



T 615.9
BON
efe

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTOS DE LA EXPOSICION PERINATAL A THC
SOBRE EL DESARROLLO FETAL Y NEONATAL DE
LAS NEURONAS CATECOLAMINERGICAS**

Ana Bonnin Bioslada

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



Madrid, 1995

R. 24593



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID (SPAIN)

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

CERTIFICAN:

Que Ana Bonnin Bioslada, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: "Efectos de la exposición perinatal a THC sobre el desarrollo fetal y neonatal de las neuronas catecolaminérgicas", que presenta para la obtención del Título de Doctor en Ciencias Biológicas.

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

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a veintinueve de octubre de mil novecientos noventa y cinco.

Fdo: J. A. Ramos Atance

Fdo: J. J. Fernández Ruiz

ABREVIATURAS

ACTH	hormona adrenocorticotropa.
AMPC	adenosina monofosfato cíclico.
ATP	adenosina trifosfato.
B_{max}	densidad máxima de receptores.
CB1	receptor de cannabinoides central.
CB2	receptor de cannabinoides periférico.
CBD	cannabidiol.
CBN	cannabinol.
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario.
DA	dopamina.
DG	día gestacional.
DHBA	3,4 dihidroxibencilamina.
DMEM	medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DPN	día postnatal.
DTT	ditiotreitól.
ECH	extracto crudo de hachís.
EDTA	ácido etilendiaminotetracético.
EMEM	medio esencial mínimo de Eagle.
EEM	error estandar de la media.
FSH	hormona estimulante del folículo.
GABA	ácido γ -aminobutirato.
GH	hormona del crecimiento.
GTP	guanosin trifosfato.
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento.
5-HT	serotonina.
K_d	Constante de disociación.
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina.
LH	hormona luteinizante.
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.
NE	norepinefrina.
PBS	solución salina tamponada con fosfato.
³²P_i	fósforo inorgánico radiactivo.
PRL	prolactina.
RNA	ácido ribonucleico.
RNA_m	ácido ribonucleico mensajero.
SDS	dodecil sulfato sodico.
SFB	Suero fetal bovino.
SNC	Sistema Nervioso Central.
SNK	Student-Newman-Keuls.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina.
TH	tirosina hidroxilasa.
TH₄	DL-6-metil-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina.
THC	(-)- Δ^9 -tetrahidrocannabinol.

INTRODUCCION.	1
1. ASPECTOS GENERALES DE LOS CANNABINOIDES.	1
1.1. Principios activos de los preparados de <i>Cannabis sativa</i> .	1
1.1.1. Química de los cannabinoides.	
1.1.2. Requerimientos estructurales y estereoquímicos para la actividad cannabimimética.	
1.1.2.1. Requerimientos estructurales.	
1.1.2.2. Requerimientos estereoquímicos.	
1.2. Receptor de cannabinoides.	5
1.2.1. Localización anatomica.	
1.2.2. Mecanismos de transducción de señal.	
1.2.3. Clonaje del receptor de cannabinoides.	
1.2.4. Receptor periférico de cannabinoides.	
1.2.5. Antagonistas de los receptores de cannabinoides.	
1.3. Ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides.	10
1.3.1. Actividad farmacológica.	
1.3.2. Síntesis y degradación.	
1.3.3. Otras anandamidas.	
2. CANNABINOIDES Y NEUROTRANSMISION DOPAMINERGICA.	13
2.1. Cannabinoides y sistema nigroestriatal.	13
2.2. Cannabinoides y sistema mesolímbico.	14
2.3. Cannabinoides y sistema tuberoinfundibular.	15
3. EXPOSICION PERINATAL A CANNABINOIDES: EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO.	15
3.1. Generalidades sobre los cannabinoides y el desarrollo cerebral.	18
3.2. Ontogenia de las neuronas dopaminérgicas.	18
3.3. Importancia de las neuronas dopaminérgicas en el comportamiento adictivo y el desarrollo.	20
3.4. Efecto de los cannabinoides sobre el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas.	21
3.4.1. Dimorfismo sexual en los efectos perinatales de los cannabinoides.	
3.4.2. Presencia de receptores para cannabinoides durante el desarrollo.	
OBJETIVOS.	25

MATERIALES Y METODOS.	28
1. ANIMALES, TRATAMIENTOS Y RECOGIDA DE MUESTRAS.	28
1.1. Experimentos <i>in vivo</i> .	28
1.1.1. Seguimiento del ciclo estral.	
1.1.2. Control gestacional y lactacional.	
1.1.3. Tratamientos.	
1.1.4. Sacrificio y recogida de muestras.	
1.2. Experimentos <i>in vitro</i> .	30
2. DETERMINACION DE CATECOLAMINAS MEDIANTE HPLC.	32
3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TIROSINA HIDROXILASA MEDIANTE HPLC.	33
4. CUANTIFICACION DE TIROSINA HIDROXILASA.	34
4.1. Preparación de las muestras.	34
7.2. Análisis por "western blot".	35
5. CUANTIFICACION DEL RNA MENSAJERO DE TIROSINA HIDROXILASA.	36
5.1. Obtención y marcaje de la sonda de cDNA de TH.	36
5.2. Aislamiento de RNA total.	37
5.3. Análisis de "northern blot".	37
6. DETERMINACION DE LOS NIVELES PLASMATICOS DE THC MEDIANTE RADIOINMUNOANALISIS.	38
7. ANALISIS ESTADISTICOS.	38
RESULTADOS	40
1. VALIDACION DEL MODELO DE TRATAMIENTO.	40
2. ONTOGENIA DE LA NEUROTRANSMISION CATECOLAMINERGICA.	43
2.1. Ontogenia del RNA mensajero de TH.	43
2.2. Ontogenia de la cantidad total de TH.	44
2.3. Ontogenia de la actividad de TH.	45
2.4. Ontogenia de los contenidos de catecolaminas.	46

3. EFECTOS DE LA EXPOSICION PERINATAL A THC SOBRE EL DESARROLLO DE LOS SISTEMAS CATECOLAMINERGICOS.	48
3.1. Efectos en los días gestacionales 14 y 16.	48
3.1.1. Efecto sobre el RNA mensajero de TH.	
3.1.2. Efecto sobre la cantidad de TH.	
3.1.3. Efecto sobre la actividad de TH.	
3.1.4. Efecto sobre los contenidos de DA y NE.	
3.2. Efectos en el día gestacional 18.	53
3.3. Efectos en los días gestacional 21 y postnatales 1 y 5.	57
3.3.1. Efecto sobre el RNA mensajero de TH.	
3.3.2. Efectos sobre el resto de los parámetros.	
3.3.3. Efecto sobre los contenidos de DOPAC.	
4. EFECTOS DEL THC EN CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES DE EMBRION DE MESENCEFALO DE RATA.	71
4.1. Efecto del THC sobre la actividad de TH y los contenidos de DA.	71
4.2. Implicación del receptor de cannabinoides en los efectos del THC en células embrionarias.	72
DISCUSION	75
1. VALIDACION DEL MODELO DE TRATAMIENTO.	75
2. EFECTOS DE LA EXPOSICION PERINATAL A THC SOBRE EL DESARROLLO FETAL Y NEONATAL DE LA NEUROTRANSMISION CATECOLAMINERGICA.	77
2.1. Dimorfismo sexual en los efectos perinatales de los cannabinoides.	79
2.2. Implicación del receptor de cannabinoides en los efectos perinatales del THC.	81
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFIA	85

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1. ASPECTOS GENERALES DE LOS CANNABINOIDES.

Marihuana, hachís, charas, dagga, bhang y otros preparados de la planta *Cannabis sativa* L. están entre las drogas psicotrópicas de consumo más extendido en el mundo. Su uso en Occidente empieza alrededor de la mitad de este siglo, aunque se pueden encontrar datos sobre su utilización hace miles de años en otros países, sobre todo en China e India, con fines medicinales o en ceremonias religiosas y sociales (Mechoulam, 1986).

Los efectos producidos por esta droga en el hombre y los animales son únicos, y no pueden ser clasificados farmacológicamente como prioritariamente estimulantes, sedantes, tranquilizantes o alucinógenos aunque compartan propiedades de cada uno de estos efectos. No es un narcótico y comparado con otras drogas como opiáceos, barbitúricos, etc., no produce una típica situación de dependencia física aunque su consumo prolongado produce tolerancia y la retirada de la droga ciertos signos de abstinencia (Nahas, 1984; Dewey, 1986; Lemberger, 1980; Hollister, 1986; Tsou y cols., 1995). Son importantes sus aplicaciones como agente terapéutico en determinadas situaciones entre las que se incluyen analgesia, sedación, atenuación de la náusea y el vómito en tratamientos de cáncer por quimioterapia, estimulación del apetito, disminución de la motilidad intestinal en diarrea, acciones antirreumáticas y antipiréticas, disminución de la constricción bronquial en asma y disminución de la presión intraocular en glaucoma (Abood y Martin, 1992).

1.1. Principios activos de los preparados de *Cannabis sativa*.

La planta *Cannabis sativa* contiene cientos de diferentes entidades químicas de las cuales 60 ó más son cannabinoides (Turner y cols., 1980). El término cannabinoide se usa para describir un grupo de compuestos que se caracterizan por presentar una estructura carbocíclica de 21 carbonos, incluyendo a sus análogos y productos de transformación. Los cannabinoides son los responsables del poder psicoactivo de los diversos derivados de *Cannabis sativa* y no han sido aislados hasta ahora de ninguna otra especie vegetal o animal. Sin embargo, el término "cannabinoide" incluye actualmente a otro tipo de compuestos de origen no vegetal (ver tabla 1). Entre estos, se pueden considerar como cannabinoides una nueva serie de compuestos sintetizados en el laboratorio como el CP-55,940 o el levonantradol que corresponden al grupo de los cannabinoides bicíclicos y tricíclicos. Como compuestos cannabinoides aunque se debería decir cannabimiméticos están los aminoalquilindoles, como el WIN 55212-2. Y finalmente los ligandos endógenos del receptor de cannabinoides y sus antagonistas de los que se hablará posteriormente, pero que en nada semejan la estructura química de los clásicos cannabinoides derivados de la *Cannabis sativa*.

Tabla 1: Compuestos "cannabinoides".

- 1 - Cannabinoides bicíclicos y tricíclicos: derivados de *Cannabis sativa* (Δ^9 -THC), cannabinoides sintéticos (CP-55,940).
- 2 - Aminoalquilindoles (WIN 55212-2).
- 3 - Cannabinoides endógenos (anandamida).
- 4 - Antagonista del receptor CB1 (SR-141716A).

En el siguiente apartado nos referiremos básicamente al grupo de cannabinoides bicíclicos y tricíclicos, y en particular a los compuestos obtenidos de la planta *Cannabis sativa*, cuya modificación en el laboratorio ha permitido definir la relación estructura-actividad de estos compuestos.

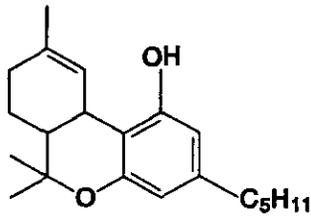
1.1.1. Química de los cannabinoides.

El principal componente psicoactivo de las preparaciones de cannabis es el (-)-delta-9-6a,10a-*trans*-tetrahidrocannabinol que normalmente se conoce como Δ^9 -THC o THC, y que ha sido ampliamente estudiado desde su aislamiento en 1964 (Gaoni y Mechoulam, 1964).

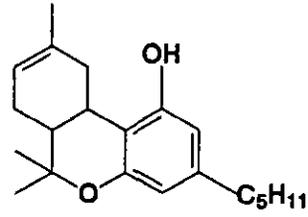
Además del Δ^9 -THC, otros cannabinoides abundantes en la mayoría de las preparaciones de la planta son el cannabinal (CBN), que ya fue identificado en los años 40 pero que en un principio se creyó que no era psicoactivo y del que se ha demostrado que tiene un décimo de la actividad del Δ^9 -THC, el cannabidiol (CBD) un cannabinoide prácticamente desprovisto de propiedades psicoactivas, y un isómero de Δ^9 -THC, el Δ^8 -THC. Debido a la gran cantidad de compuestos encontrados en las preparaciones del cannabis es muy posible que estos actúen sinérgicamente, aditivamente e incluso antagónicamente cuando se utiliza marihuana u otro preparado de la planta *Cannabis sativa* (Dewey, 1986).

Se han sintetizado análogos de los cannabinoides basados en la estructura del Δ^9 -THC, compuestos bicíclicos y tricíclicos algunos de los cuales son hasta 700 veces más potentes que el Δ^9 -THC, como el CP-55,940. Dentro de estos grupos cannabimiméticos sintetizados en el laboratorio habría que incluir como se ha dicho anteriormente, a los aminoalquilindoles, que como los cannabinoides tienen actividad analgésica y efectos motores (sedación y ataxia), y parece que realizan estos efectos a través de su unión al receptor de cannabinoides. Estos compuestos son estructuralmente diferentes al THC, consisten en un núcleo indol con una sustitución en el nitrógeno por un grupo aminoalquil y un grupo aromático en posición 3. Dentro de este grupo el WIN 55212-2 es un potente agonista (Figura 1).

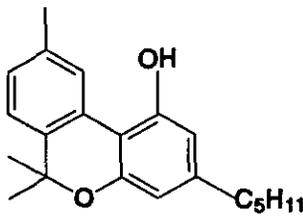
Figura 1: Cannabinoides más importantes.



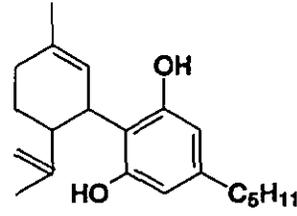
delta-9-THC



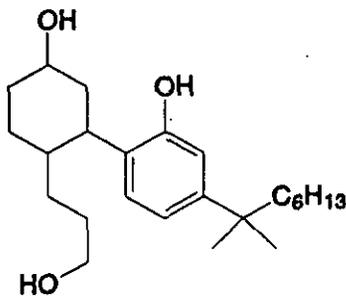
delta-8-THC



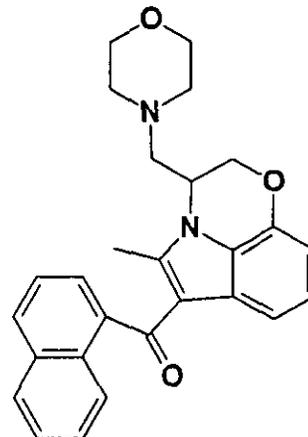
cannabinalol



cannabidiol



CP-55,940



WIN 55212-2

1.1.2. Requerimientos estructurales y estereoquímicos para la actividad cannabimimética.

Las actividades farmacológicas de los cannabinoides psicotrópicos están influenciadas significativamente por su estructura química. Pequeñas modificaciones en la molécula de un cannabinoide pueden provocar importantes cambios en las acciones de dicho cannabinoide sobre el organismo humano y sobre animales de experimentación. Se han descrito diversas pruebas para la valoración de los efectos psicotrópicos de los distintos cannabinoides. Las pruebas más usadas han sido realizadas en animales de experimentación, haciendo estudios de comportamiento y de discriminación de drogas (Razdan,

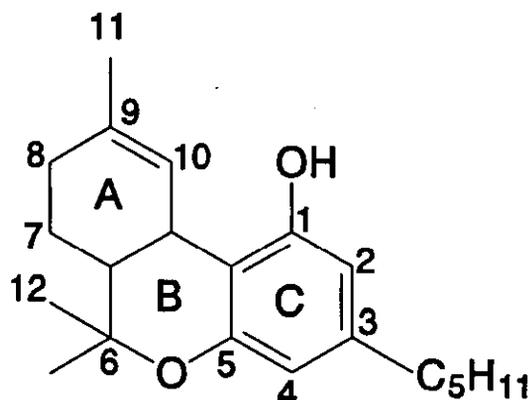
1986; Martin y cols., 1991, Mechoulam y cols., 1992). También hay ensayos realizados en humanos, aunque con un número limitado de cannabinoides, en los que se obtiene información de los requerimientos necesarios para la producción de un estado de euforia por los cannabinoides. Los resultados obtenidos sugieren que estos requerimientos son similares a los necesitados para la producción de cambios comportamentales en animales de experimentación (Razdan, 1986).

1.1.2.1. Requerimientos estructurales.

Basándose en estas pruebas se han podido describir las características estructurales más importantes para la actividad psicotrópica de un cannabinoide (Figura 2):

1. Un anillo aromático (anillo C) con la posición 1 sustituida (generalmente un hidroxilo) y con un grupo alquilo en posición 3. La potencia del Δ^9 -THC y otros cannabinoides depende de este grupo alquilo, encontrándose el máximo de potencia con la introducción de un resto dimetil-heptil-alquilo.
2. Un anillo (anillo A) generalmente no aromático de seis carbonos. La potencia del cannabinoide se reduce saturando el anillo, motivo por el cual el cannabinoide es menos potente que el Δ^9 -THC. La posición del doble enlace del anillo A parece ser crucial, aunque no es esencial para la actividad cannabimimética; la potencia del Δ^9 -THC es atenuada si este enlace se encuentra en las posiciones 8, 9 ó 6a, 10a en vez de 9, 10.
3. Muchos cannabinoides, incluyendo el Δ^9 -THC, también tienen un tercer anillo (anillo B) que normalmente es un anillo pirano y que se une al anillo A por las posiciones 6a y 10a y al anillo C por las posiciones 5 y 10b. La presencia del anillo B no parece esencial ya que han sido sintetizados muchos cannabinoides con actividad psicotrópica que contienen sólo los anillos A y C. Para que estos compuestos bicíclicos sean activos no deben contener más de un grupo OH situado en la posición 1 del anillo C (Mechoulam y cols., 1992).

Figura 2: Puntos clave en la estructura de un cannabinoide.



1.1.2.2. Requerimientos estereoquímicos.

La estereoquímica de la molécula también influye de manera importante en la actividad cannabimimética (Mechoulam y cols., 1992). Se ha comprobado que:

1. Los enantiómeros (-) de los cannabinoides son más potentes que los enantiómeros (+). Las diferencias en potencia que han sido observadas entre pares de enantiómeros varían de compuesto a compuesto. No está comprobado si esta variabilidad ocurre porque las moléculas de diferentes cannabinoides no tienen la misma rigidez conformacional y/o porque algunas de las muestras obtenidas de los isómeros menos activos (+) son menos puras que otras.
2. Los cannabinoides con un sustituyente en la posición 9 del anillo A son más potentes cuando el sustituyente es ecuatorial que cuando es axial.
3. Los cannabinoides que tienen anillos A y B tienen mucha mayor actividad cuando el doble enlace en la posición 6a, 10a está en *trans* que cuando está en *cis*.

1.2. Receptores para cannabinoides.

Hasta ahora se han descrito dos subtipos del receptor de cannabinoides, uno central (CB1) y otro periférico (CB2) y no se descarta que puedan aparecer más. El primero, CB1, se expresa en cerebro y el receptor CB2 se ha encontrado asociado a componentes del sistema inmune. De este último subtipo del receptor de cannabinoides existe poca información y nos referiremos a él más adelante.

Los cannabinoides son compuestos altamente lipofílicos que se unen con elevada afinidad a muchos materiales incluyendo el cristal, el plástico y el papel (Garrett y Hunt, 1974). Por ello, tienen un alto grado de unión no específica que tiende a enmascarar la presencia de los sitios de unión específicos para cannabinoides. Así, la investigación en el área de los cannabinoides ha dependido de los avances en el desarrollo de compuestos cannabimiméticos marcados, con alta afinidad por estos sitios. El primer cannabinoide de este tipo que se sintetizó fue el [³H]CP-55,940, que tiene una gran afinidad para los sitios de unión específicos y menos unión no específica que los cannabinoides "clásicos", y con el que se pudieron desarrollar ensayos de unión. Utilizando [³H]CP-55,940 en cortex de cerebro de rata, se encontró una única población de sitios de unión en donde el valor de K_d fue 133 pM y la B_{max} 1.85 pmol/mg de proteína (Devane y cols., 1988). Aunque estos sitios de unión específicos para [³H]CP-55,940 fueron detectados originariamente en fracciones P₂ de membranas de cerebro de rata, se han detectado después altas concentraciones en otras

preparaciones de cerebro de rata y en tejidos cerebrales de otras especies, como el hombre, el mono, el perro, el cobaya y el ratón (Herkenham y cols., 1990, 1991; Mailleux y cols., 1992a y 1992b).

Hay muchos datos experimentales que indican que estos sitios específicos de unión son los receptores funcionales de los cannabinoides:

1. Los sitios de unión para cannabinoides en cerebro son saturables a bajas concentraciones de [³H]CP-55,940 y muestran alta afinidad por este cannabinoide sintético (Devane y cols., 1988; Herkenham y cols., 1990 y 1991).
2. La unión del [³H]CP-55,940 es desplazada por un amplio rango de cannabinoides no marcados y este desplazamiento depende de la estructura química del compuesto (Devane y cols., 1988; Herkenham y cols., 1990 y 1991). Los cannabinoides además, muestran estereoselectividad en su habilidad para desplazar [³H]CP-55,940, ya que los enantiómeros (-) son mucho más efectivos que los enantiómeros (+) (Devane y cols., 1988; Howlett y cols., 1990; Herkenham y cols., 1990 y 1991). Estos requerimientos estructurales y geométricos para el desplazamiento de [³H]CP-55,940 de sus sitios de unión mimetizan los requerimientos para la producción de efectos cannabimiméticos tanto *in vivo* como *in vitro* (Herkenham y cols., 1990; Howlett y cols., 1990 y 1992; Martin y cols., 1991).
3. Howlett y cols. (Howlett y cols., 1992; Bidaut-Russell y cols., 1990) han estudiado de forma exhaustiva posibles ligandos para este receptor y han probado más de 100 ligandos para receptores clásicos (incluyendo péptidos, aminoácidos, eicosanoides, esteroides y ligandos de receptores adrenérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos o serotoninérgicos) viendo que ninguno de ellos desplaza al [³H]CP-55,940 de sus sitios de unión en cerebro de rata, lo que indica el alto grado de selectividad que estos sitios de unión tienen por los cannabinoides.
4. Además, las áreas cerebrales donde se han encontrado en altas concentraciones estos sitios de unión específicos para cannabinoides son precisamente las zonas donde se cree que los cannabinoides psicotrópicos ejercen muchos de sus efectos característicos, como sus efectos en la percepción, el aprendizaje, la memoria a corto plazo (cortex cerebral e hipocampo), el control de la actividad motora (ganglios basales y cerebelo). Esto apoya la idea de que los sitios específicos a los que se une el [³H]CP-55,940 son los sitios de reconocimiento de los receptores funcionales de los cannabinoides (Bidaut-Russell y cols., 1990; Herkenham y cols., 1990 y 1991; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992a).

1.2.1. Localización anatómica.

La distribución anatómica del receptor de cannabinoides en cerebro ha sido estudiada por autorradiografía con [³H]CP-55940 (Herkenham y cols., 1990 y 1991). Estos estudios revelan que este receptor se distribuye de una manera heterogénea en el cerebro, existiendo un único patrón de unión conservado en muchas especies de mamíferos, incluyendo humanos (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992a). Este patrón de distribución presenta una gran abundancia de sitios de unión para [³H]CP-55,940 en los núcleos de proyección de los ganglios basales (*globus pallidus* y *substantia nigra pars reticulata*), en el hipocampo (estrato molecular del *gyrus dentatus*, y región CA3 del asta de Ammón) y en el cerebelo (estrato molecular). Otras zonas de alta densidad de receptores son los estratos más internos del bulbo olfatorio, el caudado-putamen lateral y el núcleo entopeduncular. El córtex cerebral presenta una densidad de receptores moderada. La médula espinal y el tronco cerebral carecen prácticamente de receptores.

1.2.2. Mecanismos de transducción de señal.

El receptor para cannabinoides es miembro de la familia de receptores ligados a proteínas G, y está acoplado a la adenilato ciclasa y/o canales de calcio tipo N dependientes de voltaje a través de proteínas G_i y G_o respectivamente, implicando AMP cíclico y calcio como segundos mensajeros de los receptores de cannabinoides. Los datos experimentales en los que se basa esta afirmación son los siguientes:

1. El receptor de cannabinoides ha sido clonado y la proteína para la que codifica su cDNA tiene características similares a las de la familia de receptores ligados a proteínas G. Hay muchos residuos que están altamente conservados en esta familia, información para siete dominios transmembrana y numerosos sitios potenciales de glicosilación (Gérard y cols., 1991; Matsuda y cols., 1990).
2. La unión del [³H]CP-55,940 en cerebro disminuye marcadamente en presencia de análogos no hidrolizables del GTP (Devane y cols., 1988; Herkenham y cols., 1990 y 1991), característica típica de receptores acoplados a proteínas G.
3. Los cannabinoides atenúan la habilidad de la forskolina y de otros compuestos de estimular la producción de AMPc, siendo este efecto inhibitorio dependiente de su concentración. Esto se ha observado en preparaciones *in vitro* de células de neuroblastoma intactas, en membranas de estas células, (Howlett y cols., 1984a, 1984b y 1986), en células de ovario de hamster chino (CHO) transfectadas con el cDNA del receptor de cannabinoides de rata o humano (Felder y cols., 1992; Gérard y cols., 1991; Matsuda y col., 1991) y en cortes de cortex cerebral, hipocampo, cerebelo y

estriado de rata (Bidaut-Russell y cols., 1990 y 1991).

4. Tratamientos con toxina de pertussis, tanto *in vivo* como *in vitro*, bloquean la acción de los cannabinoides, lo que indica que su receptor debe estar acoplado a la adenilato ciclasa mediante una proteína G_i (Bidaut-Russell y cols., 1990; Howlett y cols., 1986 y 1992.).
5. Los cannabinoides no interaccionan directamente con la adenilato ciclasa ni aceleran el catabolismo del AMPc (Howlett y cols., 1984b, 1985 y 1986) lo que apoya la hipótesis de que el efecto inhibitorio de los cannabinoides sobre la producción de AMPc está mediado por proteínas G_i .
6. Recientemente se ha observado que en cultivos celulares (Caulfield y cols., 1992; Mackie y Hille, 1992) los cannabinoides inhiben los canales de calcio tipo N, reduciendo la concentración de Ca^{2+} intraneuronal. Los experimentos llevados a cabo con toxina de pertussis indican que este efecto de los cannabinoides puede ser mediado por una proteína G, posiblemente la G_o (Caulfield y cols., 1992; Mackie y Hille, 1992).

1.2.3. Clonaje del receptor de cannabinoides.

Han sido aislados los cDNAs que codifican para el receptor de cannabinoides en rata de una librería de cDNAs de cortex cerebral (Matsuda y cols., 1990), y en humanos, de librerías de cDNAs de tronco cerebral y testículos (Gérard y cols., 1990 y 1991). Las secuencias nucleotídicas de los cDNAs humano y de rata son idénticas en un 90%, y las secuencias de aminoácidos esperadas para sus productos proteícos lo son en un 98% (Gérard y cols., 1990 y 1991). Estas proteínas tienen características similares a las de la familia de receptores ligados a proteínas G. Se encuentran muchos residuos que están altamente conservados en esta familia, información para siete dominios transmembrana y numerosos sitios potenciales de glicosilación. La secuencia del cDNA del receptor de cannabinoides difiere de la de otros receptores conocidos y se observa que en experimentos con células transfectadas con este cDNA los cannabinoides pueden ejercer sus efectos, lo que prueba que este cDNA aislado de rata y humano codifica para el receptor de cannabinoides. Además, el gen se ha localizado en la región q14-q15 del cromosoma 6 (Caenazzo y cols., 1991; Hoeche y cols., 1991).

1.2.4. Receptor periférico de cannabinoides.

Recientemente se ha clonado un receptor de cannabinoides periférico denominado CB2 que se expresa en células de mieloma (Munro y cols., 1993) La proteína que se deduce de la secuencia de este cDNA tiene un 44% de homología con el receptor humano de cannabinoides cerebral, denominado CB1,

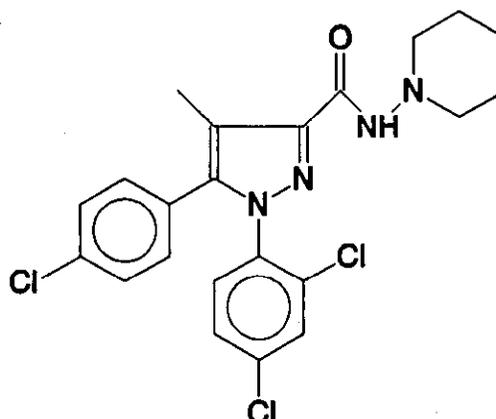
y esta homología llega al 68% cuando se estudian los residuos aminoacídicos propuestos para conferir especificidad de ligando en los dominios transmembrana.

Cuantificando el RNA de varios tejidos por técnicas de "northern blot" se observa que este subtipo del receptor de cannabinoides está presente en la población macrófago/monocito del bazo, pero no en cerebro, y con hibridación *in situ* se ha demostrado que el RNA mensajero del receptor de cannabinoides está concentrado en las zonas marginales del bazo. Usando autorradiografía se ha encontrado una distribución similar del receptor periférico de cannabinoides (Herkenham y cols., 1994). En un estudio de más de 60 tejidos de rata no neuronales, los niveles más altos de unión de [³H]CP-55,940 se observaron en la zona marginal del bazo. También se encontraron receptores en el cortex de los nódulos linfáticos, la corona de las placas de Peyer y en frotis de sangre enriquecida en leucocitos. Así, el receptor de cannabinoides periférico parece estar limitado al sistema inmune. Entre las implicaciones terapéuticas relacionadas con el receptor periférico de cannabinoides estarían el desarrollo de antiinflamatorios y compuestos inmunosupresores (Facci y cols., 1995). El hecho de que el receptor periférico y el de cerebro tengan tan baja homología y sus relaciones estructura-actividad sean diferentes (el CBN se une al CB2 con la misma afinidad que el THC) sugiere el posible desarrollo de drogas selectivas para cada subtipo del receptor de cannabinoides. Recientemente se ha descrito que este receptor está acoplado a la adenilato ciclasa vía una proteína G sensible a toxina de pertussis (Slipetz y cols., 1995).

1.2.5. Antagonistas del receptor de cannabinoides.

Ha sido descrito recientemente un compuesto que actúa como antagonista del receptor de cannabinoides cerebral CB1 (Figura 5) (Rinaldi-Carmona y cols., 1994). Este compuesto, SR141716A, antagoniza los efectos farmacológicos inducidos por los compuestos cannabimiméticos y el ligando endógeno anandamida, es específico del receptor CB1 e interacciona con el receptor clonado.

Figura 3: Antagonista del receptor de cannabinoides, SR141716A.



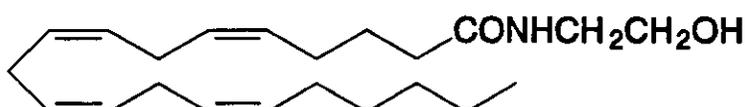
In vitro, el SR141716A desplaza al [³H]CP-55,940 unido en preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata y en membranas de células CHO expresando el CB1, de forma dependiente de concentración. Además atenúa la disminución producida por cannabinoides de la contracción inducida eléctricamente del vaso deferente del ratón. *In vivo* antagoniza de una manera potente y dosis dependiente los efectos comportamentales producidos por el WIN 55212,2. Ultimamente Makriyannis y cols. han desarrollado un nuevo compuesto antagonista del receptor de cannabinoides más potente que el SR141716A (Makriyannis y cols., datos no publicados).

1.3. Ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides.

Un paso evidente desde el momento en que se descubrieron los receptores de cannabinoides ha sido la búsqueda de un ligando endógeno para este receptor. La situación es similar a la que se produjo en la década de los 70 con la descripción de los receptores para opiáceos como la morfina, y el posterior descubrimiento de los péptidos opiáceos endógenos. Varios grupos están trabajando en la búsqueda de los posible ligandos del receptor de cannabinoides. En el grupo de Howlett han buscado este compuesto basándose en la premisa de que un ligando para un receptor endógeno debe tener las propiedades de un neuromodulador y ser almacenado en vesículas dentro de las células. Observaron que la adición del ionóforo de calcio A-23187 en secciones de cerebro de rata causa la liberación de un factor que inhibe la unión de [³H]CP-55,940 al receptor de cannabinoides. Este compuesto liberado es insensible al calentamiento y a pH ácido, lo que sugiere que es de naturaleza peptídica, pero esta sustancia todavía no ha sido ni identificada ni caracterizada (Evans y cols., 1994).

El grupo de Mechoulam comenzó la búsqueda de ligandos endógenos analizando la capacidad de distintas fracciones de cerebro para desplazar un agonista del receptor de cannabinoides. Como resultado de este trabajo purificaron una sustancia de cerebro de cerdo que podría actuar como ligando endógeno para el receptor de cannabinoides (Devane y cols., 1992). Esta sustancia se une al receptor de cannabinoides desplazando al agonista cannabimimético HU-243 en preparaciones de sinaptosomas y produce, al igual que los cannabinoides, una inhibición de la contracción inducida eléctricamente del vaso deferente del ratón y de forma dependiente de concentración. La estructura de esta sustancia se ha determinado por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear y confirmado por síntesis química. Se ha identificado como araquidoniletanolamida y se le ha llamado anandamida (de la palabra sánscrita "ananda" que significa embeleso, arrobamiento).

Figura 4: Anandamida.



1.3.1. Actividad farmacológica.

La anandamida produce muchos de los efectos farmacológicos causados por los cannabinoides psicotrópicos. Además de desplazar la unión de agonistas cannabimiméticos marcados en membranas de cerebro y de inhibir la contracción inducida electricamente del vaso deferente del ratón se ha comprobado que la anandamida activa los mecanismos moleculares acoplados al receptor de cannabinoides. En estudios con células transfectadas se demuestra que la anandamida interacciona específicamente con el receptor de cannabinoides CB1 produciendo efectos similares a los del THC. Así, en células expresando transitoriamente (células COS) (Vogel y cols., 1993) o de forma estable (células CHO) el receptor de cannabinoides CB1 (Felder y cols., 1993), la anandamida muestra unión específica e inhibe la estimulación de la adenilato ciclasa producida por forskolina, siendo esta inhibición bloqueada por toxina de pertussis. Estas propiedades funcionales son similares a las del THC y los agonistas cannabimiméticos y no se encuentran en células no transfectadas. La anandamida se une *in vitro* al receptor de cannabinoides CB2, aunque dado que su síntesis se localiza únicamente en cerebro es difícil que se una también *in vivo*. La anandamida inhibe la corriente de calcio vía canales tipo N (Mackie y Devane, 1993) y la unión de antagonistas de canales de calcio (Johnson y cols., 1993) según se ha visto con estudios de "patch-clamp" en células de neuroblastoma N18. La anandamida produce muchos de los efectos comportamentales causados por los cannabinoides en ratas (Romero y cols., 1994a) y ratones (Fride y Mechoulam, 1993; Crawley y cols., 1993), como catalepsia, hipotermia, analgesia y actividad motora reducida en test de campo abierto. Además se ha comprobado que es capaz de inhibir la liberación de PRL (Romero y cols., 1994b) y estimular la secreción de ACTH (Weidenfeld y cols., 1994).

1.3.2. Síntesis y degradación.

Se han propuesto dos mecanismos completamente diferentes de síntesis de anandamida. Uno de los mecanismos sugiere que la anandamida se forma por condensación de etanolamina y ácido araquidónico aunque se requieren altas concentraciones de ambos compuestos (Devane y cols., 1994). Esta síntesis sería independiente de ATP y CoA (Kruska y cols., 1994). El otro mecanismo es el descrito recientemente por Di Marzo y cols. (1994) Estos autores proponen que la anandamida se sintetiza por la ruptura de un precursor fosfolípido, araquidonilfosfatidiletanolamina (APE) por fosfolipasas, probablemente fosfolipasa D, y que la síntesis por condensación no es posible en condiciones basales por los bajos niveles existentes en la célula de etanolamina y ácido araquidónico. La anandamida sólo se produce en las neuronas y tras su síntesis se libera al medio externo donde es inactivada por un mecanismo de recaptación rápido, selectivo y saturable. La anandamida captada por las células no se acumula sino que se convierte rápidamente en ácido araquidónico (que se incorpora en otros lípidos) y etanolamina, lo que indica la presencia de una actividad amidohidrolasa (Deutsch y Chin, 1993). Esta actividad amidohidrolasa

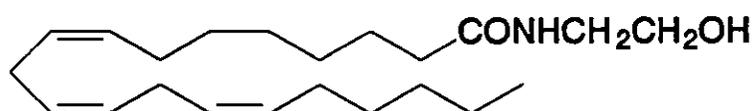
está discretamente distribuida en el SNC de la rata y es abundante en regiones ricas en receptores de cannabinoides (Desarnaud y cols., 1995)

1.3.3. Otras anandamidas.

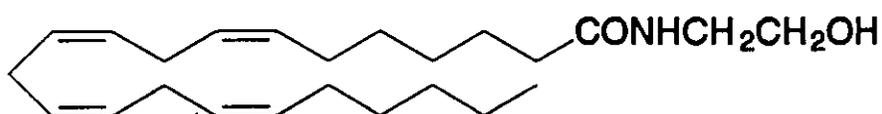
La anandamida podría ser sólo uno de los representantes de una familia más amplia de compuestos, etanolamidas derivadas de ácidos grasos poli-insaturados que se unen al receptor de cannabinoides. Hanus y cols. (1993) han encontrado otras etanolamidas derivadas de ácidos grasos insaturados, la homo- γ -linoleniletanolamida, anandamida (20:3,n-6), y la 7,10,13,16,-docosatetraeniletanolamida, anandamida (22:4, n-6), que están presentes en cerebro, y que al igual que la anandamida inhiben la unión específica del agonista cannabimimético HU-243 a membranas de sinaptosomas e inhiben la producción de AMPc. Estos dos compuestos también inhiben la contracción del vaso deferente del ratón, encontrándose tolerancia cuando esta inhibición se estudia en animales pretratados con THC (Pertwee y cols., 1994).

Recientemente se ha aislado otro compuesto, un monoglicérido, el 2-araquidonilglicerol (2-Ara-Gl), que se une al CB1 y al CB2 *in vitro*, pero por su localización es difícil que lo haga también *in vivo*. Este compuesto se ha aislado de intestino y no está presente en cerebro. En presencia de forskolina, 2-Ara-Gl inhibe la adenilato ciclasa en células de bazo de ratón con la misma potencia que el Δ^9 -THC (Mechoulam, 1995).

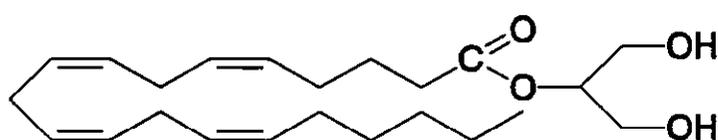
Figura 5: Otras anandamidas.



Homo- γ -linoleniletanolamida



7,10,13,16-docosatetraeniletanolamida



2-araquidonilglicerol

2. CANNABINOIDES Y NEUROTRANSMISION DOPAMINERGICA.

Entre los múltiples efectos que el consumo de preparados de *Cannabis sativa* produce sobre el organismo se encuentran cambios a nivel endocrino, alteraciones del metabolismo, déficits inmunológicos y otros. Sin embargo, sus efectos más importantes se producen sobre el sistema nervioso. El tratamiento de animales de experimentación con cannabinoides produce múltiples efectos en diversos neurotransmisores y neuromoduladores del SNC (Pertwee, 1992). Así, después de la administración aguda o crónica de marihuana o THC a animales de experimentación se han encontrado modificaciones en varios índices bioquímicos (concentración, recambio, biosíntesis, número y afinidad de los receptores para estos neurotransmisores) que reflejan la actividad de la neurotransmisión catecolaminérgica, serotoninérgica, colinérgica y GABAérgica. Una de los principales neurotransmisores afectados por la acción de los cannabinoides es la dopamina. Varios datos apoyan esta afirmación:

- Los receptores para cannabinoides se encuentran ampliamente distribuidos en las áreas cerebrales más ricas en neuronas dopaminérgicas. Entre ellas hay que destacar los ganglios basales, el hipotálamo y el área tegmental ventral del mesencéfalo (Herkenham y cols., 1990).

- El consumo de marihuana en humanos y el tratamiento con cannabinoides en animales de experimentación afectan procesos neurobiológicos en los que la inervación dopaminérgica juega un papel importante. Los cannabinoides modifican el control motor (Conti y Musty, 1984) y producen cambios en la liberación de hormonas de la adenohipófisis (Murphy y cols., 1990). También potencian los procesos de recompensa cerebral (Lepore y cols., 1995) y producen exacerbación de algunos desórdenes psiquiátricos (Andreasson y cols., 1987). Los tres sistemas dopaminérgicos más importantes parecen estar implicados en estos efectos.

2.1. Cannabinoides y sistema nigroestriatal.

Algunos estudios clínicos han demostrado que el consumo de marihuana produce alteraciones de la motilidad extrapiramidal en individuos sanos. Este efecto ha sido objeto de investigación clínica por su posible aplicación terapéutica en algunos desórdenes motores, como la enfermedad de Parkinson o el corea de Huntington, en los que los cannabinoides podrían producir efectos antidistónicos.

El sitio de acción de estos efectos extrapiramidales parece ser las neuronas nigroestriatales dopaminérgicas. Se ha descrito que el THC produce inhibición de la actividad de estas neuronas, disminución de la actividad motora y de las conductas estereotipadas y aumento del tiempo de inactividad en ratas (Navarro y cols., 1993a; Romero y cols., 1995a). También se han encontrado resultados similares en experimentos realizados en desarrollo, cuando el THC se administró

perinatalmente (Navarro y cols., 1994). La anandamida, ligando endógeno del receptor de cannabinoides, también produce una inhibición de la actividad inhibitoria motora (Fride y Mechoulam, 1993; Crawley y cols., 1993; Smith y cols., 1994). Sin embargo, bajas dosis de anandamida o de otros cannabimiméticos incrementan la actividad motora en ratones (Souilhac y cols., 1995). Esto se confirma con resultados de Fride y cols. (1995), estos autores reducen los efectos farmacológicos del THC administrando dosis bajas de anandamida que por sí solas no producen ningún efecto.

En nuestro laboratorio se ha observado recientemente que la anandamida inhibe la actividad motora y los comportamientos estereotipados de manera dosis dependiente (Romero y cols., 1995a) y hemos realizado una cinética de tiempos de este efecto (Romero y cols., 1995b). Aunque en ambos estudios se observó junto con la inhibición motora un descenso en la actividad de TH en estriado, lo que indica una disminución en la actividad dopaminérgica nigroestriatal, estudios recientes indican que la primera diana de acción de los efectos extrapiramidales de los cannabinoides son las neuronas GABAérgicas estriatonigrales y estriatopalidales. Además estos efectos sobre las neuronas GABAérgicas parecen mediados por los receptores GABA-B, ya que la inhibición motora causada por los cannabinoides se atenúa al bloquear estos receptores (Romero y cols., datos no publicados).

2.2. Cannabinoides y sistema mesolímbico.

El abuso crónico de cannabinoides puede incrementar la incidencia de diversos síndromes psiquiátricos (Andreasson y cols., 1987). Observaciones clínicas han mostrado la existencia de un antagonismo entre el consumo de cannabinoides y el tratamiento con neurolepticos en pacientes esquizofrénicos, lo que podría producir una exacerbación de los síntomas de la enfermedad (Knudsen y Vilmar, 1984). Este hecho parece indicar que los efectos psiquiátricos de los cannabinoides se relacionan con alteraciones en la actividad de las neuronas dopaminérgicas en el área límbica. En animales de experimentación se ha podido ratificar esta hipótesis. La administración de THC a ratas va seguida de un incremento en la velocidad de disparo de las neuronas dopaminérgicas (Levenson y French, 1990), en el contenido de ácido homovanílico en el cortex prefrontal y el tubérculo olfatorio (Bowers y Hoffman, 1986) y de DOPAC, DA y número de receptores D₁ en el área límbica anterior (Navarro y cols., 1993). Además, Chen y cols. (1990) han encontrado que el THC aumenta la liberación de DA, medida por microdiálisis *in vivo*, en *nucleus accumbens*. Estos efectos neuroquímicos se acompañan de modificaciones a nivel comportamental, como facilitación de los procesos de recompensa cerebral (Gardner y cols., 1988), disminución de la motivación sexual e incremento de la emocionalidad y del comportamiento agresivo (Navarro y cols., 1993b).

2.3. Cannabinoides y sistema tuberoinfundibular.

La administración de THC produce una marcada alteración en la liberación de hormonas por la adenohipófisis. Este cannabinoide disminuye la secreción de PRL, GH, FSH y LH e incrementa la liberación de ACTH (Murphy y cols., 1990). La disminución de PRL es uno de los efectos más característicos, estudiado tanto en adultos (Murphy y cols., 1990) como en animales inmaduros (Fernández-Ruiz y cols., 1992). Estos efectos parecen ser ocasionados principalmente como consecuencia de alteraciones inducidas por el THC en la actividad de neurotransmisores hipotalámicos, como 5-HT (Kramer y Ben-David, 1978) y DA (Fernández-Ruiz y cols., 1992b). Recientemente se ha encontrado en nuestro laboratorio que la anandamida también es capaz de inhibir la secreción de PRL, probablemente vía estimulación de la actividad tuberoinfundibular (Romero y cols., 1994b).

3. EXPOSICION PERINATAL A CANNABINOIDES: EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO

La mayor parte de los estudios acerca de los efectos psicoactivos de la marihuana sobre la neurotransmisión cerebral se ha realizado en edad adulta, edad a la que corresponde el mayor índice de consumo de derivados de *Cannabis sativa* entre la población humana. Sin embargo, son aún bastante desconocidas las alteraciones producidas por la exposición a cannabinoides, y en particular a THC, durante el desarrollo, cuando la madre consume la droga durante los periodos de gestación y lactancia.

Los cannabinoides causan modificaciones en todas las fases de la reproducción y el desarrollo, afectando a ambos sexos y a todas las especies estudiadas. Las acciones ejercidas por los cannabinoides sobre el desarrollo pueden ocurrir en tres etapas diferentes:

1. Exposición preconcepcional: La exposición a cannabinoides daña la gametogénesis e inhibe la fertilización.

En machos la administración de THC o marihuana produce una disminución del tamaño testicular. También se han encontrado formas anormales entre los espermatozoides, así como descensos en el número total de éstos y en su movilidad (Nahas y Frick, 1986). La exposición de ratones machos a THC se asocia con alteraciones en el desarrollo de la progenie, lo que se corrobora por la presencia frecuente de alteraciones cromosómicas en los gametos (Dalterio y cols., 1982). Además, recientemente se ha descrito que el THC y la anandamida reducen la capacidad de fertilización de los espermatozoides del erizo de mar, estos compuestos actuarían bloqueando la apertura de los canales iónicos que provocan la iniciación de la reacción del acrosoma (Schuel y cols., 1994). Estos efectos podrían ser originados bien por efectos directos del THC sobre la gónada, ya que el receptor CB1 ha sido descrito en espermatozoides (Schuel y cols.,

530169034

1994) y en testículo humano (Gérard y cols., 1991), bien por acciones indirectas que causan modificaciones en el eje hipotálamo-adenohipófisis-gónada.

En las hembras, la exposición preconcepcional a THC produce un efecto gametotóxico, con alteración de los ciclos ováricos y por la aparición de una mayor incidencia de ovocitos fertilizados anormales, lo que supondría un efecto adverso sobre los primeros estadios del desarrollo embrionario (Nahas y Frick, 1986). Recientemente, Das y cols. (1995) han descrito la presencia del receptor CB1 funcional en útero de ratones y capacidad de este órgano para sintetizar el ligando endógeno del receptor de cannabinoides, la anandamida.

2. Exposición prenatal: La exposición a cannabinoides durante el periodo prenatal afecta la organogénesis embrionaria. Los cannabinoides pueden cruzar la barrera placentaria y almacenarse en el feto. La droga se deposita en el saco vitelino, los tejidos fetales y el líquido amniótico, y la degradación en feto y placenta es más lenta que en la madre lo que prolonga la exposición a la droga (Blackyard y cols., 1984).

Como en el caso de otras drogas que atraviesan la placenta, se ha descrito que los cannabinoides producen embriotoxicidad, fetotoxicidad y teratogenicidad. La incidencia de cualquiera de estos tres efectos depende de muchas variables como el momento en que se administra la droga y la duración del tratamiento, la dosis, la ruta de administración, el tipo de la preparación de cannabis, y en el hamster la estación en la que los experimentos son llevados a cabo (Nahas y Frick, 1986). Además, se ha observado un incremento dosis-dependiente en la aparición de estos efectos en todas las especies observadas.

Embriotoxicidad: Se ha descrito un aumento de la reabsorción embrionaria, probablemente asociado a alteraciones de la circulación feto-placentaria.

Fetotoxicidad: La administración prenatal de cannabinoides produce un retraso en el crecimiento del feto, pesos fetales más bajos y un mayor número de muertes.

Teratogenicidad: A altas dosis los cannabinoides son claramente teratogénicos. Las lesiones descritas más frecuentemente son anencefalia y fisura del paladar, así como alteraciones en el desarrollo dental y maxilar. En algunos casos semejan las del síndrome alcohólico fetal.

Los mecanismos por los que los cannabinoides producen estos efectos adversos durante el desarrollo gestacional son todavía desconocidos. Pero recientemente, se ha descrito la presencia de RNA mensajero de los receptores CB1 y CB2 en estadios muy tempranos del desarrollo en embriones de ratón y la capacidad de los agonistas cannabimiméticos para inhibir la preimplantación de embriones en desarrollo de forma dosis-dependiente (Paria y cols., 1995). Este tema se volverá a tratar este tema posteriormente.

3. Exposición postnatal: Los cannabinoides pueden ser transferidos de la madre a las crías mediante la leche materna durante la lactancia (Pérez-Reyes y cols., 1982) y así causar modificaciones, como retrasos en el desarrollo, disminución del peso corporal, alteraciones del eje adenohipófisis-gónada (Walters y cols., 1986) y de la conducta reproductiva (Dalterio y cols., 1984b), déficits en la capacidad de aprendizaje y retrasos en la aparición de reflejos visuales (Nahas y Frick, 1986).

La alteración de la función reproductora es uno de los efectos más característicos producidos por la exposición postnatal a cannabinoides (Albert y Solomon, 1984; Dalterio y cols., 1984). Por ejemplo, hembras expuestas a THC durante los primeros días después del nacimiento muestran retrasos en la apertura vaginal (Wenger y cols., 1988; Fernández-Ruiz y cols., 1992), una alta frecuencia de ciclos ováricos irregulares, un descenso del número de ovocitos madurados por ciclo y bajos niveles de gonadotropinas en plasma (Field y cols., 1990). Estos efectos en la función reproductiva han sido relacionados con la alteración de la funcionalidad de muchos neurotransmisores diencefálicos, como met-enkefalina, β -endorfina, y sustancia P, que a través de modificaciones en la liberación de LHRH del hipotálamo medio basal, modulan la liberación de gonadotropinas (Kumar y cols., 1986 y 1990).

Por último, dos aspectos interesantes a considerar antes de revisar los efectos que los cannabinoides producen sobre el desarrollo cerebral, serían:

1. Hay que tener en cuenta la toxicidad maternal que pueden producir los cannabinoides al evaluar los experimentos de administración perinatal de drogas. La administración de los cannabinoides puede producir en la madre una inhibición de la toma de comida y agua, alterar su comportamiento y afectar la función endocrina lo que también afectaría a las crías en desarrollo (Dalterio, 1986). Se ha descrito que el THC aumenta el canibalismo en ratones. También se alteran comportamientos maternos como la recogida de las crías o el tiempo pasado en el nido. Además, existen muchos trabajos que describen disminuciones de la producción de leche de la madre inducidas por los cannabinoides, lo que podría ocasionar déficits nutricionales en las crías en desarrollo (Tyrey y Murphy, 1988).

2. La mayoría de estos estudios experimentales sobre los efectos de la exposición perinatal a cannabinoides se han llevado a cabo en roedores, pero se corresponden con los estudios realizados en humanos. Estos estudios demuestran la existencia de una serie de alteraciones comportamentales en niños de hasta 9 años de edad debidas al consumo de marihuana por las madres durante la gestación y la lactancia (Fried, 1995).

3.1. Generalidades sobre los cannabinoides y el desarrollo cerebral.

El cerebro es una de las dianas más importantes de la acción perinatal de los cannabinoides. Estos pueden ser transferidos de la madre a las crías durante la gestación (Blackyard y cols., 1984) y la lactancia (Pérez-Reyes y cols., 1982) y alcanzar el cerebro fetal y neonatal en cantidades importantes, debido a la inmadurez de la barrera hematoencefálica en estos estadios del desarrollo. Así, cuando se administran perinatalmente, los cannabinoides pueden afectar al desarrollo y la diferenciación del SNC. De hecho, muchos estudios han demostrado que se pueden producir alteraciones en el desarrollo normal de los sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores cerebrales tras la exposición perinatal a cannabinoides (Mirmiran y Swaab, 1987).

Entre estas alteraciones se han descrito cambios en la funcionalidad del sistema opioide endógeno. Los contenidos de β -endorfinas y de metionina-encefalina se incrementan en muchas áreas cerebrales en ratas machos expuestas postnatalmente a bajas dosis de THC (Kumar y cols., 1990). Vela y cols. han descrito recientemente cambios a corto y largo plazo en la percepción del dolor y la sensibilidad a drogas opiáceas en ratas que han sido expuestas perinatalmente a cannabinoides. Las ratas machos que habían sido expuestas a la droga perinatalmente mostraron más resistencia en el test de la placa caliente tanto a edades neonatales como juveniles. Y estas mismas ratas mostraron menos sensibilidad al efecto analgésico de la morfina en la edad adulta, mientras que las hembras no fueron afectadas en ninguna de las tres edades. Además, la administración de antagonistas opioides a ratas inmaduras tratadas perinatalmente con THC provocó síntomas clásicos del síndrome de abstinencia a opiáceos (Vela y cols., 1995).

La exposición perinatal a cannabinoides también altera la actividad dopaminérgica que es objeto de estudio en esta tesis doctoral. Antes de discutir los efectos de los cannabinoides sobre las neuronas dopaminérgicas en desarrollo, haremos un breve resumen sobre la ontogenia de estas neuronas y su importancia en el desarrollo.

3.2. Ontogenia de las neuronas dopaminérgicas.

En el desarrollo del SNC se pueden distinguir cuatro procesos diferentes que normalmente se superponen durante el desarrollo:

Neurogénesis, que es un proceso que mayoritariamente se produce en la etapa prenatal temprana, aunque todavía se observa nacimiento de neuronas en etapas muy avanzadas del desarrollo postnatal.

Migración.

Formación de contactos, entre lo que se puede incluir el crecimiento de los axones que comienzan antes de que la célula haya dejado de migrar, y la sinaptogénesis que empieza tan pronto como los axones alcanzan las células postsinápticas y se sigue produciendo en la vida postnatal.

Y **mielinización**, que en la rata comienza después del periodo de proliferación y migración y sigue después del nacimiento.

Los neurotransmisores y neuromoduladores tienen una función trófica en el desarrollo. Aumentos o disminuciones de estos mensajeros químicos pueden producir alteraciones en el desarrollo normal de los procesos antes descritos. Las neuronas monoaminérgicas aparecen temprano en el curso del desarrollo del SNC y tienen gran importancia en la regulación de estos procesos.

La tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de las catecolaminas, se detecta en estadios tempranos del desarrollo prenatal. Las neuronas TH-positivas se detectan por primera vez, por inmunohistoquímica, en el día gestacional 12 (Specht y cols., 1981a) en conos de crecimiento de neuronas inmaduras que ya han completado su proceso de mitosis, pero que todavía están migrando. La actividad de esta enzima y la presencia de su neurotransmisor DA se detectan en el día gestacional 14 (Foster y cols., 1987), también antes de la completa maduración del sistema dopaminérgico. También se ha descrito la presencia de receptores funcionales de DA en estados muy tempranos del desarrollo, aunque el RNA mensajero de estos receptores se puede detectar mucho antes por técnicas de RT-PCR (D₁ en el día gestacional 11 y D₂ en el día gestacional 14) (Cadoret y cols., 1993).

En el día gestacional 14.5 ya se observan múltiples grupos neuronales que corresponden en gran medida a los grupos neuronales catecolaminérgicos de los adultos descritos por Dahlstrom y Fuxe (1964). Estos derivan de cuatro grupos neuronales primordiales que aparecen en el día gestacional 12: (i) un grupo romboencefálico caudal que dará lugar a A1-3, (ii) un grupo romboencefálico rostral que dará lugar a A4-7 y el *nucleus subcoeruleus*, (iii) un grupo ventral mesencefálico que llegará a ser A8-10 y (iv) un grupo prosencefálico ventral y unas pocas neuronas situadas ventralmente al estriado que darán lugar a A11-14.

La distribución y la morfología de las neuronas TH-positivas en los días gestacionales 18 y 21 se parecen mucho a las que presentan las neuronas catecolaminérgicas adultas (Specht y cols., 1981b). Los cambios producidos desde las etapas tempranas del desarrollo hasta ahora parecen ser el resultado de un incremento en el número de células y de una continua agregación y migración de las neuronas inmunopositivas (Solberg y cols., 1993). Aunque en estos dos días gestacionales la distribución de las neuronas TH-positivas es muy similar existen algunas diferencias entre ellos. Una de ellas es la presencia en el día gestacional 21 de neuronas TH-positivas en el bulbo olfatorio, grupo A15, que no habían sido detectadas en edades anteriores. La segunda diferencia entre

estos dos días gestacionales es la detección transitoria en el día gestacional 18 de unas neuronas marcadas en el cortex frontal, estas neuronas no aparecen en el día 21 y no han sido descritas en el cerebro adulto. La ausencia de estas neuronas en el día 21 puede indicar que ha habido una migración de estas neuronas hacia otras zonas o que estas neuronas representan una expresión transitoria de características fenotípicas de neuronas catecolaminérgicas como se ha visto en neuronas en desarrollo tanto *in vivo* como *in vitro*.

El cerebro de la rata es muy inmaduro en el momento del nacimiento y durante el periodo postnatal temprano sufre muchos cambios en composición y estructura. La mayor parte de los parámetros bioquímicos relacionados con la neurotransmisión dopaminérgica, actividad de TH, número receptores D₁ y D₂, concentraciones de DA y sus metabolitos, se incrementan significativamente durante este periodo postnatal temprano, indicando un incremento en el número de contactos sinápticos de las neuronas dopaminérgicas con sus neuronas postsinápticas, e incluso la aparición transitoria de grupos neuronales que posteriormente desaparecen. Este incremento alcanza un máximo durante la pubertad para estabilizarse posteriormente a valores adultos.

3.3. Importancia de las neuronas dopaminérgicas en el comportamiento adictivo y el desarrollo.

La DA es uno de los neurotransmisores más estudiados como diana de la acción de cocaína, opiáceos, alcohol, barbitúricos, cannabinoides y muchas otras drogas de abuso. La razón más importante para este exhaustivo estudio es que este neurotransmisor está implicado en la mayoría de los procesos neuroconductuales afectados cuando se consumen drogas de abuso. Además, una de las rutas dopaminérgicas, el sistema mesolímbico está implicado en la conducta de adicción y dependencia a drogas. Muchas drogas de abuso se consideran reforzadores positivos, lo que significa que una exposición aguda a la droga conduce al consumo de más droga. Existen muchos estudios conductuales y farmacológicos que demuestran que el sistema dopaminérgico mesolímbico es uno de los más importantes sustratos neuronales del refuerzo producido por estas drogas. En general, su consumo aumenta la actividad de este sistema dopaminérgico (Self y Nestler, 1995), por lo que se ha llegado a sugerir que la DA sea un neurotransmisor común final en los efectos de las drogas de abuso.

La función de los neurotransmisores en el SNC no está restringida a su actuación en la comunicación neuronal en el cerebro maduro, ya que también es importante en el desarrollo, mantenimiento y plasticidad de las neuronas. Entre los neurotransmisores que se cree que son capaces de modular la diferenciación del cerebro se encuentra la DA (Lipton y Kater, 1989). Este neurotransmisor junto con la enzima limitante de su síntesis, TH, están presentes dentro de los conos de crecimiento en las neuronas inmaduras, y esto parece indicar que este neurotransmisor podría intervenir en procesos de reconocimiento neural y

formación de contactos, funciones propias de los conos de crecimiento. Además, algunos grupos de neuronas dopaminérgicas se expresan de forma transitoria, apareciendo sólo durante el desarrollo. Estas neuronas parecen jugar un papel trófico y plástico en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas y otras células diana, quizás alterando procesos como migración axonal, reconocimiento neuronal y sinaptogénesis (Lankford y cols., 1988; Hagino y Inoue, 1986; De Vitry y cols., 1991; Young y cols., 1986). Todo esto nos indica que alteraciones en el sistema neurotransmisor dopaminérgico, originadas como consecuencia de la exposición perinatal a drogas, pueden contribuir a un desarrollo alterado de la propia DA y de otros neurotransmisores.

Finalmente, las neuronas dopaminérgicas son uno de los sustratos neuronales de la acción de los esteroides sexuales no sólo en el adulto, sino también en el desarrollo, cuando los esteroides ejercen un importante efecto en la diferenciación sexual de la funcionalidad cerebral. McEwen (1987) ha propuesto que muchas drogas psicoactivas que afectan la diferenciación sexual del cerebro, incluyendo los cannabinoides, están probablemente actuando como pseudohormonas mimetizando o modificando los efectos de las hormonas esteroides.

Por lo tanto, estas dos últimas características, su papel durante el desarrollo y como diana de la acción de los esteroides sexuales, además de su importancia en el comportamiento adictivo, hacen de estas neuronas un modelo válido para el estudio de los efectos epigenéticos de las drogas de abuso durante el desarrollo.

3.4. Efecto de los cannabinoides sobre el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas.

Al igual que sobre el sistema dopaminérgico adulto, los cannabinoides también producen alteraciones en las neuronas dopaminérgicas en desarrollo. En trabajos desarrollados en nuestro laboratorio (Fernández-Ruiz y cols., 1992) se ha observado que la administración de THC, sólo o mezclado con otros cannabinoides durante el periodo perinatal afecta la maduración de los tres sistemas dopaminérgicos más importantes, sistemas nigroestriatal, mesolímbico y tuberoinfundibular, tanto en edades inmaduras (15-40 días después del desarrollo) (Rodríguez de Fonseca y cols., 1990 y 1991), como en adultos (70 días) (Navarro y cols., 1994 y 1995). Entre las modificaciones encontradas hay cambios en el recambio y la síntesis de DA, en los receptores D₁ y D₂ (Rodríguez de Fonseca y cols., 1990; Navarro y cols., 1995) y en la expresión de la enzima TH (Bonnin y cols., 1994). En muchos casos se correlacionan con cambios en los procesos funcionales en los que están implicados dichos sistemas: conducta motora, motivación, secreción adenohipofisaria.

Entre las rutas dopaminérgicas más afectadas por la expresión perinatal a cannabinoides están las neuronas del mesencéfalo, en particular las neuronas

del sistema nigroestriatal que tienen sus cuerpos celulares en la *substantia nigra* y se prolongan hasta el estriado (Rodríguez de Fonseca y cols., 1990; Navarro y cols., 1994). Aunque también se encuentran cambios en otras neuronas del mesencéfalo que se proyectan hasta los núcleos límbicos del cerebro anterior y constituyen el sistema mesolímbico dopaminérgico, y también en las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares. El efecto más característico encontrado, por su magnitud y persistencia, es un descenso en la actividad de la TH en el estriado de animales machos que han sido expuestos perinatalmente a cannabinoides. Este efecto se observa permanentemente a lo largo del periodo peripuberal (15-40 días después del nacimiento) (Rodríguez de Fonseca y cols., 1990) en paralelo con una disminución de la actividad motora (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991). Este efecto ha sido descrito también por Walters y Carr (1986) aunque estos autores no diferenciaban a los animales según sexo. Además se han encontrado descensos en la inmunoreactividad para la TH en la *substantia nigra* más marcados en los machos (Suárez y cols., datos no publicados) y cambios en la expresión de esta enzima en el mesencéfalo, el área donde los cuerpos celulares de las neuronas mesolímbicas nigroestriatales se encuentran (Bonnin y cols., 1994). En paralelo las densidades de los receptores D₁ y D₂ se encuentran alteradas tras la exposición perinatal a cannabinoides. Se encuentra un descenso del número de estos receptores en el estriado y como ocurre con los efectos en la TH este descenso se produjo sólo en machos (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991).

Los efectos en las neuronas dopaminérgicas del sistema mesolímbico en ratas macho sólo fueron evidentes después de la retirada de la droga en el momento del destete (día postnatal 24). Estos efectos consisten en incrementos en la actividad presináptica, sin efectos en la sensibilidad postsináptica. Aquí los efectos también son sexualmente dimórficos ya que en la hembra desaparecieron con la interrupción del tratamiento (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991; Navarro y cols., 1993b).

En el sistema tuberoinfundibular los efectos de los cannabinoides aparecen después de la retirada de la droga siendo muy diferentes en función del sexo estudiado (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991). En machos la exposición perinatal a cannabinoides provoca un incremento en la actividad de las neuronas tuberoinfundibulares, lo que se refleja en incrementos en la actividad de TH y en la producción de DOPAC, junto con aumentos de la concentración de DA y disminuciones de la liberación de PRL. Dalterio y cols. (1984) también han encontrado incrementos en la actividad de las neuronas tuberoinfundibulares en ratones machos adultos que habían sido expuestos perinatalmente a cannabinoides. En cambio en las hembras, la actividad de estas neuronas disminuyó en etapas postpuberales tempranas, y ello se acompañó con disminuciones en los contenidos de DA en la hipófisis e incrementos de la secreción de PRL.

3.4.1. Dimorfismo sexual en los efectos perinatales de los cannabinoides.

Como se ha comentado anteriormente, uno de los efectos más interesantes encontrados en los estudios sobre las alteraciones producidas en las neuronas dopaminérgicas, tras la exposición perinatal a cannabinoides, es que estos inducen cambios en las neuronas que son dependientes del sexo (Dalterio y cols., 1984; Fernández-Ruiz y cols., 1992). En general, los efectos más marcados y constantes ocurren en machos, luego podría ser que las hembras estén más protegidas de los efectos perniciosos de los cannabinoides o los machos ser más sensibles. También se encuentran efectos sexualmente dimórficos tras la exposición perinatal a otras drogas psicoactivas como cocaína, morfina, nicotina, cafeína y etanol. Esto podría deberse a la interferencia de las drogas en el proceso de diferenciación sexual del cerebro, regulado por interacciones entre hormonas y neurotransmisores. Se comentará este aspecto a lo largo de los diferentes capítulos de esta tesis ya que se trata de una de las observaciones obtenidas también en los resultados de los experimentos de esta tesis doctoral.

3.4.2. Presencia de receptores para cannabinoides durante el desarrollo.

La mayoría de los efectos neurocomportamentales producidos por los cannabinoides se realizan a través de receptores específicos situados en el cerebro que forman parte de un nuevo sistema "neurotransmisor" constituido por las anandamidas, los ligandos endógenos de este receptor, y el llamado receptor CB1. Estos han sido muy estudiados en adultos, como se ha descrito anteriormente, y se conocen muchas de sus características farmacológicas y moleculares así como su distribución, pero se sabe muy poco de su presencia en el animal en desarrollo. Aunque no se saben los mecanismos por los cuales los cannabinoides producen efectos adversos durante el desarrollo y no se pueden descartar efectos no mediados por receptor, estos podrían ser ejercidos a través de los receptores para cannabinoides ya que han sido descritos desde etapas muy tempranas del desarrollo. Paria y cols. (1995) han demostrado por técnicas de RT-PCR que tanto el RNA mensajero de CB1 como de CB2 se encuentran en embriones preimplantados de ratón. Además, estos receptores parecen ser funcionales ya que el THC inhibe en estos embriones la producción de AMPc estimulada por forskolina, evitándose al pretratar con toxina de pertussis. En nuestro laboratorio se ha descrito la ontogenia postnatal de la unión del receptor de cannabinoides en cerebro de rata (Rodríguez de Fonseca y cols., 1993). En todas las áreas cerebrales estudiadas la evolución de la unión fue similar, se encontró un aumento en el número de receptores desde el día postnatal 10 hasta los días 30 ó 40, donde comienza a decrecer hasta alcanzar los valores adultos en el día 70. Estos trabajos han sido confirmados por otras publicaciones aparecidas posteriormente (McLaughlin y cols., 1994; Belue y cols., 1995). Recientemente, en nuestro laboratorio se ha estudiado la distribución de estos receptores en cerebro desde días gestacionales muy tempranos (DG14) por técnicas de autorradiografía (García-Palomero y cols., datos no publicados).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, nuestros primeros estudios acerca de los efectos de la exposición perinatal a cannabinoides sobre el desarrollo de los sistemas dopaminérgicos se realizaron fundamentalmente en animales inmaduros, en torno a la pubertad, y en animales adultos. Ello se debe a que sólo a partir del día 15 postnatal se pueden diseccionar con cierta facilidad las regiones cerebrales que contienen los terminales y/o los cuerpos celulares de los diferentes sistemas dopaminérgicos. Sin embargo, este día postnatal corresponde al final del periodo de tratamiento con THC (el tratamiento comenzaba el día quinto de gestación y acababa el día 24 postnatal), y probablemente refleja más las últimas consecuencias del tratamiento perinatal que la etiología de las alteraciones inducidas por el THC sobre la actividad dopaminérgica. Datos recientes sobre los niveles de THC presentes en animales inmaduros expuestos perinatalmente a cannabinoides avalan esta hipótesis (Fernández-Ruiz y cols., 1995). Hemos visto que los niveles plasmáticos de THC en las crías se reducen significativamente a partir del día 15 postnatal. Probablemente inician a partir de este momento la alimentación sólida, dependiendo menos de la madre, y por tanto, estando progresivamente menos expuestas a la droga (Fernández-Ruiz y cols., 1995). Estos datos justifican la necesidad de nuevos estudios, durante el periodo fetal y neonatal, de proteínas clave en el desarrollo de la neurotransmisión dopaminérgica. Ya que estaría en esta etapa el origen de las alteraciones observadas durante el periodo peripuberal y en el adulto.

Así, el propósito de la presente memoria ha sido caracterizar los efectos que se producen como consecuencia de la exposición perinatal a cannabinoides:

- sobre la expresión de una de las proteínas claves en el desarrollo de la neurotransmisión catecolaminérgica, como la tirosina hidroxilasa, proteína que regula la velocidad de síntesis de catecolaminas y que juega un papel importante durante el desarrollo en los fenómenos de migración axonal, reconocimiento neuronal y sinaptogénesis;

- y durante el periodo fetal y primeros días de vida postnatal, que parecen ser periodos críticos en el desarrollo de esta neurotransmisión y, por tanto, susceptibles de ser los momentos en que se producirían las alteraciones epigenéticas debidas a la exposición a cualquier droga de abuso, y en particular, a cannabinoides.

Esto se ha concretado en los siguientes objetivos:

1. Establecer si los cambios inducidos por la exposición perinatal a cannabinoides son consecuencia de alteraciones en la expresión de la tirosina hidroxilasa durante el periodo fetal (DG14 - DG21). El análisis de esta enzima se realizó cuantificando:

- la cantidad de RNA mensajero de TH, mediante "northern blot";
- la cantidad total de proteína TH, mediante "western blot";
- la actividad enzimática de TH, mediante HPLC;

En paralelo, se analizaron las concentraciones de catecolaminas y, cuando ello fue posible, la concentración de DOPAC, principal metabolito intraneuronal de la DA.

2. Repetir el mismo tipo de estudio durante otro de los periodos claves de la maduración de la neurotransmisión catecolaminérgica, los primeros días de vida postnatal (DPN1 - DPN5).

3. Reproducir *in vitro* los resultados obtenidos *in vivo*. Para ello se utilizan cultivos primarios de células mesencefálicas del día gestacional 14. En este día se han encontrado *in vivo* las mayores modificaciones producidas por el THC sobre la expresión génica y la actividad de la TH. También, abordar el estudio de los posibles mecanismos implicados a nivel molecular. En concreto la posible mediación de receptores específicos para cannabinoides.

4. Por último, con objeto de evaluar la posible influencia de una malnutrición producida por el THC en algunos de los efectos encontrados a nivel del desarrollo dopaminérgico, monitorizar diferentes parámetros gestacionales y lactacionales, medidos en las madres y/o en las crías, durante todo el periodo de tratamiento.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES, TRATAMIENTOS Y RECOGIDA DE MUESTRAS.

1.1. Experimentos *in vivo*.

En los experimentos realizados *in vivo* se han utilizado ratas de la cepa Wistar. Los animales permanecieron desde su nacimiento en condiciones constantes de fotoperiodo (luz entre las 08:00 y 20:00 horas), temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad. Los animales tuvieron acceso permanente a comida estándar y agua.

1.1.1. Seguimiento del ciclo estral.

Con objeto de asegurar la gestación, controlar la fecha en que esta se inicia y fijar el comienzo de la administración prenatal de THC, se estudió el ciclo estral de las madres que iban a ser usadas para los tratamientos con el cannabinoide. Ratas hembras adultas (> 8 semanas de vida; 200-250 g) fueron sometidas a frotis vaginales diarios, siempre entre las 10:00 y las 12:00 horas, y sólo aquellas ratas que presentaron tres o más ciclos regulares de cuatro días fueron usadas en la experimentación. Las hembras en fase de proestro permanecieron durante una tarde-noche con un macho. Al día siguiente se realizó un nuevo frotis vaginal. Los animales que presentaban espermatozoides fueron considerados como probablemente preñados y usados para los estudios de exposición a THC. Ese día fue considerado como primer día de gestación.

1.1.2. Control gestacional y lactacional.

Durante todo el periodo gestacional y durante la lactancia se controlaron una serie de parámetros con objeto de valorar la posible existencia de una malnutrición de las crías en la edad fetal y/o neonatal que pudiera alterar los resultados de la experimentación. Los parámetros estudiados fueron:

- Ganancia de peso de la madre.
- Ingesta de comida.
- Ingesta de agua.
- Duración de la gestación.
- Tamaño de la camada en el momento de la autopsia o tras el nacimiento.
- Mortalidad prenatal y postnatal.
- Proporción hembras/machos.
- Peso de los fetos o neonatos.
- Peso de las placentas.
- Concentraciones de THC en plasma y tejidos de las madres y de las crías.

1.1.3. Tratamientos.

Las ratas preñadas recibieron una dosis diaria de THC (cedido por el "National Institute of Drug Abuse") por vía oral, de 5 mg/kg de peso corporal, desde el quinto día de gestación, preparado en aceite de sésamo. Esta concentración de THC corresponde a una estimación, corregida en función de la superficie corporal, peso y ruta de administración, de la dosis habitual en humanos de consumidores crónicos de preparados de *Cannabis sativa* (Nahas, 1984). Una alícuota de THC en etanol se emulsionó en aceite de sésamo hasta alcanzar la concentración deseada, justo antes de usar, y el etanol se evaporó bajo corriente de nitrógeno. Los animales controles recibieron una dosis diaria de 0.1 ml de aceite de sesamo. El tratamiento se mantuvo hasta el día de la realización del sacrificio.

1.1.4. Sacrificio y recogida de muestras.

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación sin anestesia. La hora del sacrificio se mantuvo constante (10:00 - 12:00) con objeto de aminorar las influencias del fotoperiodo. El procedimiento de decapitación y el manejo de los animales fue siempre cuidadoso para evitar problemas de estrés. Para ello, dos horas antes de la decapitación las ratas se trasladaron al lugar del sacrificio para que se habituaran.

Después del sacrificio de las crías en los días postnatales o de la madre y extracción de los fetos por cesárea en los días gestacionales, los animales fueron pesados y sexados (cuando ello fue posible), y las cabezas seccionadas. Estas y los cuerpos se congelaron inmediatamente en nieve carbónica y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis. La sangre de las madres se recogió en tubos de plástico conteniendo 0.4 ml de una solución de EDTA 0.16 M. Las muestras se centrifugaron a 2500 g durante 10 minutos a 4°C y el plasma se almacenó a -40°C para la determinación radioinmunológica de THC. Las muestras nunca se almacenaron por un tiempo superior a tres meses.

Los días elegidos para los experimentos fueron los días gestacionales 14, 16, 18 y 21, y los días postnatales 1 y 5 (Figura 6). En los días gestacionales 14 (DG14), 16 (DG16) y 18 (DG18) se utilizó, para los distintos experimentos, el cerebro entero, mientras que cuando se analizan edades posteriores, día gestacional 21 (DG21) y días postnatales 1 (DP1) y 5 (DP5) el cerebro se dividió en cerebro anterior (prosencefalo) y posterior (cerebro medio y resto de cerebro). Además, en los fetos de más de 18 días de edad gestacional se siguió el criterio de identificación del sexo en base a la distancia anogenital, y posterior comprobación de la posición de los genitales en el cuerpo.

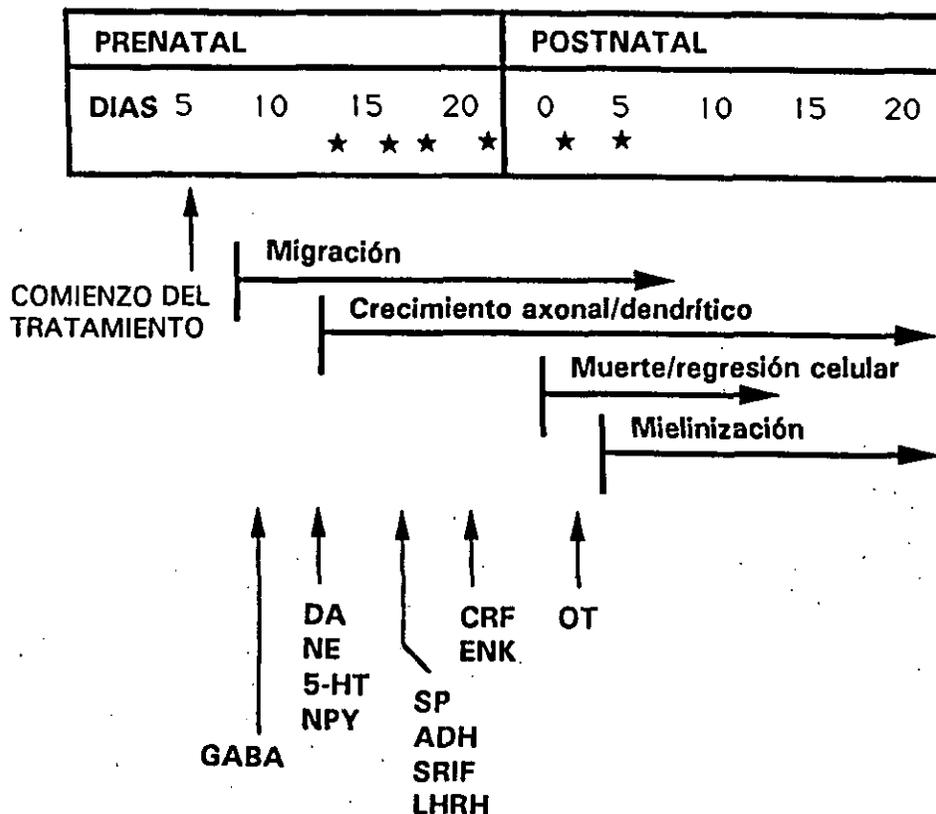


Figura 6: En el diagrama se muestra el periodo en que tienen lugar los principales acontecimientos del desarrollo así como el momento en que se detectan por inmunohistoquímica algunos neurotransmisores y neuromoduladores: norepinefrina (NE), serotonina (5-HT), dopamina (DA), neuropéptido Y (NPY), sustancia P (SP), vasopresina (ADH), somatostatina (SRIF), hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), hormona liberadora de corticotropina (CRF), encefalina (ENK), oxitocina (OT). Los asteriscos indican los días utilizados en la experimentación.

1.2. Experimentos *in vitro*.

En los cultivos se utilizaron embriones de rata del día gestacional 14, ya que esta edad fetal corresponde a un estado embrionario óptimo para la obtención de cultivos celulares enriquecidos en neuronas dopaminérgicas (Figura 7). Los mesencéfalos se diseccionaron siguiendo el método descrito por Dunnet y Björklund (1991). Tanto los fetos como los mesencéfalos ya diseccionados se mantuvieron en medio L15 de Leibovitz con penicilina estreptomycinina (100 U/ml).

Al término de la disección, se recogieron todos los mesencéfalos, se resuspendieron en medio de cultivo DMEM suplementado con un 15% de suero fetal bovino (SFB) (DMEM-SFB) y se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, tras renovar el medio DMEM-SFB el tejido se trituró suavemente con una pipeta, se centrifugó 5 minutos a 200 g y las células ya disgregadas se

resuspendieron en 1 ml de DMEM-SFB y se contó el número de vivas por el método de exclusión de tinte azul tripan. Tras una nueva centrifugación, las células se resuspendieron a una concentración estimada de $1.2 - 2 \times 10^6$ cels/ml en DMEM-SFB y se contaron de nuevo para establecer la densidad definitiva. Se sembraron a una densidad de 10^5 cel/cm² de superficie de cultivo en medio DMEM-SFB durante las primeras 24 horas tras la siembra. La siembra se realizó sobre placas multipocillos que habían sido previamente tratadas con poli-D-lisina, $4.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, disuelta en tampón borato 0.1 M pH 8.4.

Los cultivos se mantuvieron en la incubadora, a 37°C, en una atmósfera con un 5% de CO₂. 24 horas después de la siembra, el medio de cultivo DMEM-SFB se sustituyó por medio definido sin suero, con algunas modificaciones al descrito por O'Malley y cols. (1991), que denominamos EF12. Contiene medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) : nutriente F12 de Ham (1:1) suplementado con D-glucosa 6 mg/ml, insulina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, transferrina humana 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, putrescina 60 μM , selenita sódica 30 nM y progesterona 20 nM. Se añadieron antibióticos y antimicóticos, penicilina-estreptomicina con fungizona (100 U/ml). Este medio sin suero mantiene la población de células dopaminérgicas durante una semana, limitando el crecimiento de células no neuronales. Los cultivos de mesencéfalo, mantenidos en este medio durante una semana, contienen una población de astrocitos entre 1 y un 2% del total; el resto del cultivo son células neuronales, de las cuales la población de células TH - positivas representa entre un 0.5 y un 2%.

Al cuarto día de cultivo, las células (50% de los pocillos) fueron expuestas durante 24 horas a THC a una concentración de 1000 ng/ml preparado según Howlett (1985), en etanol 0.1% y albúmina 50 mg/ml. El otro 50% se trató con el vehículo correspondiente. La concentración de etanol en el medio de cultivo fue de 0.01% y la de albúmina 0.5 mg/ml. Al término del tratamiento, 24 horas después, los cultivos se lavaron 3 veces en tampón PBS, antes de su procesamiento para las diferentes determinaciones.

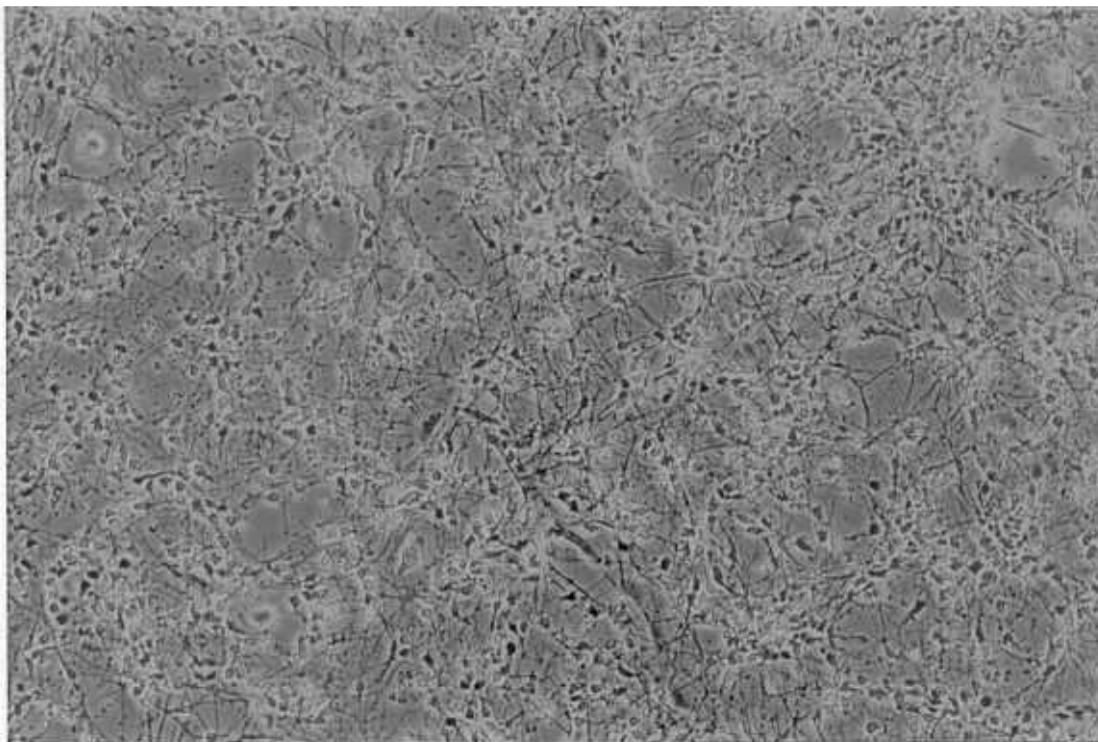


Figura 7: Cultivos primarios de mesencéfalos de embrión de rata (DG14). Imagen en contraste de fase.

2. DETERMINACION DE CATECOLAMINAS MEDIANTE HPLC.

La concentración de L-DOPA, DA, DOPAC (sólo en los días postnatales 1 y 5) y NE en los diferentes tejidos cerebrales y cultivos celulares se determinó mediante HPLC con detección electroquímica. Para llevar a cabo este proceso las muestras se prepararon de la siguiente manera:

Las muestras se homogeneizaron en 5 volúmenes de sacarosa 0.25 M. Una alícuota de los homogeneizados se diluyó (relación final: 15 volúmenes) en una solución de ácido perclórico 0.2 N que contenía bisulfito sódico 0.5 mM, EDTA 0.45 mM y una concentración conocida de DHBA como estándar interno para la determinación de catecolaminas. El resto del homogeneizado se utilizó para la determinación de la actividad de TH ya que la determinación estos parámetros neuroquímicos se realizó en la misma muestra de tejido.

Una vez preparadas las diluciones, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante dos minutos y el sobrenadante quedó en condiciones de ser inyectado en el sistema HPLC. Todo el proceso de preparación de las muestras, incluyendo las soluciones utilizadas, y el posterior almacenamiento de éstas hasta su inyección se realizó a una temperatura de 0 - 4°C. El tiempo de almacenamiento nunca fue superior a las 48 horas. El sistema HPLC se componía

de los siguientes elementos:

- Una bomba isocrática (Spectra-Physics modelo 8700XR) acoplada a un inyector para 0.02 ml de muestra.
- Una columna de fase reversa (C-18) de 15 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro y 5 μm de tamaño de las partículas (NUCLEOSIL 5C18).
- La fase móvil estaba formada por una solución citrato-acetato (0.1 M) a pH 3.9, con EDTA (1 mM), sulfonato de heptano (1.2 mM) como par iónico y metanol al 10-12%. Esta fase móvil se preparó en agua bidestilada, se filtró (a través de filtros de 0.45 μm) y se desgasificó con helio. El flujo de trabajo fue de 0.8 - 1.2 ml/minuto.
- Para la determinación de catecolaminas el eluyente se monitorizó con un sistema analítico de detección coulométrica (Esa Coulochem II) utilizando un procedimiento redox, bajo las condiciones de: célula protectora, + 360 mV; detector 1, 50 mV; detector 2: 340 mV.
- La señal fue recogida y analizada con ayuda de un integrador-registrador (Spectra-Physics, modelo 4290). La concentración de CAs en las distintas muestras se calculó por comparación con el área correspondiente a su estándar interno (DHBA) considerando a la vez la diferente respuesta individual de cada CA en el detector calculada a partir de las muestras utilizadas como estándares externos. Los resultados se expresaron referidos al peso de la muestra (pg/mg de tejido).

3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TIROSINA HIDROXILASA MEDIANTE HPLC.

La actividad de TH se determinó según el procedimiento descrito por Nagatsu y cols. (1979) con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio y que han sido previamente publicadas (Bonnin y cols., 1994). Los tejidos se homogeneizaron como se ha descrito en el apartado anterior. Una alícuota del homogeneizado equivalente a 6 mg de tejido se incubó a 37°C en 0.1 M acetato sódico, catalasa 0.1 mg/ml, 1 nM 6-metil-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (preparada en una solución 1 M de β -mercaptoetanol) 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 tejido que contenía L-DOPA 1 μM en un tubo con los mismos componentes que el blanco de incubación. Por tanto para cada tejido se prepararon los siguientes tubos:

un test con L-tirosina, en el que se medirá la producción total de L-DOPA.

un blanco con D-tirosina, en el que se medirá tanto la producción de L-DOPA a partir de la L-tirosina endógena como el contenido endógeno de L-DOPA.

un estandar interno con D-tirosina y L-DOPA, con el que se podrá medir la recuperación del producto enzimático.

La reacción se detuvo con una solución de ácido perclórico 0.2 M que contenía bisulfito sódico 0.5 mM y EDTA 0.45 mM. Además, se añadió una concentración conocida de DHBA que se utilizó como estándar interno en el proceso de determinación de la concentración de L-DOPA formado en cada muestra.

A continuación, todos los tubos se centrifugaron a 10000 g durante 2 minutos, quedando listos para iniciar el proceso de determinación de la concentración de L-DOPA. Este proceso se realizó mediante HPLC con detección electroquímica, con la particularidad de que previamente a la inyección de las muestras en el sistema HPLC, se sometieron a un proceso de extracción con alúmina activada, según el procedimiento descrito por Anton y Sayre (1962). Este procedimiento se basa en la capacidad que posee la alumina de retener específicamente las catecolaminas ya que es capaz de interaccionar con los dos grupos hidroxilos en posición 3 y 4 del anillo bencénico de éstas. De esta forma se puede eliminar la interferencia que la L-tirosina sobrante de la reacción enzimática produce en la detección electroquímica del L-DOPA formado en la reacción. Después de la extracción, las muestras se almacenaron a 4°C hasta su inyección en el sistema HPLC para determinar el contenido de L-DOPA en cada muestra.

4. CUANTIFICACION DE LA TIROSINA HIDROXILASA

Los concentración de la proteína TH se determinó mediante análisis por "western blot". Los cerebros se procesaron individualmente.

4.1. Preparación de las muestras.

Los tejidos se homogeneizaron por sonicación en tampón fosfato potásico 5 mM con 0.2% Tritón X-100, pH 6.0, según el método descrito por Labatut y cols. (1988). Los homogeneizados se centrifugaron a 10000 g durante 30 min a 4°C y se recogieron los sobrenadantes. Para la determinación de la concentración total de proteínas se siguió el método descrito por Lowry y cols. (1951).

4.2. Análisis por "western blot".

Se utilizó análisis por "western blot" para determinar la cantidad de proteína de TH. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida según el método de Laemmli y cols. (1970), utilizando geles de una concentración de acrilamida del 10% en presencia de SDS.

Las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa según el método de Towbin y cols. (1979). Para comprobar la calidad de la transferencia se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau S (Harlow y cols., 1988), se fotografiaron y se destiñeron con PBS.

A continuación las membranas se incubaron durante 1 hora en el tampón de saturación, PBS conteniendo 0.1% tween-20 (v/v) (PBS-T) y 5 % de leche desnatada en polvo (Johnson y cols., 1984). Posteriormente se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-TH (diluido 1/1000) en tampón de saturación durante 1 hora a 25°C. Después de varios lavados con PBS-T se incubaron los filtros durante 1 hora con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-inmunoglobulina de ratón) (diluido 1/2000) en tampón de saturación. Los filtros se volvieron a lavar exhaustivamente con PBS-T. La reacción de la peroxidasa se desarrolló con luminol (kit de Amersham). Finalmente, los filtros se expusieron unos segundos a temperatura ambiente sobre películas para autorradiografía y se revelaron en condiciones estándar. Las autorradiografías se cuantificaron mediante densitometría, asistida por ordenador, de la señal y determinación de su área. Como control interno en todos los geles se cargó una cantidad constante de proteínas de un homogeneizado de adrenal de rata. Los datos se expresan como media \pm EEM de al menos 3 "western" diferentes. Los datos se representan en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno.

Es interesante mencionar que en las autorradiografías del día gestacional 14 se observó ocasionalmente la existencia de dos bandas. La banda de mayor peso molecular correspondería a una forma fosforilada de la TH, ya que al incubarse las muestras con fosfatasa desapareció (Lin y cols., 1992), aumentando la densidad de la banda correspondiente a TH no fosforilada. Esta forma fosforilada de la TH se originaría durante el almacenamiento o la manipulación de las muestras. Estas autorradiografías se realizaron sumando los valores densitométricos de las dos bandas.

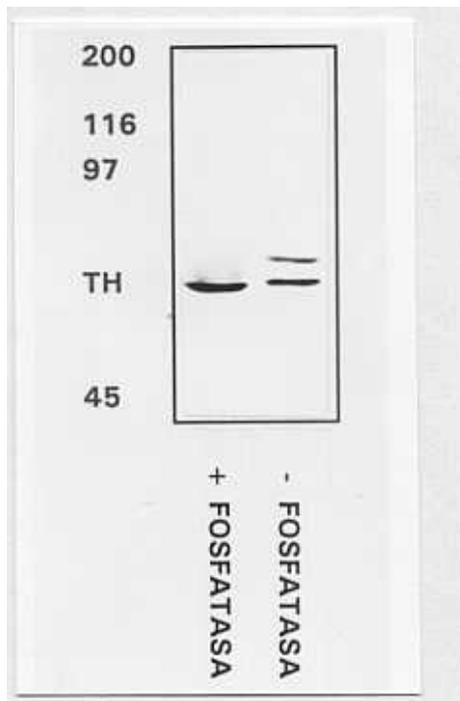


Figura 8: Tratamiento con fosfatasa. En las muestras + FOSFATASA 60 μ g de proteína total se incubaron con 2 μ g de fosfatasa ácida de patata en tampón PIPES 40 mM, pH 6.0 y DTT 1mM a 30°C durante una hora. El peso molecular de los marcadores (en KDa) se indica a la izquierda.

1. CUANTIFICACION DEL RNA MENSAJERO DE TIROSINA HIDROXILASA.

Los niveles de RNA mensajero de TH fueron determinados mediante análisis de "northern blot". Los cerebros se procesaron individualmente.

1.1. Obtención y marcaje de la sonda cDNA de TH.

Empleamos el plásmido pTH. Se trata del vector pBS que contiene un fragmento de 1200 pb clonado en el sitio EcoRI que se corresponde con el cDNA del gen de TH (Harrington y cols., 1987). Los plásmidos fueron amplificados y purificados siguiendo un procedimiento estándar de lisis alcalina (Maniatis y cols., 1982). Los insertos se aislaron, tras la digestión con los enzimas de restricción correspondientes, en geles de bajo punto de fusión o con el material de protocolo del kit "Gene Clean".

Los insertos se marcaron con [α -P³²]dCTP de Amersham (3000 Ci/mmol) usando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa contenido en el kit "Oligolabelling Reaction" de Pharmacia. Se obtuvo una actividad específica de 1×10^9 cpm/ μ g aproximadamente. Los marcajes fueron purificados por cromatografía a través de columnas "Bio-Spin" de Bio Rad.

5.2. Aislamiento de RNA total.

El RNA total se extrajo por homogeneización en isotiocianato de guanidinio y posterior extracción con fenol-cloroformo según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). El precipitado de RNA fue resuspendido en agua tratada con dietilpírocarbonato al 0.1% como inhibidor de RNAsas. El RNA obtenido se cuantificó por la lectura de la absorbancia de una alícuota a 260 nm y se comprobó su integridad mediante su resolución en un gel de agarosa.

5.3. Análisis de "northern blot".

Utilizamos análisis de "northern" para determinar la cantidad de moléculas de RNA mensajero de la enzima TH. El RNA se separó por tamaños mediante electroforesis en geles de agarosa y se transfirió posteriormente a membranas de nylon. El RNA que queremos medir se detecta por hibridación con sondas de DNA y posterior autorradiografía.

Las muestras de RNA total (10 - 30 μ g) fueron desnaturalizadas a 65°C con una mezcla que contenía MOPS 1X (MOPS 20 mM, EDTA 1 mM, acetato sódico 50 mM y hidróxido sódico 90 mM, pH 7.0), formaldehído 6.1%, formamida 50% y sometidas a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de agarosa al 1% y formaldehído 2.2 M en tampón MOPS 1X a 100 V durante 2 - 3 horas.

El RNA fue transferido a membranas de nylon por capilaridad en SSC 20X (SSC 1X es cloruro sódico 3 M, citrato sódico 0.3 M) durante toda la noche, según describe Maniatis y cols. (1982). Previamente al montaje de la transferencia el gel fue sumergido en SSC 20X durante una hora. El RNA se fijó al filtro por radiación ultravioleta (Spectrolinker). Para comprobar la cantidad de RNA cargada en cada pocillo y poder corregir posteriormente los niveles de RNA mensajero encontrados, se procedió a la tinción de las membranas, después de la transferencia, con azul de metileno (azul de metileno 0.02%, acetato sódico 0.03 M, pH 5) (Herrin y cols., 1988).

Las membranas se prehibridaron durante 4 - 8 horas a 42°C con una solución de prehibridación que contenía formamida 50%, Denhardt 5X (Ficoll 1%, polivinilpirrolidona 1% y seroalbúmina bovina 1%), SDS 0.5%, 200 mg/ml de DNA de esperma de salmón y SSC 3X. La solución de prehibridación se cambió por la solución de hibridación que constaba de los mismos componentes y de la sonda marcada. La hibridación tuvo lugar durante 18 - 24 horas a 42°C. Para eliminar la radioactividad inespecífica, las membranas fueron lavadas dos veces en SSC 2X, SDS 0.1% a temperatura ambiente durante 5 minutos; dos veces en SSC 2X a 60°C durante 20 minutos y 1 ó 2 veces en SSC 0.2X, SDS 0.1% a 60°C durante 20 minutos.

Las membranas hibridadas fueron expuestas con placas autorradiográficas

Agfa Curix a -70°C usando pantallas amplificadoras y se revelaron en condiciones estándar. El tiempo de exposición varió según la intensidad del marcaje. Las autorradiografías se cuantificaron mediante densitometría, asistida por ordenador, de la señal y determinación de su área. Como control interno en todos los geles se cargó una cantidad constante de RNA de adrenal de rata. Los datos se expresan, una vez normalizados utilizando los valores obtenidos al cuantificar los RNA ribosómicos, como media \pm EEM de al menos 3 "northern" diferentes. Los datos se representan en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno.

6. DETERMINACION DE LOS NIVELES PLASMATICOS DE THC MEDIANTE RADIOINMUNOANALISIS.

Las concentraciones de THC en plasma y tejidos se determinaron mediante un radioinmunoensayo específico, usando el material y el protocolo preparado por el "Research Triangle Institute (Research Triangle Park, NC, USA)" y suministrado por el "National Institute of Drug Abuse", con algunas modificaciones para las determinaciones en tejidos.

Volúmenes fijos ($100\ \mu\text{l}$) de muestras de plasma o de homogeneizado de tejidos en agua a pH 9 - 9.5 (10 volúmenes) se extrajeron con metanol. Las muestras, así como las diluciones de la curva estándar (para la que se utilizó Δ^9 -THC preparado en plasma humano) se incubaron 24 horas a 4°C con el antisero específico para Δ^9 -THC y ^{125}I - Δ^8 -THC que se usa como ligando radioactivo (es más estable que el Δ^8 -THC y se une al anticuerpo con afinidad similar compitiendo con este). La separación del complejo antígeno-anticuerpo se obtuvo tras la incubación de las reacciones 3 horas a 4°C con un segundo anticuerpo, consiguiéndose un complejo de mayor tamaño que se puede separar por centrifugación, 733 g durante 15 minutos. La radioactividad fue medida en el precipitado con un contador γ . El cálculo de la concentración de THC en las muestras se realizó mediante un programa de RIA en el ordenador. Las concentraciones de THC se expresaron como ng/ml para el plasma y pg/mg de peso para tejidos.

7. ANALISIS ESTADISTICOS.

Todos los valores obtenidos en las distintas determinaciones realizadas se expresaron como el valor medio \pm el error estándar de la media. Se comprobó si los datos se ajustaban a una distribución normal. En tal caso y para obtener los correspondientes niveles de significación estadística se realizaron comparaciones entre múltiples grupos mediante análisis de varianza seguido de un test pos-hoc (SNK). Se utilizaron análisis de varianza de una vía, dos vías ó tres vías según la concurrencia de una o más variables (edad x sexo x tratamiento). El tipo de análisis utilizado se detalla en la leyenda de las figuras. Para los datos gestacionales y lactacionales se utilizó el test de Student. Las diferencias entre grupos se consideraron como estadísticamente significativas si la probabilidad de error era menor del 5%.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. VALIDACION DEL MODELO DE TRATAMIENTO.

Como se mencionó en el apartado Objetivos se han evaluado durante todo el periodo gestacional y la lactancia una serie de parámetros indicativos del estado nutricional de las crías. Con esto se pretendía establecer hasta que punto los efectos del THC sobre el desarrollo dopaminérgico podían ser debidos exclusivamente a un efecto directo del cannabinoide sobre el cerebro, o en parte, a una malnutrición de la madre inducida por la droga. A continuación se muestran los resultados obtenidos (tablas 4 y 5):

1. Sobre las concentraciones de THC a las que están expuestas las crías:

El contenido de THC en plasma y tejidos de la madre (tabla 5) fue medido mediante RIA específico. Los valores de THC en plasma medidos durante la gestación son la media de los valores diarios obtenidos en la última semana de gestación. Los valores correspondientes a la lactancia son la media de los valores diarios obtenidos durante la primera semana después del parto. Los valores de THC en hígado, cerebro y grasa de la madre fueron medidos durante la lactancia (DPN1 - DPN5). En ningún caso las fluctuaciones diarias en las concentraciones de THC en ambos periodos mostraron significación estadística. Se encuentra una significativa presencia de THC en las madres gestantes y durante el periodo de lactancia en el rango de lo descrito anteriormente para una dosis oral diaria de 5 mg/ml (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991). La concentración de THC fue mayor durante la época de la lactancia, aunque a efectos de grado de exposición de la cría, es presumible que la exposición sea mayor, o al menos compensable durante la gestación, debido a la conexión más directa (transporte placentario) durante este periodo. En la tabla 4 se pueden encontrar datos que apoyan esta idea. En esta tabla se muestran las concentraciones de THC en fetos y en sus placentas en días gestacionales (DG14 - DG21), y en hígados de neonatos (DPN1 - DPN5). Se observó la presencia de cantidades significativas de THC tanto en placentas como en fetos e hígados de neonatos cuyas madres habían sido tratadas con THC.

2. Sobre los datos de nutrición de la madre y viabilidad de las crías (tabla 5):

Los valores de la toma de agua y comida por la madre se corresponden a la media de los valores diarios. La ganancia de peso de la madre se obtuvo hallando la diferencia entre el peso en el día del parto y en el día de la cópula. También se representan valores del tamaño de la camada, longitud de la gestación, mortalidad prenatal y postnatal, expresada en número de reabsorciones/fetos y neonatos muertos por camada, y la proporción hembras/machos. Por último se muestran los pesos de placentas, fetos y neonatos en las diferentes edades estudiadas, el sexo se diferenció desde el día

gestacional 18, pero los valores se muestran conjuntamente ya que no se encontraron diferencias dependientes de sexo.

No se ha encontrado ningún cambio significativo en la ingesta de agua y comida por la madre, ni durante la gestación ni la lactancia a pesar de las presencia de THC. Tan sólo se encontraron algunos pequeños cambios en los pesos de los fetos y placentas en los animales que habían sido perinatalmente expuestos a THC. Otros parámetros, como la longitud de la gestación, tamaño de la camada, mortalidad prenatal y postnatal y proporción hembras/machos no se alteraron por el tratamiento con el cannabinoide.

PARAMETRO	DIA	SEXO	CONTROL	THC
Fetos (pg/mg)				
	DG14	--	7.3 ± 2.0	38.1 ± 8.4 *
	DG16	--	11.4 ± 2.0	39.3 ± 3.1 *
	DG18	H	17.7 ± 2.9	92.4 ± 13.5 *
		M	18.9 ± 5.9	118.8 ± 7.0 *
	DG21	H	1.1 ± 0.6	24.8 ± 4.3 *
		M	1.5 ± 0.9	17.9 ± 7.6 *
Placenta (pg/mg)				
	DG14	--	ND	20.5 ± 8.6 *
	DG16	--	1.1 ± 0.3	11.0 ± 0.6 *
	DG18	H	2.9 ± 1.0	41.4 ± 8.2 *
		M	1.8 ± 0.9	48.9 ± 6.8 *
	DG21	H	6.6 ± 1.5	29.7 ± 8.2 *
		M	3.4 ± 0.4	38.2 ± 8.6 *
Hígado (pg/mg)				
	DPN1	H	5.2 ± 1.7	42.1 ± 9.7 *
		M	ND	57.7 ± 17.3 *
	DPN5	H	22.3 ± 3.9	79.4 ± 15.6 *
		M	14.9 ± 4.4	100.4 ± 17.11 *

Tabla 4: Concentraciones de THC en placentas, fetos e hígados de neonatos. El contenido de THC fue medido por RIA específico en placentas y fetos (DG14 - DG16) y en hígados de neonatos (DPN1 - DPN5). Los resultados están expresados en pg/mg de tejido y corresponden a medias ± EEM de al menos 8 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por test de Student (* p < 0.05).

PARAMETRO	CONTROL	THC
Niveles de THC en plasma (ng/ml)		
durante la gestación	ND (< 2.5)	17.3 ± 4.9*
durante la lactancia	ND (< 2.5)	42.9 ± 20.0*
Contenidos de THC (ng/mg tejido)		
en hígado	0.18 ± 0.07	2.28 ± 0.17*
en cerebro	0.10 ± 0.07	1.33 ± 0.12*
en grasa	0.03 ± 0.007	0.69 ± 0.05*
Ingesta de comida de la madre (g)		
durante la gestación	28.2 ± 0.9	26.0 ± 0.9
durante la lactancia	56.2 ± 7.1	47.8 ± 5.7
Ingesta de agua de la madre (ml)		
durante la gestación	41.6 ± 2.1	38.6 ± 1.8
durante la lactancia	78.3 ± 8.6	66.5 ± 7.0
Ganancia de peso de la madre (g)	156.6 ± 17.4	138.9 ± 8.7
Tamaño de la camada	13.1 ± 0.7	13.0 ± 0.7
Duración de la gestación (días)	22.4 ± 0.1	22.4 ± 0.1
Mortalidad prenatal	0.71 ± 0.34	0.64 ± 0.25
Mortalidad postnatal	0.27 ± 0.14	0.71 ± 0.34
Proporción hembras/machos	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Peso de placentas		
DG14 (mg)	79.3 ± 8.9	87.8 ± 8.5
DG16 (mg)	348.5 ± 19.9	258.8 ± 21.3*
DG18 (mg)	370.3 ± 17.5	335.8 ± 18.5
DG21 (mg)	618.5 ± 19.9	608.8 ± 15.3
Peso fetal		
DG14 (mg)	84.6 ± 3.5	95.0 ± 2.6*
DG16 (mg)	349.6 ± 10.9	313.8 ± 6.3*
DG18 (mg)	870.3 ± 15.5	815.8 ± 18.5*
DG21 (g)	3.9 ± 0.06	3.9 ± 0.07
Peso neonatal		
DPN1 (g)	6.0 ± 0.1	5.8 ± 0.1
DPN5 (g)	10.0 ± 0.4	10.1 ± 0.3

Tabla 5: Parámetros gestacionales estudiados en animales controles y expuestos perinatalmente a THC. Los valores corresponden a medias ± EEM de al menos 8 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por test de Student (* p < 0.05).

2. ONTOGENIA DE LA NEUROTRANSMISION CATECOLAMINERGICA.

Antes de abordar el estudio de los efectos del THC sobre el desarrollo de la neurotransmisión catecolaminérgica, dedicaremos una parte de esta presentación de Resultados al análisis de la ontogenia de los diferentes - parámetros bioquímicos y moleculares analizados, comparándolos con lo que está publicado previamente en la literatura. Así, se ha estudiado el desarrollo de la TH en cerebro durante la gestación y los primeros días postnatales. En las figuras se muestra la ontogenia de la expresión de la TH, RNA mensajero (Figura 9) y cantidad total de proteína (Figura 10), y de su actividad enzimática total (Figura 11). También se muestra la ontogenia de DA (figura 12) y NE (figura 13). Para realizar estos análisis se utilizó cerebro entero hasta el día gestacional 18, en los días siguientes se dividió en cerebro anterior y posterior. El sexo de los fetos y neonatos se diferenció desde el día gestacional 18 por observación de distancia ano-genital y posterior autopsia y observación de la posición de los genitales.

2.1. Ontogenia del RNA mensajero de TH.

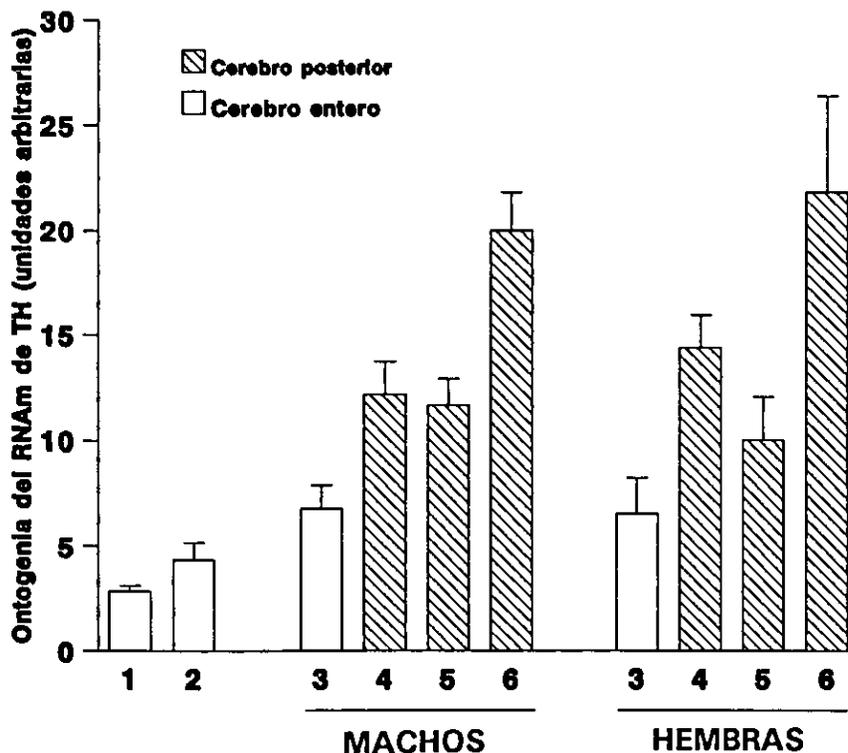


Figura 9: Expresión del RNAm de TH en cerebro durante el desarrollo. Los niveles de RNAm de TH se analizaron mediante "northern", realizado con RNA total de cerebro entero en los días gestacionales 14 (1), 16 (2) y 18 (3), y en cerebro posterior de animales de los días gestacional 21 (4) y postnatales 1 (5) y 5 (6). Se muestran los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica tras la normalización con los datos obtenidos al cuantificar los RNA ribosómicos. Se expresan como media \pm EEM de al menos 3 "northern" diferentes y se representan en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno.

Los cambios en los niveles de RNA mensajero de TH en cerebro a lo largo del desarrollo se estudiaron mediante análisis de "northern". El RNAm aumenta progresivamente durante el desarrollo, se detecta los días gestacionales 14 y 16 en cerebro entero y en cerebro posterior en los siguientes días, sin encontrarse diferencias entre machos y hembras. La señal obtenida en el día postnatal 1 fue menor que en el día gestacional 21 usando la misma cantidad de RNA total, pero ello es debido a que el tamaño del cerebro aumenta mucho en este día y aunque la cantidad total de RNA mensajero de TH es mayor en el DPN1 que en el DG21, pero la proporción de RNA mensajero de TH respecto al RNA total es, sin embargo, menor. Posteriormente vuelve a aumentar en el DPN5.

2.2. Ontogenia de la cantidad total de TH.

La cantidad de proteína se detectó por "western" y presenta un patrón similar al descrito para el RNAm.

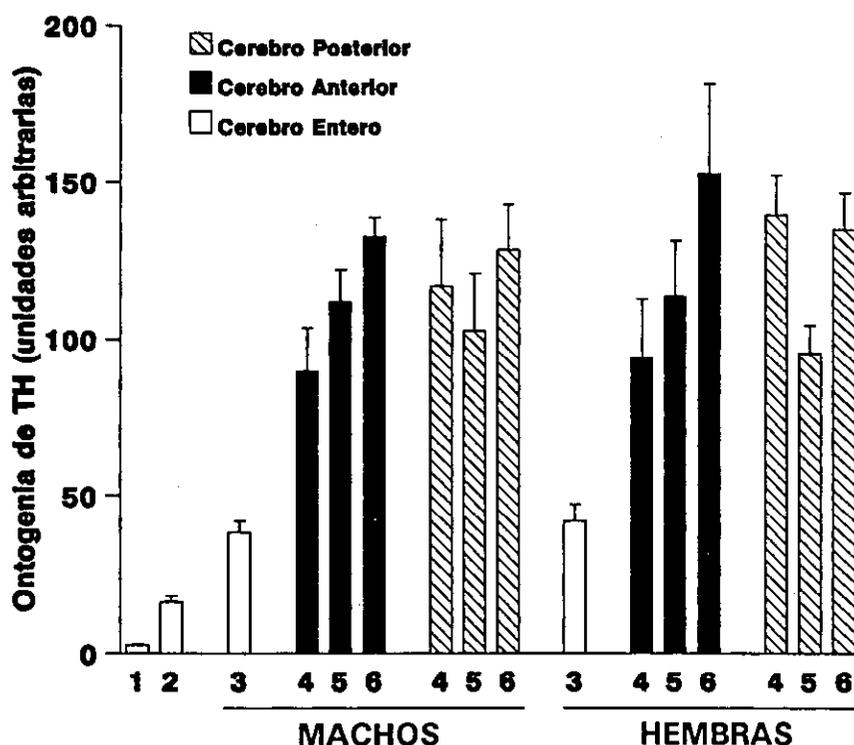


Figura 10: Cantidad de TH en cerebro durante el desarrollo. La cantidad de TH se analizó mediante "western" realizado con homogeneizados de cerebros enteros de animales del día gestacional 14 (1) y 16 (2) y 18 (3), y en cerebro anterior y posterior en los días gestacional 21 (4) y postnatales 1 (5) y 5 (6). Se muestran los valores correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan como media \pm EEM de al menos 3 "western" diferentes y se representan en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno.

La ontogenia de la cantidad de proteína se muestra en la figura 10, los niveles de TH aumentan progresivamente desde el día gestacional 14 al día postnatal 5 y no existen diferencias entre sexos. Se observa una disminución de la señal en el día postnatal 1 sólo en el cerebro posterior, lo que podría deberse, como en el caso del RNA, a una disminución de la proporción de TH presente en el conjunto total de proteínas.

2.3. Ontogenia de la actividad de TH.

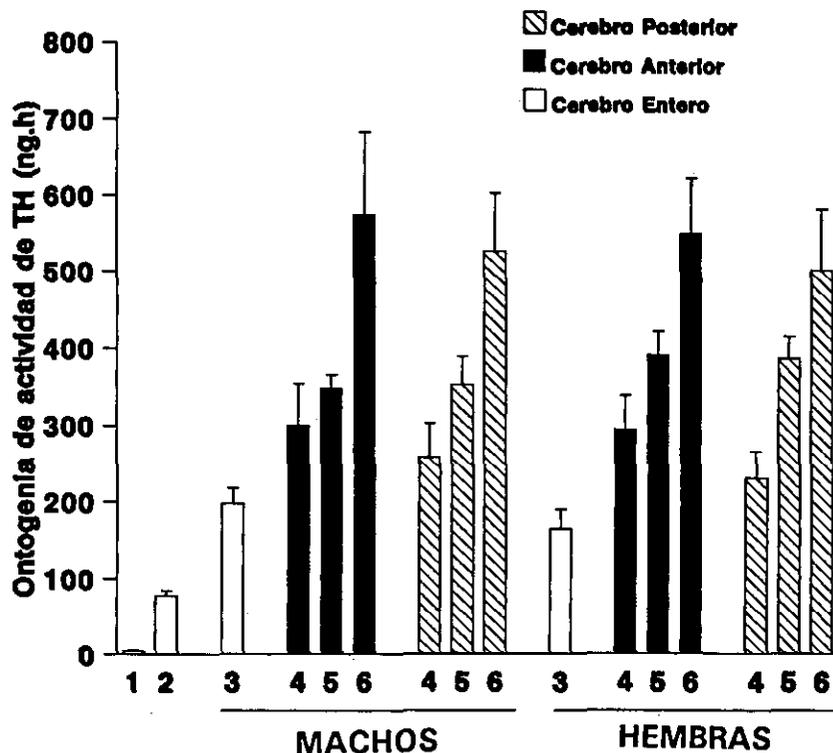


Figura 11: Ontogenia de la actividad de la TH. La actividad de la TH se midió en cerebros enteros de animales del día gestacional 14 (1), 16 (2) y 18 (3), y en cerebro anterior y posterior en los días gestacional 21 (4) y postnatales 1 (5) y 5 (6). Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo.

En la figura 11 se muestra la ontogenia de la actividad de la TH. La actividad se detectó por HPLC midiendo la cantidad de producto formado en un ensayo *in vitro*. La actividad de TH se puede detectar ya en el día gestacional 14 aumentando progresivamente durante todos los días estudiados sin existir diferencias entre sexos.

2.4. Ontogenia de los contenidos de catecolaminas.

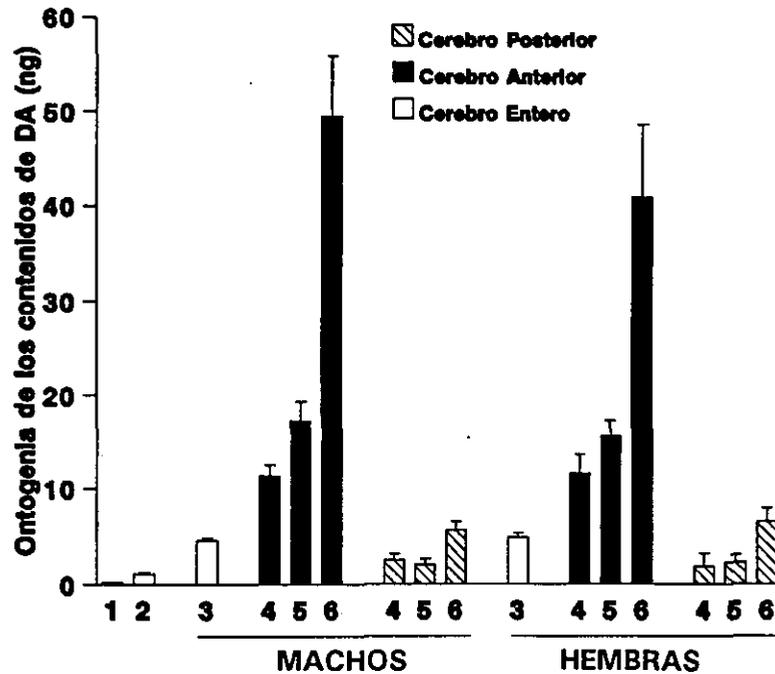


Figura 12: Ontogenia de los contenidos de DA. Los contenidos de DA se midieron en cerebros enteros de animales del día gestacional 14 (1), 16 (2) y 18 (3), y en cerebro anterior y posterior en los días gestacional 21 (4) y postnatales 1 (5) y 5 (6). Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo.

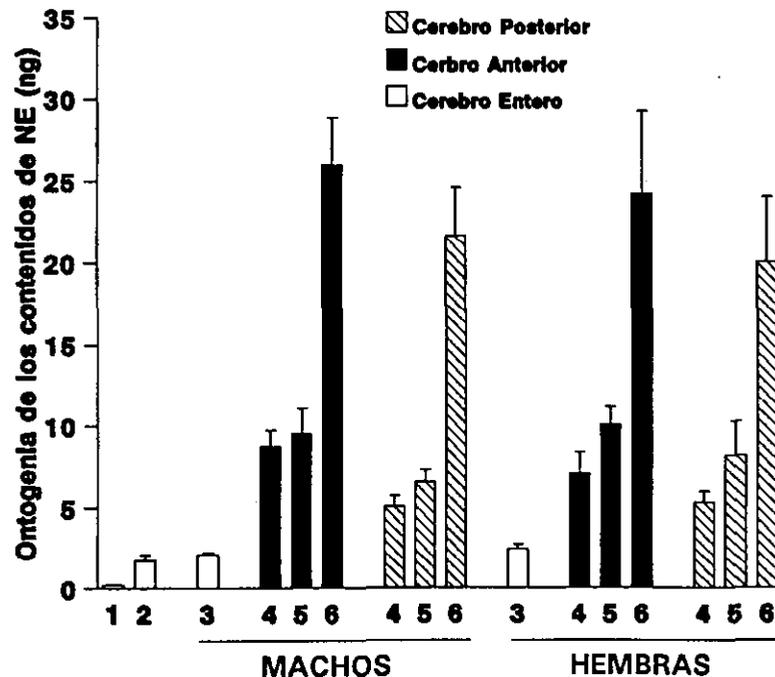


Figura 13: Ontogenia de los contenidos de NE. Los contenidos de NE se midieron en cerebros enteros de animales del día gestacional 14 (1), 16 (2) y 18 (3), y en cerebro anterior y posterior en los días gestacional 21 (4) y postnatales 1 (5) y 5 (6). Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo.

Cuando se expresan por cantidad total de tejido, la actividad de TH y los contenidos de catecolaminas muestran incrementos en función de la edad. Así, los incrementos fueron muy pronunciados del día gestacional 14 al 16 (+ de 10 veces), (actividad de TH: $F(1,16) = 131.28$, $p < 0.0001$; contenidos de DA: $F(1,16) = 37.33$, $p < 0.0001$; contenidos de NE: $F(1,16) = 29.27$, $p < 0.0001$). En el día gestacional 18, estos parámetros aumentaron hasta el doble (exceptuando los contenidos de NE), y fueron medidos en cerebro entero de hembras y machos por separado, aunque no hubo diferencias respecto al sexo, (actividad de TH: $F(1,17) = 1.063$, ns; contenidos de DA: $F(1,17) = 0.183$; contenidos de NE: $F(1,17) = 0.947$, ns). Durante el periodo DG21 - DG5, la actividad de TH y los contenidos de DA incrementaron progresivamente tanto en el cerebro anterior como en el posterior, pero no hubo diferencias por sexo tanto si se analiza esta variable individualmente como si se estudia la interacción con la edad. La estadística se muestra en la tabla 6.

Tabla 6:

	EDAD	SEXO	EDAD X SEXO
Actividad de TH			
Cerebro anterior:	$F(2,39) = 8.12$, $p < 0.005$	$F(1,39) = 0.009$, ns	$F(2,39) = 0.15$, ns
Cerebro posterior:	$F(2,39) = 10.02$, $p < 0.0005$	$F(1,39) = 0.02$, ns	$F(2,39) = 0.19$, ns
Contenidos de DA			
Cerebro anterior:	$F(2,39) = 30.55$, $p < 0.0001$	$F(1,39) = 0.76$, ns	$F(2,39) = 0.53$, ns
Cerebro posterior:	$F(2,39) = 11.96$, $p < 0.0001$	$F(1,39) = 0.07$, ns	$F(2,39) = 0.30$, ns
Contenidos de NE			
Cerebro anterior:	$F(2,39) = 26.32$, $p < 0.0001$	$F(1,39) = 0.21$, ns	$F(2,39) = 0.13$, ns
Cerebro posterior:	$F(2,39) = 26.97$, $p < 0.0001$	$F(1,39) = 0.009$, ns	$F(2,39) = 0.26$, ns
Contenidos de DOPAC			
Cerebro anterior:	$F(1,29) = 54.27$, $p < 0.0001$	$F(1,29) = 0.01$, ns	$F(1,29) = 0.03$, ns
Cerebro posterior:	$F(1,29) = 4.98$, $p < 0.01$	$F(1,29) = 0.01$, ns	$F(1,29) = 0.28$, ns

3. EFECTOS DE LA EXPOSICION PERINATAL A THC SOBRE EL DESARROLLO DE LOS SISTEMAS CATECOLAMINERGICOS.

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo de este estudio es estudiar las alteraciones producidas por el THC en la expresión de la TH y en la actividad de esta enzima durante el desarrollo prenatal y postnatal temprano. Estas alteraciones podrían ser las responsables de cambios observados en el sistema dopaminérgico de animales expuestos perinatalmente a cannabinoides bien en edades posteriores del desarrollo postnatal, bien en adultos.

3.1. Efectos en los días gestacionales 14 y 16.

La enzima TH aparece alrededor del día gestacional 14, presumiblemente en neuronas dopaminérgicas, dentro de los conos de crecimiento en las neuronas inmaduras, y esto parece indicar que esta enzima o su neurotransmisor podrían intervenir en procesos de reconocimiento neural y formación de contactos, funciones propias de los conos de crecimiento. Por eso es posible que pequeñas alteraciones producidas por los cannabinoides en esta enzima durante estos días gestacionales puedan afectar procesos críticos en la maduración de los sistemas de neurotransmisores dando lugar a alteraciones mucho más profundas en la edad adulta.

3.1.1. Efecto sobre el RNA mensajero de TH.

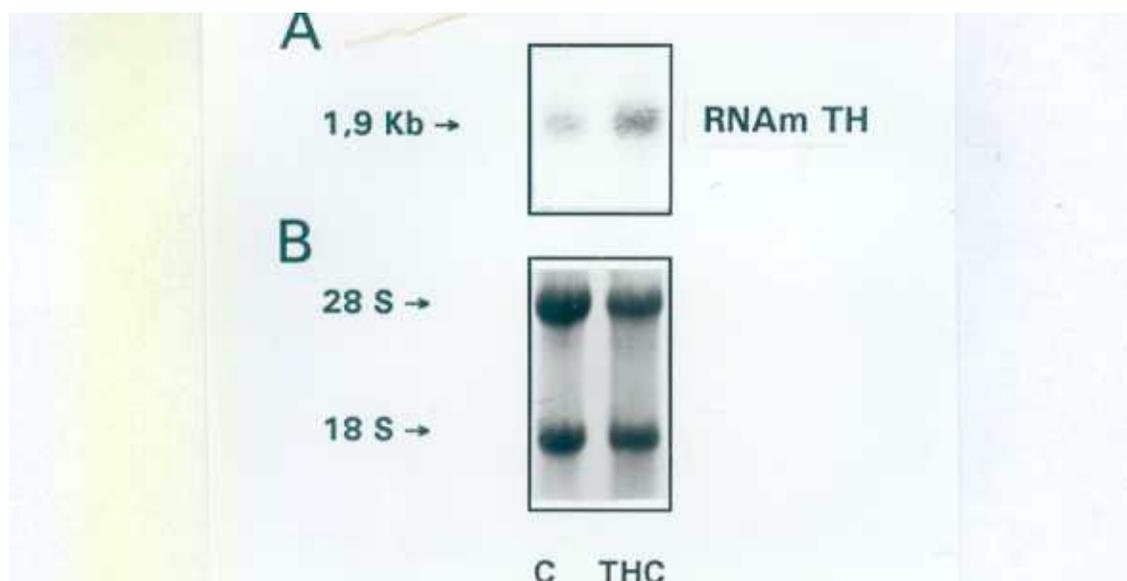


Figura 14: Expresión del RNA mensajero de TH en cerebro en el día gestacional 14. Los niveles de RNAm de TH se analizaron mediante "northern", realizado con RNA total de cerebros individuales de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). Los filtros se tiñeron con azul de metileno (panel B) y se hibridaron con la sonda cDNA de TH detectándose un RNA específico de TH de 1.9 Kb (panel A). Se muestra una autorradiografía representativa. Los datos correspondientes a la cuantificación de los "northern" se muestran en la figura 16.

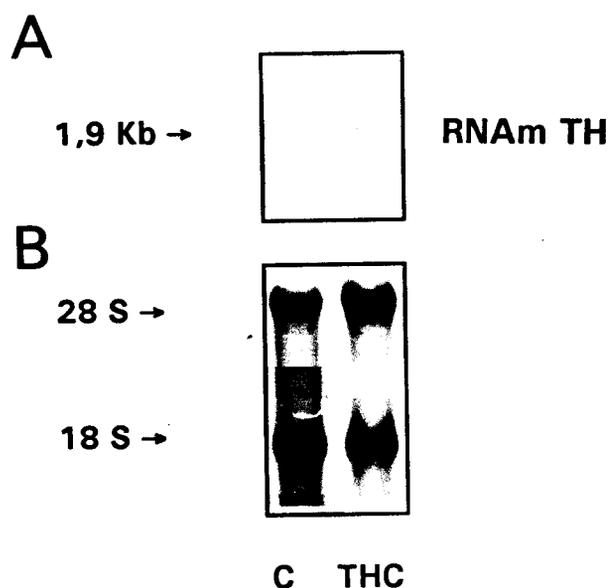


Figura 15: Expresión del RNA mensajero de TH en cerebro en el día gestacional 16. Los niveles de RNAm de TH se analizaron mediante "northern", realizado con RNA total de cerebros individuales de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). Los filtros se tiñeron con azul de metileno (panel B) y se hibridaron con la sonda cDNA de TH detectándose un RNA específico de TH de 1.9 Kb (panel A). Se muestra una autorradiografía representativa. Los datos correspondientes a la cuantificación de los "northern" se muestran en la figura 16.

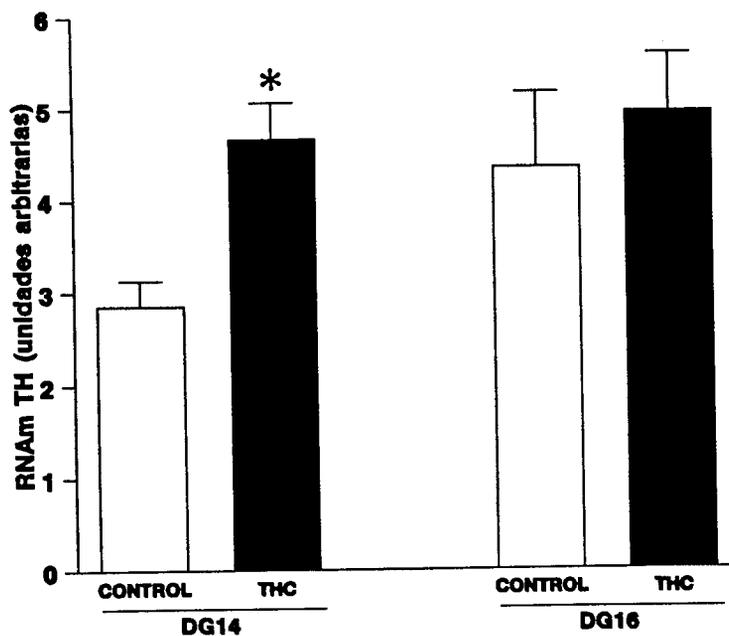


Figura 16: Expresión del RNAm de TH en cerebro en los días gestacionales 14 y 16. Se muestran los datos obtenidos de la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan, una vez normalizados con los obtenidos al cuantificar los RNA ribosómicos, como media \pm EEM de al menos 3 "northern" diferentes. Los datos se representan en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno. Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de dos vías seguido de test SNK (* $p < 0.05$).

La exposición perinatal a THC afectó la expresión del gen de TH en el cerebro de fetos durante este periodo gestacional. El análisis de varianza de dos vías (edad x tratamiento) demostró la existencia de diferencias significativas en el tratamiento ($F(1,20) = 5.998$, $p < 0.05$) y una tendencia no significativa por edad ($F(1,20) = 3.205$, $p = 0.0886$), mientras que la interacción de ambas variables no fue significativa ($F(1,20) = 1.523$, ns). Concretamente, las cantidades de RNAm en el día gestacional 14 fueron mucho más altas (dos veces) en fetos expuestos perinatalmente a THC que en los controles. Aunque este efecto se atenuó en el día gestacional 16 donde las concentraciones de RNAm en fetos expuestos a THC fueron algo más altas, de una forma no estadísticamente significativa (Figura 16).

3.1.2. Efecto sobre la cantidad de TH.

Como en el caso de el RNAm, la exposición prenatal a THC también afectó a la cantidad de proteína TH en cerebro de fetos en los días gestacionales 14 y 16. El análisis de varianza de dos vías (edad x tratamiento) demostró que existen diferencias por edad ($F(1,16) = 20.573$, $p < 0.005$) y por tratamiento ($F(1,16) = 6.227$, $p = 0.05$), aunque la interacción de ambas variables no fue significativa ($F(1,16) = 1.278$, ns). Se observó un marcado incremento en la concentración de proteína (4 veces) en el día gestacional 14, aunque este incremento se redujo en el día gestacional 16 hasta perder la significación estadística (figura 19).

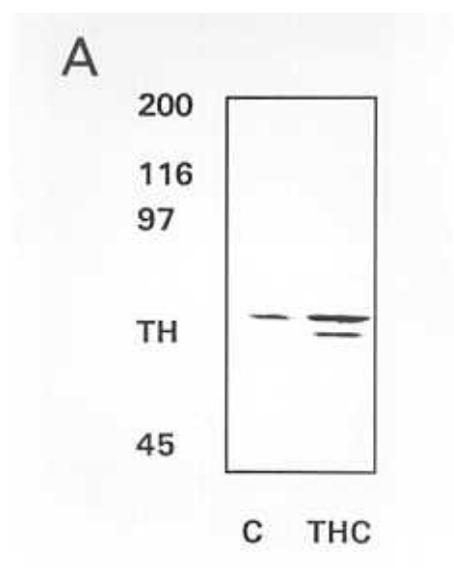


Figura 17: Cantidad de TH en cerebro en el día gestacional 14. La cantidad de TH se analizó mediante "western", realizado con homogeneizados de cerebros enteros de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). Se muestra una autorradiografía representativa, el peso molecular de los marcadores (en KDa) se indica a la izquierda. Los datos correspondientes a la cuantificación de los "western" se muestran en la figura 19.

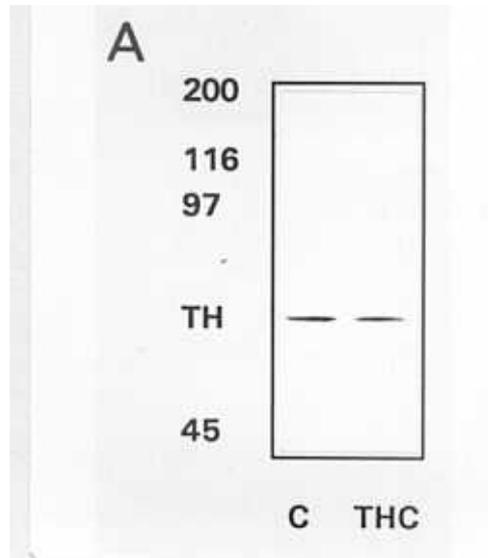


Figura 18: Cantidad de TH en cerebro en el día gestacional 16. La cantidad de TH se analizó mediante "western", realizado con homogeneizados de cerebros enteros de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). Se muestra una autorradiografía representativa, el peso molecular de los marcadores (en KDa) se indica a la izquierda. Los datos correspondientes a la cuantificación de los "western" se muestran en la figura 19.

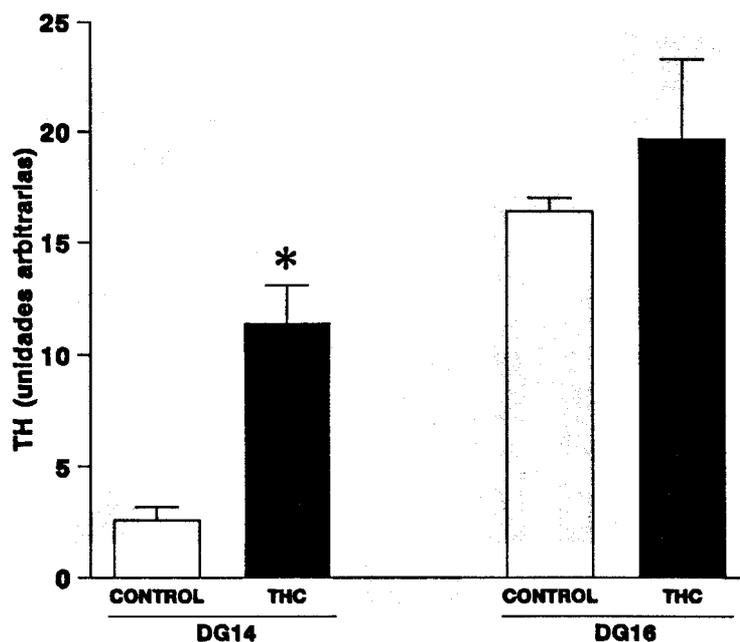


Figura 19: Cantidad de TH en cerebro en los días gestacionales 14 y 16. Se muestran los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan como media \pm EEM de al menos 3 "western" diferentes, representados en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno. Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de dos vías seguido de test SNK (* $p < 0.05$).

3.1.3. Efecto sobre la actividad de TH.

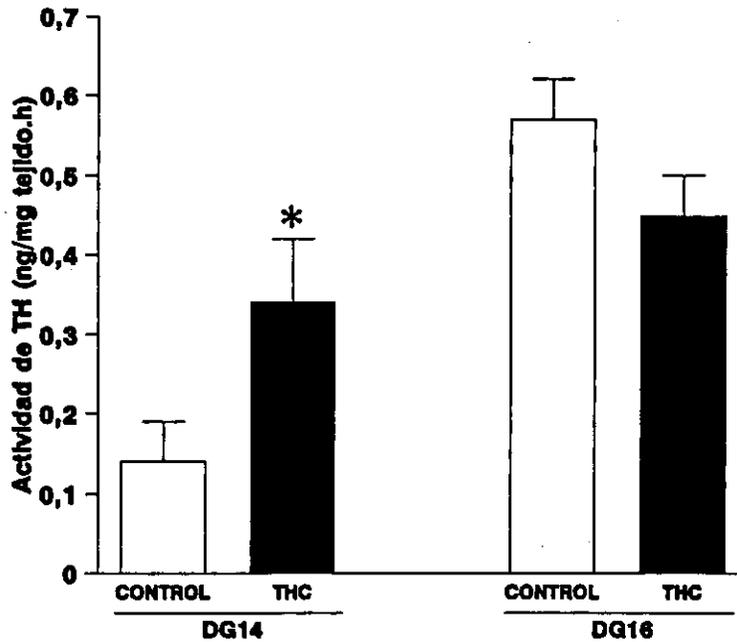


Figura 20: Actividad de TH en cerebro en los días gestacionales 14 y 16. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de dos vías seguido de test SNK (* $p < 0.05$).

El análisis de varianza de dos vías (edad x tratamiento) demostró que el efecto de la exposición perinatal a THC sobre la actividad durante este periodo fetal dependió claramente de la edad (edad: $F(1,34) = 16.43$, $p < 0.005$; tratamiento: $F(1,34) = 0.32$, ns; interacción: $F(1,34) = 6.12$, $p < 0.05$). Así, se observó un incremento muy marcado en la actividad de esta enzima (3 veces) en el día gestacional 14, pero sin cambios, incluso una cierta reducción, en el día gestacional 16 (Figura 20).

3.1.4. Efecto sobre los contenidos de DA y NE.

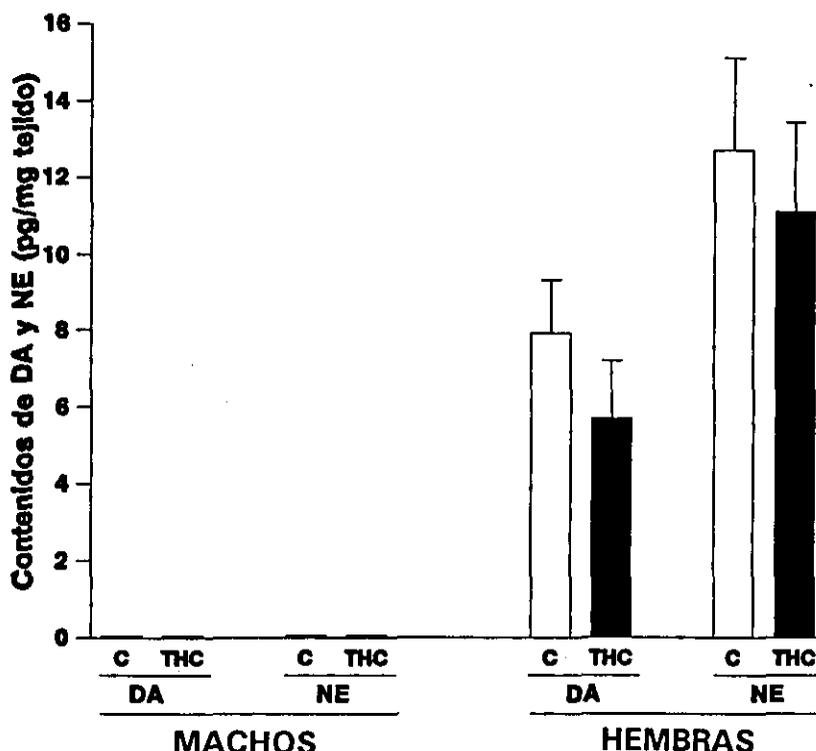


Figura 21: Concentraciones de DA y NE en cerebro en los días gestacionales 14 y 16. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de dos vías seguido de test SNK.

El análisis de varianza de dos vías (edad x tratamiento) de los efectos del THC sobre los contenidos de DA y NE durante este periodo fetal demostró que sólo por edad (DA: $F(1,34) = 27.17$, $p < 0.001$; NE: $F(1,33) = 36.96$, $p < 0.001$), pero no por tratamiento (DA: $F(1,34) = 0.32$, ns; NE: $F(1,33) = 0.12$, ns) o por la interacción entre las dos variables (DA: $F(1,34) = 1.93$, ns; NE: $F(1,33) = 0.31$, ns) aparecen diferencias estadísticas. Las concentraciones de catecolaminas fueron prácticamente no detectables en el DG14 (figura 21).

3.2. Efectos en el día gestacional 18.

Desde el día gestacional 18 los animales pudieron ser separados por sexos. El día gestacional 18 es interesante, ya que en la rata este día aparece el pico de testosterona en plasma que provoca la diferenciación sexual. Por ello, se trata de un día especialmente sensible a la influencia de factores epigenéticos.

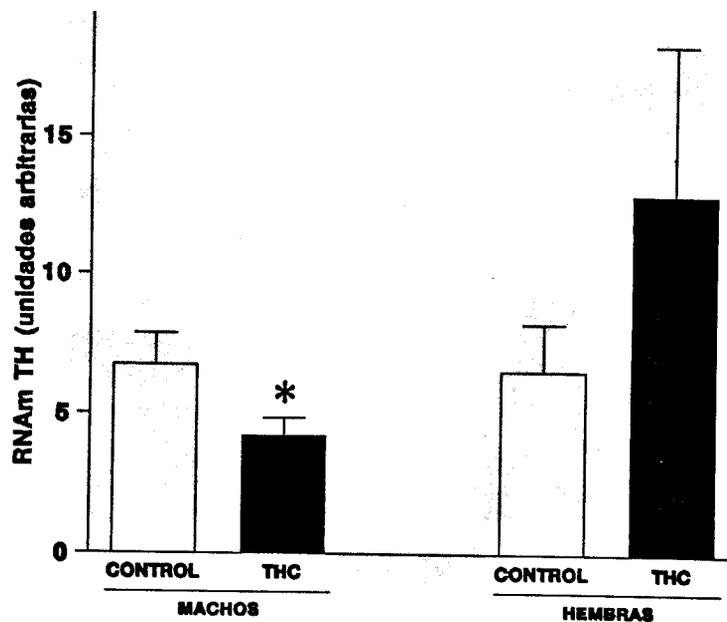


Figura 22: Expresión del RNA_m de TH en cerebro en el día gestacional 18. Los niveles de RNA_m de TH se analizaron mediante "northern", realizado con RNA total de cerebros enteros de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). Los filtros se tiñeron con azul de metileno (panel B) y se hibridaron con la sonda cDNA de TH detectándose un RNA específico de TH de 1.9 Kb (panel A), se muestra una autorradiografía representativa. En el panel C representamos los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan, una vez normalizados a los obtenidos al cuantificar los RNA ribosómicos, como media ± EEM de al menos 3 "northern" diferentes (representados en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno). Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de dos vías seguido de test SNK (* p < 0.05).

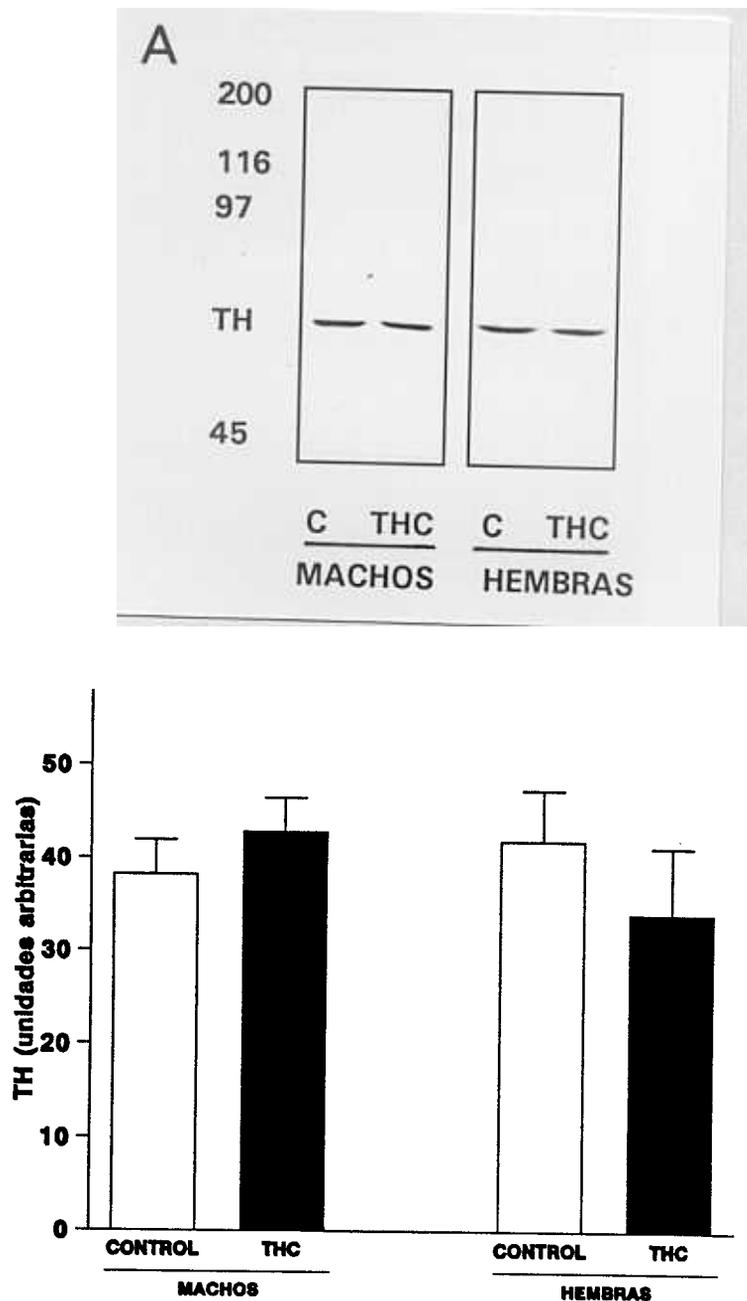


Figura 23: Cantidad de TH en cerebro en el día gestacional 18. La cantidad de TH se analizó mediante "western", realizado en cerebros enteros de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). En el panel A se muestra una autorradiografía significativa, el peso molecular de los marcadores (en KDa) se indica a la izquierda. En el panel B representamos los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan como media \pm EEM de al menos 3 "western" diferentes (representados en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno). Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de dos vías seguido de test SNK.

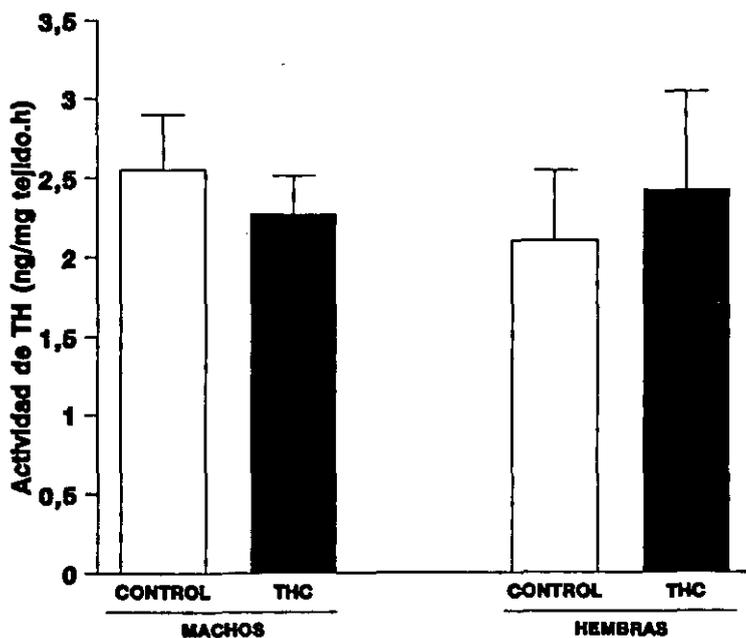


Figura 24: Actividad de TH en cerebro en el día gestacional 18. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de dos vías seguido de test SNK.

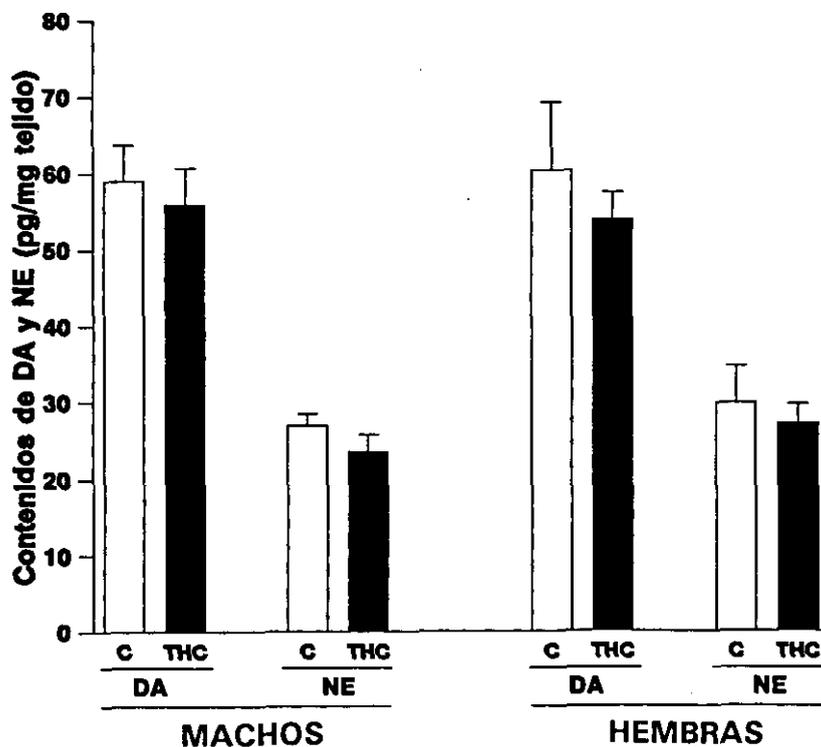


Figura 25: Contenidos de DA y NE en cerebro en el día gestacional 18. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de dos vías y test SNK.

La exposición prenatal a THC no afectó las cantidades de RNAm de TH, ni los demás parámetros estudiados en el cerebro de fetos del día gestacional 18. El análisis de varianza de dos vías (sexo x tratamiento) demostró que no existen diferencias por sexo, tratamiento o la interacción entre ellos (tabla 7).

Tabla 7:

	SEXO	TRATAMIENTO	TRATAMIENTO X SEXO
RNAm de TH:	F(1,8) = 2.102, ns	F(1,8) = 0.428, ns	F(1,8) = 2.326, ns
Proteína:	F(1,14) = 0.21, ns	F(1,14) = 0.083, ns	F(1,14) = 1.21, ns
Actividad de TH:	F(1,36) = 0.142, ns	F(1,36) = 0.03, ns	F(1,36) = 0.543, ns
Contenidos de DA	F(1,36) = 0.061, ns	F(1,36) = 0.783, ns	F(1,36) = 0.098, ns
Contenidos de NE	F(1,36) = 1.261, ns	F(1,36) = 1.116, ns	F(1,36) = 0.026, ns

De todas formas, se observó una tendencia en el RNAm de TH a disminuir en machos y a aumentar en hembras, tendencia como veremos que convierte en diferencia significativa en los siguientes días analizados.

3.3. Efectos en los días gestacional 21 y postnatales 1 y 5.

3.3.1. Efecto sobre el RNA mensajero de TH.

Como ocurrió en el día gestacional 14, en este periodo del desarrollo (DG21 - DPN5) la exposición a THC también afectó la expresión del gen de la enzima TH en el cerebro de los animales. El análisis de varianza de tres vías (edad x sexo x tratamiento) demostró la existencia de diferencias dependientes del sexo y de la edad, analizadas independientemente, y por tratamiento pero sólo cuando interacciona con el sexo. Lo que claramente indica la existencia de diferentes respuestas en función del sexo. La estadística se muestra en la tabla 8. Comparando grupos concretos, se observó que la exposición a THC disminuyó significativamente la cantidad de RNAm de TH en machos en el día gestacional 21 (figura 26) y el día postnatal 1 (figura 27) y no significativamente en el día postnatal 5 (figura 28), y aumentó significativamente en hembras en el día gestacional 21 (figura 26) y no significativamente en las edades postnatales (figuras 27 y 28).

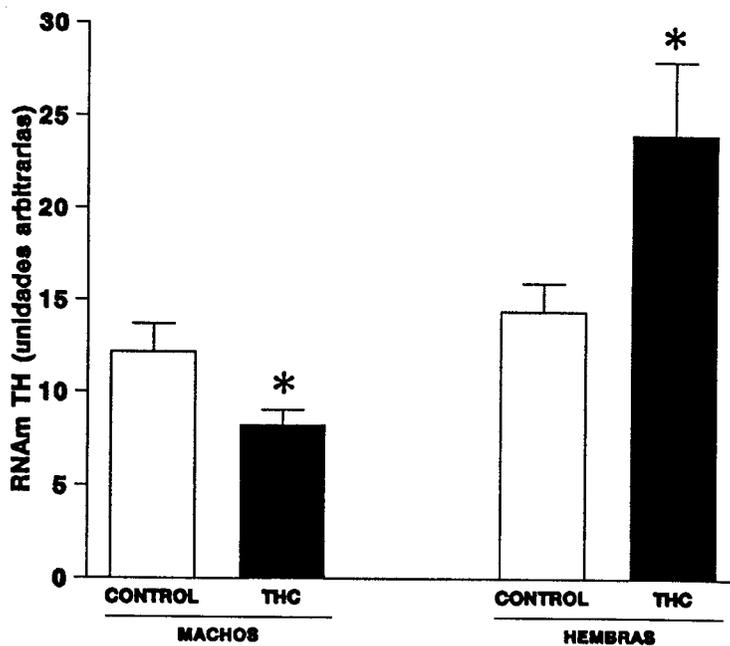


Figura 26: Expresión del RNAm de TH en cerebro en el día gestacional 21. Los niveles de RNAm de TH se analizaron mediante "northern", realizado con RNA total de cerebro posterior de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). Los filtros se tiñeron con azul de metileno (panel B) y se hibridaron con la sonda cDNA de TH detectándose un RNA específico de TH de 1.9 Kb (panel A), se muestra una autorradiografía representativa. En el panel C representamos los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan, una vez normalizados con los obtenidos al cuantificar los RNA ribosómicos, como media \pm EEM de al menos 3 "northern" diferentes (representados en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno). Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK (* $p < 0.05$).

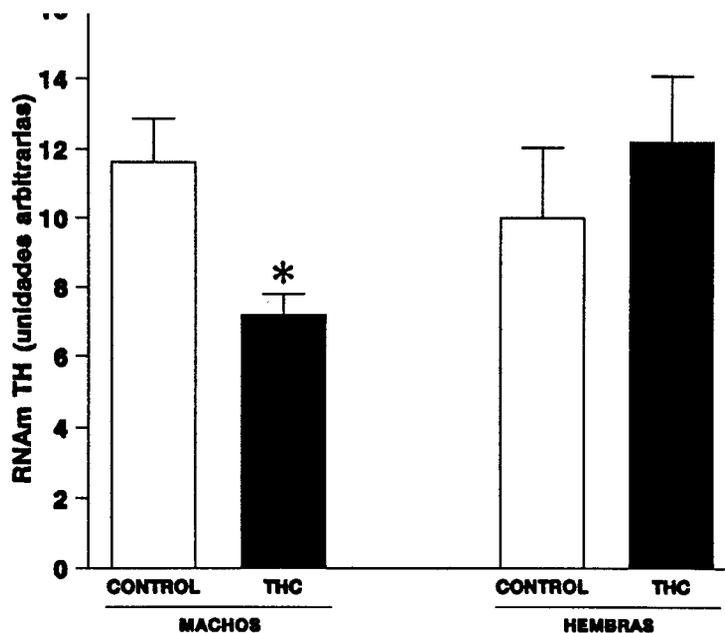


Figura 27: Expresión del RNAm de TH en cerebro en el día postnatal 1. Los niveles de RNAm de TH se analizaron mediante "northern", realizado con RNA total de cerebro posterior de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). Los filtros se tiñeron con azul de metileno (panel B) y se hibridaron con la sonda cDNA de TH detectándose un RNA específico de TH de 1.9 Kb (panel A), se muestra una autorradiografía representativa. En el panel C representamos los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan, una vez normalizados con los obtenidos al cuantificar los RNA ribosómicos, como media \pm EEM de al menos 3 "northern" diferentes (representados en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno). Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK (* $p < 0.05$).

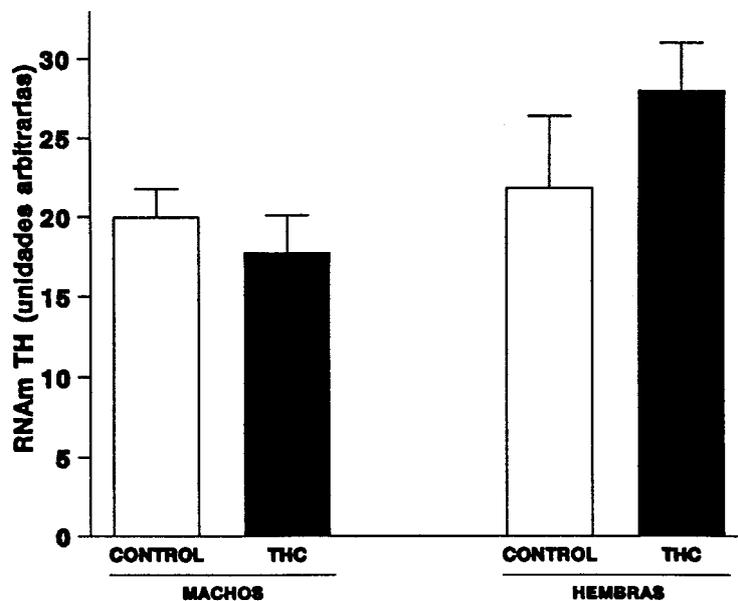
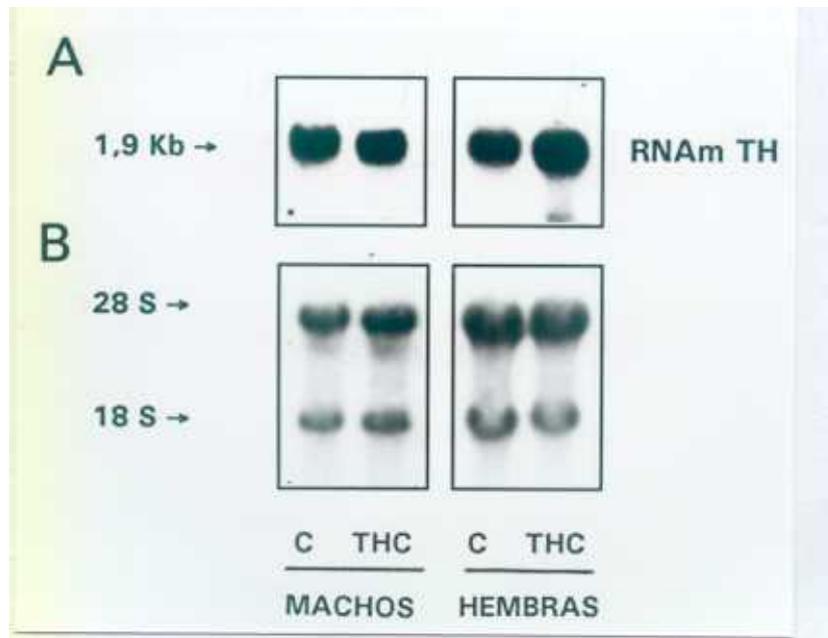


Figura 28: Expresión del RNAm de TH en cerebro en el día postnatal 5. Los niveles de RNAm de TH se analizaron mediante "northern", realizado con RNA total de cerebro posterior de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). Los filtros se tiñeron con azul de metileno (panel B) y se hibridaron con la sonda cDNA de TH detectándose un RNA específico de TH de 1.9 Kb (panel A), se muestra una autorradiografía representativa. En el panel C representamos los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan, una vez normalizados con los obtenidos al cuantificar los RNA ribosómicos, como media \pm EEM de al menos 3 "northern" diferentes (representados en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno). Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

3.3.2. Efectos sobre el resto de los parámetros.

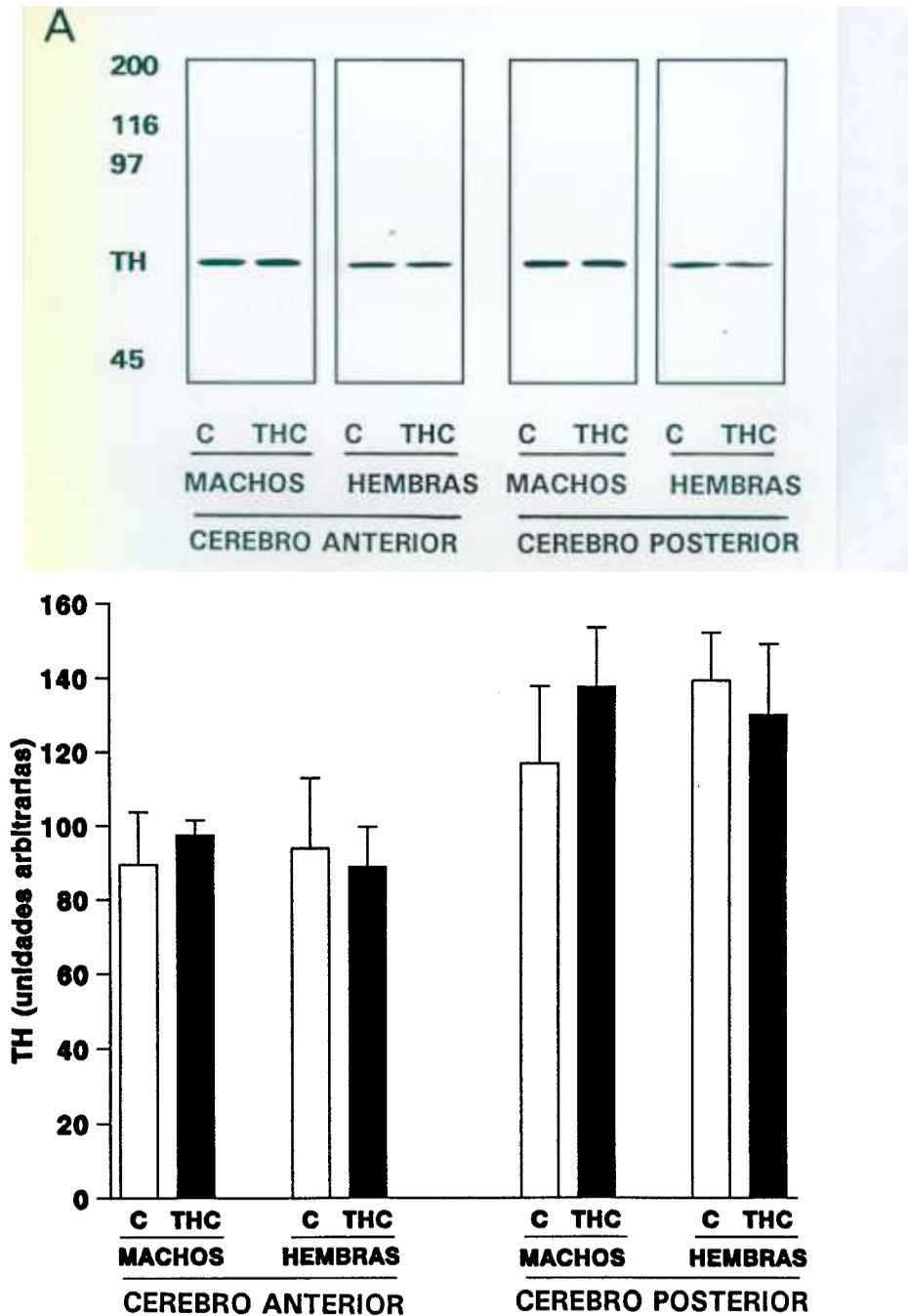


Figura 29: Cantidad de TH en cerebro en el día gestacional 21. La cantidad de TH se analizó mediante "western", realizado en cerebro anterior y posterior de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). En el panel A se muestra una autorradiografía significativa, el peso molecular de los marcadores (en KDa) se indica a la izquierda. En el panel B representamos los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan como media \pm EEM de al menos 3 "western" diferentes (representados en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno). Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

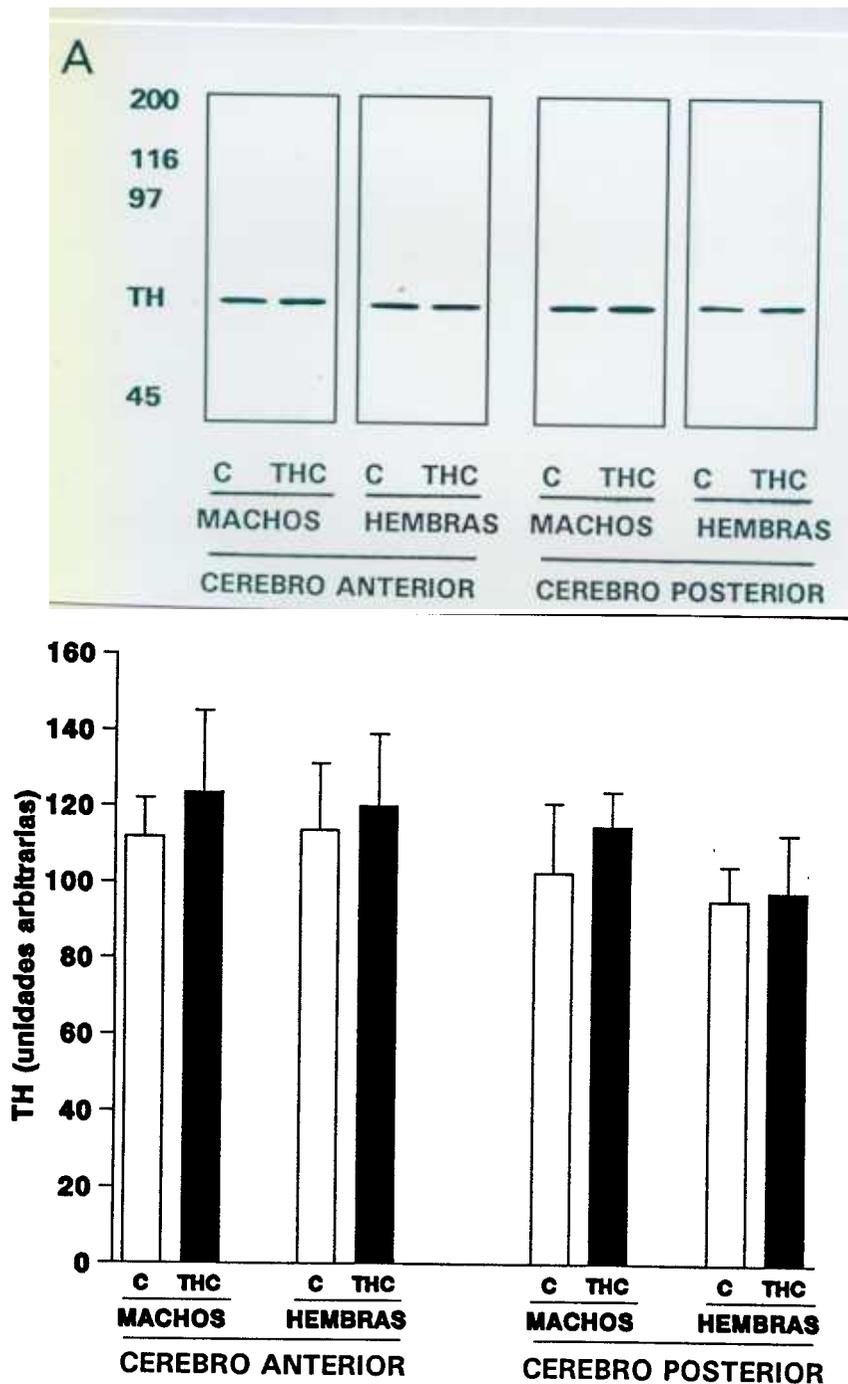


Figura 30: Cantidad de TH en cerebro en el día postnatal 1. La cantidad de TH se analizó mediante "western", realizado en cerebro anterior y posterior de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). En el panel A se muestra una autorradiografía significativa, el peso molecular de los marcadores (en KDa) se indica a la izquierda. En el panel B representamos los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan como media \pm EEM de al menos 3 "western" diferentes (representados en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno). Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

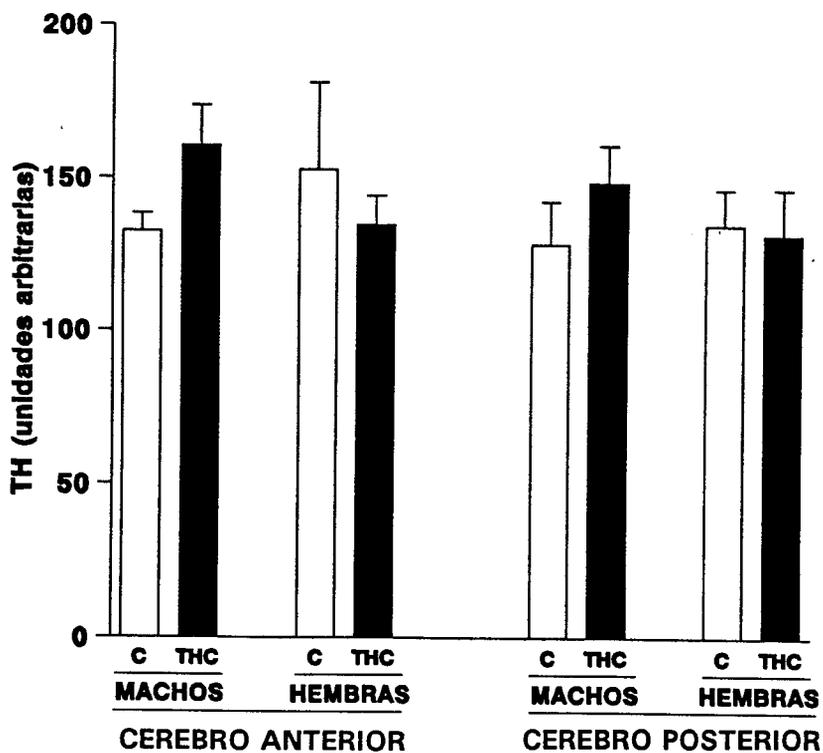
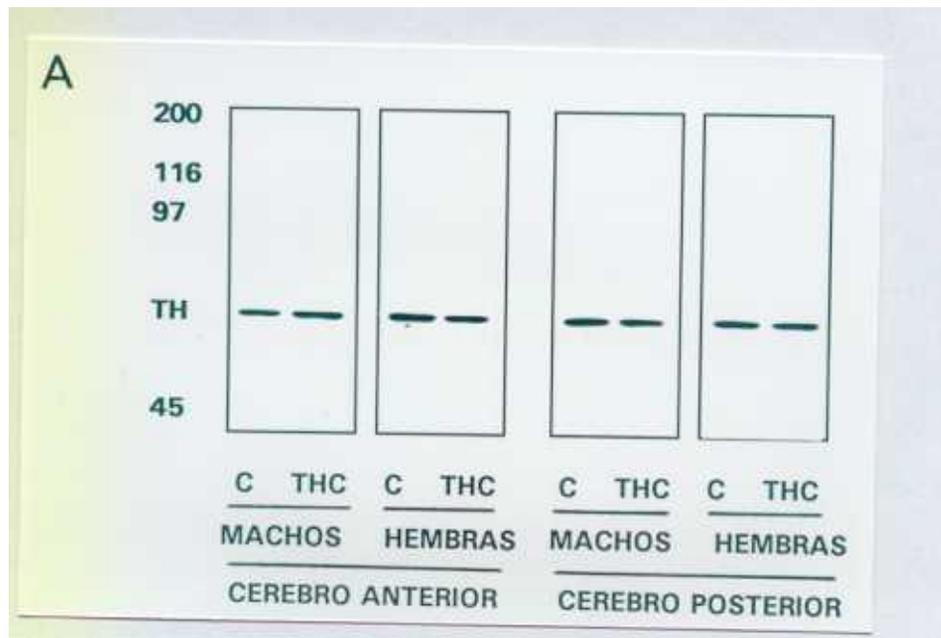


Figura 31: Cantidad de TH en cerebro en el día postnatal 5. La cantidad de TH se analizó mediante "western", realizado en cerebro anterior y posterior de animales control (C) y tratados perinatalmente con THC (THC). En el panel A se muestra una autorradiografía significativa, el peso molecular de los marcadores (en KDa) se indica a la izquierda. En el panel B representamos los datos correspondientes a la cuantificación de la banda específica. Los datos se expresan como media \pm EEM de al menos 3 "western" diferentes (representados en tanto por ciento, asignándole el valor 100% al valor obtenido en el control interno). Las significaciones estadísticas se obtuvieron mediante análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

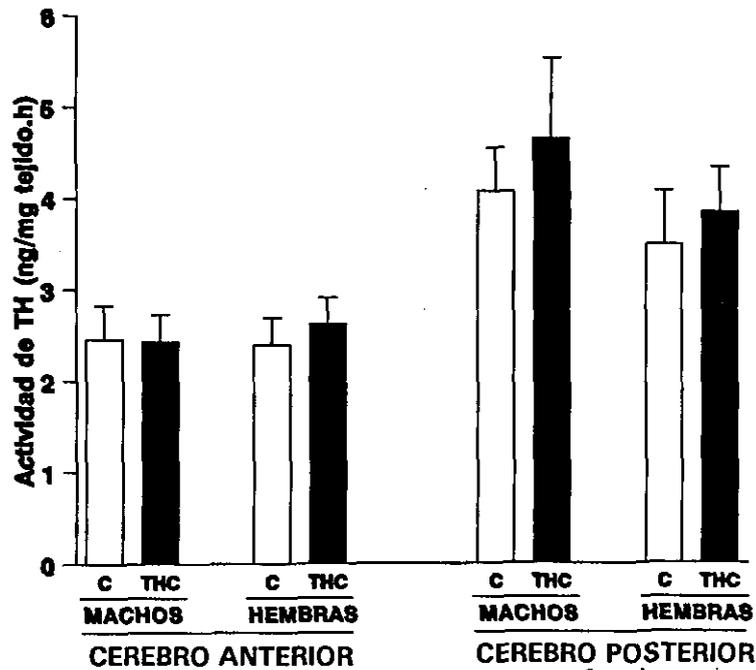


Figura 32: Actividad de TH en cerebro anterior y posterior en el día gestacional 21. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

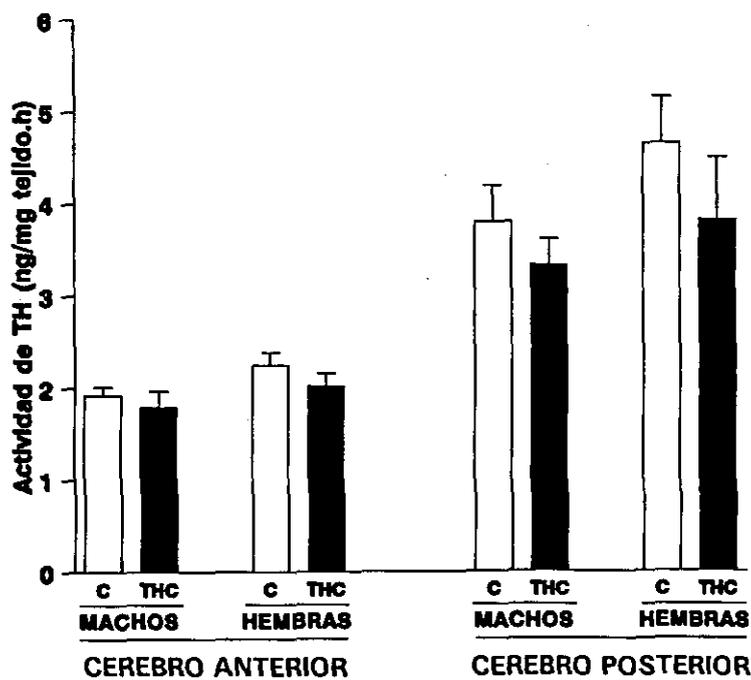


Figura 33: Actividad de TH en cerebro anterior y posterior en el día postnatal 1. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

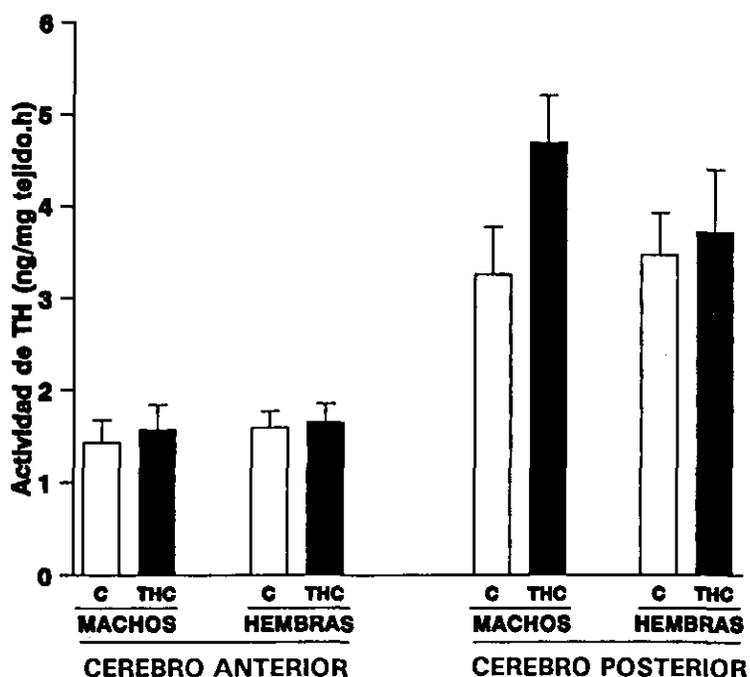


Figura 34: Actividad de TH en cerebro anterior y posterior en el día postnatal 5. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

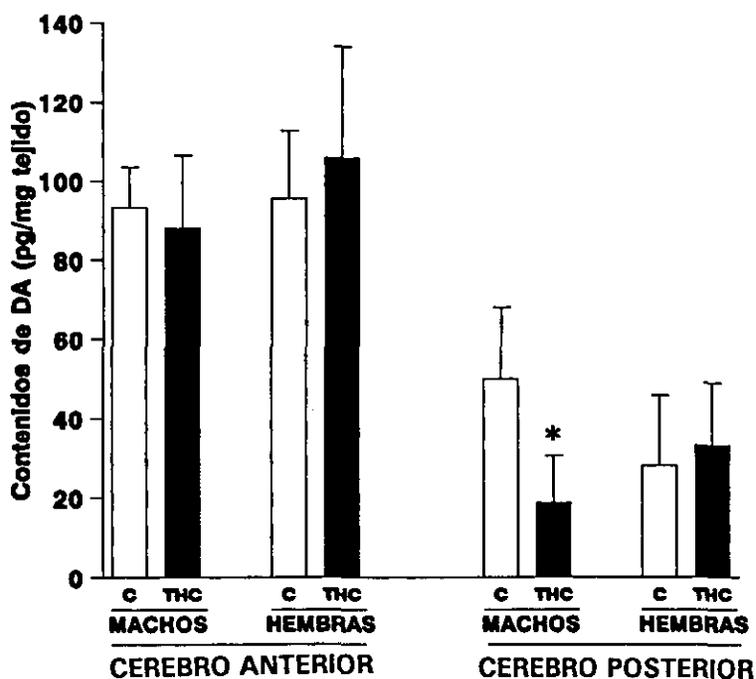


Figura 35: Contenidos de DA en cerebro anterior y posterior en el día gestacional 21. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK (* $p < 0.05$).

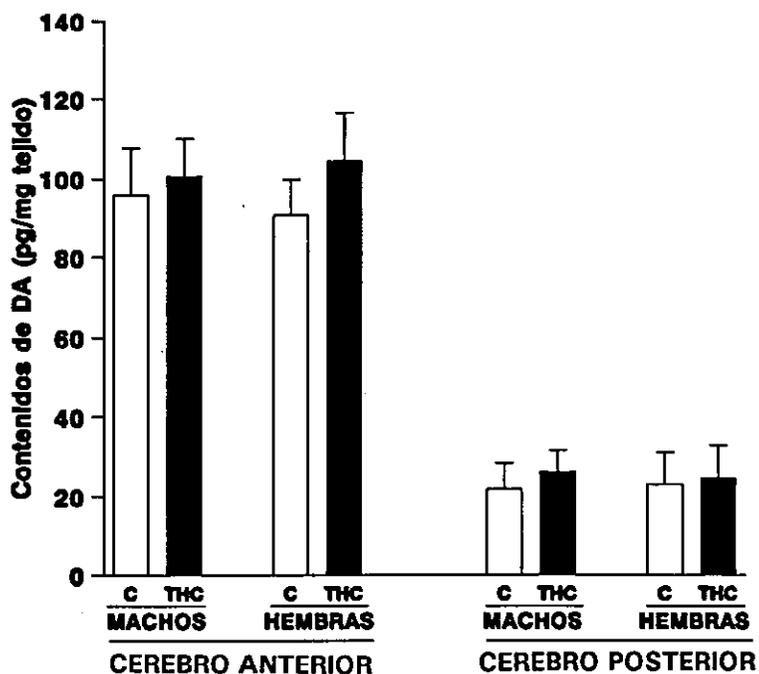


Figura 36: Contenidos de DA en cerebro anterior y posterior en el día postnatal 1. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

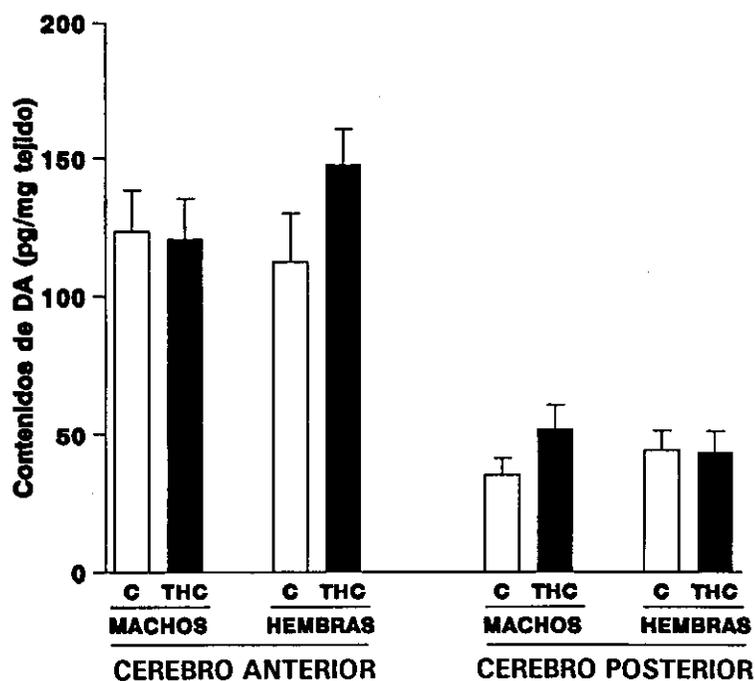


Figura 37: Contenidos de DA en cerebro anterior y posterior en el día postnatal 5. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

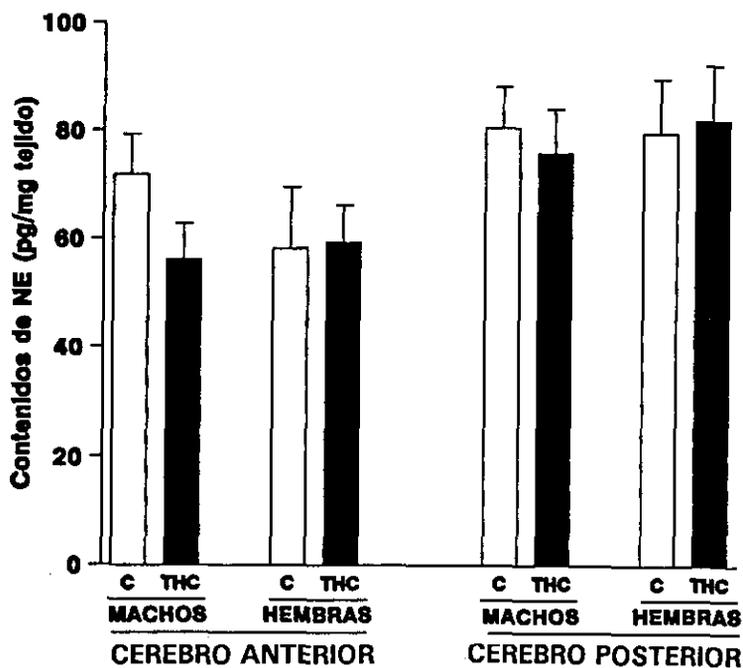


Figura 38: Contenidos de NE en cerebro anterior y posterior en el día gestacional 21. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

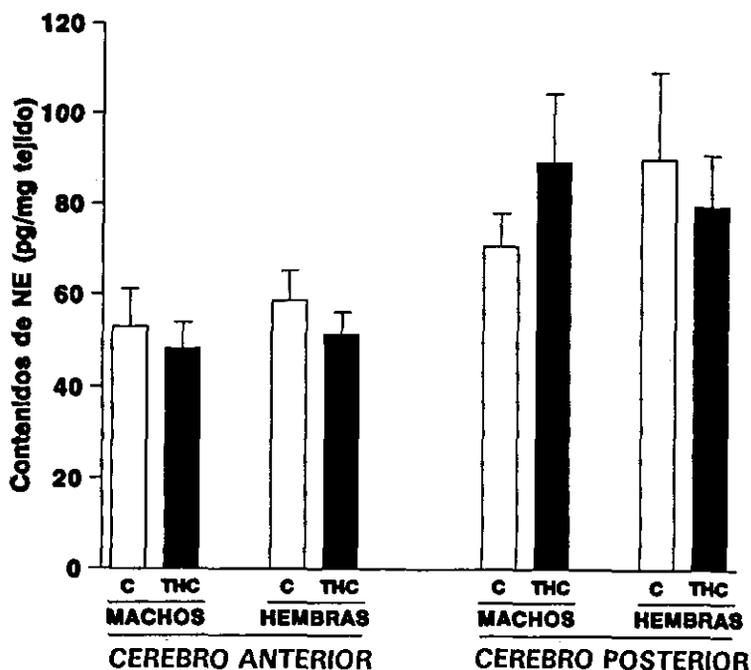


Figura 39: Contenidos de NE en cerebro anterior y posterior en el día postnatal 1. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

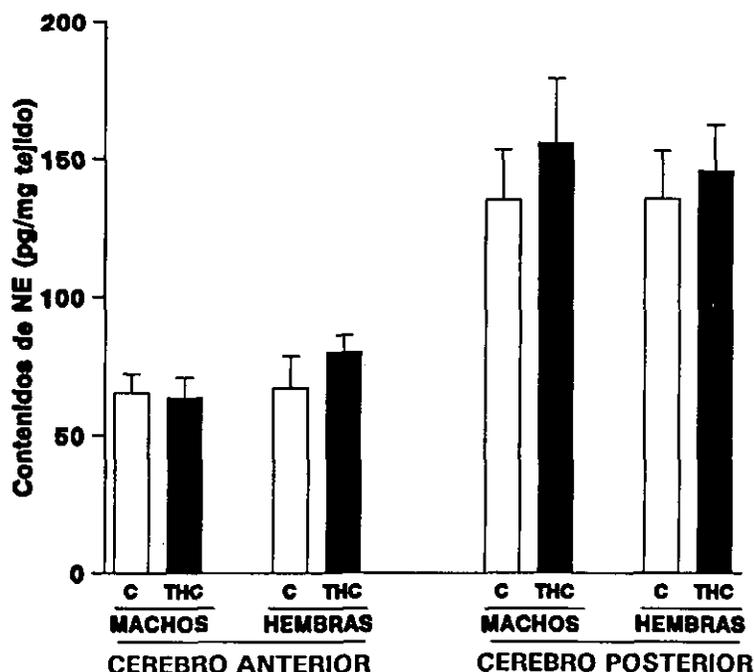


Figura 40: Contenidos de NE en cerebro anterior y posterior en el día postnatal 5. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK.

La exposición a THC no afectó la cantidad de TH, ni su actividad, ni los contenidos de catecolaminas en el cerebro anterior y posterior de animales durante este periodo (DG21 - DPN5), sólo se observó una disminución de DA en el cerebro posterior de los machos el día gestacional 21. El análisis de varianza de tres vías (edad x sexo x tratamiento) demostró la existencia de una variación significativa en estos parámetros por edad, pero ausencia de diferencias por tratamiento cuando se analizó independientemente o en relación con la edad, el sexo o ambos. Las estadísticas se muestran en la tabla 8.

3.3.3. Efectos sobre los contenidos de de DOPAC.

El análisis de la concentración de DOPAC, el principal metabolito intraneuronal de la DA sólo fue posible en los dos días postnatales (DPN1 y DPN5) ya que la señal fue indetectable en edades anteriores. El análisis de varianza de tres vías (edad x sexo x tratamiento) en el cerebro anterior indicó la existencia de diferencias por edad y tratamiento, analizadas independientemente, y en el caso del tratamiento también cuando interacciona con la variable sexo. En el caso del cerebro posterior, sólo hubo diferencias por tratamiento analizado independientemente, y en la triple interacción pudo apreciarse una tendencia. Las estadísticas se muestran en la tabla 8. Cuando grupos específicos fueron comparados mediante el test de SNK se observó un marcado incremento en la producción de DOPAC en los neonatos hembras expuestas a THC respecto a los controles, y en particular en el cerebro anterior (Figuras 41 y 42).

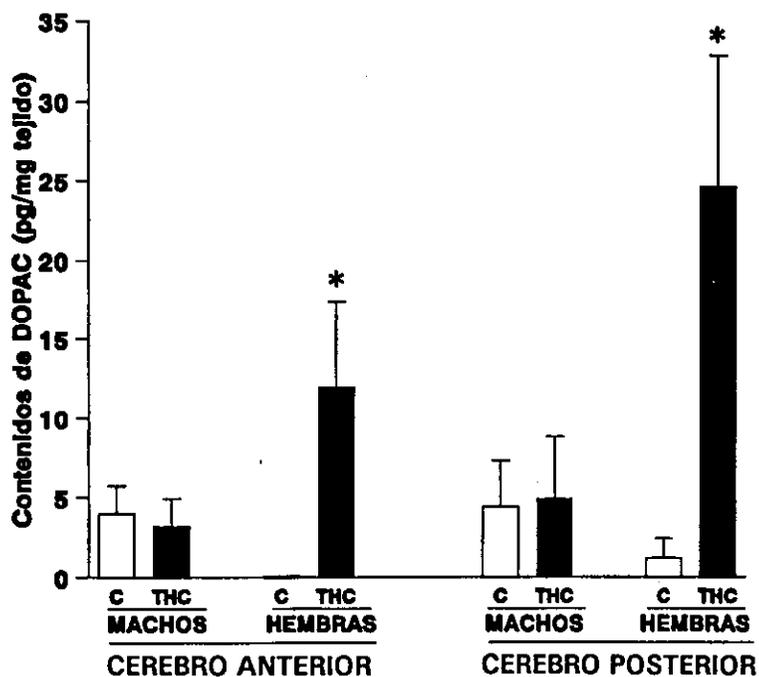


Figura 41: Contenidos de DOPAC en cerebro anterior y posterior en el día postnatal 1. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK (* $p < 0.05$).

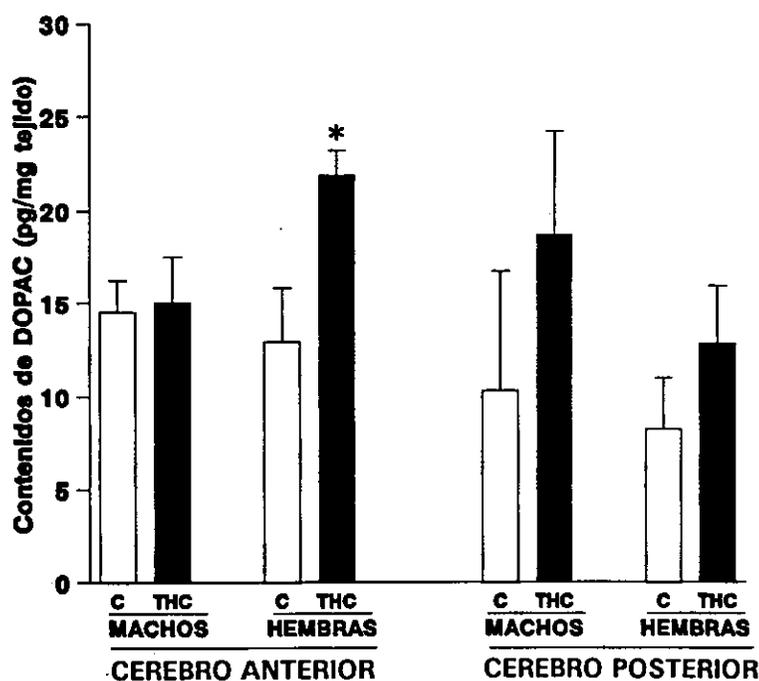


Figura 42: Contenidos de DOPAC en cerebro anterior y posterior en el día postnatal 5. Los valores corresponden a medias \pm EEM de al menos 6 determinaciones diferentes por grupo. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por análisis de varianza de tres vías seguido de test SNK (* $p < 0.05$).

Tabla 8:

A. CEREBRO ANTERIOR:

	PROTEINA TH	ACTIVIDAD TH
Edad:	F(2,34) = 11.19, p<0.001	F(2,76) = 13.53, p<0.001
Sexo:	F(1,34) = 0.04, ns	F(1,76) = 1.16, ns
Tratamiento:	F(1,34) = 0.32, ns	F(1,76) = 0.01, ns
Edad x Sexo:	F(2,34) = 0.009, ns	F(2,76) = 0.49, ns
Edad x Tratamiento:	F(2,34) = 0.05, ns	F(2,76) = 0.49, ns
Sexo x Tratamiento:	F(1,34) = 1.37, ns	F(1,76) = 0.01, ns
Edad x Sexo x Tratamiento:	F(2,34) = 0.45, ns	F(2,76) = 0.17, ns

	CONTENIDOS DE DA	CONTENIDOS DE NE
Edad:	F(2,76) = 5.31, p<0.001	F(2,76) = 4.69, p<0.05
Sexo:	F(1,76) = 0.44, ns	F(1,76) = 0.36, ns
Tratamiento:	F(1,76) = 1.16, ns	F(1,76) = 0.32, ns
Edad x Sexo:	F(2,76) = 0.15, ns	F(2,76) = 0.82, ns
Edad x Tratamiento:	F(2,76) = 0.20, ns	F(2,76) = 0.84, ns
Sexo x Tratamiento:	F(1,76) = 1.41, ns	F(1,76) = 1.15, ns
Edad x Sexo x Tratamiento:	F(2,76) = 0.28, ns	F(2,76) = 0.49, ns

B. CEREBRO POSTERIOR:

	RNAm TH	PROTEINA TH	ACTIVIDAD TH
Edad:	F(2,32) = 24.43, p<0.001	F(2,30) = 4.01, p<0.05	F(2,76) = 0.53, ns
Sexo:	F(1,32) = 18.46, p<0.001	F(1,30) = 0.10, ns	F(1,76) = 0.37, ns
Tratamiento:	F(1,32) = 0.94, ns	F(1,30) = 0.49, ns	F(1,76) = 0.69, ns
Edad x Sexo:	F(2,32) = 2.78, p = 0.0772	F(2,30) = 0.34, ns	F(2,76) = 1.07, ns
Edad x Tratamiento:	F(2,32) = 0.84, ns	F(2,30) = 0.01, ns	F(2,76) = 0.98, ns
Sexo x Tratamiento:	F(1,32) = 13.13, p<0.001	F(1,30) = 1.04, ns	F(1,76) = 1.15, ns
Edad x Sexo x Tratamiento:	F(2,32) = 0.73, ns	F(2,30) = 0.09, ns	F(2,76) = 0.01, ns

	CONTENIDOS DE DA	CONTENIDOS DE NE
Edad:	F(2,76) = 4.20, p<0.05	F(2,76) = 22.01, p<0.001
Sexo:	F(1,76) = 0.04, ns	F(1,76) = 0.01, ns
Tratamiento:	F(1,76) = 0.02, ns	F(1,76) = 0.47, ns
Edad x Sexo:	F(2,76) = 0.04, ns	F(2,76) = 0.11, ns
Edad x Tratamiento:	F(2,76) = 1.08, ns	F(2,76) = 0.30, ns
Sexo x Tratamiento:	F(1,76) = 0.20, ns	F(1,76) = 0.35, ns
Edad x Sexo x Tratamiento:	F(2,76) = 1.72, p = 0.1861	F(2,76) = 0.32, ns

4. EFECTOS DEL THC EN CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES DE MESENCEFALO DE EMBRION DE RATA.

Como se mencionó en el capítulo de Objetivos, el tercer objetivo del presente trabajo era reproducir en un modelo *in vitro* los resultados obtenidos *in vivo*. Para ello hemos utilizado cultivos primarios de células mesencefálicas obtenidas de cerebros de fetos en el día gestacional 14, día en que se encontraron las modificaciones más marcadas sobre la TH producidas por la exposición prenatal a THC. Además, utilizando estos cultivos embrionarios hemos abordado el estudio de los posibles mecanismos moleculares implicados en los efectos del THC sobre el desarrollo de las neuronas TH-positivas.

4.1. Efecto del THC sobre la actividad de TH y los contenidos de DA.

Cultivos de células mesencefálicas del día gestacional 14 se incubaron durante 24 horas con una concentración estándar de THC (1000 ng/ml), similar a la usada por Howlett y cols. (1985) para demostrar la capacidad del THC de inhibir la actividad de la adenilato ciclasa vía una proteína G_i.

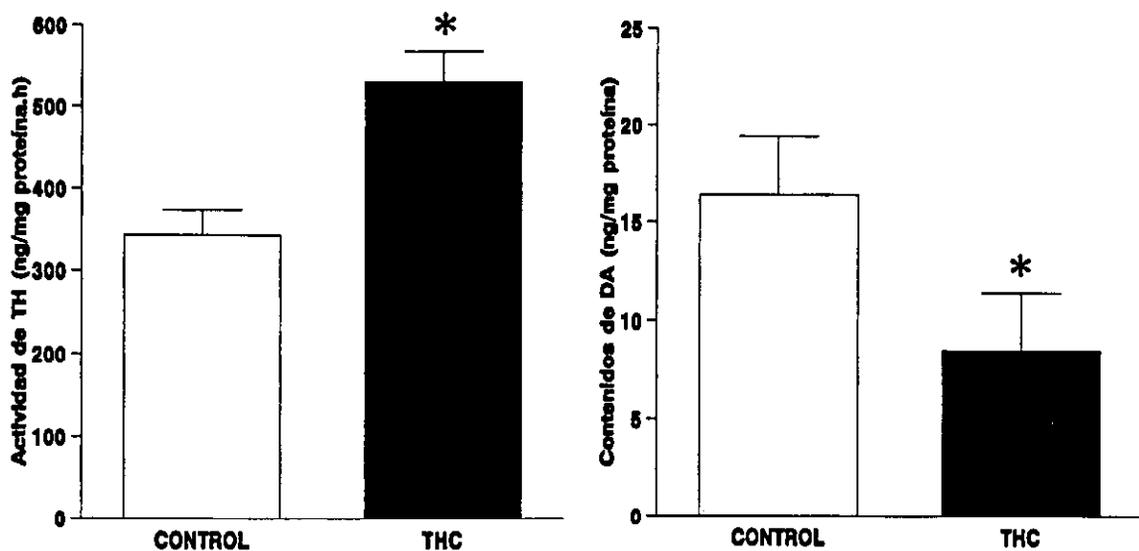


Figura 43: Efecto del THC sobre la actividad de TH y los contenidos de DA en células embrionarias. Se muestran los efectos sobre la actividad de TH (panel A) y sobre los contenidos de DA (panel B) del tratamiento con THC a una concentración de 1000 ng/ml. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por test de Student (* $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos demuestran un marcado incremento de la actividad de TH, en paralelo con una disminución de la concentración de DA (figura 43). Como se detallará en la Discusión, el aumento de TH producido por THC correlaciona claramente con los efectos encontrados *in vivo* tras exposición prenatal a THC, en concreto con el aumento no sólo de la actividad de TH sino también de la expresión del gen para este enzima en el día gestacional 14.

4.2. Implicación del receptor de cannabinoides en los efectos del THC en células embrionarias.

Para examinar si el efecto del THC sobre las células embrionarias se producía vía la unión del THC al receptor de cannabinoides se incubaron los cultivos con THC y un antagonista específico del receptor CB1, el SRF141716A (Rinaldi-Carmona y cols., 1994).

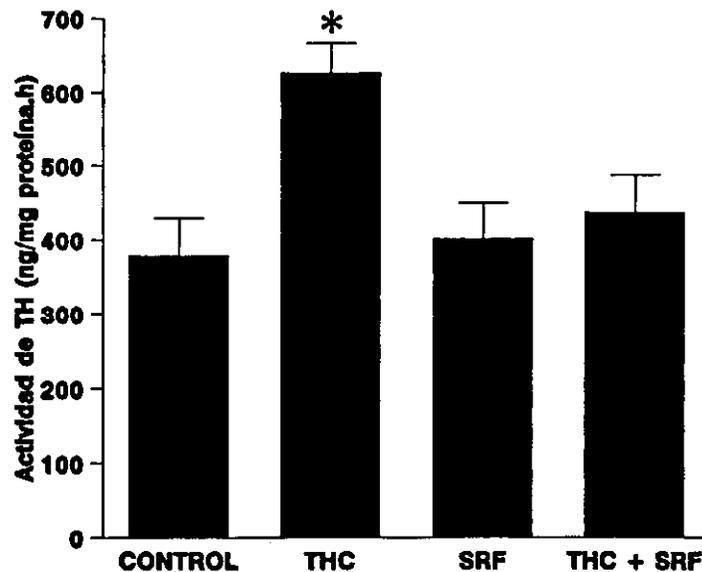


Figura 44: Efecto del THC y el SRF141716A sobre la actividad de TH: Se muestran los efectos sobre la actividad de la TH tras el tratamiento de las células en cultivo con vehículo, THC, SRF o THC y SRF conjuntamente. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por test de Student (* $p < 0.05$).

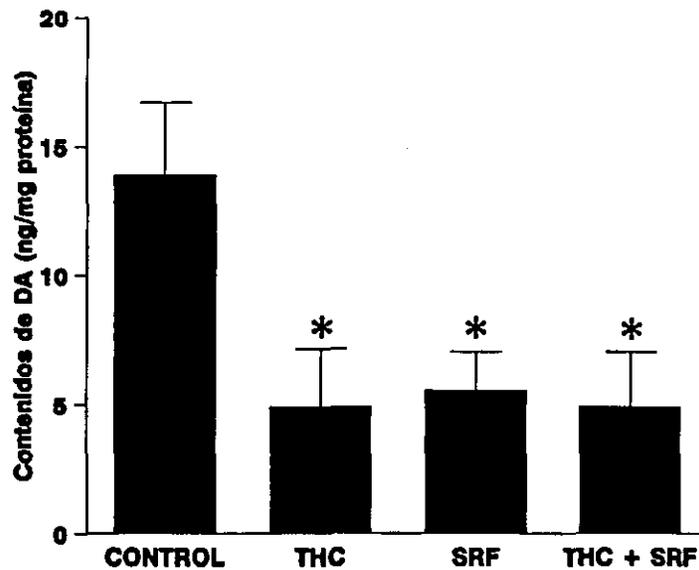


Figura 45: Efecto del THC y el SRF141716A sobre los contenidos de DA: Se muestran los efectos sobre los contenidos de DA tras el tratamiento de las células en cultivo con vehículo, THC, SRF o THC y SRF conjuntamente. Las significaciones estadísticas se obtuvieron por test de Student (* $p < 0.05$).

La coincubación con THC y el antagonista revertió el efecto del THC sobre la actividad de la TH (figura 44), pero no sobre la disminución de los contenidos de DA, que también se observó con SRF sólo o con THC (figura 45). El SRF sólo no modificó la actividad de la TH.

DISCUSSION

DISCUSION

Como se ha comentado anteriormente el objetivo principal de este trabajo es estudiar si el THC afecta el desarrollo de la neurotransmisión dopaminérgica, y en particular, de la enzima TH, una proteína clave en el desarrollo de esta neurotransmisión. Estas potenciales alteraciones podrían ser las responsables de los cambios observados en animales inmaduros y adultos expuestos perinatalmente a cannabinoides (Fernández-Ruiz y cols., 1992). En los resultados obtenidos se observa que la exposición a THC durante el desarrollo efectivamente afecta la expresión y la actividad de la TH y los contenidos de catecolaminas en cerebro de fetos y neonatos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Podría pensarse que estas alteraciones observadas en el sistema catecolaminérgico en desarrollo fueran debidas a efectos indirectos causados por los cannabinoides, como una malnutrición de la madre. Por ello se evaluaron una serie de parámetros durante la gestación y la lactancia que se discuten a continuación.

1. VALIDACION DEL MODELO DE TRATAMIENTO.

En nuestro modelo experimental el THC no produjo cambios significativos en la ingesta de agua y comida de la madre, ni en la ganancia de peso durante la gestación y la lactancia. Así que no parece que los efectos que observamos sean debidos a una malnutrición de la madre inducida por la droga que podría afectar a las crías. Esto a pesar de la existencia de cantidades significativas de THC tanto en el plasma, como en el cerebro y el hígado de las madres. Como veremos posteriormente, el THC aparece en las crías ya que puede pasar de la madre al feto a través de la placenta, o al neonato a través de la leche, y por tanto alcanza el cerebro en desarrollo en ambos periodos. Tampoco hemos encontrado diferencias en el tamaño de la camada, duración de la gestación, proporción hembras/machos y mortalidad prenatal y postnatal, lo que junto con los datos descritos anteriormente nos indica que los efectos que encontramos en el sistema dopaminérgico en desarrollo no son causados por un efecto indirecto del THC (tabla 5). Algunos autores sí han encontrado cambios en estas variables aunque en sus estudios se utilizaba o una dosis mayor de THC (15-50 mg/kg de peso), o una mezcla de cannabinoides. Dewey (1986) ha sugerido que la combinación de cannabinoides, u otros compuestos en el caso del ECH (como alcaloides, terpenos, fenoles y flavonoides) puede ser mucho más tóxica que la administración única de THC, ya que se sabe que existen acciones sinérgicas y/o antagónicas entre estos compuestos. Los estudios realizados por Walters y Carr apoyan esta idea, la exposición perinatal a ECH aumentó la mortalidad de las crías y produjo una disminución del peso de las mismas (Walters y Carr, 1986). Sin embargo, estos efectos no se produjeron al tratar a los animales con los diferentes cannabinoides (Walters y Carr, 1988). En nuestro laboratorio se observó un descenso en la ganancia de peso de las madres tratadas con ECH, que se debía a un menor número de crías nacidas en los animales tratados, y no a un déficit nutricional (Rodríguez de Fonseca y cols., 1992).

Se ha descrito que los cannabinoides pueden resultar teratogénicos, así como afectar los procesos de implantación embrionaria y organogénesis por lo que la viabilidad de los embriones en desarrollo se ve significativamente alterada en estos casos. En nuestro modelo de desarrollo hemos soslayado las alteraciones en la implantación y en parte en la organogénesis producidas por los cannabinoides, mediante el inicio del tratamiento con THC el día 5 de gestación (figura 6). De esta forma, el tratamiento con la droga se inició cuando el embrión ya está implantado y después de los primeros días del periodo de organogénesis, pero se incluyen los periodos más importantes del desarrollo de las neuronas catecolaminérgicas: expresión del fenotipo catecolaminérgico, migración y sinaptogénesis, diferenciación sexual y maduración de los sistemas de neurotransmisión.

Al examinar los datos obtenidos de pesos de fetos y placentas encontramos algunos pequeños cambios, que en nuestra opinión no parecen ser los responsables de los efectos encontrados en los parámetros moleculares (tabla 4). El aumento en el peso de los fetos encontrado el día 14 gestacional es muy pequeño y es difícil que este pequeño incremento (2%) pueda explicar completamente los aumentos de la expresión y de la actividad de TH encontrados a esta edad, los cuales son mucho más marcados (> 100%). También encontramos disminuciones en el peso de fetos y placentas en el día gestacional 16 y en el peso de los fetos en el día 18 (donde los valores de machos y hembras se mostraron conjuntamente al no ser estadísticamente significativos). Estas disminuciones fueron pequeñas y transitorias ya que no encontramos diferencias en el resto de la gestación (DG21) y en la lactancia (DPN1 - DPN5). Sin embargo, hay que notar que además de los efectos directos de la droga en el desarrollo podría haber también un efecto sobre el crecimiento fetal, que aunque no se acompañe de cambios en otros parámetros como ingesta y ganancia de peso de la madre, podría afectar indirectamente al desarrollo cerebral y debe ser considerado.

Como se mencionó anteriormente, además de estudiar las concentraciones de THC en plasma y tejidos (hígado, cerebro y grasa) de las madres a las que se les administraba la droga durante la gestación y la lactancia, también se estudió la concentración de THC en placentas, fetos (DG14 - DG21) y neonatos (DPN1 - DPN5) (tabla 6). Como se esperaba se encontraron cantidades significativas de la droga en todos los tejidos y a todas las edades estudiadas. Esto apoya la existencia de una actuación directa del THC en cerebro en desarrollo, al encontrarse el cannabinoide en el microentorno de las neuronas. Además, en los días en los que ya es posible separar animales según sexo (DG18 - DPN5) se observó que el THC se acumula de igual manera en machos que en hembras. Esto es importante porque nos indica que los efectos sexualmente dimórficos encontrados por muchos autores en los tratamientos perinatales con cannabinoides, y encontrados también en esta tesis, no son debidos a una diferente acumulación y metabolismo de los cannabinoides según sexos.

2. EFECTOS DE LA EXPOSICION PERINATAL A THC SOBRE EL DESARROLLO FETAL Y NEONATAL DE LA NEUROTRANSMISION CATECOLAMINERGICA.

La exposición prenatal a THC causó un aumento en la expresión de la TH, tanto en la cantidad de su RNAm como en la cantidad de proteína, en el día gestacional 14 (figuras 16 y 19). El incremento en la expresión de la enzima se acompañó de un aumento de su funcionalidad, ya que aumentó tres veces la actividad de la enzima en animales tratados con THC respecto a los controles (figura 20). No se pudo establecer si estos efectos sobre la TH se acompañan de alteraciones en los contenidos de catecolaminas, ya que estos no fueron detectables a esta edad. Estos incrementos en la expresión y la actividad de la TH podrían reflejar una maduración anticipada de las neuronas TH-positivas, debido o a un incremento del número de estas neuronas o a una mayor capacidad de cada una de ellas para expresar el gen de la TH. Se puede decir que este día las neuronas son especialmente sensibles al tratamiento con cannabinoides, ya que no sólo se han encontrado alteraciones *in vivo* de la TH tras el tratamiento con este cannabinoide a través de la madre, sino que *in vitro*, en cultivos primarios de neuronas mesencefálicas obtenidos el día gestacional 14, se encuentran alteraciones de la actividad de la TH producidas por la exposición a THC. En estos cultivos aumenta la actividad de la enzima tras la exposición con THC, además este efecto sobre la TH parece mediado por la unión del THC al receptor de cannabinoides ya que es revertido por un antagonista.

Los efectos observados en el día gestacional 14 desaparecieron en el día gestacional 16, aunque en días posteriores se volvieron a encontrar alteraciones en la expresión de la TH que fueron en todos los casos diferentes en función del sexo de los fetos y/o neonatos. Podemos pensar que la ausencia de efectos en el día gestacional 16 se podría deber al hecho de que en este día no se pudo determinar el sexo de los animales, y machos y hembras se analizaron conjuntamente. De forma que aunque existiesen, si fueran similares a los encontrados en el resto del desarrollo fetal y neonatal no se pondrían de manifiesto, ya que las disminuciones en los machos se compensarían con los incrementos en las hembras. La ausencia de efectos no puede ser debida a cambios en la exposición a THC, ya que no se encontraron diferencias entre las concentraciones de este cannabinoide presentes en fetos y placentas en estas dos edades gestacionales.

A partir del día de gestación 18, en que los animales se diferenciaron según sexos, se encontró una respuesta sexualmente dimórfica en la expresión del gen de la TH tras la exposición a THC. En este día se pudo observar una disminución de la cantidad de RNAm de TH en los machos expuestos al cannabinoide, mientras que en las hembras se presentó una tendencia en sentido contrario. Estos cambios se consolidaron en los siguientes días analizados, día gestacional 21 (figura 26), y postnatales 1 (figura 27) y 5 (figura 28). Aunque en general no se correspondieron con cambios en la cantidad de proteína, actividad de TH y contenidos de catecolaminas. El THC no alteraría la capacidad

de la TH para sintetizar catecolaminas aunque si la regulación de esta enzima a nivel génico. Esto induciría una posible deficiencia en machos o una mayor capacidad de respuesta en hembras ante eventuales situaciones que demandasen un aumento de la traducción del RNAm de TH con objeto de aumentar la síntesis *de novo* de la enzima.

Únicamente se encontró un aumento de la producción de DOPAC, el metabolito intraneuronal principal de la DA, en el cerebro anterior, el área donde se localizan los terminales de las neuronas dopaminérgicas mesotelencefálicas. Este efecto sólo se observó en edades postnatales ya que el DOPAC no fue detectable en otras edades más tempranas, y sólo se encontró en hembras (figuras 41 y 42). Esto indica claramente que la exposición perinatal a THC produce una activación de las neuronas dopaminérgicas mesotelencefálicas en las hembras, que se correlacionaría con los incrementos en el RNAm de TH. Esta activación no se encontró en los animales machos, que es en los que se encuentra una disminución en la expresión de la TH. Por otro lado, este aumento en la concentración de DOPAC en el cerebro anterior de los neonatos hembras expuestos perinatalmente a THC es uno de los pocos efectos exclusivos de las hembras. Aunque luego se volverá a comentar la existencia de un dimorfismo sexual en la respuesta perinatal a THC, es interesante mencionar ahora que la mayor parte de los estudios de la exposición perinatal a THC, muestran que los machos son afectados por el THC de forma más marcada y constante, mientras que las hembras lo son de forma leve y transitoria (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991). Esto se puede aplicar a nuestro estudio ya que, por ejemplo, el efecto del THC disminuyendo el RNAm de TH se observó en los días gestacionales 18, 21, y postnatal 1, mientras que en las hembras sólo claramente en el día gestacional 21. Sin embargo, hay otro efecto del THC sobre las hembras que se ha observado en nuestro laboratorio y es interesante mencionar. Se ha visto que hembras adultas, pero no machos, expuestas perinatalmente a THC resultan menos afectadas por el tratamiento agudo con anfetamina. La anfetamina produce un bloqueo de la recaptación de DA, y por tanto una disminución de la concentración de DOPAC, al metabolizarse menos DA. La disminución de la producción de DOPAC respecto a los controles es significativamente menos marcada en hembras. Podría ocurrir que la exposición perinatal a THC causara un aumento en el número de transportadores de DA, lo que está siendo actualmente examinado en nuestro laboratorio.

Estos datos apoyan la hipótesis de que la presencia del THC en el entorno de las neuronas en desarrollo puede alterar la expresión de genes clave en el desarrollo catecolaminérgico como la TH. Y así los aumentos o disminuciones que causa el cannabinoide en la expresión de la enzima pueden alterar no sólo el desarrollo de las neuronas noradrenérgicas y dopaminérgicas, sino también el de otros sistemas de neurotransmisores sujetos a una influencia trófica ejercida principalmente por las neuronas dopaminérgicas fetales. Estos cambios pueden producir alteraciones funcionales irreversibles que no necesariamente se manifestarían durante el desarrollo fetal y postnatal sino durante la juventud y en el adulto. Esto se confirma por resultados obtenidos recientemente en nuestro

laboratorio tras desafíos farmacológicos que afectan a la TH y que confirman la existencia de cambios irreversibles en la habilidad de estas neuronas para sintetizar CAs en adultos debido a la exposición perinatal a cannabinoides (García y cols., datos no publicados). Es cierto que los efectos en la expresión y la actividad de la TH se encontraron exclusivamente en el día gestacional 14, desapareciendo en el día 16 y apareciendo en los días posteriores, afectando sólo la expresión de la enzima sin alteraciones en la actividad o en la síntesis de catecolaminas. En nuestra opinión esto sugiere la existencia de periodos críticos de máxima sensibilidad a factores epigenéticos. Esto se debería, primero a que es en estos periodos tempranos del desarrollo, días gestacionales 12 - 14, cuando se detecta por primera vez la enzima TH y su neurotransmisor DA. En esta etapa el sistema dopaminérgico, una de las principales dianas de acción de las drogas psicoactivas, comienza a desarrollarse y parece especialmente vulnerable a la presencia de THC en el microentorno neuronal.

2.1. Dimorfismo sexual en los efectos perinatales de los cannabinoides.

Como se ha dicho anteriormente es interesante destacar la respuesta sexualmente dimórfica encontrada en nuestros estudios tras la exposición perinatal a THC. Este dimorfismo se pudo apreciar tanto en la expresión del RNAm de TH, como en las concentraciones de DOPAC. En ambos casos se observó un sentido opuesto en los cambios, en las hembras ambos parámetros aumentaban, mientras que en los machos disminuían. Este dimorfismo es una constante en todos los estudios del sistema dopaminérgico de ratas expuestas perinatalmente a cannabinoides, aunque en los estudios realizados anteriormente siempre se estudiaron animales en edad juvenil y adulta, y no se había realizado ningún estudio sobre las épocas fetal y neonatal. Normalmente eran los machos los que mostraban descensos en los parámetros neuroquímicos y comportamentales, mientras en las hembras estos parámetros aumentaban o no se afectaban.

El fenómeno de la existencia de respuestas sexualmente dimórficas tras la exposición perinatal a drogas de abuso (Robinson y cols., 1993; Weinberg, 1992; Forgie y Stewart, 1994; Snyder-Keller, 1995), incluso tras manipulaciones fetales de otro tipo, como estrés maternal (Weisz y cols., 1992), no es nuevo. Existe ya amplia literatura al respecto. Una de las conclusiones más significativas de la exposición perinatal a dichas drogas es la mayor frecuencia de aparición de efectos a largo plazo que presentan los machos. El mecanismo por el que han podido aparecer estos efectos sexualmente dimórficos no se conoce. Existen, sin embargo, algunas posibles explicaciones:

El medio hormonal puede jugar un papel muy importante en la aparición e intensidad de los efectos de los cannabinoides. Los días estudiados incluyen el llamado "periodo crítico de la diferenciación sexual del cerebro" (Maclusky y Naftolin, 1981), que comienza con la síntesis testicular de testosterona alrededor del día gestacional 18 y se extiende hasta la segunda semana de vida postnatal.

La presencia de cannabinoides como de otras drogas psicotrópicas puede interferir en el desarrollo normal de este proceso. Manipulaciones ambientales o farmacológicas que interfieren con el pico prenatal de testosterona en el día gestacional 18, o con el incremento progresivo de esta hormona que aparece tras el nacimiento, conducen a masculinizaciones incompletas o a la feminización de conductas sexualmente dimórficas en la edad adulta. Además, el THC es capaz de inhibir la producción de testosterona *in vitro* (Dalterio y Bartke, 1981). El mecanismo no es bien conocido, pero podría estar mediado por la inhibición que produce el cannabinoide sobre la secreción de LH, o bien a través del receptor de cannabinoides CB1, cuyo gen se expresa en testículo.

Además, muchos estudios han sugerido que el THC tiene afinidad por los receptores de esteroides, principalmente por estrógenos (Rawitch y cols., 1977) aunque hay mucha controversia al respecto (Okey y Bondy, 1978). En nuestro laboratorio hemos observado que el bloqueo de los receptores estrogénicos con tamoxifén modifica los efectos del THC en distintas áreas dopaminérgicas cerebrales, y aunque este estudio se realizó en adultos fenómenos similares podrían ocurrir durante el desarrollo (Bonnin y cols., 1992, 1993a y 1993b)

Sin embargo, Reisert y Pilgrim han demostrado que existen en las neuronas dopaminérgicas diferencias sexuales previas a la aparición del pico prenatal de testosterona en el día embrionario 18 (Reisert y cols., 1990). Es posible que la aparición de estos efectos sexualmente dimórficos en estas neuronas tras la administración de THC no sólo se deba a alteraciones en el proceso de diferenciación sexual, sino a que las neuronas dopaminérgicas de los machos sean más sensibles a factores epigenéticos. Se ha observado que la administración perinatal de ciertas drogas que interfieren con la neurotransmisión dopaminérgica puede desmasculinizar muchos comportamientos sexualmente dimórficos en ratas macho (Hull y cols., 1984).

Finalmente, una de las explicaciones puede ser la existencia de una distribución sexualmente dimórfica del receptor de cannabinoides en cerebro. Existen pequeñas diferencias entre el patrón de ontogenia del receptor de cannabinoides de machos y hembras. Estas diferencias se observan desde el día 2 postnatal pero son especialmente significativas en el estriado y el mesencéfalo durante el periodo peripuberal y en el adulto (Rodríguez de Fonseca y cols., 1993). Sin embargo, todavía no existen estudios en edades más tempranas del desarrollo.

2.2. Implicación del receptor de cannabinoides en los efectos perinatales del THC.

El mecanismo a través del cual el consumo de cannabinoides por la madre altera el desarrollo de los sistemas dopaminérgicos todavía no es conocido. Pero la caracterización de receptores específicos para estos compuestos y su presencia desde edades gestacionales muy tempranas hace pensar que podrían ser mediados por estos receptores.

En nuestros estudios *in vivo* era prácticamente imposible comprobar si los efectos estaban mediados por el receptor de cannabinoides, ya que aún existiendo un antagonista específico de este receptor no es posible su administración durante la gestación. Por eso, se iniciaron estudios de los efectos de los cannabinoides *in vitro*, utilizando células mesencefálicas de embriones del día gestacional 14. En estas células se produjo un aumento de la actividad de la TH tras la exposición a cannabinoides, similar al encontrado en ese mismo día gestacional *in vivo* en animales tratados perinatalmente con THC. Este efecto del THC *in vitro* sobre la actividad de la TH pudo ser revertido por el antagonista SRF141716A.

Todo esto nos permite sugerir que el THC administrado a la madre y transferido a los fetos mediante transporte placentario o a los neonatos a través de la leche, puede actuar sobre el cerebro en desarrollo a través del receptor de cannabinoides.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones principales que se derivan de este trabajo se detallan a continuación.

1. La presencia del THC en el microentorno de las neuronas catecolaminérgicas durante el desarrollo fetal y neonatal parece afectar la expresión de proteínas claves, como la tirosina hidroxilasa. Estas alteraciones podrían ser las responsables de los efectos a largo plazo encontrados en la actividad catecolaminérgica adulta y los procesos neurocomportamentales en los que está implicada.

2. Parecen existir periodos críticos en el desarrollo en los que las neuronas TH-positivas serían especialmente sensibles a la presencia del THC. Los estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, sugieren que el día gestacional 14 sería un día especialmente vulnerable a la presencia del THC. El THC produce en este día un incremento de la expresión del gen de la tirosina hidroxilasa y de su funcionalidad.

3. La respuesta de las neuronas TH-positivas a la presencia del THC es variable en función del sexo, como previamente se había publicado en relación a sus efectos neurocomportamentales durante el periodo de inmadurez. Los machos parecen alterarse de forma más constante y marcada durante todo el periodo fetal y primeros días postnatales, produciéndose un descenso en la expresión del gen de la tirosina hidroxilasa. Mientras que en las hembras los efectos fueron opuestos, encontrándose un aumento de la expresión del gen de la tirosina hidroxilasa y de la actividad presináptica, y menos constantes.

4. Los efectos producidos por la exposición perinatal a THC sobre el desarrollo de las neuronas TH-positivas parecen ser ejercidos a través de la unión del THC a receptores para cannabinoides, ya que se ha demostrado que estos efectos pueden ser antagonizados *in vitro* mediante la coadministración de THC y un antagonista específico de este receptor, y se sabe que los receptores CB1 están presentes en el cerebro desde edades tempranas del desarrollo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abood, M.E., Martin, B.R., Neurobiology of marijuana abuse, *Trends in Pharmacological Science*, **13**, 201-206, 1992.

Albert, M., Solomon, J., Effect of neonatal administration of delta-9-tetrahydrocannabinol and/or estradiol benzoate (EB) on reproductive development and function of the male rat, en *The Cannabinoids: Chemical, Pharmacologic and Therapeutic Aspects*, Augurell, S., Dewey, W.L., Willette, R.E., Eds., Academic Press, Orlando, FL., 339-348, 1984.

Andreasson, S., Allebeck, P., Engström, A., Rydberg, V., Cannabis and squizophrenia: a longitudinal study of swedish conscripts, *The Lancet ii*, 1483-1486, 1987.

Anton, A.H., Sayre, D.F., An study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines, *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **138**, 360-364, 1962.

Belue, R.C., Howlett, A., Westlake, T.M., Hutchings, D.E., The ontogeny of cannabinoid receptors in the brain of postnatal and aging rats, *Neurotoxicology and Teratology*, **17**, 25-30, 1995.

Bidaut-Russell, M., Devane, W.A., Howlett, A.C., Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain, *Journal of Neurochemistry*, **55**, 21-26, 1990.

Bidaut-Russell, M., Howlett, A.C., Cannabinoid receptor-regulated cyclic AMP accumulation in the rat striatum, *Journal of Neurochemistry*, **57**, 1769-1773, 1991.

Blackyard, C., Tennes, K., Human placental transfer of cannabinoids, *New England Journal of Medicine*, **311**, 797, 1994.

Bonnin, A., Fernández-Ruiz, J.J., Martín, M., Rodríguez de Fonseca, F., de Miguel, R., Ramos, J.A., Estrogenic modulation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol effects on the nigrostriatal dopaminergic activity in the female rat brain, *Molecular and Cellular Neurosciences*, **3**, 315-325, 1992.

Bonnin, A., Fernández-Ruiz, J.J., Martín, M., Rodríguez de Fonseca, F., Hernández, M.L., Ramos, J.A., Δ^9 -Tetrahydrocannabinol affects mesolimbic dopaminergic activity in the female rat brain: interactions with estrogens, *Journal of Neural Transmission*, **92**, 81-95, 1993a.

Bonnin, A., Ramos, J.A., Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Fernández-Ruiz, J.J., Acute effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the tuberoinfundibular dopaminergic activity, the anterior pituitary sensitivity to dopamine and the prolactin release vary as a function of estrous cycle, *Neuroendocrinology*, **58**, 280-286, 1993b.

Bonnin, A., de Miguel, R., Rodríguez-Manzaneque, J.C., Fernández-Ruiz, J.J., Santos, A., Ramos, J.A., Changes in tyrosine hydroxylase gene expression in mesencephalic catecholaminergic neurons of immature and adult male rats perinatally exposed to cannabinoids, *Developmental Brain Research*, **81**, 147-150, 1994.

Bowers, M.B., Hoffman, F.J., Regional homovanilic acid following delta-9-tetrahydrocannabinol and cocaine, *Brain Research*, **366**, 405-407, 1986.

Cadoret, M.A., Jaber, M., Bloch, B., Prenatal D_1 , D_{1b} and D_3 dopamine receptor gene expression in the rat forebrain: detection by reverse polymerase chain reaction, *Neuroscience Letters*, **155**, 92-95, 1993.

Caenazzo, L., Hoeche, M.R., Hsieh, W.T., Berrettini, W.H., Bonner, T.I., Gershon, E.S., HindIII identifies a two allele DNA polymorphism of the human cannabinoid receptor gene (CNR), *Nucleic Acid Research*, **19**, 4798, 1991.

Caulfield, M.P., Brown, D.A., Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a Pertussis toxin-sensitive mechanism, *British Journal of Pharmacology*, **106**, 231-232, 1992.

Chen, J., Paredes, W., Li, J., Smith, D., Lowinson, J., Gardner, E.L., Δ^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.

Chomczynski, P., Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159, 1987.

Conti, L.H., Musty, R.E., The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol injections to the nucleus accumbens on the locomotor activity in rats, en *The Cannabinoids: chemical, pharmacologic and therapeutic aspects*, Augurell, S., Dewey, W.L., Willette, R.E., eds., Academic Press, Orlando, 649-655, 1984.

Crawley, J.N., Corwin, R.L., Robinson, J.K., Felder, C.C., Devane, W.A., Axelrod, J., Anandamide, and endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia *in vivo* in rodents, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **46**, 967-972, 1993.

- Dahlstrom, A., Fuxe, K., Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I- Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons, *Acta Physiologica Scandinavica*, suppl. 62, 232, 1-48, 1964.
- Dalterio, S.L., Bartke, A., Fetal testosterone in mice: effect of gestational age and cannabinoid exposure, *Journal of Endocrinology*, 91, 509-514, 1981.
- Dalterio, S.L., Badr, F., Bartke, A., Mayfield, D., Cannabinoids in mice: effects on fertility and spermatogenesis, *Science*, 216, 315, 1982.
- Dalterio, S.L., Steger, R.W., Mayfield, D., Bartke, A., Early cannabinoid exposure influences neuroendocrine and reproductive functions in male mice. II. Postnatal effects, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 20, 115-123, 1984.
- Dalterio, S.L., Cannabinoid exposure: effects on development, *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, 8, 345-352, 1986.
- Das, S.K., Paria, B.C., Chakraborty, I., Dey, S.K., Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 92, 4332-4336, 1995.
- Desarnaud, F., Cadas, H., Piomelli, D., Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 6030-6035, 1995.
- Deutsch, D.G., Chin, S.A., Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist, *Biochemical Pharmacology*, 46, 791-796, 1993.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C., Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain, *Molecular Pharmacology*, 34, 605-613, 1988.
- Devane, W.A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science*, 258, 1946-1949, 1992.
- Devane, W.A., Axelrod, J., Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 91, 6698-6701, 1994.
- Dewey, W.L., Cannabinoid Pharmacology, *Pharmacological Reviews*, 38, 151-178, 1986.

De Vitry, F., Hillion, J., Catelon, J., Thibault, J., Benoliel, J.J., Hamon, M., Dopamine increases the expression of tyrosine hydroxylase and aromatic aminoacid descarboxylase in primary cultures of fetal neurons, *Developmental Brain Research*, **59**, 123-129, 1991.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D., Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons, *Nature*, **372**, 686-691, 1994.

Dunnet, S.B., Björklund, A., Staging and dissection of rat embryos, en *Neural transplantation: a practical approach*, Rickwood, D., Hammes, B.D., eds., Oxford University Press, Oxford, 1-19, 1991.

Evans, D.M., Lake, J.T., Johson, M.R., Howlett, A.C., Endogenous cannabinoid receptor binding activity released from rat brain slices by depolarization, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **268**, 1271-1277, 1994.

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 of America*, **92**, 3376-380, 1995.

Felder, C.C., Veluz, J.S., Williams, H.L., Briley, E.M., Matsuda, L.A., Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with an expressing cannabinoid receptor clones, *Molecular Pharmacology*, **42**, 838-845, 1992.

Felder, C.C., Briley, E.M., Axelrod, J., Simpson, J.T., Mackie, K., Devane, W.A., Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the clones human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 7656-7660, 1993.

Fernández-Ruiz, J.J., Cebeira, M., Rodríguez de Fonseca, F., Ramos, J.J., Effects of dopamine on prolactin release from ectopic and hyperplastic anterior pituitaries: changes at receptor and postreceptor level, *Neuroendocrinology Letters*, **12**, 455-463, 1990.

Fernández-Ruiz, J.J., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Ramos, J.A., Maternal cannabinoid exposure and brain development: Changes in the ontogeny of dopaminergic neurons, en *Marihuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*, Murphy, L.L., Bartke, A., eds., CRC Press, Boca Ratón, FL, 119-164, 1992.

Field, E., Tyrey, L., Delayed sexual maturation during prepubertal cannabinoid treatment: importance of the timing of treatment, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **254**, 171-175 1990.

Foster, G.A., Schultzberg, M., Hökfelt, A., Goldstein, M., Hemmings Jr., H.C., Ouimet, C.C., Walaas, S.I., Greengard, P., Development of a dopamine and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein (DARPP-32) in the prenatal rat central nervous system and its relationship to the arrival of presumptive dopaminergic innervation, *Journal of Neuroscience*, **7**, 1994-2016, 1987.

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., Barg, J., Levy, R., Saya, D., Heldman, E., Mechoulam, R., Vogel, Z., Low doses of anandamides inhibit pharmacological effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **272**, 699-707, 1995.

Fried, P.A., The Ottawa prenatal prospective study (OPPS): methodological issues and findings - it's easy to throw the baby out with the bath water, *Life Sciences*, **56**, 2159-2168, 1995.

Forgie, M.L., Stewart, J., Sex differences in the locomotor-activating effects of amphetamine: role of circulating testosterone in adulthood, *Physiology and Behavior*, **55**, 639-644, 1994.

Gaoni, Y., Mechoulam, R., Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish, *Journal of the American Society of Chemistry*, **86**, 1646-1647, 1964.

Gardner, E.L., Paredes, W., Smith, D., Donner, A., Miling, C., Cohen, D., Morrison, D., Facilitation of brain stimulation reward by delta-9-tetrahydrocannabinol, *Psychopharmacology*, **96**, 142-144, 1988.

Garrett, E.R., Hunt, C.A., Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, *Journal of Pharmacological Science*, **63**, 1056-1064, 1974.

Gérard, C., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M., Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA, *Nucleic Acid Research*, **18**, 7142, 1990.

Gérard, C.M, Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M., Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis, *Biochemical Journal*, **279**, 129-134, 1991.

- Hagino, N., Inoue, K., Hypothalamic dopamine may play a role in inducing prolactin in pituitary cells, *International Journal of Developmental Neuroscience*, **4**, 119-125, 1986.
- Harlow, E., Lane, D., en *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988.
- Hanus, L., Gopher, A., Almog, S., Mechoulam, R., Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor, *Journal of Medical Chemistry*, **36**, 3032-3034, 1993.
- Harrington, C.A., Lewis, E.J., Krzemien, D., Chikaraishi, D.M., Identification and cell type specificity of the tyrosine hydroxylase gene promoter, *Nucleic Acid Research*, **15**, 2363-2384, 1987.
- Herrin, D.L., Rapid, reversible, staining of northern blots prior to hybridization, *Bio. Techniques*, **6**, 196-200, 1988.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., Cannabinoid receptor localization in brain, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **87**, 1932-1936, 1990.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., De Costa, B.R., Rice, K.C., Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study, *Journal of Neuroscience*, **11**, 563-583, 1991.
- Herkenham, M; Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **268**, 1612-1623, 1994.
- 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.
- Hoeche, M.R., Caernazzo, L., Martinez, M.M., Hsieh, W.T., Modi, W.S., Gershon, E.S., Bonner, T.I, Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15, *New Biol.*, **3**, 880-885, 1991.
- Hollister, L.E., Health aspect of cannabis, *Pharmacological Reviews*, **38**, 1-20, 1986.
- Howlett, A., Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantadol compounds, *Life Science*, **35**, 1803-1810, 1984a.

- Howlett, A.C., Fleming, R.M., Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes, *Molecular Pharmacology*, **26**, 532-538, 1984b.
- Howlett, A.C., Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes, *Molecular Pharmacology*, **27**, 429-436, 1985.
- Howlett, A.C., Qualy, J.M., Khachatrian, L.L., Involvement of G_i in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs, *Molecular Pharmacology*, **29**, 307-313, 1986.
- Howlett, A.C., Champion, T.M., Wilken, G.H., Mechoulam, R., Stereochemical effects of 11-OH- Δ^8 -tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor, *Neuropharmacology*, **29**, 161-165, 1990.
- Howlett, A.C., Evans, D.M., Houston, D.B., The cannabinoid receptor, en *Marijuanas/Cannabinoids. Neurobiology and Neurophysiology*, Murphy, L. y Bartke, A. ed., CRC Press, Boca Ratón, FL., 35-72, 1992.
- Hull, E.N., Nishita, J.K., Bitran, D., Dalterio, S.L., Perinatal dopamine-related drugs demasculinize rats, *Science*, **224**, 1011-1013, 1984.
- Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R., Elder, J.H., Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose, *Genetics, Analysis, Techniques and applications*, **1**, 3, 1984.
- Johnson, D.E., Heald, S.L., Dally, R.D., Janis, R.A., Isolation, identification and synthesis of an endogenous arachidonic amide that inhibits calciumchannel antagonist 11,4-dihydropyridine binding, *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **48**, 429-437, 1993.
- Knudsen, P., Vilmar, T., Cannabis and neuroleptic agents in schizophrenia, *Acta Psychiatrica Scandinavica*, **69**, 162-174, 1984.
- Kramer, J., Ben-David, M., Prolactin suppression by (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC): involvement of serotonergic and dopaminergic pathways, *Endocrinology*, **103**, 452-458, 1978.
- Kruska, K.K., Gross, R.W., The ATP- and CoA-independent synthesis of arachidonylethanolamide, *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 14345-14348, 1994.
- Kumar, A.M., Solomon, J., Patel, V., Kream, R.M., Drieze, J.M., Millard, W.J., Early exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol influences neuroendocrine and reproductive functions in female rats, *Neuroendocrinology*, **44**, 260-264, 1986.

- Kumar, A.M., Haney, M., Becker, T., Thompson, M.L., Kream, R.M., Miczek, K., Effect of early exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol on the levels of opioid peptides, gonadotropin-releasing hormone and substance P in the adult male rat brain, *Brain Research*, **525**, 78-82, 1990.
- Kuster, J.E., Stevenson, J.I., Ward, S.J., D'Ambra, T.E., Haycock, D.A., Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **264**, 1352-1363, 1993.
- Labatut, R., Buda, M., Berod, B., Long-term change in rat brain tyrosine hydroxylase following reserpine treatment: a quantitative immunochemical analysis, *Journal of Neurochemistry*, **50**, 1375-1378, 1988.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, 1970.
- Lankford, K.L., De Mello, F.G., Klein, W.L., D₁-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **85**, 2839-2844, 1988.
- Lemberger, L., Potencial therapeutic usefulness of marihuana, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **20**, 151-172, 1980.
- Lepore, M., Vorel, S.R., Lowinson, J., Gardner, E.L., Conditioned place preference induced by Δ^9 -tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine and food reward, *Life Sciences*, **56**, 2073-2080, 1995.
- Levenson, S., French, E.D., Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on ventral tegmental A10 dopamine neurons in the rat, *Society of Neuroscience Abstracts*, **16**, 2, 1100, 1990.
- Lipton, S.A., Kater, S.B., Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival, *Trends in Neuroscience*, **12**, 265- 270, 1989.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275, 1951.
- Mackie, K., Hille, B., Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **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.
- Maclusky, N.J., Naftolin, F., Sexual differentiation of the Central Nervous System, *Science*, **211**, 1294-1303, 1981.
- 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, 1992a.
- Mailleux, P., Verslijpe, M., Vanderhaeghen J.-J., Initial observations on the distribution of cannabinoid receptor binding sites in the human adult basal ganglia using autoradiography, *Neuroscience Letters*, **139**, 7-9, 1992b.
- Maniatis, T., Fritsh, E.F., Sambrook, K.J., *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A., 1982.
- Martin, B.R., Compton, D.R., Thomas, B.F., Prescott, W.R., Little, P.J., Razdan, R.K., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Mechoulam, R., Ward, S.J., Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **40**, 471-478, 1991.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature*, **346**, 561-564, 1990.
- McEwen, B.S., Steroid hormones and brain development: some guidelines for understanding actions of pseudohormones and other toxic agents, *Environmental Health Perspectives*, **74**, 177-185, 1987.
- McLaughlin, C.R., Martin, B.R., Compton, D.R., Abood, M.E., Cannabinoid receptors in developing rats: detection of mRNA and receptor binding, *Drug and Alcohol Dependence*, **36**, 27-31, 1994.
- Mechoulam, R., The Pharmacohistory of *Cannabis sativa*, en *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, Mechoulam, R., Ed., CRC Press, Boca Ratón, FL., 1-19, 1986.
- Mechoulam, R., Devane, W.A., Glaser, R., Cannabinoid geometry and biological activity, en *Marijuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*, Murphy, L. y Bartke, A. ed., CRC Press, Boca Ratón, FL, 1-33, 1992.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z., Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors, *Biochemical Pharmacology*, **50**, 83-90, 1995.

Mirmiran, M., Swaab, D.F., Influence of drugs on brain neurotransmitter and behavioral states during development, *Developmental Pharmacology and Therapeutics*, **10**, 377-380, 1987.

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 affects on reproductive neuroendocrine parameters, en *Biochemistry and Physiology of Substance Abuse*, Watson, R.R. ed., vol 2, CRC Press, Boca Ratón, FL, 73-93, 1990.

Nagatsu, T., Oka, K., Kato, T., Highly sensitive assay for Tyrosine hydroxylase activity by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, **163**, 247-252, 1979.

Nahas, G.G., Toxicology and pharmacology, en *Marihuana in Science and Medicine*, Nahas, G.G. ed., Raven Press, New York, 102-247, 1984.

Nahas, G.G., Frick, H.C., Developmental effects of cannabis, *Neurotoxicology*, **7**, 381-396, 1986.

Navarro, M., Fernández-Ruiz, J.J., de Miguel, R., Hernández, M.L., Cebeira, M., Ramos, J.A., Motor disturbances induced by an acute dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol: Possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **45**, 291-298, 1993a.

Navarro, M., Fernández-Ruiz, J.J., de Miguel, R., Hernández, M.L., Cebeira, M., Ramos, J.A., An acute dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol affects behavioral and neurochemical indices of mesolimbic dopaminergic activity, *Behavioral Brain Research*, **57**, 37-46, 1993b.

Navarro, M., Rodríguez de Fonseca, F., Hernández, M., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., Motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity in adult rats perinatally exposed to cannabinoids, *Pharmacology, biochemistry and Behavior*, **47**, 47-58, 1994.

Navarro, M., de Miguel, R., Rodríguez de Fonseca, F., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., Perinatal cannabinoid exposure modifies the sociosexual approach behavior and the mesolimbic dopaminergic activity in adult male rats, *Behavioral Brain Research*, 1995, en prensa.

Okey, A.B., Bondy, G.P., delta-9-tetrahydrocannabinol and 17 β -estradiol bind to different macromolecules in estrogen target tissues, *Science*, **200**, 312-314, 1978.

O'Makkey, E.K., Black, I.B., Dreyfus, C.F., Local support cells promote survival of substantia nigra dopaminergic neurons in culture, *Experimental Neurology*, **112**, 40-48, 1991.

Paria, B.C., Das, S.K., Dey, S.K., The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling, *International Cannabis Research Society, 1995 Symposium on Cannabis and Cannabinoids*, Arizona, 1995.

Pérez-Reyes, M., Wall, M.E., Presence of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human milk, *New England Journal of Medicine*, **307**, 819-820, 1982.

Pertwee, R.G., *In vivo* interactions between psychotropic cannabinoids and other drugs involving central and peripheral neurochemical mediators, en *Marihuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*, Murphy, L.L., Bartke, A., eds., Boca Ratón, FL, CRC Press, 165-218, 1992.

Pertwee, R.G., Griffinn, G., Hanus, L., Maechoulam, R., Effects of two endogenous fatty acid ethanokamides on mouse vasa deferentia, *European Journal of Pharmacology*, **259**, 115-120, 1994.

Rawitch, A.B., Schultz, G.S., Kurt, E.E., Competition of delta-9-tetrahydrocannabinol with estrogen in rat uterine estrogen receptor binding, *Science*, **197**, 1189-1191, 1977.

Razdan, R.K., Structure-activity relationships in cannabinoids, *Pharmacological Reviews*, **38**, 75-149, 1986.

Reisert, I., Schuster, R., Zienecker, R., Pilgrim, C., Prenatal development of mesencephalic and diencephalic dopaminergic systems in the male and female rat, *Developmental Brain Research*, **53**, 222-229, 1990.

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., Le Fur, G., SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor, *FEBS Letters*, **350**, 240-244, 1994.

Robinson, S.E., Guo, H., Spencer, R.F., Prenatal exposure to methadone delays the development of striatal cholinergic neurons, *Developmental Brain Research*, **76**, 239-248, 1993.

Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Hernández, M.L., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., Changes in brain dopaminergic indices induced by perinatal exposure to cannabinoids in rats, *Developmental Brain Research*, **51**, 237-240, 1990.

Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Fernández-Ruiz, J.J., Navarro, M., Ramos, J.A., Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons, *Neuroscience*, **43**, 713-723, 1991.

Rodríguez de Fonseca, F., Hernández, M.L., de Miguel, R., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A., Early changes in the development of dopaminergic neurotransmission after maternal exposure to cannabinoids, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **41**, 469-474, 1992.

Rodríguez de Fonseca, F., Ramos, J.A., Bonnin, A., Fernández-Ruiz, J.J., Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages, *Neuroreport*, **4**, 135-138, 1993.

Romero, J., García, L., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos J.A., The putative endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits motor and stereotypic behaviors: role of nigrostriatal dopaminergic neurons, *Biochemical Pharmacology*, **47**, 4, 711-715, 1994a.

Romero, J., García, L., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., The putative cannabinoid receptor ligand, anandamide, stimulate hypothalamic tyrosine hydroxylase activity and inhibits prolactin release, *Neuroendocrinology Letters*, **16**, 159-164, 1994b.

Romero, J., García, L., Cebeira, M., Zadrozny, D., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A., The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior, role of striatal dopaminergic neurons, *Life Science*, **56**, 2033-2040, 1995a.

Romero, J., García-Palomero, E., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A., Involvement of GABA-B, but not GABA-A, receptors in the motor inhibition caused by agonists of brain cannabinoid receptors, *Brain Research*, 1995b, en prensa.

Schuel, H., Goldstein, E., Mechoulam, R., Zimmerman, A.M., Zimmerman, S., Anandamide (arachidonylethanolamide), a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States*, **91**, 7678-7682, 1994.

Self, D., Nestler, E., Molecular mechanisms of Drug reinforcement and addiction, *Annual Review of Neuroscience*, **18**, 463-495, 1995.

- Slipetz, D.M., Oneill, G.P., Favreau, L., Dufresne, C., Gallant, M., Gareau, Y., Guay, D., Labelle, M., Metters, K.M., Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase, *Molecular Pharmacology*, **48**, 2, 352-361, 1995.
- 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.
- Snyder-Keller, A.M., Keller, R.W., Prenatal cocaine alters later sensitivity to cocaine-induced seizures, *Neuroscience Letters*, **191**, 149-152, 1995.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny, *The Journal of Comparative Neurology*, **199**, 233-253, 1981a.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. Late ontogeny, *The Journal of Comparative Neurology*, **199**, 255-276, 1981b.
- Solberg, Y., Silverman, W.F., Pollack, Y., Prenatal ontogeny of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat ventral mesencephalon, *Developmental Brain Research*, **73**, 91-97, 1993.
- Souilhac, J., Poncelet, M., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Soubrie, P., Intraatrial injection of cannabinoid receptor agonist induced turning behavior in mice, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **51**, 3-7, 1995.
- Ton, J.M., Gerhardt, G.A., Friedeman, M., Etgen, A.M., Rose, G.M., Sharless, N.S., Gardner, E.L., The effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on potassium-evoked release of dopamine in the rat caudate nucleus: an *in vivo* electrochemical and *in vitro* microdialysis study, *Brain Research*, **451**, 59-64, 1988.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States*, **76**, 4350-4354, 1979.
- Tsou, K., Patrick, L.P., Walker, J.M., Physical withdrawal in rats tolerant to Δ^9 -tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist, *European Journal of Pharmacology*, **280**, R13-R15, 1995.
- Turner, C.E., ElSohly, M.A., Boeren, E.G., Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents, *Journal of Natural Products*, **43**, 169-190, 1980.

- Tyrey, L., Murphy, L.L., Inhibition of suckling induced milk ejections in the lactating rat by delta-9-tetrahydrocannabinol, *Endocrinology*, **123**, 469-472, 1988.
- Vela, G., Fuentes, J.A., Bonnin, A., Fernández-Ruiz, J.J., Ruiz-Gayo, M., Perinatal exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) leads to changes in opioid-related behavioral patterns in rats, *Brain Research*, **680**, 142-147, 1995.
- Vogel, Z., Barg, J., Levy, R., Saya, D., Heldman, E., Mechoulam, R., Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoids receptors and inhibits adenylate cyclase, *Journal of Neurochemistry*, **61**, 352-355, 1993.
- Walters, D.E., Carr, L.A., Changes in brain catecholamine mechanisms following perinatal exposure to marihuana, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **25**, 763, 1986.
- Walters, D.E., Carr, L.A., Perinatal exposure to cannabinoids alters neurochemical development in the rat brain, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **29**, 213-216, 1988.
- Weidenfeld, J., Feldman, S., Mechoulam, R., Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat, *Neuroendocrinology*, **59**, 110-112, 1994.
- Weinberg, J., Prenatal ethanol effects: sex differences in offspring stress responsiveness, *Alcohol*, **9**, 219-223, 1992.
- Weisz, J., Brown, B.L., Ward, I.L., Maternal stress decreases steroid aromatase activity in brains of male and female rat fetuses, *Neuroendocrinology*, **35**, 374-379, 1992.
- Wenger, T., Croix, D., Tramm, G., The effect of chronic prepuberal administration of marihuana (delta-9-tetrahydrocannabinol) on the onset of puberty and the postpuberal reproductive functions in female rats, *Biology of Reproduction*, **39**, 540, 1988.
- Young, W.S., Bonner, T.I., Braun, M.R., Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **83**, 9827-9834, 1986.

La presente tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Fernández-Ruiz, J.J., Bonnín, A., Cebeira, M., Ramos, J.A., Ontogenic and adult changes in the activity of hypothalamic and extrahypothalamic dopaminergic neurons after perinatal cannabinoid exposure, en *Strategies for studying CNS active compounds: models, screens and clinical syndromes*. Seiden, L., Palomo, T., Archer, T., eds., Farren Press, London, England, volumen I, 357-390, 1994.

Bonnín, A., de Miguel, R., Hernández, M.L., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., The prenatal exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol affects the gene expression and the activity of tyrosine hydroxylase during early brain development, *Life Science*, **56**, 2177-2184, 1995.

Fernández-Ruiz, J.J., Bonnín, A., de Miguel, R., Castro, J.G., Ramos, J.A., Perinatal exposure to marihuana or to its main psychoactive constituent, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, affects the development of brain dopaminergic neurons, en *Drugs of abuse*, Ali, S.Y., Tavares, M., eds., European Monitoring Center for Drug Addictions (en prensa).

Bonnín, A., de Miguel, R., Castro, J.G., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., Effects of perinatal exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the fetal and early postnatal development of tyrosine hydroxylase containing neurons, *Neuroscience* (en prensa).

Además ha dado lugar a 5 comunicaciones en congresos internacionales.