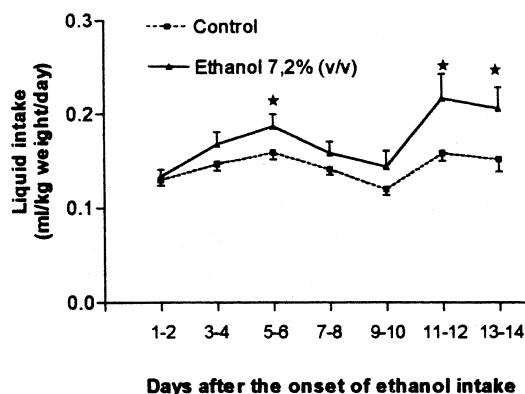


Fig. 1. Pattern of liquid intake of rats forced to drink of a unique bottle containing only water (control rats) or water with 7.2% ethanol (ethanol-exposed rats) during 2 weeks (see details in the text). Data are expressed as means ± S.E.M. of values grouped in intervals of 2 days. Statistical analysis was performed with using two-way analysis of variance (days × alcohol exposure) followed by the Student–Newman–Keuls test (**P* < 0.05, ***P* < 0.005).

were thaw-mounted onto RNase-free gelatin/chrome alum coated slides and dried briefly at 30 °C and stored at –80 °C until used. For the identification of the different brain nuclei, the sections adjacent to those used for autoradiographic analysis were stained with cresyl-violet and analyzed according to the Paxinos and Watson, 1986.

2.2.2. Autoradiography of cannabinoid receptor binding

The protocol used is basically the method described by Herkenham et al. (1991). Briefly, slide-mounted brain sections were incubated for 2.5 h, at 37 °C, in a buffer containing 50 mM TRIS with 5% bovine serum albumin (fatty acid-free), pH 7.4, and 10 nM [³H]-CP-55,940 (Du Pont NEN) prepared in the same buffer, in the absence or the presence of 10 μM non-labelled CP-55,940 (kindly supplied by Pfizer) with the aim of determining total and non-specific binding, respectively. After incubation, the slides were washed in 50 mM TRIS buffer with 1% bovine serum albumin (fatty acid-free), pH 7.4, for 4 h (2 × 2 h) at 0 °C, dipped in ice-cold distilled water and then dried under a stream of cool dried air. Autoradiograms were generated by apposing the labelled tissues, together with autoradiographic standards ([³H] micro-scales, Amersham), to tritium-sensitive film ([³H]-Hyperfilm, Amersham) for a period of 1 week, and developed (D-19, Kodak) for 4 min at 20 °C. Developed films were analyzed and quantitated in a computer-assisted videodensitometer using the standard curve generated from [³H]-standards.

2.2.3. Analysis of mRNA levels for CB₁ receptor by *in situ* hybridization

The analysis of CB₁ receptor mRNA levels was carried out according to Rubino et al. (1997). Briefly, sections were fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min and, after rinsing twice in phosphate buffer saline, were acetylated by incubation in 0.25% acetic anhydride, prepared in 0.1 M triethanolamine/0.15 M sodium chloride (pH 8.0), for 10 min. Sections were rinsed in 0.3 M sodium chloride/0.03 M sodium citrate, pH 7.0, dehydrated and delipidated by ethanol/chloroform series. A mixture (1:1:1) of the three 48-mer oligonucleotide probes complementary to bases 4–51, 349–396 and 952–999 of the rat CB₁ receptor cDNA (Du Pont; the specificity of the probes used was assessed by Northern Blot analysis) was 3'-end labelled with [³⁵S]-dATP using terminal deoxynucleotidyl-transferase. Sections were, then, hybridized with [³⁵S]-labelled oligonucleotide probes (7.5 × 10⁵ dpm per section), washed and exposed to X-ray film (βmax, Amersham) for 1 week, and developed (D-19, Kodak) for 6 min at 20 °C. The intensity of the hybridization signal was assessed by

measuring the grey levels in the autoradiographic films with a computer-assisted videodensitometer. Adjacent brain sections were co-hybridized with a 100-fold excess of cold probe or with RNase to assert the specificity of the signal (data not shown).

2.3. Statistics

Data on liquid intake in ethanol experiment were assessed by two-way analysis of variance (time × ethanol) followed by Student–Newman–Keuls test. The remaining data were assessed by *t*-tests. Although the statistical analyses were always performed with raw data, for presentation purpose the data were transformed to percentages in relation to vehicle-treated groups.

3. Results

3.1. CB₁ receptor binding and mRNA levels in different brain regions of control rats

In the three experiments in this study, control values (vehicle-treated rats) for CB₁ receptor binding and mRNA levels were generally similar to those reported previously in naive rats (Herkenham et al., 1991; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Romero et al., 1998). Thus, for binding, some regions showed high levels (> 100 fmol/mg tissue), ranging from the substantia nigra (206.3 ± 10.3), cerebellum (175.5 ± 7.0), globus pallidus (159.7 ± 3.4), Ammon's horn (CA1: 140.3 ± 4.2; CA2: 143.7 ± 4.3; CA3: 127.8 ± 3.6), dentate gyrus (140.2 ± 3.9), and entopeduncular nucleus (112.9 ± 9.8). Other regions showed moderate to low levels (< 100 fmol/mg tissue), ranging from the caudate-putamen (lateral part: 94.3 ± 2.8; medial part: 86.9 ± 2.2), limbic structures (septum nuclei: 93.4 ± 4.7; nucleus accumbens: 78.8 ± 7.4; basolateral amygdala: 72.5 ± 4.6), and cerebral cortex (superficial layer: 92.3 ± 5.4; deep layer: 79.2 ± 4.6). Also as previously reported (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992), some regions exhibited high levels of CB₁ receptor gene transcripts (> 0.3 U of optical density), ranging from the cerebellum (0.75 ± 0.02), lateral caudate-putamen (0.50 ± 0.05), dentate gyrus (0.41 ± 0.04), Ammon's horn (CA2: 0.35 ± 0.03; CA3: 0.35 ± 0.03), ventromedial hypothalamic nucleus (0.31 ± 0.04), and medial caudate-putamen (0.30 ± 0.03). Moderate to low levels (< 0.3 U of optical density) were found in the basolateral amygdala (0.28 ± 0.03), septum nuclei (0.27 ± 0.03), CA1 subfield of the Ammon's horn (0.27 ± 0.02), and the cerebral cortex (deep layer: 0.22 ± 0.03; superficial layer: 0.22 ± 0.02).

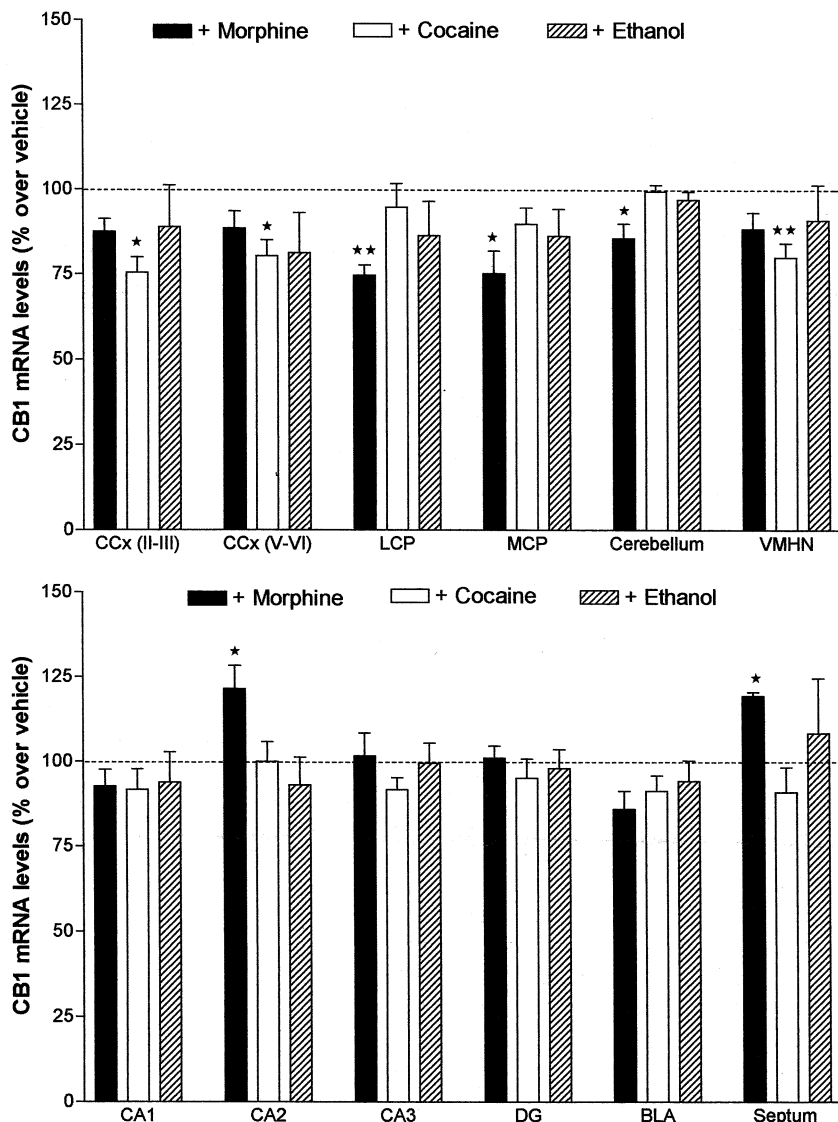


Fig. 2. CB₁ receptor mRNA levels in brain regions of rats chronically exposed to morphine, cocaine or ethanol (see details on treatments in the text). Data are expressed as means \pm S.E.M. of values for each drug transformed to percentage of the mean of the corresponding vehicle-treated group (see data of vehicle groups in the Results section). Statistical analysis was performed with raw data using the Student's *t*-test (**P* < 0.05, ***P* < 0.005).

3.2. CB₁ receptor binding and mRNA levels in rats chronically exposed to morphine, cocaine or ethanol

As mentioned above, there were not relevant differences in CB₁ receptor binding and mRNA levels for vehicle-treated groups in the three experiments for this study. Binding and mRNA levels in animals exposed to morphine, cocaine or ethanol were compared with the corresponding vehicle-treated group. In addition, the statistical analyses were performed on raw data, but for presentation purposes the data were transformed to percentages in relation to vehicle-treated groups.

In the Experiment I, we explored the effects of the chronic morphine exposure, using a well-established method for inducing morphine dependence with pro-

gressively-increased doses of this opiate (Fumentalba et al., 2000). Chronic morphine exposure increased the density of CB₁ receptors in the medial caudate-putamen, but decreased their mRNA levels in this region and also in the lateral caudate-putamen and the cerebellum (Fig. 2). In limbic structures, chronic exposure to morphine increased both binding and mRNA levels for CB₁ receptors in the septum nuclei, whereas binding was increased in the nucleus accumbens, but reduced in the basolateral amygdala (Fig. 3). In hippocampal structures, CB₁ receptor binding in the dentate gyrus was reduced by chronic morphine exposure although mRNA levels were unaffected in this region, but increased in the CA2 subfield of the Ammon's horn (Fig. 3).

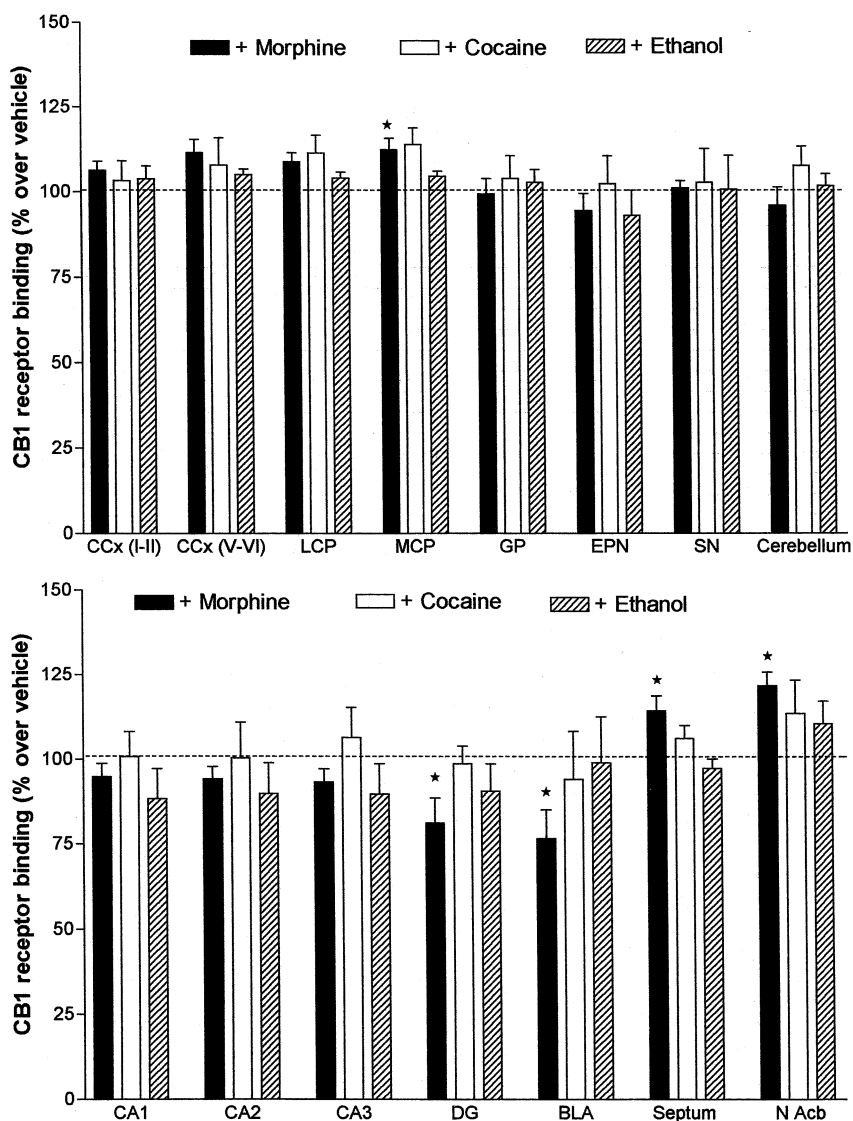


Fig. 3. CB₁ receptor binding in brain regions of rats chronically exposed to morphine, cocaine or ethanol (see details on treatments in the text). Data are expressed as means \pm S.E.M. of values for each drug transformed to percentage of the mean of the corresponding vehicle-treated group (see data of vehicle groups in the Results section). Statistical analysis was performed with raw data using the Student's *t*-test (**P* < 0.05).

In the Experiment II, exposure to cocaine produced some significant changes but only at the level of CB₁ receptor mRNA, with decreases of the transcript levels in the ventromedial hypothalamic nucleus and the superficial and deep layers of the cerebral cortex, but no changes in the hippocampal, motor and limbic structures (see Figs. 2 and 3).

In the Experiment III, we used a paradigm of chronic alcohol exposure by means of a liquid diet. Liquid fluid intake was recorded to ensure that animals were adequately exposed to ethanol. The pattern followed by these animals was concordant with previous reports (Uzbay et al., 2000), and, even, animals given ethanol had higher liquid intake during the second phase of ethanol exposure (Fig. 1). However, despite the animals were significantly exposed to ethanol, there was no

changes in CB₁ receptor binding and mRNA levels in all regions examined (see Figs. 2 and 3).

4. Discussion

According to previous studies (see the Introduction for key references), the prolonged consumption of habit-forming drugs, might produce similar effects on endocannabinoid transmission (at least in those regions directly or indirectly related to reinforcement processes) despite the differences in the molecular process activated by each of these drugs. To test this hypothesis, we evaluated the effects of prolonged exposure to morphine, cocaine or alcohol on the status of CB₁ receptors in different brain regions. However in contrast to ex-

pectation the mRNA levels or binding capacity for these receptors were not affected in a similar manner by these three habit-forming drugs. This means that mechanisms of dependence of these drugs, at least in terms of their impact on the endocannabinoid receptors, are significantly different.

With regards to chronic morphine exposure, the present data indicates that this opiate produces region-dependent effects on CB₁ receptor binding and mRNA levels. This is not surprising given the fact that previous studies into the effects of chronic morphine on CB₁ receptors also proved the existence of these regional differences (Rubino et al., 1997; Romero et al., 1998; Sim-Selley et al., 2000). In our study, the most affected regions were the basal ganglia and limbic and hippocampal structures. It is worth mentioning the fact that these alterations were not confined to those regions involved in rewarding processes. Thus, we observed a decrease in CB₁ receptor-mRNA levels in motor regions, such as the caudate-putamen and the cerebellum, although this was accompanied by no changes in binding in the case of the cerebellum, or by an increase in the case of the medial caudate-putamen. In limbic structures, chronic morphine exposure increased both binding capacity and mRNA levels in the septum nuclei, whereas binding was increased in the nucleus accumbens, and reduced in the basolateral amygdala. In hippocampal structures, chronic morphine exposure reduced CB₁ receptor binding in the dentate gyrus, whereas mRNA levels were unaffected in this region, but increased in the CA2 subfield of the Ammon's horn. These data disagree with previous studies (Rubino et al., 1997; Romero et al., 1998; Sim-Selley et al., 2000), some of which were carried out in our laboratories, these earlier studies suggested that chronic morphine does not affect CB₁ receptors (Romero et al., 1998; Sim-Selley et al., 2000), or produces an increase in the caudate-putamen only (Rubino et al., 1997). Although differences in species, strains and methods to induce morphine dependence might account for these differences, it seems likely that the effects of opioids on endocannabinoid system might be difficult to evaluate, because of the existence of several region-dependent links in the mechanisms of action of both compounds (for a recent review, see Manzanares et al., 1999). Pharmacological experiments have led to similar controversial results. For example, whereas some authors report that administration of SR141716, (a specific CB₁ receptor antagonist) to morphine-dependent rats produced withdrawal responses similar to those elicited with naloxone (Navarro et al., 1998), others studies suggest that the blockade of CB₁ receptors might be useful in the treatment of morphine dependence (Ledent et al., 1999; Mascia et al., 1999; Rubino et al., 2000). Thus, the absence of CB₁ receptors in a recently developed strain of knockout mice, (which may be

equivalent to the pharmacological blockade with SR141716), led to a reduction in the rewarding properties of morphine (Ledent et al., 1999). This observation corresponded to a lack of stimulation by this opiate of limbic dopamine release, a fact that occurs in wild-type mice (Mascia et al., 1999). This would be concordant with the recent demonstration that long-term treatment with SR141716 reduced the intensity of naloxone-induced withdrawal in morphine-dependent rats (Rubino et al., 2000), but in contradiction to Navarro et al. (1998) and other data that suggests a beneficial effects of CB₁ receptor agonists rather than antagonists in the treatment of morphine dependence (Vela et al., 1995). Further studies will be, hence, necessary to clarify these controversial aspects.

Concerning the analysis of CB₁ receptors in cocaine-exposed rats, our data indicated that cocaine produces significant changes at the level of CB₁ receptor mRNA. For example, cocaine produced decreases in the transcript levels in the ventromedial hypothalamic nucleus and the superficial and deep layers of the cerebral cortex, but no changes in the hippocampal, motor and limbic structures. The fact that changes were seen only at the level of mRNA transcripts might indicate that cocaine addiction does not affect the basal activity of endocannabinoid transmission in the affected regions, but merely affects its capability to respond to a variety of stimuli requiring CB₁ receptor synthesis. It also appears that cocaine exposure might interfere with mechanisms involved in mRNA stability. On the other hand, since this is the first study that has addressed the analysis of endocannabinoid transmission in cocaine-exposed rats, we cannot compare our findings with previous results. Nonetheless there are, some pharmacological studies which have demonstrated that cannabinoid receptor agonists were able to reduce cocaine self-administration (Fattore et al., 1999) or the behavioral sensitization to cocaine (Arnold et al., 1998). In contrast, other studies reported that CB₁ receptor antagonists block cocaine place-preference in rats (Chaparron et al., 1998), whereas other authors (Tanda et al., 2000) found that SR141716 was unable to reduce or intensify cocaine self-administration in monkeys. Again, methodological differences might account for these controversial observations.

Some previous studies related alcohol consumption and endocannabinoid system (for review, see Hungund and Basavarajappa, 2000a). For example, changes in density and/or affinity for CB₁ receptors have been demonstrated in brain membranes from two different mouse strains that differ significantly in their preference for alcohol (Hungund and Basavarajappa, 2000b). However, the effects of chronic ethanol exposure on the status of CB₁ receptors have rarely been tested-except two studies from the same group (see Hungund and Basavarajappa, 2000a, for review). Nevertheless, al-

though these authors reported a decrease in binding and desensitization of cannabinoid-activated signal transduction mechanisms in brain membranes from mice chronically exposed to ethanol, they examined the whole brain with not specific regions. Our present data in rats chronically exposed to ethanol indicates, a complete lack of changes in both mRNA levels and binding capacity for all brain regions examined. It is possible that the effects of alcohol on endocannabinoid transmission might be related more to changes in endocannabinoid ligands rather than in the status of CB₁ receptors. We are, therefore, presently examining the potential changes in endocannabinoid contents in different regions of rats chronically exposed to ethanol using the same paradigm as used here for the analysis of receptors. Other authors, using cultures of cerebellar granule neurons or neuroblastoma cell lines, have recently reported that chronic ethanol exposure stimulates the production of endocannabinoids (Basavarajappa and Hungund, 1999; Basavarajappa et al., 2000). This is consistent with a possible enhancement of endocannabinoid tone during alcohol dependence. This would be concordant with the observation that CB₁ receptor blockade with SR141716 reduced ethanol intake in genetically-determined alcohol preferring rats (Colombo et al., 1998), whereas cannabinoid receptor agonists produced an increase (McMillan and Snodgrass, 1991). It also supports the claim that the pharmacological treatment of the endocannabinoid system might be effective in the treatment of alcoholism.

In summary, the present results indicate that mechanisms of dependence for alcohol, cocaine and morphine are different in terms of their impact on the endocannabinoid system. Alcohol did not produce any effects on CB₁ receptor binding and mRNA levels, whereas cocaine only affected transcript levels in selected regions and morphine produced divergent and region-dependent effects. Results have been discussed at the light of the suggested pharmacological managements of the endocannabinoid system to reduce or increase the severity of dependence/withdrawal to these three drugs.

Acknowledgements

This work has been supported by grants from CICYT (PM99-0056) and 'Plan Nacional sobre Drogas' (Madrid, Spain). The authors are indebted to the 'Servicio de Restricción de Estupefacientes, Agencia Española del Medicamento, Ministerio de Sanidad' (Madrid, Spain) for kindly providing morphine and cocaine. Sara González is a predoctoral fellow supported by the 'Plan Nacional sobre Drogas'.

References

- Arnold, J.C., Topples, A.N., Hunt, G.E., McGregor, I.S., 1998. Effects of pre-exposure and co-administration of the cannabinoid receptor agonist CP55,940 on behavioral sensitization to cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* 354, 9–16.
- Arnone, M., Maruani, J., Chaperon, F., Thiébot, M.H., Poncelor, M., Soubrié, P., Le Fur, G., 1997. Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR141716, an antagonist of central cannabinoid (CB₁) receptors. *Psycho. Pharmacol.* 132, 104–106.
- Basavarajappa, B.S., Hungund, B.L., 1999. Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor *N*-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells. *J. Neurochem.* 72, 522–528.
- Basavarajappa, B.S., Saito, M., Cooper, T.B., Hungund, B.L., 2000. Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonoylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1535, 78–86.
- Chaperon, F., Soubrié, P., Puech, A.J., Thiébot, M.H., 1998. Involvement of central cannabinoid (CB₁) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology* 135, 324–332.
- Colombo, G., Agabio, R., Fa, M., Guano, L., Lobina, C., Loche, A., Reali, R., Gessa, G.L., 1998. Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol preferring SP by the cannabinoid antagonist SR141716. *Alcohol* 33, 126–130.
- Fattore, L., Martellota, M.C., Cossu, G., Mascia, M.S., Fratta, W., 1999. CB₁ cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Behav. Brain Res.* 104, 141–148.
- Fuentealba, J.A., Forray, M.I., Gysling, K., 2000. Chronic morphine treatment and withdrawal increase extracellular levels of norepinephrine in the rat bed nucleus of stria terminalis. *J. Neurochem.* 75, 741–748.
- Gallate, J.E., Saharov, T., Mallet, P.E., McGregor, I.S., 1999. Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB₁ receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 370, 233–240.
- Gardner, E.L., Vorel, S.R., 1998. Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol. Dis.* 5, 502–533.
- Giorgetti, M., Zhdanova, I.V., 2000. Chronic cocaine treatment induces dysregulation in the circadian pattern of rats' feeding behavior. *Brain Res.* 877, 170–175.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., De Costa, B.R., Rice, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in situ autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583.
- Hungund, B.L., Basavarajappa, B.S., 2000a. Are anandamide and cannabinoid receptors involved in ethanol tolerance? A review of the evidence. *Alcohol* 35, 126–133.
- Hungund, B.L., Basavarajappa, B.S., 2000b. Distinct differences in the cannabinoid receptor binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption. *J. Neurosci. Res.* 60, 122–128.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Böhme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B., Vassart, G., Fratta, W., Parmentier, M., 1999. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB₁ receptor knockout mice. *Science* 283, 401–404.
- Lukas, S.E., Sholar, M., Kouri, E., Fukuzako, H., Mendelson, J.H., 1994. Marijuana smoking increases plasma cocaine levels and subjective reports of euphoria in male volunteers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48, 715–721.
- Mailleux, P., Vanderhaeghen, J.J., 1992. Distribution of neuronal cannabinoid receptors in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48, 655–668.

- Manzanares, J., Corchero, J., Romero, J., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A., Fuentes, J.A., 1999. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharm. Sci.* 20, 287–294.
- Martellota, M.C., Cossu, G., Fattore, L., Gessa, G.L., Fratta, W., 1998. Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 in drug-naive mice. *Neuroscience* 85, 327–330.
- Mascia, M.S., Obinu, M.C., Ledent, C., Parmentier, M., Böhme, G.A., Imperato, A., Fratta, W., 1999. Lack of morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 383, R1–R2.
- McMillan, D.E., Snodgrass, S.H., 1991. Effects of acute and chronic administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol or cocaine on ethanol intake in a rat model. *Drug Alcohol Depend.* 27, 263–274.
- Navarro, M., Chowen, J., Rocio, A., Carrera, M., del Arco, I., Villanua, M.A., Martin, Y., Roberts, A.J., Koob, G.F., Rodríguez de Fonseca, F., 1998. CB₁ cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport* 9, 3397–3402.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
- Romero, J., Fernández-Ruiz, J.J., Vela, G., Ruiz-Gayo, M., Fuentes, J.A., Ramos, J.A., 1998. Autoradiographic analysis of cannabinoid receptor binding and cannabinoid agonist-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding in morphine-dependent mice. *Drug Alcohol Depend.* 50, 241–249.
- Rubino, T., Tizzoni, L., Vigano, D., Massi, P., Parolaro, D., 1997. Modulation of rat brain cannabinoid receptors after chronic morphine treatment. *Neuroreport* 8, 3219–3223.
- Rubino, T., Massi, P., Vigano, D., Fuzio, D., Parolaro, D., 2000. Long-term treatment with SR141716, the CB₁ receptor antagonist, influences morphine withdrawal syndrome. *Life Sci.* 66, 2213–2219.
- Sim-Selley, L.J., Selley, D.E., Vogt, L.J., Childers, S.R., Martin, T.J., 2000. Chronic heroin self-administration desensitizes μ opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. *J. Neurosci.* 20, 4555–4562.
- Tanda, G., Munzar, P., Goldberg, S.R., 2000. Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nature Neurosci.* 3, 1073–1074.
- Uzbay, I.T., Usanmaz, S.E., Akarsu, E.S., 2000. Effects of chronic ethanol administration on serotonin metabolism in various regions of the rat brain. *Neurochem. Res.* 25, 257–262.
- Vela, G., Ruiz-Gayo, M., Fuentes, J.A., 1995. Anandamide decreases naloxone-precipitated withdrawal signs in mice chronically treated with morphine. *Neuropharmacology* 34, 665–668.

Research report

Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine

Sara González^{a,1}, Maria Grazia Cascio^{b,1}, Javier Fernández-Ruiz^{a,*}, Filomena Fezza^b,
Vincenzo Di Marzo^{b,*}, José A. Ramos^a

^a*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain*

^b*Endocannabinoid Research Group, Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Campi Flegrei 34, Compensorio Olivetti, Fabbr. 70, 80078-Pozzuoli, Naples, Italy*

Accepted 24 July 2002

Abstract

Despite recent data suggesting that the endocannabinoid transmission is a component of the brain reward system and plays a role in dependence/withdrawal to different habit-forming drugs, only a few studies have examined changes in endocannabinoid ligands and/or receptors in brain regions related to reinforcement processes after a chronic exposure to these drugs. Recently, we carried out a comparative analysis of the changes in cannabinoid CB₁ receptor density in several rat brain regions caused by chronic exposure to some of the most powerful habit-forming drugs. In the present study, we have extended this objective by examining changes in the brain contents of arachidonylethanolamide (AEA) and 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG), the endogenous ligands for cannabinoid receptors, in animals chronically exposed to cocaine, nicotine or ethanol. Results were as follows. Cocaine was the drug exhibiting the minor number of effects, with only a small, but significant, decrease in the content of 2-AG in the limbic forebrain. In contrast, chronic alcohol exposure caused a decrease in the contents of both AEA and 2-AG in the midbrain, while it increased AEA content in the limbic forebrain. This latter effect was also observed after chronic nicotine exposure together with an increase in AEA and 2-AG contents in the brainstem. In contrast, the hippocampus, the striatum and the cerebral cortex exhibited a decrease in AEA and/or 2-AG contents after chronic nicotine exposure. We also tested the effect of chronic nicotine on brain CB₁ receptors, which had not been investigated before, and found an almost complete lack of changes in mRNA levels or binding capacity for these receptors. In summary, our results, in concordance with previous data on CB₁ receptors, indicate that the three drugs tested here produce different changes in endocannabinoid transmission. Only in the case of alcohol and nicotine, we observed a common increase in AEA contents in the limbic forebrain. This observation is important considering that this region is a key area for the reinforcing properties of habit-forming drugs, which might support the involvement of endocannabinoid transmission in some specific events of the reward system activated by these drugs.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Theme: Neural basis of behavior

Topic: Drugs of abuse

Keywords: Endocannabinoid; CB₁ receptor; Chronic drug exposure; Cocaine; Nicotine; Alcohol

1. Introduction

It is generally accepted that the endocannabinoid signalling system plays modulatory roles in the control of motor behavior, nociception, memory and learning, regulation of emesis, appetite or temperature, and brain development [20,24,51,64]. Recent evidence has also attributed to this system a novel role in brain reward processes [2,12,17,32,38,41,43,66]. This argument has been used to

*Corresponding author. Tel.: +34-91-394-1450; fax: +34-91-394-1691.

*Corresponding author. Tel.: +39-81-867-5093; fax: +39-81-804-1770.

E-mail addresses: jjfr@med.ucm.es (J. Fernández-Ruiz), vdimarzo@icmib.na.cnr.it (V. Di Marzo).

¹These authors contributed equally to this work.

explain why the chronic consumption of plant-derived cannabinoids produces behavioral and molecular changes that might be seen as similar to the states of dependence/withdrawal from other drugs of abuse ([13,19,34,49]; for a recent review, see Ref. [28]), despite the difficulties to observe patterns of self-administration of psychoactive cannabinoids in experimental animals [40,42,58]. It has also been argued that compounds that increase or decrease endocannabinoid transmission may: (i) increase the vulnerability to other drugs of abuse [27,39,62], or (ii) attenuate drug seeking behavior or other signs of dependence/withdrawal to morphine ([9,38,61]; for a recent review, see Ref. [41]), cocaine [1,22] or alcohol [2,11,25,37].

In the attempt to further explore the involvement of endocannabinoid transmission in the brain reward circuitry, several studies have addressed the possibility that chronic exposure to some of the most powerful habit-forming drugs causes changes in CB₁ receptors in several brain regions, directly or indirectly related to drug reinforcement. However, such studies have produced results that were either controversial, as in the case of opiates, with authors showing increases [53] or no changes [50,56] in cannabinoid receptors, or limited, as in the case of alcohol, where the data available have been obtained only in whole brain [3,4]. Furthermore, no published study has investigated so far the effect of chronic treatment with cocaine or nicotine on endocannabinoid transmission. Recently, we have explored this issue by performing a comparative analysis of the changes caused by the chronic exposure to morphine, cocaine or alcohol in CB₁ receptor density and mRNA expression in several rat brain regions [30], and we found that the changes were very different for each drug. Data on changes in cannabinoid receptor endogenous ligands after a chronic exposure to some of these drugs are instead scarce. In a recent preliminary report, Vigano et al. [63] have demonstrated a decrease in endocannabinoid contents in several brain regions of morphine-exposed rats. However, equivalent studies *in vivo* with the other habit-forming drugs have not been performed yet, whereas a rise of endocannabinoids after a chronic alcohol exposure was observed *in vitro* using cell cultures [5,6]. Therefore, in the present study, we wanted to explore whether there is any similarity in the changes induced by chronic exposure to cocaine or ethanol in the contents of anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in several rat brain regions. We also examined the effect of a chronic exposure to nicotine on endocannabinoid transmission, including the analysis of both endogenous ligands and CB₁ receptors, since this drug was not examined in our earlier study [30]. In the three cases, we used paradigms of chronic exposure according to well-established procedures [29,46,59], which, together with opiates, are among the more highly consumed drugs by humans and also those more frequently combined with marijuana.

2. Material and methods

2.1. Animals, treatments and sampling

Male Wistar rats were housed in a room with controlled photoperiod (08:00–20:00 h light) and temperature (23 ± 1 °C). They had free access to standard food and water and were used at adult age (3 months old; 250–300 g weight) for three different experiments, all conducted according to European rules (directive 86/609/EEC). In the experiment I, rats were injected *i.p.*, twice daily (08:00 h and 20:00 h), with a dose of 15 mg/kg weight of cocaine (kindly provided by the ‘Servicio de Restricción de Estupefacientes, Agencia Española del Medicamento, Ministerio de Sanidad’, Madrid, Spain) or vehicle (saline) during a period of 10 days, according to the procedure described by Giorgetti and Zhdanova [29]. Two hours after the last injection, animals were killed by decapitation, their brains were quickly and carefully removed and dissected, and the different regions collected were rapidly frozen in dry ice. All samples were stored at -80 °C until processed for the analysis of endocannabinoid contents. The following regions were dissected: cerebral cortex, diencephalon, striatum, limbic forebrain, hippocampus, midbrain, cerebellum and brainstem. In the experiment II, rats were housed individually and allowed to drink ethanol (7.2% v/v) in the liquid diet for a period of 15 days, according to the procedure described by Uzbay et al. [59]. The liquid diet was prepared daily and presented at the same time of the day (10:00 h). Controls animals were allowed to drink water alone. The weight of the rats was recorded every day, and daily liquid intake was measured and expressed as ml/kg weight per day (see Ref. [30] for previous data and method details). On day 15 after the onset of this treatment, animals were killed by decapitation, their brains collected, dissected and frozen for the analysis of endocannabinoid contents, as described for the above experiment. In the experiment III, rats were *s.c.* injected with a dose of 1 mg/kg weight of nicotine base (Sigma, Madrid, Spain) or vehicle (saline) during a period of 7 days, according to the procedure of Miksys et al. [46]. Two hours after the last injection, rats were killed by decapitation and their brains collected, dissected and frozen for the analysis of endocannabinoid content, as described for the above experiments. An additional set of animals treated with the same paradigm for nicotine were decapitated and their brains were quickly and carefully removed and rapidly frozen, by immersion in 2-methyl-butane cold in dry ice, to be used for analysis of CB₁ receptor binding and mRNA levels.

2.2. Measurement of endocannabinoid content

2.2.1. Extraction procedure

Pools for each brain region, in amount ranging from 0.5 to 3 g wet weight, were extracted immediately after

decapitation to avoid the postmortem rise in the concentrations of long-chain *N*-acylethanolamines. This occurs approximately from 30 min after death, as reported previously [54]. The tissue was homogenized in 5 vol of chloroform/methanol/Tris–HCl 50 mM (2:1:1) containing 1 nmol of d_8 -AEA and d_8 -2-AG. Deuterated standards were synthesized from d_8 arachidonic acid and ethanolamine or glycerol as described, respectively, in Devane et al. [18] and Bisogno et al. [7]. Homogenates were centrifuged at 13 000×*g* for 16 min (4 °C), the aqueous phase plus debris were collected and extracted again twice with 1 vol of chloroform. The organic phases from the three extractions were pooled and the organic solvents eliminated in a rotating evaporator. Samples were then stored frozen at –80 °C under nitrogen atmosphere until analyzed.

2.2.2. Analysis of endocannabinoid content by GC/MS

Lyophilized extracts were resuspended in chloroform/methanol 99:1 by vol. The solutions were then purified by open bed chromatography on silica [26]. Fractions eluted with chloroform/methanol 9:1 by vol. (containing AEA and 2-AG) were collected and the excess solvent eliminated with a rotating evaporator. The former fractions were further fractionated by normal phase high pressure liquid chromatography (NP-HPLC) carried out using a semi-preparative silica column (Spherisorb S5W, Phase Sep, Queensferry, Clwyd, UK) eluted with a 40-min linear gradient from 9:1 to 8:2 (by vol.) of *n*-hexane/2-propanol (flow rate=2 ml/min). These elution conditions allow the separation of 1(3)- and 2-acyl-glycerols (retention time of 18 and 20 min, respectively) from *N*-acylethanolamines (retention time=26–27 min). NP-HPLC fractions from 17 to 22 min and from 24 to 28 min were pooled, the solvent evaporated in a Speed-vac, and the components derivatized with 20 µl 1% trimethylchlorosilane for 2 h at room temperature and analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC–MS) carried out under conditions described previously [7] and allowing the separation of monoacylglycerols or *N*-acylethanolamines with different fatty acid chains. MS detection was carried out in the selected ion monitoring mode using *m/z* values of 427 and 419 (molecular ions for deuterated and undeuterated AEA), 412 and 404 (loss of 15 mass units from deuterated and undeuterated AEA), 530 and 522 (molecular ions for deuterated and undeuterated 2-AG), and 515 and 507 (loss of 15 mass units from deuterated and undeuterated 2-AG). The area ratios between signals of deuterated and undeuterated AEA varied linearly with varying amounts of undeuterated AEA (20 pmol–20 nmol). The same applied to the area ratios between signals of deuterated and undeuterated 2-AG in the 100 pmol–20 nmol interval. AEA and 2-AG levels in unknown samples were therefore calculated on the basis of their area ratios with the internal deuterated standard signal areas. Two GC–MS peaks for both deuterated and undeuterated mono-arachi-

donoylglycerol were found, corresponding to 2-AG and 1(3)-AG, in agreement with the previous observation that 2-AG undergoes isomerization during the purification procedure [57]. Therefore, the amounts of 2-AG were calculated by adding the amounts of the two isomers. The amounts of endocannabinoids are expressed as pmol or nmol per g of wet tissue extracted. Further details on the GC/MS technique, including the detection and quantification limits, have been published [15].

2.3. Autoradiographic techniques

2.3.1. Brain slicing

Coronal sections 20 µm thick were cut in a cryostat, according to the Paxinos and Watson atlas [47]. Sections were thaw-mounted onto RNase-free gelatin/chrome alum coated slides and dried briefly at 30 °C and stored at –80 °C until used. For the identification of the different brain nuclei, adjacent sections to those used for autoradiographic analysis were stained with cresyl-violet and analyzed according to the Paxinos and Watson atlas [47].

2.3.2. Autoradiography of cannabinoid receptor binding

The protocol used is basically the method described by Herkenham et al. [31]. Briefly, slide-mounted brain sections were incubated for 2.5 h, at 37 °C, in a buffer containing 50 mM Tris with 5% bovine serum albumin (fatty acid-free), pH 7.4, and 10 nM [³H]CP-55,940 (Du Pont NEN) prepared in the same buffer, in the absence or the presence of 10 µM non-labelled CP-55,940 (kindly supplied by Pfizer) to determine the total and the non-specific binding, respectively. Following this incubation, slides were washed in 50 mM Tris buffer with 1% bovine serum albumin (fatty acid-free), pH 7.4, for 4 h (2×2 h) at 0 °C, dipped in ice-cold distilled water and then dried under a stream of cool dried air. Autoradiograms were generated by apposing the labelled tissues, together with autoradiographic standards ([³H] micro-scales, Amersham), to tritium-sensitive film (³H-Hyperfilm MP, Amersham) for a period of 2 weeks. An intensifying screen (Biomax Transcreen LE, Kodak) was also used. Autoradiograms were developed (D-19, Kodak) for 4 min at 20 °C, and the films were analyzed and quantitated in a computer-assisted videodensitometer using the standard curve generated from ³H-standards.

2.3.3. Analysis of mRNA levels for CB₁ receptor by *in situ* hybridization

The analysis of CB₁ receptor mRNA levels was carried out according to Rubino et al. [52]. Briefly, sections were fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min and, after rinsing twice in phosphate buffered saline, were acetylated by incubation in 0.25% acetic anhydride, prepared in 0.1 M triethanolamine/0.15 M sodium chloride (pH 8.0), for 10 min. Sections were rinsed in 0.3 M sodium chloride/0.03 M sodium citrate, pH 7.0, dehydrated and delipidated by

an ethanol/chloroform series. A mixture (1:1:1) of the three 48-mer oligonucleotide probes complementary to bases 4–51, 349–396 and 952–999 of the rat CB₁ receptor cDNA (Du Pont; the specificity of the probes used was assessed by Northern Blot analysis) was 3'-end labelled with [³⁵S]dATP using terminal deoxynucleotidyl-transferase. Sections were, then, hybridized with ³⁵S-labelled oligonucleotide probes (7.5 × 10⁵ dpm per section), washed and exposed to X-ray film (βmax, Amersham) for 1 week, and developed (D-19, Kodak) for 6 min at 20 °C. The intensity of the hybridization signal was assessed by measuring the grey levels in the autoradiographic films with a computer-assisted videodensitometer. Adjacent brain sections were co-hybridized with a 100-fold excess of cold probe or with RNase to assess the specificity of the signal (data not shown).

2.4. Statistics

Data on endocannabinoid content were compared by using analysis of variance, followed by the Bonferroni's test. The other data were assessed by Student's *t*-test.

3. Results

In this study, we measured endocannabinoid levels in several rat brain regions with a well established isotope-dilution GC–MS procedure [15,26]. Although it is possible in principle that the derivatization procedure may affect artefactually the levels of endocannabinoids, it is worthwhile noting that the amounts found in the present study were not too dissimilar from those found in some previous studies from our group using a technique similar to that

used here [8], as well as from the levels reported by other groups using liquid chromatography–mass spectrometry [23,35], which does not require sample derivatization prior to analysis.

In the Experiment I, we employed a classic paradigm for chronic cocaine exposure [29], which leads to typical effects on locomotion and feeding behavior, and is sufficient, once interrupted, to elicit withdrawal signs. However, we observed very little influence on endocannabinoid content with this treatment. In fact, the chronic exposure to this psychostimulant only resulted in a small, but significant, decrease in the content of 2-AG in the limbic forebrain (Table 1). No changes were observed for this endocannabinoid in the cerebral cortex, striatum, diencephalon, midbrain, hippocampus, brainstem and cerebellum (Table 1), and for AEA in the eight regions examined (Table 1), despite some trends in certain regions that did not reach statistical significance (Table 1).

In the Experiment II, we used a paradigm of chronic alcohol exposure by adding a fixed amount of ethanol in the liquid diet. We recorded liquid intake in order to control that animals were effectively exposed to ethanol (data not shown). The pattern followed by these animals was concordant with previous reports (for a review, see Ref. [44]), and animals given ethanol presented higher values of liquid intake during the second phase of ethanol exposure [30], thus indicating the occurrence of addictive phenomena. Using this paradigm, we observed that chronic alcohol exposure caused a decrease in the contents of both endocannabinoids, AEA and 2-AG, in the midbrain, but it increased the content of AEA in the limbic forebrain (Table 1). No other changes were measured in the other regions for either AEA or 2-AG (Table 1).

In the Experiment III, we used a paradigm of repeated

Table 1
Endocannabinoid content in brain regions of rats chronically exposed to cocaine, nicotine or ethanol (see details on treatments in the text)

Endocannabinoid	Brain region	Cocaine experiment		Nicotine experiment		Alcohol experiment	
		+ vehicle	+ cocaine	+ vehicle	+ nicotine	+ vehicle	+ ethanol
Anandamide (pmol/g)	Cerebellum	12.9±4.7	14.1±4.9	11.3±5.3	12.3±1.7	15.3±3.1	20.4±4.6
	Brainstem	24.0±5.0	17.4±2.7	20.2±3.2	68.0±19.2*	22.9±2.3	17.9±3.9
	Midbrain	33.8±3.7	39.2±3.5	37.7±14.0	24.2±2.3	49.5±6.0	9.6±2.0*
	Hippocampus	78.9±23.2	47.2±6.2	84.4±12.7	32.9±9.4*	87.6±14.3	89.0±17.5
	Limbic forebrain	32.6±1.3	33.5±2.3	33.1±4.8	55.3±13.3*	34.1±5.7	53.5±4.3*
	Striatum	62.1±6.0	74.5±6.2	85.6±28.9	20.2±6.6*	81.5±7.3	88.6±13.6
	Diencephalon	14.3±2.0	22.6±7.3	15.3±2.5	20.4±8.0	14.4±2.6	12.6±2.6
	Cerebral cortex	11.0±1.3	13.2±5.5	13.6±6.0	4.8±1.1*	16.7±1.0	17.3±4.6
2-Arachidonoylglycerol (nmol/g)	Cerebellum	6.8±1.5	14.3±4.3	12.3±1.7	10.8±1.3	18.2±2.4	11.5±2.4
	Brainstem	7.2±1.5	7.5±1.2	14.1±1.1	23.3±3.9*	13.3±1.1	8.1±1.5
	Midbrain	7.7±1.4	9.7±0.7	7.2±1.0	6.3±0.7	8.7±1.2	4.9±0.4*
	Hippocampus	5.7±0.5	5.9±2.2	4.6±0.7	2.7±0.5*	5.5±1.2	5.2±1.1
	Limbic forebrain	3.5±0.1	2.7±0.1*	3.3±0.4	3.4±0.7	3.6±0.9	4.9±1.0
	Striatum	4.9±0.4	5.8±0.7	4.9±1.5	5.5±1.2	4.3±0.9	4.9±1.0
	Diencephalon	3.9±0.8	5.9±2.1	5.2±0.9	4.3±0.5	5.8±1.7	6.9±0.8
	Cerebral cortex	8.9±3.0	9.8±2.9	10.2±3.3	4.2±0.7*	9.3±0.9	8.6±1.4

Data are expressed as means ± S.E.M. of four determinations per group. Data were assessed by analysis of variance followed by Bonferroni's test (**P* < 0.05).

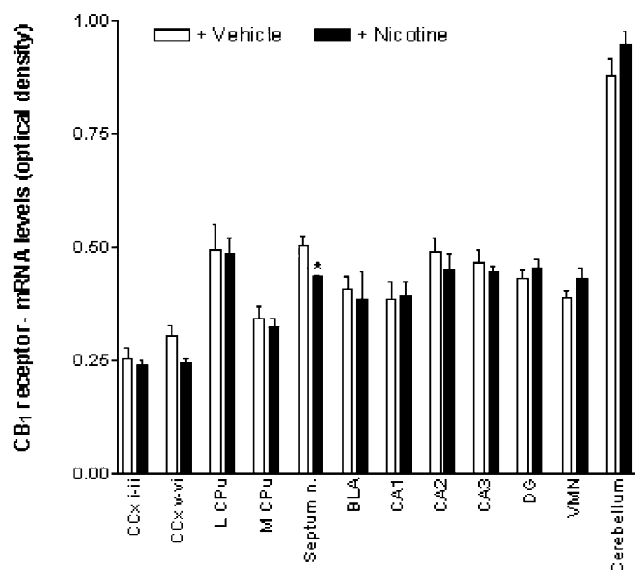


Fig. 1. CB₁ receptor mRNA levels in brain regions of rats chronically exposed to nicotine (see details on the treatment in the text). Data are expressed as means \pm S.E.M. of at least 6–8 determinations per group. Statistical analysis was carried out using the Student's *t*-test (* $P < 0.05$). CCx, cerebral cortex; LCPu, lateral caudate-putamen; MCPu, medial caudate-putamen; BLA, basolateral amygdala; DG, dentate gyrus; VMN, ventromedial hypothalamic nucleus.

nicotine injections [46] that leads to the development of nicotine dependence/withdrawal (for review, see Ref. [65]). In contrast with cocaine, nicotine-exposed rats exhibited changes in endocannabinoid contents in several

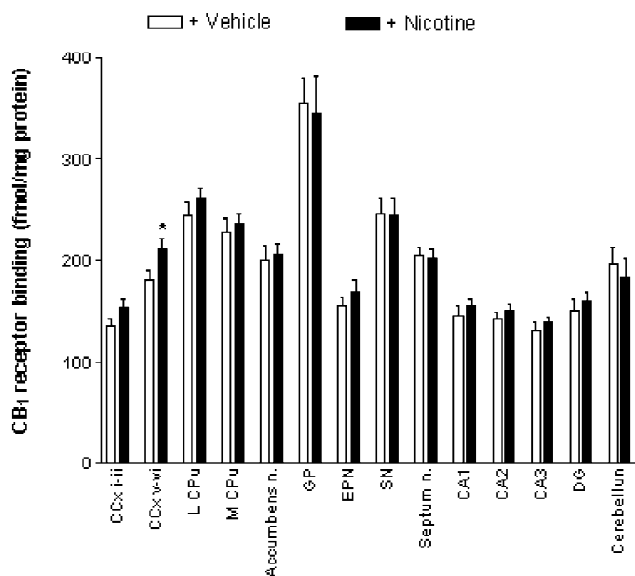


Fig. 2. CB₁ receptor binding in brain regions of rats chronically exposed to nicotine (see details on the treatment in the text). Data are expressed as means \pm S.E.M. of at least 6–8 determinations per group. Statistical analysis was carried out using the Student's *t*-test (* $P < 0.05$). CCx, cerebral cortex; LCPu, lateral caudate-putamen; MCPu, medial caudate-putamen; GP, globus pallidus; EPN, entopeduncular nucleus; SN, substantia nigra; DG, dentate gyrus.

brain areas. So, there was an increase in AEA contents in the limbic forebrain, as also observed in alcohol-exposed animals (see above), as well as an augmentation of both AEA and 2-AG contents in the brainstem (Table 1). In contrast, other regions, such as the hippocampus and the cerebral cortex, exhibited a decrease in both AEA and 2-AG content after chronic nicotine exposure, whereas, in the striatum, there was a decrease in AEA only (Table 1). No changes were seen in the cerebellum, midbrain and diencephalon for any of the two endocannabinoids (Table 1). As this drug had not been examined for its effects on brain CB₁ receptors in our earlier study [30], we also tested here these effects, but the data revealed an almost complete lack of changes in mRNA levels or binding capacity for these receptors after a chronic nicotine exposure (Figs. 1 and 2). The only changes observed in nicotine-exposed rats were a decrease in CB₁ receptor-mRNA levels in the septum nuclei (Fig. 1) and an increase in CB₁ receptor density in the deep layer (V–VI) of the cerebral cortex (Fig. 2), but these effects were very small and of dubious physiological relevance.

4. Discussion

The hypothesis that the endocannabinoid system plays a modulatory role in reward circuitry [2,12,32,38,41,43,66] would be compatible with the possible observation of similar effects on endocannabinoid transmission (at least in those regions directly or indirectly related to reinforcement processes) after a prolonged exposure to different habit-forming drugs, and despite the differences in the molecular processes activated by each of these drugs. This has been previously described for other components of the brain reward system such as dopaminergic or opioidergic neurons (for review, see Ref. [36]). In the present study, we have evaluated the effects of prolonged exposures to nicotine, cocaine or alcohol on endocannabinoid content in different brain regions. However, contrary to what was expected from the above reasoning, we did not find that, overall, the levels of endocannabinoids were affected in a similar manner by these three habit-forming drugs. The same finding emerged from the analysis of CB₁ receptors in a previous study [30], thus supporting the notion that the states of dependence of these drugs have a different influence on endocannabinoid transmission. However, some similar observations for nicotine and ethanol, but not for cocaine (present data) or morphine [63], in a key region for reward processes, such as the limbic forebrain (among other nuclei, this structure contains the nucleus accumbens and the amygdala), are worthwhile noting and might be suggestive of a certain similarity in the rewarding effects of these drugs. In fact, chronic nicotine or ethanol exposure did produce a significant increase in the contents of AEA in this region, with no changes in CB₁ receptor binding and mRNA levels in limbic nuclei for any of the

two drugs ([30] and present data). It is interesting that a similar increase in the content of this endocannabinoid in the limbic structures has been reported recently in rats chronically exposed to Δ^9 -tetrahydrocannabinol [21], the major plant-derived cannabinoid, therefore, this increase in endocannabinoid production might represent an adaptative response to the insult with some, but not all, habit-forming drugs. In the case of alcohol, this increase is particularly interesting since it would explain why compounds that block endocannabinoid transmission, such as the selective antagonist of CB₁ receptors SR141716A, are effective in attenuating the motivational or reinforcing properties of alcohol thus reducing the intake of this drug in rodents [2,11,25,37]. Anyway, it is necessary to mention that, despite this common effect for nicotine and alcohol revealed here, and for cannabinoid dependence described previously [21], the remaining regions showed a clearly different pattern of changes in endocannabinoid contents, as observed here also for cocaine and as reported previously for the receptors of these endogenous ligands [30]. To simplify the discussion, the data will be discussed below drug-by-drug.

Starting with alcohol, it should be noted that there are some previous studies that related alcohol consumption to the endocannabinoid system (for review, see Ref. [32]). Thus, changes in density and/or affinity for CB₁ receptors have been previously demonstrated in brain membranes from two different mouse strains that differ significantly in their preference for alcohol [33]. The same authors reported a decrease in CB₁ receptor binding [3] and desensitization of cannabinoid-activated signal transduction mechanisms [4] in brain membranes of chronic ethanol-exposed mice, but they worked with whole brain with no indications on specific regions. We performed a region-by-region analysis in our earlier study mentioned above [30] using a chronic ethanol paradigm identical to that used in our present study, and found no changes in CB₁ receptor mRNA levels and binding capacity in any of the brain regions examined. With regard to endocannabinoids, some studies, using cultures of cerebellar granule neurons or neuroblastoma cells, have demonstrated a stimulation of the endocannabinoid production following chronic exposure to ethanol [5,6]. This finding is consistent with a possible enhancement of endocannabinoid tone during alcohol dependence, a fact that has also been demonstrated for cannabinoid tolerance [21]. Till the present study, however, there were no data obtained *in vivo*. The data reported here are highly concordant with the suggestion that chronic ethanol consumption stimulates endocannabinoid production, at least in some regions, since we observed a significant increase in AEA contents in the limbic forebrain, a key region for drug reinforcement processes. Even though the status of CB₁ receptors in the limbic structures does not change in rats subjected to the same paradigm of chronic ethanol exposure [30], the augmentation of AEA levels observed here is likely to be

sufficient to stimulate the receptors in these regions, thus producing a hyperactivity of endocannabinoid transmission that might be responsible, at least in part, for the addictive properties of alcohol. As mentioned above, this possibility provides a plausible explanation for pharmacological data showing that CB₁ receptor blockade with SR141716A reduces ethanol intake [2,11,25,37], and the acquisition of alcohol drinking behavior [55], whereas cannabinoid receptor agonists produce opposite effects [45], thus supporting a role of CB₁ receptor blockade in the treatment of alcoholism. However, the time of SR141716A administration might be crucial to determine its beneficial effects in alcohol dependence, since the recent report by Lallemand et al. [37], while demonstrating a lowering effect of this antagonist when administered after chronic alcoholization or at the time of withdrawal, also described an increase in alcohol preference when SR141716A was administered concurrently with chronic alcoholization.

In addition to the increase in AEA in the limbic forebrain of alcohol-exposed rats, we have also measured a decrease in this endocannabinoid and of 2-AG in the midbrain, the area that contains the cell bodies of the mesolimbic dopaminergic neurons that play a role in reinforcement. Thus, endocannabinoid levels appear to be enhanced where the terminals of these neurons are located (limbic forebrain), and reduced in the region containing the somas of these neurons (midbrain). It is possible that the reduction of endocannabinoid signalling in this region represents a compensatory response elicited by the activation of the negative feedback regulatory loop that goes from the limbic forebrain to the ventral tegmental area. This concomitant occurrence of opposite changes in endocannabinoid contents in the limbic forebrain (increases) and the midbrain (decreases) might also explain the opposite effects described by Lallemand et al. [37] for the blockade of CB₁ receptors as a function of the time of SR141716A administration, although this hypothesis clearly requires further examination.

With regard to nicotine, it should be first noted that only a recent work has addressed the study of the pharmacological and/or molecular interactions between nicotine and cannabinoids [60], despite the fact that *Cannabis sativa* derivatives are mainly consumed in combination with tobacco. So, our present results are one of the first demonstrations of such a relationship, as we found here that chronic nicotine exposure affects endocannabinoid transmission in numerous regions, although, as observed with ethanol, this treatment did not seem to affect the cannabinoid CB₁ receptors. We were, in fact, unable to reveal here any relevant changes in CB₁ receptors in cortical, limbic, motor and hippocampal regions. However, we observed a significant increase in AEA and 2-AG contents in the brainstem, a region that contains the locus coeruleus, which, in turn, is involved in drug withdrawal symptoms. We also found a significant decrease in endocannabinoids in the hippocampus, striatum (only AEA) and

cerebral cortex. The most relevant effect, in terms of comparison with the other drugs of abuse, was the increase in AEA content in the limbic forebrain, which was similar to the increase noted with alcohol (present data) or Δ^9 -tetrahydrocannabinol [21]. As for alcohol dependence, this observation might be compatible with the possible use of CB₁ receptor blockers for the treatment of nicotine dependence/withdrawal. However, there are not many studies that demonstrate a possible participation of the endocannabinoid system in the neural mechanisms of nicotine dependence. A recent report by Cossu et al. [14] showed that nicotine self-administration was not altered in CB₁ receptor knockout mice, but, at variance with alcohol, there are no studies that have examined the effects of CB₁ receptor agonists or antagonists in animals chronically exposed to nicotine.

Concerning the decrease in endocannabinoid content found in the cerebral cortex, striatum and hippocampus of nicotine-exposed rats, it is interesting to note that these decreases were observed in regions that display a high density of nicotinic receptors, e.g. the cerebral cortex and hippocampus (for a recent review, see Ref. [10]). These variations might reflect an action on the biochemical pathways controlling endocannabinoid production, which are under the control of a variety of ionotropic and metabotropic receptors [21]. Based on this assumption, it is tempting to speculate that the decrease in both AEA and 2-AG levels, and the subsequent inhibition of endocannabinoid signalling, induced by chronic nicotine in those brain nuclei controlling cognition (cerebral cortex) and learning (hippocampus) might contribute to the well-known stimulatory properties of nicotine on these processes (for a recent review, see Ref. [48]). In the same line of reasoning, the decrease in striatal AEA content might contribute to explain the excitatory actions of nicotine on locomotion in rodents [10].

Lastly, concerning the analyses carried out in brain areas from cocaine-exposed rats, our data showed that the only statistically significant effect found was a reduction in the contents of 2-AG in the limbic forebrain, which indicates that the effects of this psychostimulant are clearly different from those described above for nicotine and ethanol. No changes were seen in the remaining regions for both endocannabinoids, which is compatible with the lack of changes at the level of CB₁ receptors reported in our earlier study, where we only found effects in the levels of mRNA transcripts for this receptor in hypothalamic and cortical regions, but not in hippocampal, motor and limbic structures [30]. As with nicotine, the present and our previous reports [30] represent, to our knowledge, the first studies that have addressed the analysis of endocannabinoid transmission in cocaine-exposed rats. Hence, it is not possible to compare our data with previous results. There are, however, pharmacological studies that demonstrated that cannabinoid receptor agonists can reduce cocaine self-administration [22] or the behavioral sensitiza-

tion to cocaine [1]. Other investigations reported that CB₁ receptor antagonists block cocaine-induced place-preference in rats [9] and attenuate relapse to cocaine seeking [16]. In contrast, other authors [58] found that SR141716A was unable to reduce or intensify self-administration behavior of cocaine in monkeys. In the same direction, Cossu et al. [14] reported that cocaine self-administration addiction was not affected in CB₁ receptor knockout mice, which is more in agreement with the general lack of effects of chronic cocaine on endocannabinoid transmission found here and in our earlier study [30]. We assume that methodological differences might account for these controversial observations.

In summary, the present results, in agreement with the previous data on CB₁ receptors [30], indicate that the three drugs tested here produce different changes in endocannabinoid transmission, which a priori argues against the existence of a common alteration of the endocannabinoid system during dependence states to these habit-forming drugs. Only in the case of alcohol and nicotine, we observed a common enhancement of AEA content in the limbic forebrain, which has been previously reported also with chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol. This fact is interesting considering that this region is a key area for the reinforcing properties of habit-forming drugs, which might support the involvement of endocannabinoid transmission in some specific events of the reward system activated by these drugs. Results have been discussed in the light of the pharmacological manipulations of endocannabinoid transmission that have been reported previously to reduce or increase the severity of dependence/withdrawal to these three habit-forming drugs.

Acknowledgements

This work has been supported by grants from CICYT (PM99-0056), 'Plan Nacional sobre Drogas' and Agencia Antidroga de la CAM (Madrid, Spain), and MURST (grants 3933 and Fondi Strutturali). The authors are indebted to the 'Servicio de Restricción de Estupefacientes, Agencia Española del Medicamento, Ministerio de Sanidad' (Madrid, Spain) for kindly providing cocaine. Sara González is a predoctoral fellow supported by the 'Plan Nacional sobre Drogas'.

References

- [1] J.C. Arnold, A.N. Topple, G.E. Hunt, I.S. McGregor, Effects of pre-exposure and co-administration of the cannabinoid receptor agonist CP55,940 on behavioral sensitization to cocaine, *Eur. J. Pharmacol.* 354 (1998) 9–16.
- [2] M. Arnone, J. Maruani, F. Chaperon, M.H. Thiébot, M. Poncelor, P. Soubrié, G. Le Fur, Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR141716, an antagonist of central cannabinoid (CB₁) receptors, *Psychopharmacology* 132 (1997) 104–106.

- [3] B.S. Basavarajappa, T.B. Cooper, B.L. Hungund, Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane, *Brain Res.* 79 (1998) 212–218.
- [4] B.S. Basavarajappa, B.L. Hungund, Down-regulation of cannabinoid receptor agonist-stimulated [³⁵S]GTPγS binding in synaptic plasma membrane from chronic ethanol exposed mouse, *Brain Res.* 815 (1999) 89–97.
- [5] B.S. Basavarajappa, B.L. Hungund, Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells, *J. Neurochem.* 72 (1999) 522–528.
- [6] B.S. Basavarajappa, M. Saito, T.B. Cooper, B.L. Hungund, Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonoylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons, *Biochim. Biophys. Acta* 1535 (2000) 78–86.
- [7] T. Bisogno, N. Sepe, D. Melck, S. Maurelli, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells, *Biochem. J.* 322 (1997) 671–677.
- [8] T. Bisogno, F. Berrendero, G. Ambrosino, M. Cebeira, J.A. Ramos, J.J. Fernández-Ruiz, V. Di Marzo, Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256 (1999) 377–380.
- [9] F. Chaperon, P. Soubrie, A.J. Puech, M.H. Thiebot, Involvement of central cannabinoid (CB₁) receptors in the establishment of place conditioning in rats, *Psychopharmacology* 135 (1998) 324–332.
- [10] F. Clementi, D. Fornasari, C. Gotti, Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function, *Eur. J. Pharmacol.* 393 (2000) 3–10.
- [11] G. Colombo, R. Agabio, M. Fa, L. Guano, C. Lobina, A. Loche, R. Reali, G.L. Gessa, Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol preferring SP by the cannabinoid antagonist SR141716, *Alcohol Alcohol.* 33 (1998) 126–130.
- [12] D.E. Comings, D. Muhleman, R. Gade, P. Johnson, R. Verde, G. Saucier, J. MacMurray, Cannabinoid receptor gene (CNR1): association with i.v. drug use, *Mol. Psychiatry* 2 (1997) 161–168.
- [13] S.A. Cook, J.A. Lowe, B.R. Martin, CB₁ receptor antagonist precipitates withdrawal in mice exposed to Δ⁹-tetrahydrocannabinol, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285 (1998) 1150–1156.
- [14] G. Cossu, C. Ledent, L. Fattore, A. Imperato, G.A. Böhme, M. Parmentier, W. Fratta, Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse, *Behav. Brain Res.* 118 (2001) 61–65.
- [15] L. De Petrocellis, D. Melck, T. Bisogno, A. Milone, V. Di Marzo, Finding of endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: possible role in the feeding response, *Neuroscience* 92 (1999) 377–387.
- [16] T.J. De Vries, Y. Shaham, J.R. Homberg, H. Crombag, K. Schuurman, J. Dieben, L.J.M.J. Vanderschuren, A.N.M. Schoffelmeer, A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking, *Nat. Med.* 7 (2001) 1151–1254.
- [17] V. Deroche-Gamonet, M. Le Moal, P.V. Piazza, P. Soubrie, SR141716, a CB1 receptor antagonist, decreases the sensitivity to the reinforcing effects of electrical brain stimulation in rats, *Psychopharmacology* 157 (2001) 254–259.
- [18] W.A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam, Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science* 258 (1992) 1946–1949.
- [19] M. Diana, M. Melis, A.L. Muntoni, G.L. Gessa, Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 10269–10273.
- [20] V. Di Marzo, D. Melck, T. Bisogno, L. De Petrocellis, Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuro-modulatory action, *Trends Neurosci.* 21 (1998) 521–528.
- [21] V. Di Marzo, F. Berrendero, T. Bisogno, S. González, P. Cavaliere, J. Romero, M. Cebeira, J.A. Ramos, J.J. Fernández-Ruiz, Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of Δ⁹-tetrahydrocannabinol-tolerant rats, *J. Neurochem.* 74 (2000) 1627–1635.
- [22] L. Fattore, M.C. Martellota, G. Cossu, M.S. Mascia, W. Fratta, CB₁ cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats, *Behav. Brain Res.* 104 (1999) 141–148.
- [23] C.C. Felder, A. Nielsen, E.M. Briley, M. Palkovits, J. Priller, J. Axelrod, D.N. Nguyen, J.M. Richardson, R.M. Riggan, G.A. Koppel, S.M. Paul, G.W. Becker, Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat, *FEBS Lett.* 393 (1996) 231–235.
- [24] J.J. Fernández-Ruiz, F. Berrendero, M.L. Hernández, J.A. Ramos, The endogenous cannabinoid system and brain development, *Trends Neurosci.* 23 (2000) 14–20.
- [25] C.S. Freedland, A.L. Sharpe, H.H. Samson, L.J. Porrino, Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25 (2001) 277–282.
- [26] A. Fontana, V. Di Marzo, H. Cadas, D. Piomelli, Analysis of anandamide, an endogenous cannabinoid substance, and other natural N-acyl ethanolamines, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 53 (1995) 301–308.
- [27] J.E. Gallate, T. Saharov, P.E. Mallet, I.S. McGregor, Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB₁ receptor agonist, *Eur. J. Pharmacol.* 370 (1999) 233–240.
- [28] E.L. Gardner, S.R. Vorel, Cannabinoid transmission and reward-related events, *Neurobiol. Dis.* 5 (1998) 502–533.
- [29] M. Giorgetti, I.V. Zhdanova, Chronic cocaine treatment induces dysregulation in the circadian pattern of rats' feeding behavior, *Brain Res.* 877 (2000) 170–175.
- [30] S. González, J.J. Fernández-Ruiz, V. Sparpaglione, D. Parolaro, J.A. Ramos, Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB1 receptor binding and mRNA levels, *Drug Alcohol Depend.* 66 (2002) 77–84.
- [31] M. Herkenham, A.B. Lynn, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. De Costa, K.C. Rice, Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in situ autoradiographic study, *J. Neurosci.* 11 (1991) 563–583.
- [32] B.L. Hungund, B.S. Basavarajappa, Are anandamide and cannabinoid receptors involved in ethanol tolerance? A review of the evidence, *Alcohol Alcohol.* 35 (2000) 126–133.
- [33] B.L. Hungund, B.S. Basavarajappa, Distinct differences in the cannabinoid receptor binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption, *J. Neurosci. Res.* 60 (2000) 122–128.
- [34] D.M. Hutcheson, E.T. Tzavara, C. Smadja, E. Valjent, B.P. Roques, J. Hanoune, R. Maldonado, Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with Δ⁹-tetrahydrocannabinol, *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 1567–1577.
- [35] D. Koga, T. Santa, T. Fukushima, H. Homma, K. Imai, Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 690 (1997) 7–13.
- [36] G.F. Koob, Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies, *Ann. NY Acad. Sci.* 909 (2000) 170–185.
- [37] F. Lallemand, P.H. Soubrie, P.H. De Witte, Effects of CB1 cannabinoid receptor blockade on ethanol preference after chronic ethanol administration, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25 (2001) 1317–1323.
- [38] C. Ledent, O. Valverde, G. Cossu, F. Petitet, J.F. Aubert, F. Beslot, G.A. Böhme, A. Imperato, T. Pedrazzini, B. Roques, G. Vassart, W. Fratta, M. Parmentier, Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB₁ receptor knockout mice, *Science* 283 (1999) 401–404.

- [39] S.E. Lukas, M. Sholar, E. Kouri, H. Fukuzako, J.H. Mendelson, Marijuana smoking increases plasma cocaine levels and subjective reports of euphoria in male volunteers, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48 (1994) 715–721.
- [40] R.S. Mansbach, K.L. Nicholson, B.R. Martin, R.L. Balster, Failure of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and CP55,940 to maintain intravenous self-administration under a fixed-interval schedule in rhesus monkeys, *Behav. Pharmacol.* 5 (1994) 219–225.
- [41] J. Manzanares, J. Corchero, J. Romero, J.J. Fernández-Ruiz, J.A. Ramos, J.A. Fuentes, Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids, *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999) 287–294.
- [42] M.C. Martellota, G. Cossu, L. Fattore, G.L. Gessa, W. Fratta, Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 in drug-naïve mice, *Neuroscience* 85 (1998) 327–330.
- [43] M.S. Mascia, M.C. Obinu, C. Ledent, M. Parmentier, G.A. Böhme, A. Imperato, W. Fratta, Lack of morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of cannabinoid CB₁ receptor knockout mice, *Eur. J. Pharmacol.* 383 (1999) R1–R2.
- [44] W.J. McBride, T.K. Li, Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents, *Crit. Rev. Neurobiol.* 12 (1998) 339–369.
- [45] D.E. McMillan, S.H. Snodgrass, Effects of acute and chronic administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol or cocaine on ethanol intake in a rat model, *Drug Alcohol Depend.* 27 (1991) 263–274.
- [46] S. Miksys, E. Hoffmann, R.F. Tyndale, Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 1501–1511.
- [47] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, London, 1986.
- [48] A.H. Rezvani, E.D. Levin, Cognitive effects of nicotine, *Biol. Psychiatry* 49 (2001) 258–267.
- [49] F. Rodríguez de Fonseca, M.R.A. Carrera, M. Navarro, G.F. Koob, F. Weiss, Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal, *Science* 276 (1997) 2050–2054.
- [50] J. Romero, J.J. Fernández-Ruiz, G. Vela, M. Ruiz-Gayo, J.A. Fuentes, J.A. Ramos, Autoradiographic analysis of cannabinoid receptor binding and cannabinoid agonist-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding in morphine-dependent mice, *Drug Alcohol Depend.* 50 (1998) 241–249.
- [51] J. Romero, I. Lastres-Becker, R. de Miguel, F. Berrendero, J.A. Ramos, J.J. Fernández-Ruiz, The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia: biochemical, pharmacological and therapeutic aspects, *Pharmacol. Ther.* 95 (2002) 137–152.
- [52] T. Rubino, P. Massi, G. Patrini, I. Venier, G. Giagnoni, D. Parolaro, Chronic CP-55,940 alters cannabinoid receptor-mRNA in the rat brain: an in situ hybridization study, *Neuroreport* 5 (1994) 2493–2496.
- [53] T. Rubino, L. Tizzoni, D. Vigano, P. Massi, D. Parolaro, Modulation of rat brain cannabinoid receptors after chronic morphine treatment, *Neuroreport* 8 (1997) 3219–3223.
- [54] P.C. Schmid, R.J. Krebsbach, S.R. Perry, T.M. Dettmer, J.L. Maasson, H.H.O. Schmid, Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain N-acyl ethanolamines in mammalian brain, *FEBS Lett.* 375 (1995) 117–120.
- [55] S. Serra, M.A. Carai, G. Brunetti, R. Gómez, S. Melis, G. Vacca, G. Colombo, G.L. Gessa, The cannabinoid receptor antagonist SR141716 prevents acquisition of drinking behavior in alcohol-preferring rats, *Eur. J. Pharmacol.* 430 (2001) 369–371.
- [56] L.J. Sim-Selley, D.E. Selley, L.J. Vogt, S.R. Childers, T.J. Martin, Chronic heroin self-administration desensitizes μ opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain, *J. Neurosci.* 20 (2000) 4555–4562.
- [57] N. Stella, P. Schweitzer, D. Piomelli, A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation, *Nature* 388 (1997) 773–778.
- [58] G. Tanda, P. Munzar, S.R. Goldberg, Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys, *Nat. Neurosci.* 3 (2000) 1073–1074.
- [59] I.T. Uzbay, S.E. Usanmaz, E.S. Akarsu, Effects of chronic ethanol administration on serotonin metabolism in various regions of the rat brain, *Neurochem. Res.* 25 (2000) 257–262.
- [60] E. Valjent, J.M. Mitchell, M.J. Besson, J. Caboche, R. Maldonado, Behavioural and biochemical evidence for interactions between Δ^9 -tetrahydrocannabinol and nicotine, *Br. J. Pharmacol.* 135 (2002) 564–578.
- [61] G. Vela, M. Ruiz-Gayo, J.A. Fuentes, Anandamide decreases naloxone-precipitated withdrawal signs in mice chronically treated with morphine, *Neuropharmacology* 34 (1995) 665–668.
- [62] G. Vela, S. Martín, L. García-Gil, J.A. Crespo, M. Ruiz-Gayo, J.J. Fernández-Ruiz, C. García-Lecumberri, D. Pelaprat, J.A. Fuentes, J.A. Ramos, E. Ambrosio, Maternal exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol facilitates morphine self-administration behavior and changes regional binding to central μ opioid receptors in adult offspring female rats, *Brain Res.* 807 (1998) 101–109.
- [63] D. Vigano, F. Fezza, M.G. Cascio, P. Massi, A. Vaccani, S. Romorini, V. Di Marzo, D. Parolaro, Reduction of endocannabinoid contents in several brain regions after chronic morphine treatment in rats. In: 2001 Symposium on the Cannabinoids, Burlington, VT. International Cannabinoid Research Society, 2001.
- [64] J.M. Walker, A.G. Hohmann, W.J. Martin, N.M. Strangman, S.M. Huang, K. Tsou, The neurobiology of cannabinoid analgesia, *Life Sci.* 65 (1999) 665–673.
- [65] S.S. Watkins, G.F. Koob, A. Markou, Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal, *Nicotine Tobacco Res.* 2 (2000) 19–37.
- [66] T. Yamamoto, K. Takada, Role of cannabinoid receptors in the brain as it relates to drug reward, *Jpn. J. Pharmacol.* 84 (2000) 229–236.