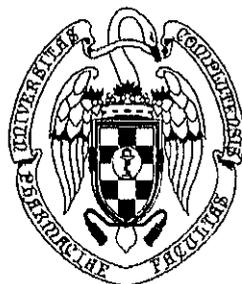


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología
(Farmacología General y Aplicada,
Farmacodinamia, Farmacognosia).



INTERACCIÓN DEL
 Δ^9 -TETRAHIDROCANNABINOL CON EL
SISTEMA OPIOIDE CENTRAL EN
ROEDORES

Directores:
José Ángel Fuentes Cubero
Mariano Ruiz Gayo

MEMORIA
que para optar al grado de
DOCTOR EN FARMACIA

presenta

Gema Vela López

Madrid, 1996

JOSÉ ANGEL FUENTES CUBERO, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y MARIANO RUIZ GAYO, Doctor en Ciencias Químicas,

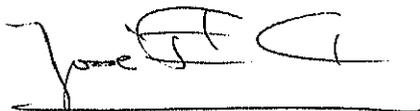
CERTIFICAN, Que GEMA VELA LÓPEZ, licenciada en Farmacia por la Universidad Complutense, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: "Interacción del Δ^9 -Tetrahydrocannabinol con el sistema opioide central en roedores", que presenta para la obtención del título de Doctor en Farmacia.

Madrid, Octubre de 1.996

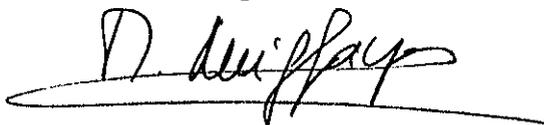
Fdo.:

Fdo.:

J.A. Fuentes Cubero



M. Ruiz Gayo



El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, con la ayuda de una Beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

Quiero expresar mi agradecimiento a mis Directores de Tesis:

Al Dr. José Ángel Fuentes Cubero, Director de esta Tesis Doctoral, por posibilitarme la realización de este trabajo, por haberme introducido en el campo de la investigación, por su interés constante y estímulo.

Al Dr. Mariano Ruiz-Gayo, Co-Director de la Tesis, por todo lo que me ha enseñado y por su apoyo y confianza, nunca me han faltado.

No me puedo olvidar de: Mis compañeros de laboratorio, y muy especialmente de Mercedes, Luis, Fernando, Vivien, Maribel, Carmen y de las Doctoras Marisol Fernández y Paulina Bermejo, por todo lo que me han ayudado.

Grande la amabilidad: Del Equipo de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la U.C.M., dirigido por el Dr. Ramos, especialmente la del Dr. Javier Fernández Ruíz.

Mi agradecimiento: Al Dr. Emilio Ambrosio Flores, del Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la UNED, por su ayuda en todo momento, su entusiasmo y su buen humor.

Mucha ciencia y gratos recuerdos: En la Unidad 339 del INSERM (París), dirigida por el Dr. W. Rostène, con el Dr. Didier Pelaprat al frente, Anne-Marie, Mounia, Valerie, Catalina, y sobre todo gracias a tí, Milin por tu amistad.

Buena estancia la que realicé en : El laboratorio del Dr. S. Scacianocce, de La Sapienza (Roma), grande su amabilidad y también la de Katia y Daniella.

Amistad y muy buenos ratos: La que conseguí de Rafa Maldonado y Olga Valverde, que bien el haberos conocido.

A Elena: por tu comprensión y amistad, ... tanto hemos compartido...

A vosotros: Papá, Mamá y Ramón, por estar siempre a mi lado, por aguantarme mis épocas de estrés, por apoyar mis estancias fuera de España, por vuestro ánimo constante y por ser como sois.

A tí, Jaime, te dejo para el final, has vivido esta Tesis tanto ó más que yo, me has enseñado todo lo que sé en la práctica sobre Drogodependencias, me has ayudado un montón y me has soportado otro tanto. Sin tí esta Tesis, no hubiera sido lo que es. No esperaba menos de tí, pero de todas maneras MIL GRACIAS.

Y a tí, enano, que te voy a decir..., que te ha tocado una madre un poco estresada en los últimos meses, y que dentro de poco, muy poquito, promete dedicarse sólo a TÍ.

A mis padres y hermano
A Jaime

ABREVIATURAS

ACTH:	Corticotropina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AMP _c :	Monofosfato de adenosina cíclica
AnNH:	Anandamida (Araquidoniletanolamida)
ANOVA:	Análisis de la varianza
ARN _m :	Ácido ribonucléico, mensajero
CBD:	Cannabidiol
CBN:	Cannabinol
CB1:	Receptor central de Cannabinoides
CB2:	Receptor periférico de Cannabinoides
CORT:	Corticosterona
CRF:	Factor Liberador de corticotropina
Δ^9 -THC:	Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
DOPAC:	Ácido dihidroxifenilacético
GABA:	Ácido γ -aminobutírico
GC _β :	Glucocorticoides
FSH:	Hormona Foliculoestimulante
HHA:	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
i.c.v:	Administración intracerebroventricular
i.p:	Administración intraperitoneal
i.t:	Administración intratecal
i.v:	Administración intravenosa
LH:	Hormona Luteinizante
p.o:	Administración oral
NKT:	Test estadístico de Newman-Keuls
NPV:	Núcleo paraventricular hipotalámico
s.c:	Administración subcutánea
SNC:	Sistema Nervioso Central
TH:	Tirosinhidroxilasa

ÍNDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
1.- <u>EXPOSICION PERINATAL A DROGAS DE ABUSO</u>	1
2.- <u>ASPECTOS GENERALES DE LOS CANNABINOIDES</u>	2
2.1 CANNABIS SATIVA	2
2.2 PRINCIPIOS ACTIVOS	3
2.2.1 Generalidades	3
2.2.2 Estructura Química	4
2.2.3 Propiedades Físico-Químicas	5
2.2.4 Relaciones Estructura-Actividad	5
2.3 FARMACOCINETICA	6
2.3.1 Absorción	6
2.3.2 Distribución	7
2.3.3 Metabolismo.....	8
2.3.4 Excreción	8
2.3.5 Transferencia placentaria	8
2.3.5.1 Exposicion perinatal a Cannabinoides	9
2.4 MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ACCIÓN DEL Δ^9 - TETRAHIDROCANNABINOL	12
2.4.1 Receptores	12
2.4.1.1 Receptor Central de Cannabinoides (CB1)	12

2.4.1.2 Receptor Periférico de Cannabinoides (CB2)	13
2.4.2 Agonistas Endógenos	14
2.4.3 Antagonistas	17
2.4.4 Agonistas Sintéticos de los Receptores Cannabinoides	17
2.5 FARMACOLOGÍA	20
2.5.1 Efectos Psicotomiméticos	20
2.5.2 Antinociocepción.....	21
2.5.3 Antiemesis	21
2.5.4 Locomoción	21
2.5.5 Posibles usos terapéuticos	22
2.6 DROGADICCIÓN	23
3.- <u>EL SISTEMA OPIOIDE</u>	25
3.1 FAMILIAS DE PÉPTIDOS OPIOIDES	25
3.2 RECEPTORES OPIOIDES	26
3.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS OPIOIDES	28
4.- <u>INTERACCIÓN DEL Δ^9-TETRAHIDROCANNABINOL CON EL SISTEMA OPIOIDE</u>	29
4.1 NEUROQUIMICA	29
4.2 COMPORTAMIENTO	30
4.2.1 Analgesia	30
4.2.2 Síndrome de Abstinencia	31

5.- <u>INTERACCIÓN DE LOS CANNABINOIDES CON DISTINTOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN</u>	32
5.1 SISTEMAS CATECOLAMINÉRGICOS	32
5.1.1 Sistema Dopaminérgico	32
5.1.1.1 Sistema Nigroestriatal	32
5.1.1.2 Sistema Mesolímbico	33
5.1.1.3 Sistema Tuberoinfundibular ...	34
5.1.2. Sistemas Adrenérgicos	34
5.2 SISTEMA COLINÉRGICO	35
5.3 SISTEMA SEROTONINÉRGICO	36
5.4 SISTEMA GABÉRGICO	36
<u>OBJETIVOS</u>	38
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	40
1.- <u>MATERIALES</u>	40
1.1 FÁRMACOS Y REACTIVOS QUÍMICOS	40
1.2 MATERIAL Y REACTIVOS UTILIZADOS EN AUTORRADIOGRAFIA DE RECEPTORES	40
1.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. CONDICIONES EXPERIMENTALES GENERALES	41
2.- <u>MÉTODOS</u>	41
2.1 METODOS EXPERIMENTALES EN EL ANIMAL IN VIVO	41

2.1.1 Síndrome de Abstinencia a opiáceos en ratón. Efecto del Δ^9 -THC y la ANANDAMIDA	41
2.1.1.1 Inducción de la dependencia física y precipitación del síndrome de abstinencia a morfina	41
2.1.1.2 Estudio de la actividad locomotora	43
2.1.2 Exposición perinatal a Δ^9 -THC en la rata	43
2.1.2.1 Estudio del efecto de la naloxona	44
2.1.2.2 Medida de umbrales nociceptivos	44
2.1.2.3 Efecto de la morfina en animales adultos expuestos perinatalmente con Δ^9 -THC	45
2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES IN VITRO	45
2.2.1 Método de Autorradiografía de receptores opioides μ	45
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	46
<u>RESULTADOS</u>	48
1.- <u>EFFECTO DE LOS CANNABINOIDES SOBRE EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A OPIÁCEOS EN EL RATÓN</u>	48

1.1.- EFECTO DEL Δ^9 -THC Y LA ANANDAMIDA	48
1.2.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA	51
2.- <u>MODIFICACIONES DE IMPLICACIÓN OPIOIDE EN RATAS</u>	
<u>PERINATALMENTE EXPUESTAS A Δ^9-THC</u>	51
2.1.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA NALOXONA EN RATAS DE 24 DÍAS	51
2.2.- MEDIDA DE UMBRALES NOCICEPTIVOS EN RATAS DE 24, 50 Y 70 DÍAS DE EDAD	54
2.3.- EFECTO DE LA MORFINA EN LA SENSIBILIDAD AL DOLOR DE ANIMALES ADULTOS	55
2.4.- AUTORRADIOGRAFÍA DE RECEPTORES OPIOIDES μ	57
<u>DISCUSION</u>	73
1.- <u>SÍNDROME DE ABSTINENCIA A OPIÁCEOS EN EL RATON</u> ..	73
1.1.- EFECTO DEL Δ^9 -THC Y LA ANANDAMIDA	73
2.- <u>EXPOSICIÓN PERINATAL A Δ^9-THC EN LA RATA</u>	76
2.1.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA NALOXONA EN RATAS DE 24 DIAS	78
2.2.- UMBRALES NOCICEPTIVOS Y EFECTO DE LA MORFINA EN ANIMALES EXPUESTOS PERINATALMENTE A Δ^9 -THC	80
2.3.- AUTORRADIOGRAFIA DE RECEPTORES OPIOIDES μ	82
<u>CONCLUSIONES</u>	88
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	89

RESUMEN

La marihuana (*Cannabis sativa*) es una de las drogas de naturaleza psicotomimética más ampliamente consumida en la actualidad, especialmente por la población juvenil. Cada vez es mayor el número de mujeres en edad fértil que son consumidoras habituales de esta droga. No obstante, los estudios sobre los efectos perinatales de drogas de amplia difusión, como es el caso de la marihuana, son relativamente escasos.

A lo largo de los últimos años se han ido acumulando evidencias acerca de la interacción del Δ^9 -tetrahidrocannabinol, principal principio psicoactivo de la marihuana, con el sistema dopaminérgico. La exposición a cannabinoides durante el desarrollo embrionario produce profundas alteraciones del sistema dopaminérgico, reflejadas a nivel neuroquímico, y detectadas en edades perinatales y peripuberales así como en la madurez. Además, se trata de efectos que son dependientes del sexo siendo los machos, en general, los que presentan efectos más marcados y constantes, mientras que las hembras se muestran menos sensibles.

La información acerca de los efectos de los cannabinoides sobre la ontogenia de otros sistemas de neurotransmisión es relativamente escasa.

En el presente trabajo, se ha estudiado la interacción del Δ^9 -THC con el sistema opioide central en roedores. Para ello, se han llevado a cabo una serie de experimentos *in vivo*, como son estudios de tolerancia y de analgesia, que se han completado con estudios de autorradiografía (experimentos *in vitro*).

En ratones dependientes de morfina, bien por implantación de un pellet ó por administración s.c. durante 5 días de dosis crecientes de morfina, se ha observado que la anandamida (AnNH), ligando endógeno del receptor central de cannabinoides (CB1), reduce los principales signos del síndrome de abstinencia a opiáceos, como son el número de saltos y la pérdida de peso. Este resultado sugiere que la AnNH puede modular la actividad de vías

neuronales implicadas en la expresión de los signos físicos de la dependencia a opiáceos y por tanto, si extrapoláramos a humanos, los cannabinoides podrían ser utilizados como una terapia alternativa en el tratamiento de la deshabituación a opiáceos.

Por otro lado, se ha comprobado que la naloxona es capaz de inducir un síndrome de abstinencia en ratas macho de 24 días de edad que habían estado expuestas a un tratamiento perinatal con Δ^9 -THC desde el quinto día de gestación de la madre hasta el día 24 de vida, día que las crías son destetadas. Este hecho, apunta claramente hacia una alteración del sistema opioide endógeno. Utilizando este mismo protocolo de exposición perinatal a cannabinoides, se ha puesto de manifiesto también, que las ratas macho de 24 y 50 días de edad expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC, muestran una menor sensibilidad basal al dolor en el test de retirada de la cola. Además, las ratas macho adultas (75 días) expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC, presentaron una tolerancia al efecto analgésico de la morfina en este mismo test de analgesia. Todos estos resultados sugieren la existencia de una interacción entre receptores opioides y cannabinoides, hecho que se puede explicar considerando una modulación alostérica ó una interacción de ambos tipos de drogas con un sistema neuroefector común.

Por último, se ha comprobado que la exposición perinatal a Δ^9 -THC produce cambios en la densidad de receptores opioides μ en ratas de 24 y 70 días de edad. Además, estos cambios se producen en diferentes áreas cerebrales relacionadas directamente con comportamientos modulados por el sistema opioide y con la percepción del dolor.

En conclusión, estos resultados aportan evidencias de la existencia de una clara interacción del Δ^9 -THC con el sistema opioide central, y además, sugieren el riesgo del uso indiscriminado de la marihuana por parte de mujeres en edad procreativa, ante la posibilidad de manifestación de efectos perjudiciales en la eventual progenie.

UN PEQUEÑO APUNTE SOBRE EL ABUSO DE DROGAS

El abuso de drogas constituye un grave problema de la sociedad actual. Cada vez es mayor el número de personas con problemas de adicción. A la hora de hablar de consumo de drogas no se puede generalizar, ya que depende del individuo concreto que abuse, de la droga objeto del abuso y del medio social en donde se de el abuso (Swonger y Constantine, 1985).

Según la legalidad de la sustancia y la forma de obtención, las drogas se dividen en drogas legales (tabaco, alcohol, psicofármacos) ó ilegales (heroína, cocaína, Cannabis...).

Cada vez es mayor el número de mujeres en edad fértil consumidoras de drogas, y sin embargo, los estudios sobre los efectos de la exposición perinatal a determinadas drogas consideradas como "blandas", son bastante escasos.

El hecho de que, a pesar de las importantes consecuencias sanitarias, el consumo de drogas ilegales desborde el problema sanitario, hace que no se pueda reclamar a este sistema la solución de un problema que engloba aspectos políticos, económicos y morales (Ochoa-Mangado, 1992).

Actualmente hay que reconocer, que la extensión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es uno de los mayores problemas públicos de salud, y como consecuencia, las prioridades en el tratamiento de la dependencia a drogas de abuso están cambiando. Son por tanto, necesarios programas (Alvarez y cols, 1994) cuyo objetivo final no sea tanto la abstinencia sino el reducir las consecuencias dañinas del uso de drogas (Bell y cols., 1992).

INTRODUCCIÓN

1.- EXPOSICION PERINATAL A DROGAS DE ABUSO

Actualmente las drogas de abuso constituyen un factor muy importante a considerar como posibles agentes capaces de modificar el desarrollo cerebral, dada su amplia difusión y la alta posibilidad de ser usadas durante la gestación.

Los sucesos que se producen en el desarrollo del SNC de los vertebrados, se clasifican en distintos estadios para facilitar así su estudio y discusión. Se diferencian tres etapas (Arenander y Vellis, 1989) que son:

- a) Organogénesis y multiplicación neuronal
- b) Diferenciación, crecimiento y organización cerebral
- c) Maduración y adquisición de la morfología y del tamaño adulto

El segundo estadio es el de curso más lento, ya que incluye procesos como la adquisición de un fenotipo neurotransmisor, de una morfología neuronal concreta incluyendo también el desarrollo de interconexiones neuronales. Todos estos procesos se realizan a lo largo del suficiente tiempo, como para que las influencias del medio ambiente extraneuronal puedan inducir modificaciones (Noisin y Thomas, 1988). Por tanto, la exposición a drogas de abuso durante el periodo fetal y primeros momentos de la vida postnatal da lugar a alteraciones sutiles, que a veces pueden pasar inadvertidas durante la ontogenia cerebral, pero que originan alteraciones a largo plazo en la expresión comportamental adulta, como son la disminución en la capacidad de aprendizaje y memoria, las alteraciones en la ejecución motora y en las actividades motivacionales, la disminución de la atención y de la inclinación al esfuerzo, los cambios en la respuesta a estrés, etc.

Durante el periodo embrionario, la exposición a drogas de

abuso produce un aumento de la toxicidad prenatal, así como una serie de efectos teratogénicos que conducen a una serie de anormalidades morfológicas.

Entre los neurotransmisores implicados en el proceso de desarrollo y diferenciación cerebral destacan la serotonina y la dopamina, que aparecen temprano durante la ontogenia (Mirmiran y Swaab, 1987). Concretamente la dopamina, tiene gran importancia en relación con las drogas psicotrópicas ya que drogas de elevada difusión hoy en día, como son la cocaína y las anfetaminas, actúan alterando la funcionalidad de las neuronas dopaminérgicas (Le Moal y Simon, 1991). Existen numerosos estudios realizados en roedores que demuestran que la exposición perinatal a drogas de abuso altera el perfil de desarrollo de los sistemas cerebrales que utilizan la dopamina como neurotransmisor (Dow-Edwards y cols., 1990; Cooper y Rudeen, 1988; Middaugh, 1989).

En el caso de drogas de alta difusión y gran problemática social, como son los preparados de *Cannabis sativa*, el tabaco o las metilxantinas, todas ellas capaces de interactuar con sistemas de neurotransmisión a través de receptores específicos presentes en el cerebro, nos encontramos con que los estudios de los efectos de la exposición perinatal a estas drogas son escasos.

2.- ASPECTOS GENERALES DE LOS CANNABINOIDES

2.1 CANNABIS SATIVA

La planta del cáñamo (*Cannabis sativa*) es un arbusto que crece de forma natural en regiones templadas y tropicales. En algunos países como India y China, su utilización con fines medicinales ó en rituales religiosos y sociales se remonta a miles de años (Mechoulam, 1986).

Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera: Clase

Angiospermae; Subclase Dicotyledoneae; Orden Urticales; Familia Cannabinaceae; Género Cannabis; Especie Cannabis sativa L.; Subespecies sativa e indica.

Se trata de una planta anual, herbácea, dioica de gran talla, que alcanza desde 1 hasta 3 m de altura. Posee hojas aserradas compuestas de color verde oscuro por el haz y pálidas y vellosas por el envés. Las flores masculinas están constituidas por racimos axilares o panículas, mientras que las inflorescencias femeninas son cimas compactas y espigadas. El fruto de Cannabis sativa es un aquenio glandular y la semilla es ovoidea con un sólo embrión oleaginoso y con escaso albumen. Todas las partes de la planta contienen sustancias psicoactivas, aunque la mayor concentración de ellas se encuentra en las inflorescencias (Abood y Martin, 1992).

Marihuana es el nombre que reciben las hojas y flores secas preparadas de tal forma que puedan fumarse; el hachís es la resina extraída de esta planta.

Entre los factores que influyen en la potencia psicotomimética de la marihuana se incluyen los factores genéticos, el clima donde crece y el momento de recolección.

2.2 PRINCIPIOS ACTIVOS

2.2.1 Generalidades

Las distintas preparaciones de Cannabis sativa deben su poder psicoactivo a una serie de principios activos presentes en la planta y que globalmente se denominan cannabinoides (Dewey, 1986). El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) es el cannabinoide con mayor poder psicoactivo (Mechoulam, 1970). Otros cannabinoides presentes en cantidades apreciables son el Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), el cannabinol (CBN) y el cannabidiol (CBD). Debido a la gran cantidad de cannabinoides

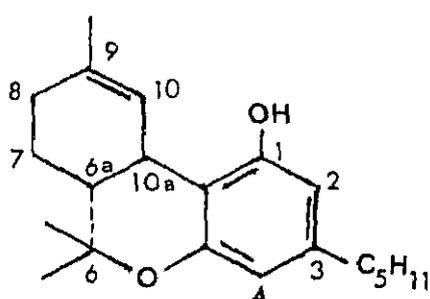
existentes en la marihuana, es muy posible que actúen sinérgicamente, aditivamente e incluso antagónicamente cuando se administra la planta o el extracto crudo a los animales de experimentación (Dewey, 1986).

2.2.2 Estructura Química

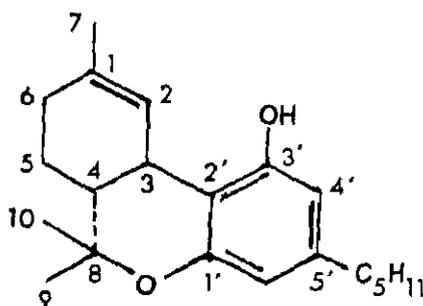
La estructura química de los cannabinoides fué identificada por Mechoulam a finales de los años 60 (Mechoulam, 1970). Estos compuestos se caracterizan por presentar una estructura carbocíclica de 21 carbonos. Presentan dos tipos de numeración en función de que se considere la estructura principal como un benzopirano o bien como un monoterpeneo (Razdan, 1986), así el Δ^9 -THC es exactamente el mismo compuesto que el $^1\Delta$ -THC utilizando respectivamente la nomenclatura dibenzopiránica o monoterpénica (Esquema 1). Los cannabinoides naturales poseen dos centros quirales en C-6a y C-10a en la configuración *trans*, siendo las formas (-) 20 veces más activas que las formas (+). Así, la mayor actividad farmacológica del Δ^9 -THC, corresponde al isómero (-) *trans*, el cual se encuentra de manera natural en la planta (Dewey, 1986).

ESQUEMA 1

Estructura química del Δ^9 -THC.



Considerando el grupo
dibenzopirano



Considerando el grupo
monoterpenoide

2.2.3 Propiedades Físico-Químicas

Los cannabinoides y la mayoría de sus metabolitos son compuestos altamente lipófilos y de baja solubilidad en disoluciones acuosas. Concretamente, el Δ^9 -THC es un compuesto resínico, insoluble en agua, con un valor de pK_a de 10.6 . Presenta un coeficiente de reparto octanol/agua a pH neutro del orden de 6000 (Agurell y cols., 1986). Se trata de un compuesto fotolábil, sensible al calor, a la acción de los ácidos y a la oxidación, pasando fácilmente a CBN. Sin embargo, almacenado correctamente, a -20°C y disuelto en etanol, permanece estable durante varios meses.

2.2.4 Relaciones Estructura-Actividad

La relación estructura-actividad de los cannabinoides se puede resumir en los siguientes apartados (Razdan, 1986):

a.- Un anillo (anillo A) generalmente no aromático, de seis carbonos. Si dicho anillo se satura, la potencia del cannabinoide se reduce. La posición del doble enlace del anillo A parece ser crucial, aunque no es esencial para la actividad cannabimimética.

b.- Un anillo aromático (anillo C) con la posición 1 sustituida (normalmente un hidroxilo) y con un grupo alquilo en posición 3. Esta cadena alifática lateral es fundamental para la actividad, y se ha observado que la máxima potencia se encuentra tras la introducción de un resto dimetilheptilalquilo.

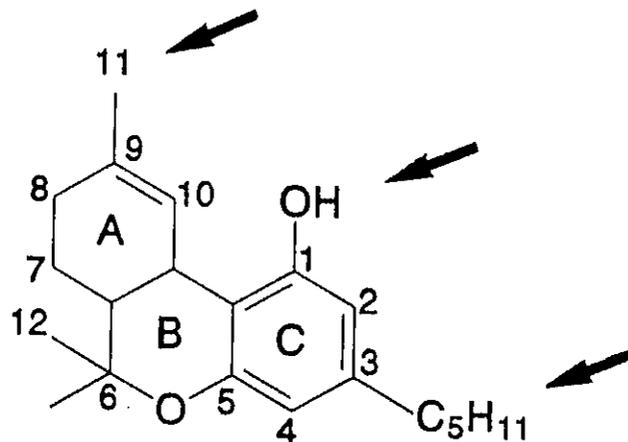
c.- Muchos cannabinoides, incluido el Δ^9 -THC, también presentan un tercer anillo (anillo B) que normalmente es un anillo de pirano. La presencia del anillo B no parece esencial ya que han sido sintetizados muchos cannabinoides con actividad psicotrópica que contienen sólo los anillos A y C. Para que estos

compuestos bicíclicos sean activos no deben contener más de un grupo hidroxilo situado en la posición 1 del anillo C (Mechoulam y cols., 1992).

Como resumen, en el esquema 2, se representan aquellos puntos que resultan claves en la estructura de un cannabinoide.

ESQUEMA 2

Puntos clave en la estructura de un cannabinoide.



2.3 FARMACOCINETICA

2.3.1 Absorción

Los efectos del *Cannabis*, tanto si se fuma como si se administra por vía intravenosa, tarda aproximadamente 1 hora en manifestarse por completo, perdurando éste durante 2-3 horas. Los cannabinoides se unen con gran afinidad a las proteínas plasmáticas, por lo que la mayor parte del fármaco permanece en sangre (Rang y Dale, 1992).

Los preparados del *Cannabis sativa* (hachís, marihuana) suelen consumirse fumados en forma de cigarrillo o en pipa. Esta particular vía de administración dificulta enormemente el análisis farmacocinético.

La absorción por vía aérea de los compuestos activos depende del tipo de preparado (el hachís contiene diez veces más Δ^9 -THC que los preparados foliares: hojas y flores), del tiempo invertido en fumarlo, de la duración de la inhalación, y de la retención del aliento tras la aspiración (Agurell y cols., 1986). A esto hay que sumar las peculiares características químicas de los cannabinoides. Así, su hidrofobicidad hace que sufran redistribución y almacenamiento en tejido adiposo, desde donde se liberan lentamente, provocando una caída paulatina de los niveles plasmáticos tras el cese de la administración. Esto, junto con la escasa elevada capacidad adictógena del *Cannabis*, explica la ausencia de un síndrome de abstinencia agudo, como ocurre en el caso de la adicción a opiáceos (Agurell y cols., 1986).

2.3.2 Distribución

El Δ^9 -THC absorbido en sangre se une en un 20% a los glóbulos rojos y en un 77% a proteínas plasmáticas, fundamentalmente lipoproteínas. Los efectos psicológicos de la droga aparecen retrasados respecto a la elevación de la concentración plasmática (Cochetto y cols., 1981) debido a una penetración lenta del Δ^9 -THC en el cerebro. El curso de la concentración plasmática del Δ^9 -THC estudiada a lo largo de 48 horas, y tras una administración única, puede interpretarse utilizando modelos de distribución multicompartimental (3 a 5 compartimentos). Determinando de esta manera la vida media plasmática del Δ^9 -THC, ésta oscila entre las 20 y las 30 horas en humanos y roedores, alcanzando un tiempo máximo de 8 días, valor detectado en el perro (Agurell y cols., 1986).

2.3.3 Metabolismo

El Δ^9 -THC plasmático se fija en un 70% a los tejidos (fundamentalmente adiposo), y el resto se metaboliza. El metabolismo es muy complejo, y sólo el Δ^9 -THC es capaz de producir más de cien metabolitos. Este proceso metabólico comienza con la oxidación, vía citocromo p-450 que conduce a derivados mono-, di- ó trihidroxilados, que posteriormente son oxidados a los correspondientes derivados cetónicos y carboxílicos (Harvey, 1987 y 1990).

2.3.4 Excreción

Los metabolitos se eliminan en forma de ácidos libres o conjugados con glucurónico o ácidos esteárico, oleico o palmítico. La eliminación se realiza por vía biliar (2/3) y renal (1/3). No se excretan ni Δ^9 -THC ni CBD inalterados, pero sí trazas de CBN (Harvey, 1987).

2.3.5 Transferencia Placentaria

Los cannabinoides son transferidos a través de la barrera placentaria desde la sangre materna a la fetal (Hutchings y cols., 1989) y excretados en la leche materna durante la lactancia (Jakubovic y cols, 1977). Durante la gestación, los niveles en los fetos son aproximadamente un 10% de los niveles plasmáticos maternos. La exposición repetida a múltiples dosis de estos compuestos produce acumulación en los fetos (Hutchings y cols., 1989), ya que el mecanismo de metabolización de los cannabinoides no parece estar establecido todavía en esta etapa del desarrollo (Slikker y cols., 1987).

2.3.5.1 Exposición Perinatal a Cannabinoides

La progenie de animales de experimentación que han sido administrados con cannabinoides durante los periodos de gestación y lactancia, presenta múltiples alteraciones neuroquímicas y comportamentales. La mayoría de estos estudios experimentales se han llevado a cabo en roedores.

Los efectos de los cannabinoides sobre el desarrollo pueden ocurrir en tres etapas diferentes.

a.- Exposición preconcepcional: La exposición a cannabinoides daña la gametogénesis e inhibe la fertilización. En los roedores macho, la administración de Δ^9 -THC o marihuana produce una disminución del tamaño de los testículos. También, se han encontrado formas anormales en los espermatozoides, así como descensos en su número total y en su grado de movilidad (Nahas y Frick, 1986). La exposición de ratones macho a Δ^9 -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). Estos efectos podrían ser originados bien por acciones directas del Δ^9 -THC sobre la gónada (el receptor CB1 ha sido descrito tanto en espermatozoide -Schuel y cols., 1994-, como en testículo humano -Gérard y cols., 1991-) ó bien por acciones indirectas que causen modificaciones en el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal.

En las hembras, la exposición preconcepcional a Δ^9 -THC produce un efecto gametotóxico, con alteración de los ciclos ováricos y 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 la capacidad de este órgano para sintetizar anandamida.

b.- Exposición prenatal: La exposición a cannabinoides durante el periodo prenatal afecta la organogénesis embrionaria. Como en el caso de otras drogas que atraviesan la placenta, se ha descrito que los cannabinoides producen embriotoxicidad, fetotoxicidad y teratogenicidad.

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

Fetotoxicidad: La exposición prenatal a 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 altamente teratogénicos. Las lesiones descritas más frecuentes son anencefalia, fisura del paladar y alteraciones en el desarrollo dental y maxilar. En algunos casos dichas alteraciones macroscópicas, se asemejan a las que se producen en el síndrome alcohólico fetal.

Los mecanismos por los cuales los cannabinoides producen todos estos efectos adversos durante el desarrollo gestacional son todavía desconocidos. Recientemente, Paria y cols. (1995) han descrito la presencia de ARN_m de los receptores cannabinoides en estadios muy tempranos del desarrollo en embriones de ratón, demostrándose así la capacidad, dependiente de la dosis, de agonistas cannabimiméticos para inhibir la preimplantación de embriones en desarrollo.

c.- 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 tales como disminución del peso corporal medio de la camada, alteración del funcionalismo neuroendocrino y de la respuesta al estrés (Mokler y cols., 1987), alteraciones

en la conducta reproductiva (Dalterio y cols., 1984), déficit en la capacidad de aprendizaje (Dalterio, 1986) y retrasos en la aparición de reflejos visuales (Nahas y Frick, 1986). El retraso en el desarrollo como consecuencia de la exposición perinatal a cannabinoides, parece deberse a varios factores:

- * Disminución de la ingesta de agua y comida por la madre (Dalterio, 1986).

- * Disminución de la producción total de proteínas, especialmente en el cerebro, así como en la síntesis de ADN y ARN (Morgan y cols., 1988).

- * Disminución de la producción de leche por la madre

- * Interferencia con el ambiente hormonal del feto (Dalterio, 1986).

En humanos, Fried (1995) ha demostrado la existencia de una serie de alteraciones comportamentales en niños de hasta 9 años de edad debidas al consumo de marihuana por parte de la madre durante la gestación y la lactancia.

Numerosos estudios han demostrado que la exposición perinatal a cannabinoides puede producir alteraciones en el desarrollo normal de los sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores cerebrales (Mirmiran y Swaab, 1987). Este aspecto se tratará más ampliamente en otro capítulo de esta memoria ("Interacción de los cannabinoides con distintos sistemas de neurotransmisión").

2.4 MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ACCIÓN DEL Δ^9 -
TETRAHIDROCANNABINOL

2.4.1 Receptores

Se han caracterizado hasta la fecha dos receptores distintos, CB1 y CB2.

2.4.1.1 Receptor central de cannabinoides (CB1)

El clonaje del receptor CB1 ha demostrado que se trata de un receptor que pertenece a la familia de proteínas que poseen siete dominios transmembranales, acoplados a proteínas G_i (Matsuda, 1990).

Se trata de un receptor de localización central. Herkenham y cols. (1990,1991), mediante técnicas de autorradiografía, han descrito que en rata, primate y humano, la mayor densidad del receptor central de cannabinoides (CB1) se encuentra en el globo pálido, sustancia negra *pars reticulata*, capa molecular del giro dentado del hipocampo así como región CA3 del asta de Ammón, y en la capa molecular del cerebelo. Otras zonas de alta densidad de receptores son los estratos mas internos del bulbo olfatorio, el caudado-putamen lateral y el núcleo entopeduncular. La corteza cerebral presenta una densidad de receptores moderada. Se considera que las respuestas centrales a los cannabinoides son mediadas exclusivamente por CB1.

El ARN_m de CB1 se ha encontrado fundamentalmente en aquellas regiones cerebrales en las que existe una mayor densidad de receptor CB1 (Matsuda y cols., 1990), aunque también se ha encontrado una pequeña cantidad en testículos (Gérard y cols., 1991).

En cerebro de rata, se ha descrito la ontogenia postnatal del receptor CB1, observándose un aumento en el número

de receptores desde el día postnatal 10 hasta los días 30 ó 40, momento en que comienza a decrecer hasta alcanzar ya el valor correspondiente a edad adulta, el día 70 (Rodríguez de Fonseca y cols., 1993; Belue y cols., 1995).

El mecanismo de segundo mensajero acoplado a la activación del receptor CB1, parece implicar al AMP cíclico (AMP_c), de tal manera que la activación del receptor central de Δ^9 -THC, produce la inhibición de la enzima adenilatociclasa mediada por proteínas G_i , (Howlett, 1985). Además, los cannabinoides inhiben los canales de calcio tipo N, participando, en este proceso, una proteína G sensible a toxina de pertussis (Mackie y Hille, 1992).

2.4.1.2 Receptor periférico de cannabinoides (CB2)

En el año 1993, Munro y cols. realizan el clonaje de un receptor de cannabinoides, en este caso de localización periférica, al que se le denomina CB2. Se trata también de un receptor con siete dominios transmembranales, que presenta un 68% de identidad con el CB1 en cuanto a las regiones helicoidales y un 44% con el resto de la proteína.

El receptor CB2 está presente en la población de monocitos/macrófagos del bazo. Mediante la técnica histoquímica de hibridación *in situ*, se ha demostrado que el ARN_m del CB2 se localiza en las zonas marginales del bazo. Utilizando autorradiografía, se ha encontrado una distribución similar de CB2, por tanto parece ser un receptor asociado al sistema inmune (Herkenham y cols., 1994). En el año 1995, Slipetz y cols. describen que este receptor está acoplado a adenilatociclasa por medio de una proteína G_i sensible a toxina de pertussis.

2.4.2 Agonistas Endógenos

En el año 1992, se aisló, a partir de cerebro porcino, un producto del metabolismo no oxidativo del ácido araquidónico con capacidad para unirse al receptor central de cannabinoides CB1 (Devane y cols., 1992). Este compuesto, que químicamente se corresponde con la araquidoniletanolamida, se denominó anandamida (AnNH).

La AnNH cumple mayoritariamente los criterios requeridos para ser considerado como un neurotransmisor (Di Marzo y cols., 1994), constituyendo el ligando endógeno del receptor CB1. Estos criterios son:

a) Síntesis: La maquinaria enzimática para producir AnNH y su precursor está presente en neuronas pero no en astrocitos.

b) Liberación: La liberación de AnNH al medio extracelular, se produce por estímulos que incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular.

c) Inactivación: Las acciones de la AnNH finalizan rápidamente (5-20 min) por medio de hidrólisis enzimática y/o recaptación por neuronas y astroglia.

La constante de inhibición (K_i) de la AnNH expresada como la capacidad para desplazar al [3H]-CP-55,940 de su unión al receptor CB1 es de 30.8 nM, mientras que su afinidad por el receptor CB2 es aproximadamente 30 veces menor (Munro y cols., 1993).

La AnNH es capaz de inhibir la adenilatociclasa estimulada por forskolina en células N_1, TG_2 que expresan de manera natural el receptor CB1. Al igual que los cannabinoides exógenos, la inhibición de la adenilatociclasa estimulada por forskolina

es bloqueada por tratamiento con toxina pertussis (Vogel y cols., 1993). También, la AnNH, al igual que otros agonistas cannabinoides, inhibe los canales de calcio tipo N en células de neuroblastoma N18 (Felder y cols., 1993).

La AnNH administrada por vía i.p, produce efectos farmacológicos semejantes a los de los cannabinoides tales como una disminución de la actividad locomotora, hipotermia y analgesia (Fride y Mechoulam, 1993).

Fride y cols. (1995) demostraron que bajas concentraciones de AnNH provocan una disminución en la potencia de la inhibición de la adenilatociclasa producida por el Δ^9 -THC en células de neuroblastoma N18TG2. En ratones, también se ha podido observar que una baja concentración de AnNH es capaz de inhibir parcial o totalmente respuestas *in vivo* típicas de los cannabinoides.

Existen una serie de compuestos relacionados con la AnNH, es decir una familia de etanolamidas derivadas de ácidos grasos poli-insaturados que también se unen al receptor central de cannabinoides. Hanus y cols.(1993) descubrieron la homo- γ -linoleniletanolamida, anandamida (20:3,n-6), y la 7,10,13,16,-docosatetraeniletanolamida, anandamida (22:4, n-6), compuestos que se encuentran en cerebro, y que al igual que la AnNH, inhiben la unión específica del agonista cannabimimético HU-243 a membranas de sinaptosomas, bloqueando además la producción de AMP_c.

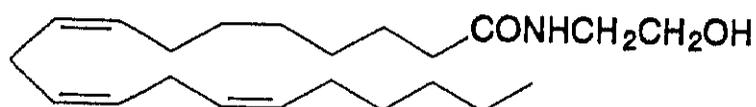
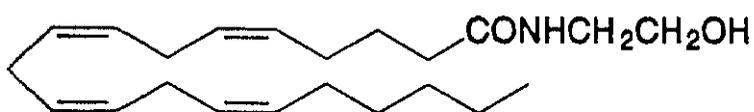
Recientemente, se ha identificado otro compuesto, el 2-araquidonilglicerol (2-Ara-Gl), que se une al CB1 y al CB2 *in vitro*. Este compuesto se ha aislado de intestino, no encontrándose en cerebro. En presencia de forskolina, el 2-Ara-Gl inhibe la adenilatociclasa en células de bazo de ratón con la misma potencia que el Δ^9 -THC (Mechoulam, 1995).

En el esquema 3 se representan las estructuras químicas de los agonistas endógenos de los receptores cannabinoides.

ESQUEMA 3

Estructuras químicas de los agonistas endógenos de los receptores cannabinoides.

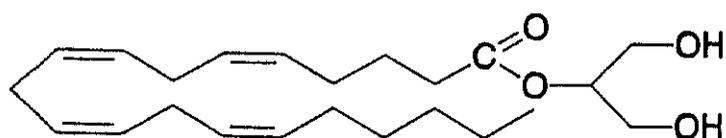
indamida.



Homo- γ -linoleniletanolamida



7,10,13,16-docosatetraeniletanolamida



2-araquidonilglicerol

2.4.3 Antagonistas

Rinaldi-Carmona y cols. (1994) sintetizaron el primer antagonista selectivo y activo p.o del receptor central de cannabinoides (CB1) llamado SR 141716A [N-(piperidin)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamidahidroclorada]. Este compuesto posee una afinidad nanomolar para el CB1 pero no es activo para el CB2.

2.4.4 Agonistas Sintéticos de los receptores Cannabinoides

A.- CANNABINOIDES TRICICLICOS Y BICICLICOS: A este grupo pertenecen el CP-55,940, el levonantradol, y el HU 210.

B.- AMINOALQUILINDOLES: Compuestos estructuralmente diferentes al Δ^9 -THC, ya que consisten en un grupo indol con una sustitución en el nitrógeno por un grupo aminoalquil y un grupo aromático en posición 3. Destacan: la PRAVADOLINA, el WIN-55212-2 y el WIN-56098.

En el esquema 4 se representan las estructuras químicas de los principales agonistas sintéticos de los receptores cannabinoides.

En la tabla 1 se muestra la capacidad de una serie de compuestos con afinidad por el receptor CB1 para desplazar la unión del [3 H]-CP-55,940.

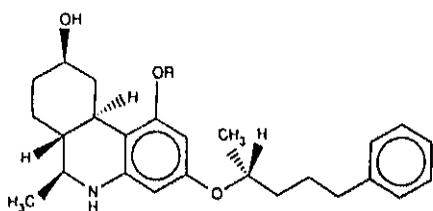
TABLA 1

Capacidad de distintos compuestos con afinidad por el receptor CB1 para desplazar la unión del [³H]-CP-55,940.

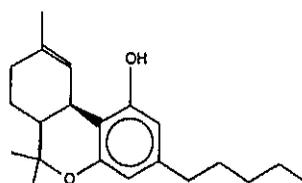
<u>COMPUESTOS</u>	<u>CONSTANTES DE INHIBICION Ki (nM)</u>
CP-55,940	0.72
WIN-55,212	1.83
Δ ⁹ -THC	29.7
ANANDAMIDA	30.8
CANNABINOL	258
CANNABIDIOL	2678
SR-141716A	1.69

ESQUEMA 4

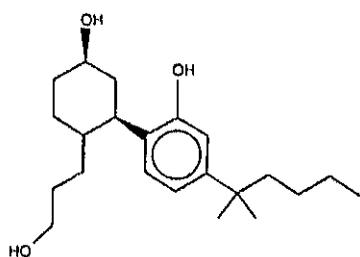
Estructuras químicas de los principales agonistas sintéticos de los receptores de cannabinoides.



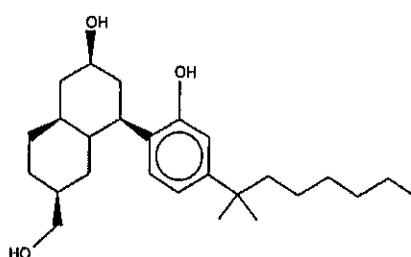
LEVONANTRADOL R = Ac
DESACETILLEVONANTRADOL R = H



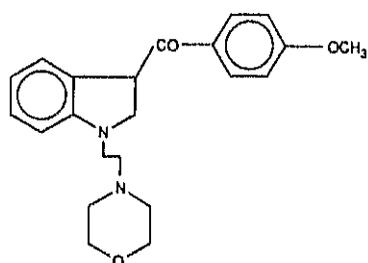
DELTA⁹TETRAHIDROCANNABINOL



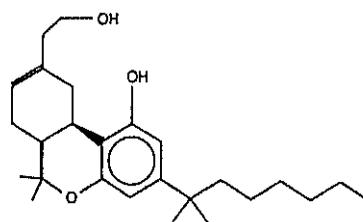
CP55-940



CP55-244



PRAVADOLINA



HU-210

2.5 FARMACOLOGIA

2.5.1 Efectos Psicotomiméticos

Los efectos que puede producir el consumo de *Cannabis sativa* en el hombre son muy complejos. Los efectos subjetivos que experimentan los individuos incluyen: excitación y disociación de ideas, aumento y distorsión de la percepción sensorial, errores en la apreciación del tiempo y espacio, alteración de las emociones, ideas fijas e ilusiones, impulsos irresistibles, espejismos y alucinaciones (Dewey, 1986). Se ha comprobado que estos efectos varían de unos individuos a otros en función de la dosis, vía de administración y la vulnerabilidad individual a ciertos efectos psicotóxicos.

Tras el consumo de la droga, los efectos comienzan con un periodo inicial de euforia o *high*, descrito como una sensación de bienestar y felicidad, que va seguido frecuentemente por un estado de somnolencia o sedación.

Hay evidencias de que el uso crónico de derivados del *Cannabis* puede llevar consigo un alto riesgo de agravamiento de enfermedades mentales preexistentes. Un estudio realizado mediante el seguimiento de una amplia población de consumidores habituales de marihuana, durante 15 años, ha mostrado un aumento de la incidencia de esquizofrenia y de otros procesos psicóticos 6 veces superior a la presentada por los no consumidores de dicha droga. Esto indica que el consumo de *Cannabis* puede ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de esquizofrenia (Andréasson y cols., 1987).

Generalmente, los cannabinoides inducen agresividad en animales de laboratorio, y a ciertas dosis, potencian la agresividad inducida por factores estresantes: descargas eléctricas, dieta... (Dewey, 1986). En humanos, parece ser que

existe un aumento de la agresividad en los sujetos durante las horas siguientes a la inhalación de marihuana (Cherek y cols., 1993).

2.5.2 Antinocicepción

El Δ^9 -THC se comporta como un compuesto altamente analgésico en roedores (Dewey, 1986) y en humanos (Drugs of Choice, The Medical Letter Inc., New Rochelle, New York, pág. 109, 1993). Numerosos estudios demuestran una interacción entre los sistemas opioide y cannabinoide en la modulación de la nocicepción (Smith y cols., 1994; Welch y cols., 1995; Reche y cols., 1996).

Este aspecto será ampliamente tratado en el capítulo de Interacción del Δ^9 -Tetrahydrocannabinol con el sistema opioide de esta misma memoria.

2.5.3 Antiemesis

En humanos, la administración oral de Δ^9 -THC previene las náuseas y los vómitos en pacientes que son tratados con antineoplásicos (Dewey, 1986).

El Δ^9 -THC se comporta como un activo antiemético cuando se administra a gatos por vía oral o intramuscular. En cambio por vía i.v. su acción antiemética no es predecible (McCarthy y cols., 1984). También, el Δ^9 -THC en ratones es capaz de atenuar el sabor aversivo inducido por la ciclofosfamida (Landauer y cols., 1985).

2.5.4 Locomoción

La administración aguda de Δ^9 -THC produce, en la mayoría de las especies animales, catalepsia y adopción de posturas anormales, ataxia y disminución de la actividad motora

espontánea y de exploración. Estos efectos se producen con dosis de 1-10mg/kg de Δ^9 -THC en ratón (Holtzman y cols., 1969). No obstante, la habituación previa a la situación experimental, disminuye los efectos del Δ^9 -THC sobre la actividad motora.

2.5.5 Posibles usos terapéuticos

* Disminución de los vómitos y nauseas asociados a la quimioterapia del cáncer: En ensayos clínicos se ha visto que pacientes sometidos a terapia anticancerosa tratados con Δ^9 -THC, presentan una mejoría en cuanto a los vómitos y nauseas, pero también experimentaban una serie de efectos psicoestimulantes como somnolencia, disforia y confusión mental. La Nabilona, cuya estructura química se corresponde con el levonantradol, tiene una menor incidencia de efectos centrales aunque no está exenta de efectos secundarios como sequedad de boca, alteraciones de la coordinación y mareos.

* Reducción de la presión intraocular: Este efecto es similar en cuanto a potencia y duración al producido por la pilocarpina. Por tanto, un posible uso terapéutico de los cannabinoides sería el tratamiento del glaucoma (Lester y Bakalar, 1993).

* Acción sedante: Las preparaciones de *Cannabis*, administradas por vía oral, a dosis mucho más bajas que a las que produce efectos psicoactivos, inducen un efecto sedante y tranquilizante que va acompañado por una disminución de la ansiedad.

* Efecto broncodilatador: Para que el Δ^9 -THC sea eficaz como antiasmático debe ser administrado mediante aerosol. Actualmente, se están ensayando análogos eficaces en este sentido exentos de efectos psicoactivos.

* Acción anticonvulsivante: El Δ^9 -THC se comporta como un potente anticonvulsivante, aunque se ha comprobado que el CBD presenta una potencia todavía mayor y además está exento de efectos psicoactivos marcados (Martin, 1986).

* Actividad analgésica: El Δ^9 -THC se comporta como analgésico (ver capítulo de Interacción del Δ^9 -Tetrahidrocannabinol con el sistema opioide).

* Actualmente, se ha descubierto un posible efecto beneficioso de la marihuana en el tratamiento del síndrome de desgaste asociado al SIDA (Steele, 1995).

2.6 DROGADICCIÓN

La marihuana, a pesar de ser una droga consumida desde tiempos antiguos, incluso utilizada con fines medicinales, comenzó a ser consumida de forma extensiva principalmente por sus efectos euforizantes, a partir de la segunda mitad de este siglo, para ser posteriormente superada por otras drogas teóricamente más adictógenas. Para esto, contó con una buena prensa acerca de su relativa inocuidad en el organismo humano. Desde entonces se han realizado multitud de estudios clínicos y experimentales para elucidar los efectos neurobiológicos derivados de su consumo.

Las estadísticas más recientes sugieren que en torno al 15% de la población adulta en América y Europa Occidental ha consumido Cannabis en alguna ocasión, siendo este porcentaje mucho más elevado (cerca al 50%) entre los adolescentes y adultos jóvenes. Estudios realizados en 1987 demostraron que uno de cada veinte adolescentes fuma marihuana a diario en los países del mundo occidental (Mendelson, 1987).

La marihuana y el hachís siguen hoy representando, junto con el alcohol y el tabaco, el primer punto de conexión de los jóvenes con el mundo de las drogas, jugando, en ocasiones, un

papel de trampolín en el consumo de las llamadas "drogas duras". A pesar de la fama de relativa inocuidad de esta droga, tanto los estudios clínicos como los experimentales demuestran que produce importantes efectos a nivel comportamental, tanto cuando la exposición se realiza en edad adulta, como cuando se produce en periodos tempranos del desarrollo.

En el DSM-IV (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Transtornos Mentales) la intoxicación por *Cannabis* está definida sobre seis criterios:

A.- Consumo reciente de *Cannabis*

B.- Cambios psicológicos o comportamentales desadaptativos clínicamente significativos (por ejemplo, deterioro de la coordinación motora, euforia, ansiedad, sensación de que el tiempo transcurre lentamente, deterioro de la capacidad de juicio, retraimiento social) que aparecen durante o poco tiempo después del consumo de *Cannabis*.

C.- Dos (o más) de los siguientes síntomas que aparecen a las dos horas del consumo de *Cannabis*:

- 1.- Dilatación de la conjuntiva
- 2.- Aumento de apetito
- 3.- Sequedad de boca
- 4.- Taquicardia

D.- Los síntomas no son debidos a enfermedad ni se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental.

Se ha demostrado la existencia de una marcada tolerancia a la mayoría de los efectos farmacológicos de la marihuana en la mayoría de las especies animales y en el hombre (Dewey, 1986). Esta tolerancia se caracteriza por prevalecer largo tiempo tras el cese del consumo de la droga, esto constituye una diferencia

con respecto a la tolerancia desarrollada a los opiáceos.

La dependencia física se ha demostrado en ratas (Tsou y cols, 1995) a las que se ha precipitado un síndrome de abstinencia como consecuencia de la administración del antagonista del receptor CB1, SR 141716A. Dicho síndrome de abstinencia se manifiesta fundamentalmente por una serie de cambios en el comportamiento motor de los animales.

En humanos, la ausencia de resultados concluyentes sobre los efectos negativos en el uso crónico de marihuana no permite descartar que sea una droga cuyo uso persistente cause efectos nocivos.

3.- EL SISTEMA OPIOIDE

3.1 FAMILIAS DE PEPTIDOS OPIOIDES

Según el precursor del que derivan, los péptidos opioides conocidos hasta el momento, se han dividido en tres familias:

A.- PEPTIDOS DERIVADOS DE LA PROOPIOMELANOCORTINA: Se denominan endorfinas, y a ellos pertenece la β -endorfina.

B.- PEPTIDOS DERIVADOS DE LA PROENCEFALINA: Son las encefalinas. Sus representantes de mayor importancia son la metionina-encefalina (met-encefalina) y la leucina-encefalina (leu-encefalina).

C.- PEPTIDOS DERIVADOS DE LA PRODINORFINA : A este grupo pertenecen las dinorfinas, siendo sus representantes la dinorfina A (1-17), dinorfina A (1-8), dinorfina B (1-13) y la α - y β -neoendorfinas.

En el esquema 5, se muestra la secuencia de los péptidos opioides mencionados anteriormente.

ESQUEMA 5

Secuencias de los péptidos opioides más importantes

<u>PEPTIDO</u>	<u>SECUENCIA</u>
β -endorfina	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu-OH
[Met ⁵]encefalina	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH
[Leu ⁵]encefalina	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH
Dinorfina A(1-17)	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH
Dinorfina B(1-13)	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-OH
α -Neoendorfina	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys-OH
β -Neoendorfina	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-OH

3.2 RECEPTORES OPIOIDES

Los péptidos opioides pueden interactuar a su vez con varios tipos de receptores. Existen fundamentalmente tres tipos de receptores: μ (μ), δ (δ) y κ (κ).

La afinidad relativa (expresada como constante de inhibición) de los péptidos opioides endógenos por los receptores μ , δ y κ se muestra en la Tabla 2 (Delay-Goyet, 1989).

TABLA 2

Afinidad relativa de los péptidos opioides por los distintos tipos de receptores.

PEPTIDO	RECEPTORES (K_i , nM)		
	μ	δ	κ
β -endorfina	2.05	2.36	67
Met-enkefalina	9.50	0.91	4440
Leu-enkefalina	18.8	1.18	8210
Dinorfina A(1-17)	0.70	2.40	0.12
Dinorfina A(1-8)	3.40	4.40	9
Dinorfina B(1-13)	0.70	3.20	0.12
α -Neoendorfina	1.30	0.57	0.20

Actualmente, numerosos indicios sugieren la existencia de subtipos de receptores opioides, así existirían dos subtipos para el receptor μ : μ_1 , μ_2 (Wolozin y Pasternak, 1981), dos subtipos para el receptor δ : δ_1 , δ_2 (Negri y cols., 1991) y tres subtipos para el receptor κ : κ_1 , κ_2 , κ_3 (Clark y cols., 1989), además del posible acoplamiento alostérico μ - δ (Traynor y Elliot, 1993).

En cuanto a su distribución regional, los receptores opioides están ampliamente distribuidos en todo el SNC con algunas localizaciones periféricas (Mansour y cols., 1988). Las estructuras más ricas en receptores son las estructuras límbicas, la corteza, el estriado y los núcleos del tálamo. Los receptores μ tienen una distribución amplia: el estriado, tálamo, hipocampo, la sustancia gris periacueductal, la sustancia negra, los colículos y los núcleos del tracto solitario. La localización de los receptores δ es más restringida: neocortex, estriado y amígdala. Por lo que respecta a los receptores κ , éstos presentan una localización preferentemente en el área preóptica, eminencia media, amígdala, hipocampo, corteza y médula espinal.

Se ha comprobado que, en ocasiones, la distribución anatómica de los péptidos opioides endógenos y la de sus receptores no se solapan (Khachaturian y cols., 1985). En el caso de las encefalinas, su distribución mayoritariamente coincide con la de sus receptores μ y δ . Esto no ocurre con las dinorfinas y los receptores κ . Existen zonas ricas en receptores κ , como es la corteza cerebral, en las que la presencia de péptidos derivados de prodinorfina es muy baja. Otro ejemplo lo constituye la elevada densidad de receptores μ en estriado y corteza cerebral cuando el contenido de péptidos derivados de proopiomelanocortina es prácticamente nulo.

3.3 MECANISMO DE ACCION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES

Los receptores μ , δ y κ están acoplados a proteínas G_i/G_o (Receptor and ion channel nomenclature Supplement, Trends in Pharmacological Sciences, 1996). Su activación conduce a una inhibición de la adenilatociclasa con la correspondiente disminución en los niveles intracelulares de AMP_c . Los agonistas de los tres tipos de receptores opiáceos también provocan un incremento en la conductancia al K^+ , mediante la apertura de canales de K^+ dependientes de voltaje. Esto supone una hiperpolarización de la membrana, con el consiguiente aumento en la duración del potencial de acción, lo que produce una inhibición de la liberación de neurotransmisores (Chesselet, 1984). Por último, estos receptores por estar acoplados a proteínas G_o , inhiben canales de Ca^{2+} -potasio dependientes, provocando el correspondiente descenso en la conductancia al Ca^{2+} .

4.- INTERACCION DEL Δ^9 -TETRAHIDROCANNABINOI. CON EL SISTEMA OPIOIDE

Muchas de las acciones farmacológicas de los opioides tales como analgesia, depresión respiratoria, inhibición de la motilidad intestinal y de la actividad locomotora, también las presentan los cannabinoides (Paton y Pertwee, 1973). Además, alguno de los efectos farmacológicos del Δ^9 -THC es bloqueado por antagonistas opiáceos como la naloxona (Wilson y May, 1975; Reche y cols., 1996) y la clornaltrexamina (Tulunay y cols., 1981).

4.1 NEUROQUIMICA

Vaysse y cols (1987) demostraron que el tratamiento de membranas de cerebro de rata con Δ^9 -THC disminuía la unión específica de [3 H]-dihidromorfina (agonista opioide μ) de una forma concentración-dependiente. Esta disminución se debe a una reducción en el número de receptores ("down-regulation") más que a una alteración en la afinidad por el receptor, por tanto se trata de una interacción no competitiva. Además, el principal componente psicoactivo del *Cannabis*, el Δ^9 -THC, también inhibe la unión del agonista opioide δ [3 H]D-penicilina², D-penicilina⁵-encefalina (DPDPE) y del antagonista opioide [3 H]naloxona. Estos autores sugieren que la modulación alostérica del receptor opiáceo por el Δ^9 -THC es el resultado de una interacción directa con el receptor o con un complejo lípido-proteico específico y no meramente el resultado de una perturbación de la bicapa lipídica de la membrana.

Los opiáceos y los cannabinoides se unen a receptores acoplados a proteínas G_i para inhibir la actividad de la adenilatociclasa en neuronas. En tejido estriatal de rata, Bidaut-Russell y cols. (1991) demostraron que la interacción del sistema cannabinomimético con el sistema opioide para inhibir la acumulación de AMP_c no es ni aditiva ni sinérgica. Estos estudios en preparaciones de SNC sugieren que ambos tipos de receptores

pudieran estar colocalizados en algunas de las mismas neuronas compartiendo un mecanismo común de segundo mensajero.

Kumar y cols (1983; 1984), han demostrado una elevación en los niveles diencefálicos de met-enkefalina y β -endorfina después de la administración aguda y crónica de Δ^9 THC a ratas adultas. Posteriormente, se demostró (Kumar y cols., 1990) que ratas macho adultas que habían recibido un tratamiento neonatal con Δ^9 THC (2 mg/kg) desde el momento de su nacimiento hasta el día 4°, también presentaban un aumento en los niveles de met-enkefalina y β -endorfina en el área diencefálica (área anterior hipotálamica-preóptica e hipotálamo medio-basal).

4.2 COMPORTAMIENTO

4.2.1 Analgesia

Históricamente, se conoce que los preparados de *Cannabis sativa* alivian el dolor. En el año 1975, Wilson y May comprobaron que el Δ^9 -THC, principal compuesto activo de la marihuana, tenía propiedades analgésicas. Es importante destacar que el cannabinoide sintético levonantradol muestra una potencia analgésica 30 veces superior a la de la morfina (Howlett y cols., 1990).

La implicación del sistema opioide endógeno en la analgesia producida por los cannabinoides es un aspecto controvertido.

Welch (1993) demuestra que las respuestas antinociceptivas a CP-55940, levonantradol y Δ^9 -THC podían ser atenuadas por la administración intratecal (no intracerebroventricular) del antagonista del receptor opiáceo κ nor-binaltorfimina. En nuestro laboratorio (Reche y cols., 1996), han puesto de manifiesto que la naloxona, a la dosis de 1 mg/kg (s.c.), es capaz de bloquear parcialmente la respuesta analgésica

del Δ^9 -THC, y además la administración i.t. de un antisuero de conejo antidinorfina A(1-8), también produce un bloqueo de la analgesia producida por el Δ^9 -THC. Esto apunta la posibilidad de que la respuesta analgésica producida por los cannabinoides pueda estar relacionada con la liberación de péptidos relacionados con dinorfina en médula espinal. Mason y Welch (1996) han comprobado la presencia de dinorfina y Leu-encefalina en líquido cefalorraquídeo de animales tratados con Δ^9 -THC. Por otro lado, se ha demostrado la existencia de una tolerancia cruzada entre el Δ^9 -THC y los agonistas κ (Smith y cols., 1994), sugiriendo que en la analgesia espinal, una vía neuronal que implique a los receptores opiáceos κ puede converger con una vía que implique a los receptores cannabinoides. También debe existir algún sinergismo en los mecanismos de analgesia μ y δ opioide con la analgesia producida por los cannabinoides porque el pretratamiento i.t. de ratones con dosis subefectivas de Δ^9 -THC es capaz de desplazar hacia la izquierda la curva dosis-respuesta de la morfina i.t. o del DPDPE en el test de retirada de la cola (Welch, 1993). Recientemente, se ha puesto de manifiesto en nuestro laboratorio, que ratones pretratados con una dosis inactiva per se de morfina, muestran una reducción en la DE_{50} del Δ^9 -THC en los test de retirada de la cola ó del plato caliente. Este efecto potenciador es bloqueado por norbinaltorfimina i.t y por β -funaltrexamina i.c.v. Por tanto, el sinergismo entre morfina y Δ^9 -THC parece implicar, tanto a receptores μ supraespinales, como a receptores κ espinales (datos no publicados).

Kumar y cols (1990), han observado que ratas adultas macho que habían sido expuestas a un tratamiento neonatal con Δ^9 -THC mostraban una mayor sensibilidad al dolor tras la administración de morfina.

4.2.2 Síndrome de Abstinencia

Hine y cols.(1975) pusieron de manifiesto que el Δ^9 -THC

reduce la intensidad de la abstinencia a morfina. Si se compara la eficacia de los distintos cannabinoides para inhibir el síndrome de abstinencia a morfina, el más efectivo es el Δ^9 -THC, seguido del Δ^8 -THC, el 11-hidroxi- Δ -THC, cannabidiol y cannabinol (Bhargava, 1976). Por otro lado, la naloxona (1 mg/kg i.p) es capaz de inducir un síndrome de abstinencia en ratas tolerantes a Δ^9 -THC (Kaymakcalan y cols., 1987).

La marihuana y concretamente su principal principio activo, el Δ^9 -THC, estimula los circuitos de recompensa cerebrales del mismo modo que las demás drogas de abuso (Gardner y cols., 1988) y aumenta la liberación de dopamina en núcleo accumbens (Chen y cols., 1989). Estos dos efectos son revertidos por naloxona, hecho que implica un mecanismo opioide endógeno como mediador de la acción euforizante de todas las drogas de abuso, incluida la marihuana.

5.-INTERACCION DE LOS CANNABINOIDES CON DISTINTOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISION

El tratamiento de animales de experimentación con Δ^9 -THC produce múltiples efectos sobre la actividad de dopamina, serotonina y otros neurotransmisores en diversas áreas cerebrales, con cambios en su concentración, recambio, biosíntesis, abundancia y afinidad de los receptores respectivos.

5.1 SISTEMAS CATECOLAMINÉRGICOS

5.1.1 Sistema Dopaminérgico

5.1.1.1 Sistema Nigroestriatal

El Δ^9 -THC produce disminución de la concentración cerebral de dopamina (Aulack y cols., 1980), inhibición de la actividad de las neuronas nigroestriatales dopaminérgicas, disminución de la actividad motora y de las conductas

estereotipadas y aumento del tiempo de inactividad en ratas (Navarro y cols., 1993a). Se han encontrado resultados similares cuando el Δ^9 -THC se administró perinatalmente (Navarro y cols., 1994).

En ratas macho expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC se observa un descenso en la actividad enzimática de la TH en el estriado. En paralelo, las densidades de los receptores D_1 y D_2 se encuentran alteradas tras la exposición perinatal a cannabinoides, observándose un descenso en el número de estos receptores en el estriado de ratas macho (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991).

La exposición prenatal a Δ^9 -THC aumenta la expresión de la TH tanto en la cantidad de su ARN_m como en la cantidad de proteína, en el día gestacional 14. También en los animales tratados con Δ^9 -THC se observa un aumento de la actividad de la enzima. A partir del día de gestación 18, se encuentra una respuesta sexualmente dimórfica en la expresión del gen de la TH tras la exposición a Δ^9 -THC. En este día, se produce una disminución en de la cantidad de ARN_m de TH en los machos expuestos a Δ^9 -THC, mientras que en las hembras se presenta una tendencia en sentido contrario (Ana Bonnin, Tesis Doctoral, 1995).

5.1.1.2 Sistema Mesolímbico

La administración de Δ^9 -THC a ratas va seguida de los siguientes hechos: incremento en la velocidad de disparo de las neuronas dopaminérgicas (Levenson y French, 1990), aumento en el contenido de ácido homovanílico en la corteza prefrontal y tubérculo olfatorio (Bowers y Hoffman, 1986) y elevación del contenido de DOPAC, dopamina y número de receptores D_1 en el área límbica anterior (Navarro y cols., 1993b). Por otro lado, Chen y cols (1990), han demostrado que el Δ^9 -THC aumenta la liberación de dopamina al medio extracelular medida por microdialisis *in vivo*, en núcleo accumbens. Estos efectos neuroquímicos se

acompañan de modificaciones a nivel comportamental, como por ejemplo, facilitación de los procesos de recompensa cerebral (Gardner y cols., 1988), disminución de la motilidad sexual e incremento de la emotividad (Navarro y cols., 1993b).

Por otra parte, se ha descrito un incremento en la actividad presináptica de neuronas dopaminérgicas del sistema mesolímbico en ratas macho expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991; Navarro y cols., 1993b).

5.1.1.3 Sistema Tuberoinfundibular

La administración de Δ^9 -THC produce una marcada alteración en el proceso de liberación de hormonas por la adenohipófisis. Concretamente, tras la administración de Δ^9 -THC, se observa una disminución en la secreción de prolactina, hormona luteinizante (LH), hormona folículoestimulante (FSH), hormona del crecimiento (GH) y un incremento en la liberación de ACTH (Murphy y cols., 1990). Estos efectos parecen ser ocasionados principalmente como consecuencia de alteraciones inducidas por el Δ^9 -THC en la actividad de determinados neurotransmisores hipotalámicos, como es el caso de la serotonina (Kramer y Ben-David, 1978) y de la dopamina (Fernández-Ruiz y cols., 1992).

En machos, la exposición perinatal a cannabinoides provoca un incremento en la actividad de las neuronas tuberoinfundibulares, que se refleja en incrementos en la actividad de TH y en la producción de DOPAC, junto con un aumento en la concentración de dopamina y disminución de la liberación de prolactina (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991).

5.1.2 Sistemas Adrenérgicos

Los efectos de la exposición a cannabinoides sobre los sistemas adrenérgico y noradrenérgico son muy parecidos a los

producidos sobre el sistema dopaminérgico. La administración aguda de Δ^9 -THC a animales de experimentación produce una disminución en las concentraciones cerebrales de noradrenalina junto con diversos cambios comportamentales (Aulakh y cols., 1980), mientras que el tratamiento crónico conduce a incrementos en el recambio y la biosíntesis de dicho neurotransmisor (McDougall y cols., 1992).

Lichtman y Martin (1991) han demostrado que el antagonista α_2 -noradrenérgico yohimbina, cuando se administra en la región lumbar produce una reducción en la respuesta analgésica del Δ^9 -THC. Por otro lado, el Δ^9 -THC modifica la afinidad del receptor β -adrenérgico en corteza cerebral, aumentando la unión de los antagonistas pero no la de los agonistas (Hillard y cols., 1984).

Adicionalmente, el tratamiento perinatal con extractos crudos de marihuana (proporción variable de Δ^9 -THC, CBN y CBD), disminuye el número de receptores α_1 -adrenérgicos (Walters y Carr, 1988).

5.2 SISTEMA COLINERGICO

El hipocampo parece ser el área más afectada por los cambios inducidos por los cannabinoides en la transmisión colinérgica. Así el Δ^9 -THC produce una disminución en el recambio de acetilcolina paralelamente a un incremento de su contenido (Tripathy y cols., 1987). En menor grado, también se afectan el cortex, el estriado, el cerebro medio y la protuberancia. El incremento de los niveles de acetilcolina no va acompañado de una inhibición del enzima acetilcolinesterasa (Pertwee y cols., 1992).

Por otro lado, se sabe que el Δ^9 -THC y el cannabinoide sintético levonantradol producen una potenciación de la hipoquinesia inducida mediante el tratamiento con flufenazina.

Al parecer se trata de un efecto nicotínico ya que es mimetizado por nicotina y antagonizado por mecamilamina (Moss y cols., 1987).

5.3 SISTEMA SEROTONÉRGICO

La administración crónica de cannabinoides causa efectos bifásicos sobre la síntesis de este neurotransmisor. Inicialmente, se observa un incremento significativo del contenido cerebral de serotonina, siendo el hipotálamo y el cerebelo las zonas más afectadas. Paralelamente se observa una depresión del comportamiento animal. Seguidamente, se produce una fase estimuladora, que se relaciona con una disminución de la serotonina en las respectivas áreas cerebrales (Dewey, 1986).

Por otro lado, los agonistas cannabinoides bloquean la activación de los receptores 5-HT₁ en neuronas ganglionares de rata (Fan, 1995). Esta interacción puede ser un posible mecanismo que explique algunos de los efectos comportamentales de los cannabinoides tales como la antiemesis y la analgesia.

La exposición perinatal a Δ^9 -THC aumenta los niveles de serotonina en el estriado y disminuye su contenido en el hipotálamo anterior, núcleos del rafe y *locus coeruleus* (Molina-Holgado y cols., 1993). La administración aguda de Δ^9 -THC produce un deterioro de la memoria a corto plazo, aunque tal efecto parece que no está relacionado con alteraciones serotoninérgicas (Molina-Holgado y cols., 1994), ya que por ejemplo no se observan diferencias en la velocidad de recambio de serotonina entre los animales tratados con Δ^9 -THC y los controles.

5.4 SISTEMA GABÉRGICO

El tratamiento con Δ^9 -THC altera la unión de diazepam y flunitrazepam a membranas de cerebro. Esto parece indicar alteraciones de la neurotransmisión GABAérgica, ya que el lugar

de fijación a benzodiazepinas es parte constituyente del complejo GABA-receptor. Además, se ha observado que un análogo del Δ^9 -THC se une fuertemente a los sitios de unión para las benzodiazepinas (Shan-Ching y Jakubovic, 1987).

También se ha descrito que el Δ^9 -THC presenta un efecto sinérgico con las benzodiazepinas en la producción de catalepsia en el ratón, hecho que puede ser debido a que el Δ^9 -THC incrementa las concentraciones sinápticas de GABA (Pertwee y Greentree, 1988). Herkenham y cols (1991), apuntan la posibilidad de que el receptor CB1 esté localizado en neuronas estriatales GABAérgicas.

OBJETIVOS

Muchas de las acciones farmacológicas de los opioides tales como analgesia, depresión respiratoria, inhibición de la motilidad intestinal y de la actividad locomotora, también las presentan los cannabinoides (Paton y Pertwee, 1973). Además, alguno de los efectos farmacológicos del Δ^9 -THC es bloqueado por antagonistas opiáceos como la naloxona (Reche y cols., 1996), la clornaltrexamina (Tulunay y cols., 1981) y la nor-binaltorfimina.

Son conocidas las alteraciones que produce la exposición perinatal a cannabinoides sobre el sistema dopaminérgico (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991). Además, la marihuana y concretamente su principal principio activo, el Δ^9 -THC, activa los circuitos de recompensa cerebrales del mismo modo que las demás drogas de abuso (Gardner y cols., 1988). Este efecto es revertido por naloxona, hecho que sugiere la implicación de un mecanismo opioide endógeno como mediador de la acción euforizante de la marihuana.

El objetivo general ha consistido en estudiar la interacción de los sistemas cannabinoide y opioide centrales. Dicho objetivo general, se ha articulado en los siguientes objetivos parciales:

1) Evaluación en rata del efecto del tratamiento perinatal con Δ^9 -THC sobre aspectos distintos indicativos del funcionalismo opioide central en la progenie.

1.1) Administración de un antagonista opiáceo y observación del eventual síndrome de abstinencia.

1.2) Estudio de la respuesta al dolor en un test de nocicepción.

1.3) Estudio de la respuesta a la administración de un analgésico opiáceo.

1.4) Estudio de la densidad de receptores opioides en regiones discretas del SNC.

2) Explorar la posible tolerancia cruzada entre opiáceos y cannabinoides, utilizando para ello la dependencia inducida por administración subcrónica de morfina en ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES

1.1 FARMACOS Y REACTIVOS QUÍMICOS

El sulfato de morfina se obtuvo del Servicio de Restricción de Estupefacientes, M° de Sanidad y Consumo, Madrid, España. Los pellets de morfina fueron preparados por la Dra. M.A. Camacho, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. El Δ^9 -THC fue suministrado por el National Institute of Drug Abuse, NIDA (EE.UU). La anandamida se obtuvo de SPI BIO, Francia. El cremophore EL y la naloxona procedían de Sigma (EE.UU).

Los reactivos orgánicos generales, así como las sales inorgánicas utilizadas, fueron de calidad analítica y procedían de las casas comerciales Sigma, Merck, Fluka y Boheringer.

1.2 MATERIAL Y REACTIVOS UTILIZADOS EN AUTORADIOGRAFIA DE RECEPTORES

El compuesto (D-ala², N-metil-fenil⁴, glicocola⁵) (tirosil-3,5-³H) encefalina, [³H]-DAGO (actividad específica ≈ 60 Ci/mmol), las cassettes y las películas autorradiográficas Hyperfilm-³H, se compraron a Amersham (Gran Bretaña).

El Tris 50 mM se preparó a partir de trizma base (Tris-hidroximetil-aminometano) suministrado por Sigma. La gelatina, bacitracina y el DAGO no radiactivo también se compraron a Sigma. El sulfato de potasio y cromo III, $KCr(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$, se obtuvo de Fluka (Suiza).

El revelador (D-19) así como el fijador fueron suministrados por Kodak (Gran Bretaña) .

1.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. CONDICIONES
EXPERIMENTALES GENERALES

En los experimentos de síndrome de abstinencia a opiáceos utilizamos ratones Swiss macho de 25-30 gramos (Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Barcelona), que fueron estabulados en el animalario con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y temperatura constante (22-23°C) hasta el momento en que se realizó el experimento.

En los experimentos de toxicidad perinatal al Δ^9 -THC utilizamos ratas Wistar que permanecieron desde su nacimiento en condiciones constantes de luz (entre las 08:00 y las 20:00 horas), temperatura (23 \pm 1°C) y humedad. Los animales tuvieron acceso permanente a comida y agua.

2.- MÉTODOS

2.1 METODOS EXPERIMENTALES EN EL ANIMAL *IN VIVO*

2.1.1 Síndrome de abstinencia a opiáceos en ratón.
Efecto del Δ^9 -THC y de la ANANDAMIDA

2.1.1.1 Inducción de dependencia física y
precipitación del síndrome de
abstinencia a morfina

Para provocar la dependencia física se utilizaron dos protocolos diferentes:

a) A un grupo de ratones les fue implantado subcutáneamente (s.c), en el dorso, a la altura de la región cervical, un pellet de morfina sulfato (75 miligramos) o de placebo bajo el efecto de ligera anestesia con éter (San Martin Clark y cols., 1993). Setenta y dos horas después de la intervención quirúrgica, los animales fueron tratados con Δ^9 -THC

(10 mg/kg) o anandamida (1 y 5 mg/kg). El Δ^9 -THC y la anandamida, se administraron por vía i.v. disueltos en Cremophore EL: Etanol: Agua (1:1:8).

b) Otro grupo de ratones fue tratado s.c. con morfina sulfato o salino 2 veces al día (Maldonado y cols., 1992). La dosis de morfina fue progresivamente incrementándose desde 8 mg/kg a 45 mg/kg a lo largo de un período de 5 días. El primer y segundo número dentro del paréntesis representan la dosis de morfina (mg/kg) inyectada a las 9 horas a.m. y 6 horas p.m., respectivamente, en días consecutivos: día 1 (8,15), día 2 (20,25), día 3 (30,35), día 4 (40,45), día 5 (45, sólo a las 9 horas a.m.). Dos horas después de la última dosis de morfina los ratones fueron tratados con anandamida (0.1, 1 y 5 mg/kg) por vía i.v. (vehículo: Cremophore EL: Etanol: Agua 1:1:8).

El síndrome de abstinencia a morfina fue precipitado por inyección intraperitoneal (I.P.) de una dosis de 1 mg/kg (protocolo a) ó 5 mg/kg s.c. (protocolo b) del antagonista opiáceo naloxona. Dicha inyección se efectuó 30 minutos después de la administración de Δ^9 -THC, o 5 minutos después de la administración de anandamida.

Evaluamos el síndrome de abstinencia mediante la observación del número de saltos. Para ello los animales se introdujeron en unos cilindros de metacrilato de dimensiones 20 cm de diámetro x 35 cm de altura. El número de saltos se contó durante un período de 30 minutos, medidos inmediatamente después de la administración de naloxona.

El peso corporal se determinó 2 minutos antes de la administración de Δ^9 -THC o de anandamida, y 30 y 60 minutos después de la administración de naloxona. Los cambios en el peso corporal se expresaron como porcentajes calculados sobre el peso inicial.

2.1.1.2 Estudio de la actividad locomotora

Realizamos este estudio para discernir si el efecto de la anandamida sobre el síndrome de abstinencia a morfina estaba provocado por un mecanismo relacionado con vías serotoninérgicas o era únicamente debido a un efecto sobre la actividad locomotora.

La actividad locomotora fue medida en un actímetro (Imetrex, Apelab Francia) consistente en una jaula (20 cm x 25 cm) dividida en 4 compartimentos idénticos por 2 haces de luz. Los animales se colocaron en las jaulas y el número de haces de luz rotados (número de cuadrados cruzados) se registró automáticamente. La actividad locomotora se midió durante 30 minutos. Los animales fueron previamente habituados a las condiciones experimentales durante un período de 30 minutos 6 horas antes de la medida de la actividad. Se determinó la actividad locomotora 5 minutos después de la administración de 5 mg/kg de anandamida i.v.

2.1.2 Exposición perinatal a Δ^9 -THC en la rata

Los animales utilizados fueron las crías procedentes de ratas Wistar preñadas que habían recibido una dosis diaria por vía oral de 5 mg/kg de Δ^9 -THC en 0.1 ml de aceite de sésamo desde el quinto día de la gestación hasta el día veinticuatro después del nacimiento de las crías (día del destete). Este tratamiento que hemos utilizado corresponde a una estimación corregida en función de la superficie corporal, peso y ruta de administración, de un consumo crónico moderado de preparados de *Cannabis sativa* en humanos (Nahas G.G., 1984). Durante todo el experimento madres y crías se mantuvieron estabuladas en grupos de 4 a 8 animales/jaula, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con un acceso continuo a comida y agua. Se procesó también un grupo control que recibió durante el mismo período de tiempo un

tratamiento consistente en una dosis diaria de 0.1 ml de aceite de sésamo.

2.1.2.1 Estudio del efecto de la naloxona.

Utilizamos ratas de 24 días de edad (recién destetadas), a las que se les administró una dosis por vía i.p. de 5 mg/kg del antagonista opiáceo naloxona. La existencia del síndrome de abstinencia se evaluó mediante la observación de 4 signos típicos de la abstinencia a opiáceos como son: ptosis palpebral, mascado, piloerección y sacudidas corporales espontáneas. Estos experimentos se realizaron en unos cilindros de metacrilato idénticos a los descritos en el apartado 2.1.1.1. El tiempo de evaluación de los signos característicos del síndrome de abstinencia fue de 30 minutos dividido en tres períodos consecutivos de 10 minutos cada uno.

La ptosis palpebral y la piloerección se contaron dando un punto por la presencia del signo en cada período de 10 minutos, de tal manera que la máxima puntuación posible fue 3 puntos.

El mascado y las sacudidas corporales espontáneas se contabilizaron contando el número total de veces que aparecían a lo largo de los 30 minutos.

2.1.2.2 Medida de umbrales nociceptivos.

Se determinaron los umbrales nociceptivos o tiempo de latencia al test de retirada de la cola (d'Amour y Smith, 1956) en animales de 24, 50 y 70 días de edad expuestos perinatalmente a Δ^9 -THC. Se realizaron tres determinaciones para cada animal, calculándose la media.

El aparato usado fue un analgesímetro L 17106 (Letica, España). Las respuestas antinociceptivas se determinaron

midiendo el tiempo transcurrido hasta que el animal responde al estímulo térmico (foco luminoso). La rata se inmoviliza de manera que el foco luminoso incida sobre el tercio medio de la cola. La intensidad del estímulo térmico se ajustó para obtener una latencia control entre 4 y 6 segundos. Se tomó como tiempo máximo ("cut off time") aquel que puede resistir el animal a dicho estímulo sin que se produzca daño tisular, quedando fijado en 15 segundos.

2.1.2.3 Efecto de la morfina en animales
adultos expuestos perinatalmente a Δ^9 -
THC.

En animales de 75 días de edad se administró una dosis de morfina de 5 mg/kg por vía i.p. y se determinó la latencia al test de retirada de la cola. Los porcentajes de analgesia se calcularon para cada animal en relación con su propio nivel basal determinado 30 minutos antes de la administración de morfina [% de analgesia = (Latencia tratado - Latencia control/15 - Latencia control) x 100]. Cada valor fue la media de tres determinaciones.

2.2 METODOS EXPERIMENTALES IN VITRO

2.2.1 Método de autorradiografía de receptores
opioides μ

Se realizaron cortes de cerebro de ratas de 24 y 70 días de edad expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC según protocolo detallado en el apartado 2.1.2.

Los animales se sacrificaron por decapitación entre las 10 y las 12 a.m. Los cerebros se extrajeron y se congelaron en isopentano (-40°C aproximadamente) durante 1 minuto y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta que fueron cortados.

Se realizaron cortes transversales (20 μ m) en un criostato refrigerado Bright (-15°C) sobre portas previamente gelatinizados. Dichos cortes de cerebro se incubaron a 25°C con una concentración 3nM de [³H]-DAGO (actividad específica=60Ci/mmol) en Tris 50 mM (pH= 7.4) junto con bacitracina 0.2mg/ml, durante 1 hora. Después de la incubación, los cortes fueron sometidos a dos lavados de 5 minutos cada uno, a 4°C en Tris 50mM (pH= 7.4). A continuación los cortes de tejido cerebral se secaron mediante una corriente de aire frío, y se expusieron a una película autorradiográfica (Hyperfilm-³H) en cassettes X-ray standars durante 10 semanas a 4°C. Cuando terminó la exposición, las películas se revelaron durante 120 segundos a 20°C en un revelador Kodak D-19, luego se fijaron durante 5 minutos con un fijador (Kodak, fixer), y por último se pasaron por agua y se secaron. La unión no específica se determinó incubando los cortes con 3 nM de [³H]-DAGO y 1 μ M de DAGO no marcado.

Los autorradiogramas se analizaron con el sistema Biocom 200 (Francia). Este sistema permite la cuantificación de dichos autorradiogramas mediante densitometría computerizada. Las medidas de densidad óptica obtenidas (niveles de negro) se transformaron en concentraciones (nCi/mg tejido) usando una escala patrón de tritio (Amersham) que comprende desde 1.30 hasta 21.20 nCi/mg de téjido equivalente.

2.3 ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los valores se expresan mediante un parámetro de centralización, la media aritmética, y otro de dispersión, el error estándar de la media aritmética (E.S.M). En todos los experimentos se indica el número de casos (n) por grupo experimental.

Las diferencias entre los valores de los distintos grupos

experimentales se analizaron utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía cuando existía una sola variable, o de dos vías cuando existían dos variables.

Si el correspondiente ANOVA indicaba que existían grupos significativamente distintos ($p < 0.05$), posteriormente se analizaban las diferencias aplicando el test de "Newman-Keuls", o el test de "Student-t" cuando sólo se comparaban dos grupos experimentales. Se consideran grupos significativamente distintos, desde el punto de vista estadístico, cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

1.- EFECTO DE LOS CANNABINOIDES SOBRE EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A OPIÁCEOS EN EL RATON

1.1.- EFECTO DEL Δ^9 -THC Y LA ANANDAMIDA

Con el protocolo de implantación s.c. de un pellet de morfina (protocolo a), se observó que la anandamida a la dosis de 5 mg/kg i.v., producía una disminución del síndrome de abstinencia a morfina precipitado por naloxona (1 mg/kg i.p.). Los signos examinados fueron el número de saltos y la pérdida de peso medida 30 y 60 minutos tras la administración de naloxona.

Como se ilustra en la Figura 1A, la AnNH (5 mg/kg; i.v.; 5 min antes de la administración de naloxona), indujo una disminución significativa del número de saltos (1.9 ± 0.8 vs 42 ± 9.6 ; ANOVA I: $F_{3,40} = 6.84$, $p < 0.01$; NKT, $p < 0.01$). La misma dosis de anandamida previno la pérdida de peso medida 30 minutos después de la administración de naloxona y expresada en % sobre el peso medido justo después de la administración de naloxona (3.7 ± 0.4 vs 5.3 ± 0.4 ; ANOVA I: $F_{3,41} = 6.01$, $p < 0.01$; NKT, $p < 0.05$, Tabla 3) y 60 minutos después de la administración de naloxona (4.1 ± 0.5 vs 6.0 ± 0.5 ; ANOVA I: $F_{3,39} = 4.14$, $p < 0.05$; NKT, $p < 0.05$, Tabla 3).

A la dosis de 1 mg/kg, la AnNH no presentó un efecto significativo sobre el número de saltos (58 ± 20.7 vs 42 ± 9.6 ; NS). Tampoco previno la pérdida de peso a los 30 minutos de la administración de naloxona (4.2 ± 0.4 vs 5.3 ± 0.4 ; NS). En cambio, esta dosis sí que resultó efectiva para prevenir la pérdida de peso a los 60 minutos tras la administración de naloxona (4.3 ± 0.5 vs 6.0 ± 0.5 ; ANOVA I: $F_{3,39} = 4.14$, $p < 0.05$; NKT, $p < 0.05$, Tabla 3).

El efecto de la anandamida a las dosis de 5 y 1 mg/kg fue también examinado en ratones implantados con un pellet de placebo, encontrándose que la anandamida no producía ningún efecto ni sobre el número de saltos, ni tampoco sobre la pérdida de peso (datos no mostrados).

El ANOVA I también refleja un efecto significativo para el tratamiento con Δ^9 -THC a la dosis de 10 mg/kg i.v. sobre el número de saltos (27.1 \pm 8.3 vs 12.4 \pm 5.3; ANOVA I: $F_{3,31}$ = 7.36, $p < 0.01$; NKT, $p < 0.05$, Fig.1A), así como sobre la pérdida de peso a los 60 minutos (2.9 \pm 0.4 vs 5.9 \pm 0.8; ANOVA I: $F_{3,33}$ = 11.29, $p < 0.01$; NKT, $p < 0.01$, Tabla 3) y a los 90 minutos (3.1 \pm 0.3 vs 8.3 \pm 1.7; ANOVA I: $F_{3,32}$ = 7.86, $p < 0.01$; NKT, $p < 0.01$, Tabla 3) tras la administración de naloxona.

La Figura 1B y la Tabla 3 ilustran el efecto de la anandamida (0.1, 1 y 5 mg/kg i.v.) en el síndrome de abstinencia opiáceo (saltos y pérdida de peso) en ratones tratados crónicamente con sulfato de morfina s.c. durante 5 días (protocolo b). Así, la AnNH a la dosis de 5 mg/kg redujo significativamente el número de saltos (0.5 \pm 0.3 vs 31.9 \pm 8.8; ANOVA I: $F_{4,53}$ = 3.93, $p < 0.01$; NKT, $p < 0.05$). También esta dosis, previno la pérdida de peso a los 30 minutos (2.4 \pm 0.4 vs 4.4 \pm 0.2; ANOVA I: $F_{4,46}$ = 4.68, $p < 0.01$; NKT, $p < 0.05$) y 60 minutos (3.4 \pm 0.3 vs 5.0 \pm 0.4; ANOVA I: $F_{4,51}$ = 4.85, $p < 0.01$) tras la administración de naloxona. Bajo estas condiciones experimentales, 1mg/kg de AnNH provocó una reducción no significativa en el número de saltos (6.0 \pm 1.7 vs 31.9 \pm 8.8; NS). Esta misma dosis previno la pérdida de peso a los 30 minutos (2.6 \pm 0.4 vs 4.4 \pm 0.2; ANOVA I: $F_{4,46}$ =4.68, $p < 0.01$; NKT, $p < 0.05$) y a los 60 minutos (3.2 \pm 0.5 vs 5.0 \pm 0.4; ANOVA I: $F_{4,51}$ = 4.85, $p < 0.01$; NKT, $p < 0.05$) tras la administración de naloxona.

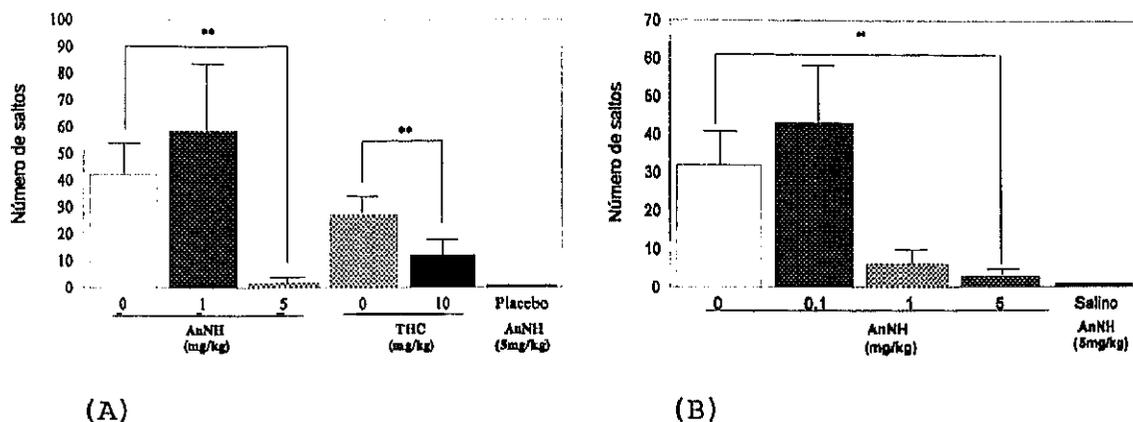


Fig. 1. Efecto de la anandamida o THC en el síndrome de abstinencia a morfina precipitado por naloxona en ratones crónicamente implantados con pellets de morfina (A) o tratamiento s.c con morfina(B). La anandamida a la dosis de 5 mg/kg i.v. disminuye significativamente el número de saltos ($p < 0.01$) comparado con los animales controles. La anandamida administrada a animales implantados con pellets de placebo o inyectados con suero salino, no produce efectos sobre el número de saltos. El THC a la dosis de 10 mg/kg i.v. también previene el efecto de la naloxona en animales implantados con pellets de morfina ($p < 0.01$).

	Morfina + Vehículo	Morfina + AnNH 0.1	Morfina + AnNH (1)	Morfina + AnNH (5)	Placebo + Vehículo	Morfina + Vehículo	Morfina + THC
Morfina pellets 30 minutos	5.3 ± 0.4	---	4.2 ± 0.4	3.7 ± 0.4 (*)	2.6 ± 0.5 (*)	5.9 ± 0.8 ^a	2.9 ± 0.4 ^a (**)
Morfina pellets 60 minutos	6.0 ± 0.5	---	4.3 ± 0.5 (*)	4.1 ± 0.5 (*)	3.7 ± 0.4 (*)	8.3 ± 1.7 ^b	3.1 ± 0.3 ^b (**)
Morfina S.C. 30 minutos	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.9	2.6 ± 0.4 (*)	2.4 ± 0.4 (*)	2.0 ± 0.4 (*)	---	---
Morfina S.C. 60 minutos	5.0 ± 0.4	4.4 ± 0.3	3.2 ± 0.5 (*)	3.4 ± 0.3 (*)	2.9 ± 0.3 (*)	---	---

Tabla 3. Efecto de la AnNH y del THC sobre la variación de peso corporal en el síndrome de abstinencia a morfina precipitado por naloxona en ratones. Los resultados son medias ± E.S.M. de 8-15 animales. La pérdida de peso corporal se determinó 30 y 60 minutos tras la administración de naloxona

y se expresa como variación en el porcentaje sobre el peso corporal medido justo después de la administración de naloxona. En el caso del grupo del THC (Columnas 6 y 7), la pérdida de peso corporal fue determinada 60 minutos (a) y 90 minutos (b) tras la administración de naloxona. AnNH, anandamida; THC, Δ^9 -tetrahidrocannabinol. Los valores entre paréntesis corresponden a la dosis de anandamida en mg/kg. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, test de Newman-Keuls, comparando con el grupo morfina+vehículo.

1.2.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

En cuanto al estudio de la actividad locomotora, la AnNH a la dosis de 5mg/kg i.v induce una ligera hipolocomoción, que no es estadísticamente significativa (tratados: 103.9 ± 22.2 frente a controles 146.4 ± 19.8 cuadrados cruzados, siendo $N = 9-12$ animales/grupo).

2.- MODIFICACIONES DE IMPLICACIÓN OPIOIDE EN RATAS PERINATALMENTE EXPUESTAS A Δ^9 -THC

2.1.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA NALOXONA EN RATAS DE 24 DÍAS

Se administró una dosis de naloxona de 5 mg/kg i.p. a animales de 24 días, expuestos perinatalmente a Δ^9 -THC, y se midieron 4 signos indicativos de síndrome de abstinencia, como son la ptosis palpebral, el mascado, la piloerección y las sacudidas corporales.

En el caso de la ptosis palpebral, se observa un efecto significativo para el tratamiento (ANOVA II: $F_{1,59} = 3.76$, $p < 0.05$) y para el sexo (ANOVA II: $F_{1,59} = 4.75$, $p < 0.05$) sin interacción entre tratamiento y sexo (ANOVA II: $F_{1,59} = 1.47$, NS). El test de la t de Student revela un efecto significativo del tratamiento en machos ($t = 2.303$, $p < 0.05$) pero no en hembras ($t = 0.417$, NS).

Para los otros tres signos examinados (mascado, piloerección y sacudidas corporales espontáneas), el ANOVA II reveló solamente

un efecto significativo para el tratamiento ($F_{1,59} = 6.97$, $p < 0.05$; $F_{1,59} = 9.83$, $p < 0.01$; $F_{1,59} = 6.97$, $p < 0.01$ para mascado, piloerección y sacudidas respectivamente). Los machos que recibieron un tratamiento perinatal con Δ^9 -THC mostraban significativamente signos de abstinencia (test de la t de Student: $t = 2.39$, $p < 0.05$; $t = 3.70$, $p < 0.01$, $t = 2.45$, $p < 0.05$ para mascado, piloerección y sacudidas respectivamente).

En las hembras no se encontraron diferencias significativas entre las que habían recibido un tratamiento perinatal con Δ^9 -THC y las controles.

Todos estos resultados se resumen en la Tabla 4 y en la Figura 2.

TABLA 4

Tabla de los resultados del estudio del efecto de la naloxona en ratas de 24 días.

	MACHOS THC	MACHOS ACEITE	HEMBRAS THC	HEMBRAS ACEITE
PTOSIS	2.6 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.3
MASCADO	10.6 ± 2.8	3.0 ± 1.2	5.7 ± 1.5	3.9 ± 1.1
PILOERECCION	1.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.2
SACUDIDAS	2.2 ± 0.6	0.6 ± 0.5	1.1 ± 0.4	0.6 ± 0.4

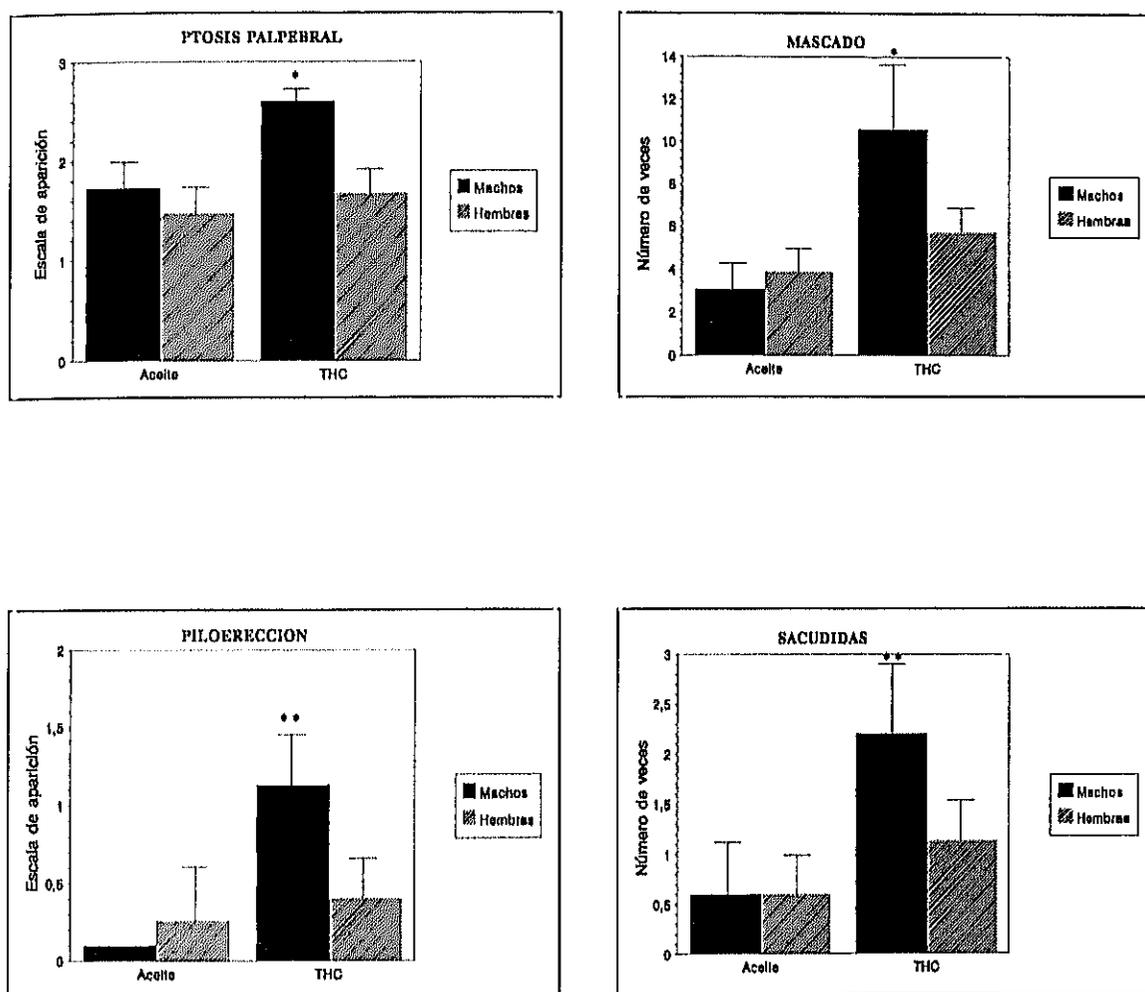


Fig.2. La naloxona produce un síndrome de abstinencia en crías de ratas tratadas crónicamente con THC. Las ratas preñadas recibieron una dosis diaria de 5 mg/kg de Δ^9 -THC desde el día 5° de gestación hasta el día 24 después del nacimiento de las crías. A las crías de 24 días, se les administró una dosis de 5 mg/kg de naloxona i.p., y los signos típicos de abstinencia fueron evaluados usando una escala de aparición (3,máximo-0,mínimo), o contando el número de veces que el signo aparece. Los valores expresados en la gráfica corresponden a la media \pm E.S.M para cada grupo de ratas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; test de la t de Student. N= 15 animales por grupo.

2.2.- MEDIDA DE UMBRALES NOCICEPTIVOS EN RATAS DE 24, 50 Y 70 DÍAS DE EDAD

La sensibilidad basal a un estímulo térmico se examinó usando el test de retirada de la cola, en machos y hembras de 24, 50 y 70 días de edad expuestos perinatalmente a Δ^9 -THC (Tabla 5 y Figura 3).

El ANOVA II revela solamente efecto significativo entre tratamiento y sexo en ratas de 24 ($F_{1,42} = 4.91$, $p < 0.05$) y 50 ($F_{1,35} = 12.43$, $p < 0.01$) días. En el día 70 de edad, ni el sexo, ni el tratamiento, ni la interacción entre ambos fue estadísticamente significativa.

El test de la t de Student aplicado por separado a machos y hembras mostró diferencias significativas en machos de 24 días ($t = 2.397$, $p < 0.05$) y de 50 días ($t = 2.898$, $p < 0.01$), encontrándose que los que habían recibido un tratamiento perinatal con Δ^9 -THC mostraban menor sensibilidad al dolor en comparación con los controles.

TABLA 5

Tabla de los resultados de la medida de umbrales nociceptivos en ratas de 24, 50 y 70 días de edad.

	MACHOS THC	MACHOS ACEITE	HEMBRAS THC	HEMBRAS ACEITE
DIA 24	4.5 ± 0.2	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.3	4.2 ± 0.2
DIA 50	4.4 ± 0.4	3.2 ± 0.2	3.1 ± 0.3	4.6 ± 0.8
DIA 70	2.3 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1

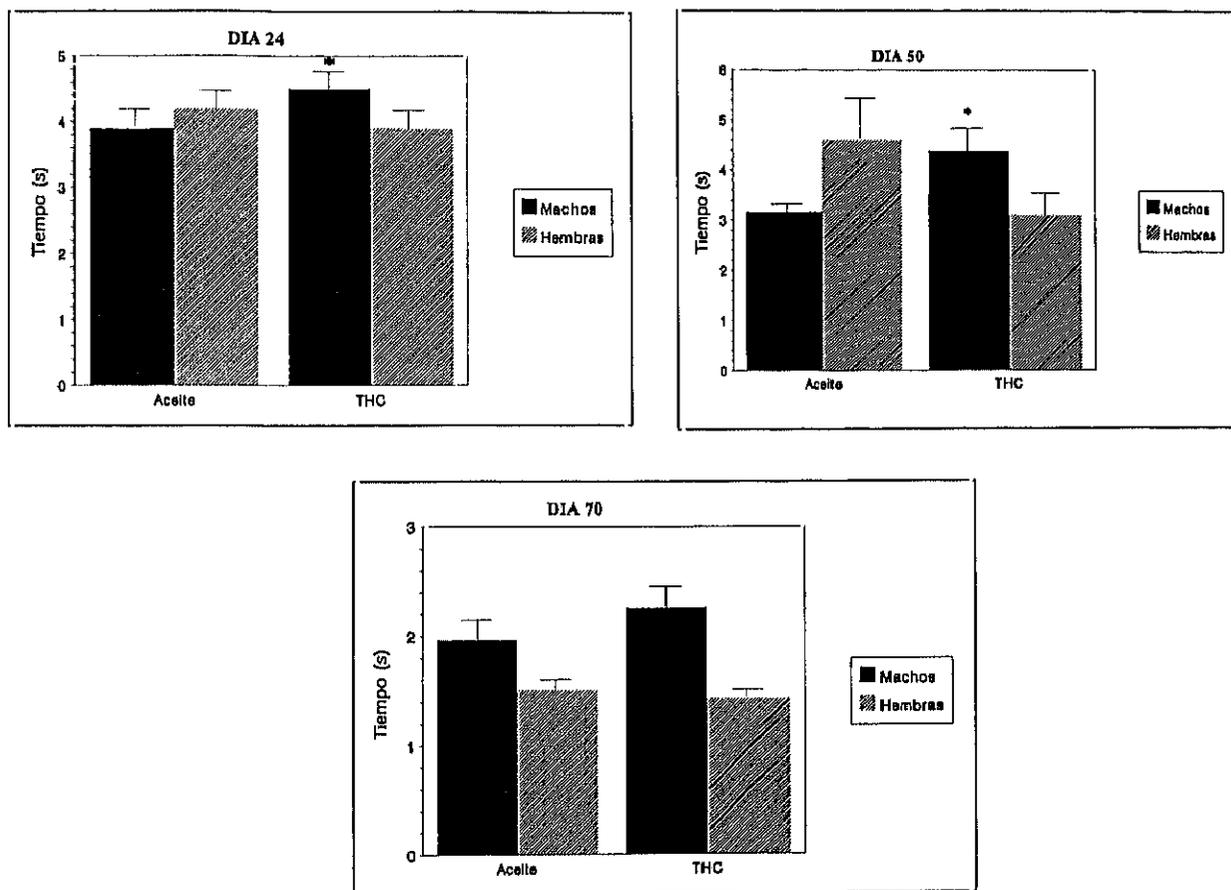


Fig.3. Efecto del tratamiento perinatal con Δ^9 -THC en los umbrales nociceptivos de crías de 24, 50 y 70 días de edad. La sensibilidad al estímulo térmico fue evaluada usando el test de retirada de la cola. La latencia en el test de retirada de la cola se determinó en los mismos animales, a las edades de 24, 50 ó 70 días. Los valores expresados en la gráfica corresponden a la media \pm E.S.M. para cada grupo de ratas. * $p < 0.05$; test de la t de Student.

2.3.- EFECTO DE LA MORFINA EN LA SENSIBILIDAD AL DOLOR DE ANIMALES ADULTOS

En ratas adultas (75 días) expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC, se estudió el efecto de la morfina (5 mg/kg i.p.) sobre la sensibilidad al dolor (test de retirada de la cola), calculándose

los porcentajes de analgesia (Tabla 5 y Figura 4).

TABLA 5

Tabla de los resultados del estudio del efecto de la morfina sobre la sensibilidad al dolor de animales adultos.

	MACHOS THC	MACHOS ACEITE	HEMBRAS THC	HEMBRAS ACEITE
% DE ANALGESIA	35.5 ± 10.5	71.7 ± 10.2	21.1 ± 6.6	11.6 ± 4.7

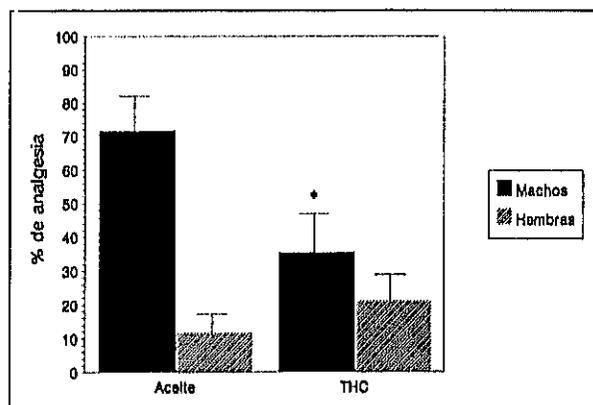


Fig.4. Efecto de la morfina en la sensibilidad al dolor de crías nacidas de ratas tratadas crónicamente con Δ^9 -THC. En el día 75 de vida postnatal, estas crías recibieron una dosis de 5 mg/kg de morfina i.p. La sensibilidad al estímulo térmico fue evaluada midiendo las latencias al test de retirada de la cola 30 minutos después de la administración del fármaco. El porcentaje de analgesia fue calculado para cada animal en relación a su latencia basal determinada 30 minutos antes de la administración del fármaco [% de analgesia = (Latencia tratado - Latencia control/15 - Latencia control) x 100]. Los valores expresados en la gráfica corresponden a la media ± E.S.M. para cada grupo de ratas. *P<0.05; **P<0.01; test de la t de Student.

El ANOVA II, reveló un efecto significativo para el sexo ($F_{1,36}=18.01$, $p<0.01$) y para la interacción entre sexo y tratamiento ($F_{1,36}=6.52$, $p<0.01$), pero no para el tratamiento ($F_{1,36}=2.09$, NS).

La morfina (5 mg/kg i.p) produce un aumento de la sensibilidad al dolor en machos expuestos perinatalmente a Δ^9 -THC respecto a sus correspondientes controles. Dicho efecto no se observó en el caso de las hembras (test de la t de Student: machos $t= 2.249$, $p<0.05$; hembras $t= 1.08$, NS).

2.4.- AUTORADIOGRAFÍA DE RECEPTORES OPIOIDES μ

Los estudios de densidad de receptores opioides μ en diferentes regiones cerebrales en animales de 24 y 70 días de edad expuestos perinatalmente a Δ^9 -THC, muestran que el tratamiento perinatal con Δ^9 -THC, produce cambios en la densidad de receptores opioides μ en la mayoría de las estructuras cerebrales estudiadas y además estos cambios son diferentes en machos que en hembras.

Las regiones cerebrales examinadas se presentan en la Figura 5.

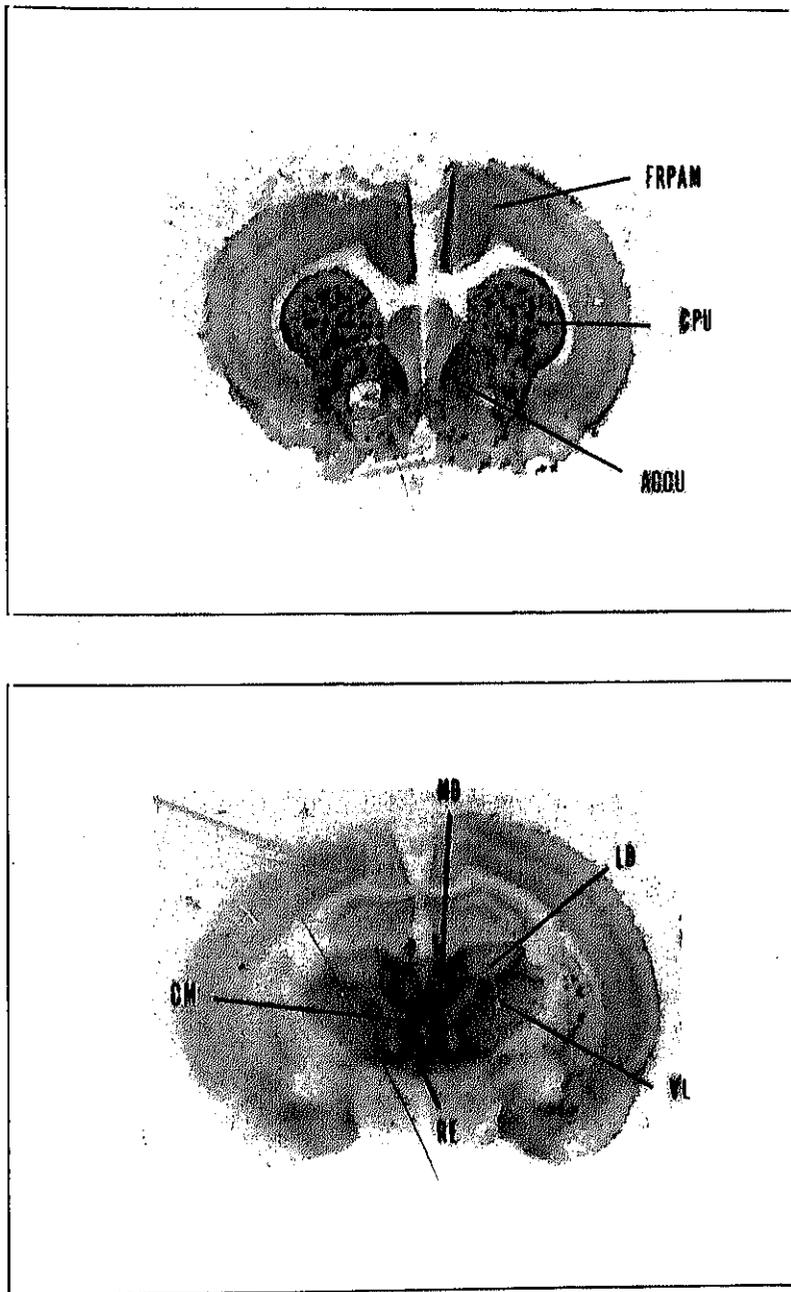
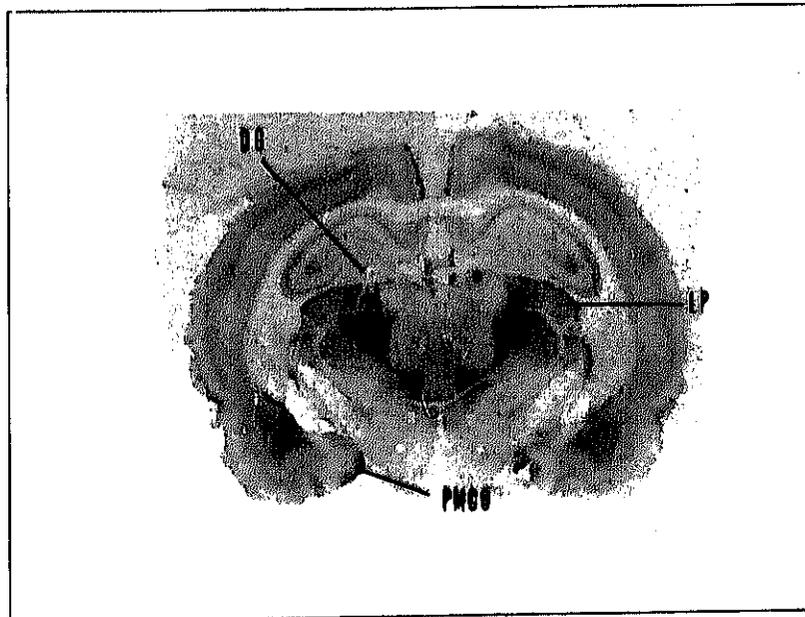
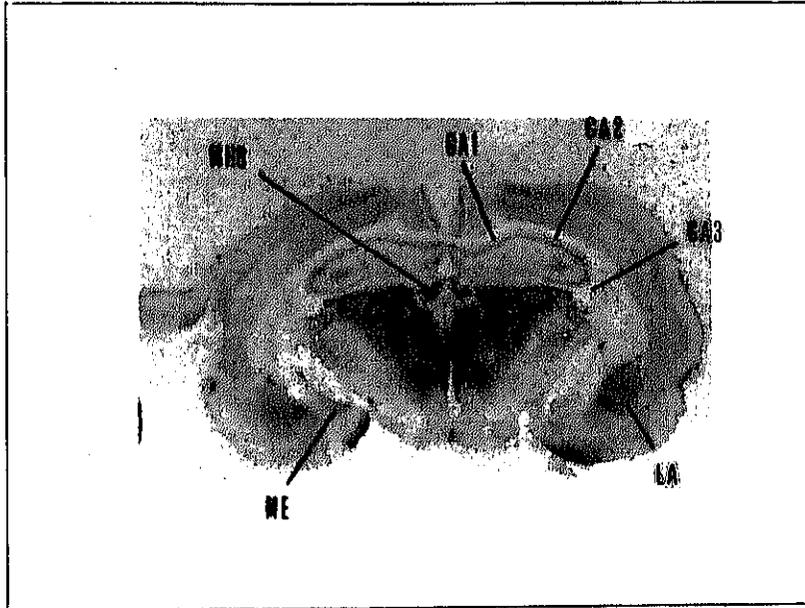
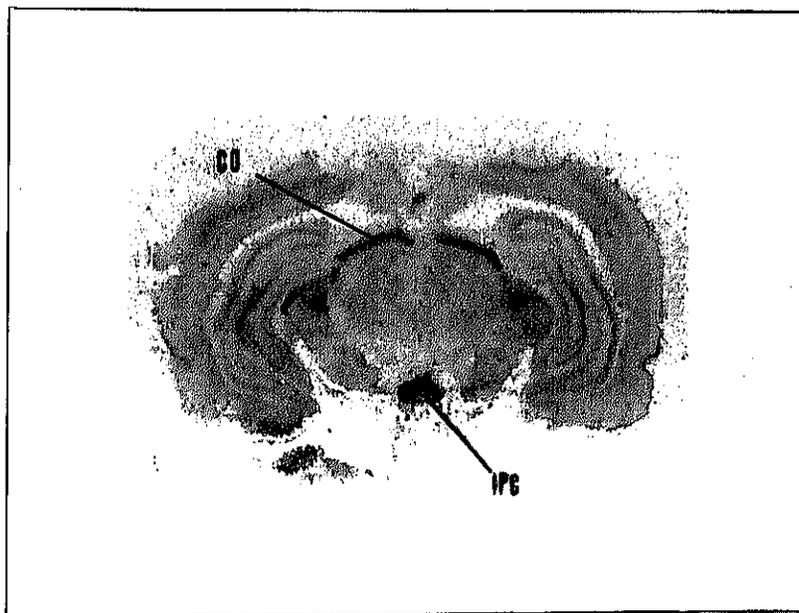
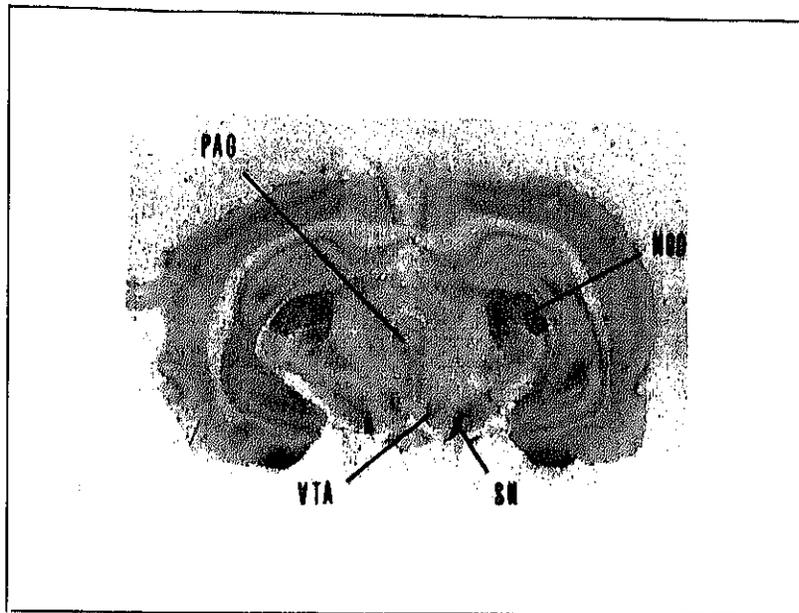


Fig.5 Localización autorradiográfica de la fijación de [³H]-Dago a distintas regiones de cerebro de rata.

CPU: Caudado-putamen, ACCU: Núcleo accumbens, FRPAM: Corteza prefrontal, DG: Giro dentado (Hipocampo), CA1: Capa molecular del hipocampo, CA2: Capa molecular del hipocampo, CA3: Capa molecular del hipocampo, CM: Núcleo centro-medial (Tálamo), RE: Núcleo Reuniens (Tálamo), MD: Núcleo medio-dorsal

(Tálamo), LD: Núcleo latero-dorsal (Tálamo), VL: Núcleo ventro-lateral (Tálamo), MHB: Habénula, LP: Núcleo latero-posterior (Tálamo), LA: Núcleo lateral (Amígdala), ME: Núcleo medial (Amígdala), PMCO: Núcleo posteromedial-cortical (Amígdala), CO: Colículos superiores, SN: Sustancia negra, VTA: Área ventral-tegmental, PAG: Sustancia gris periacueductal, IPC: Núcleo interpeduncular, MGD: Núcleo geniculado medio-dorsal.



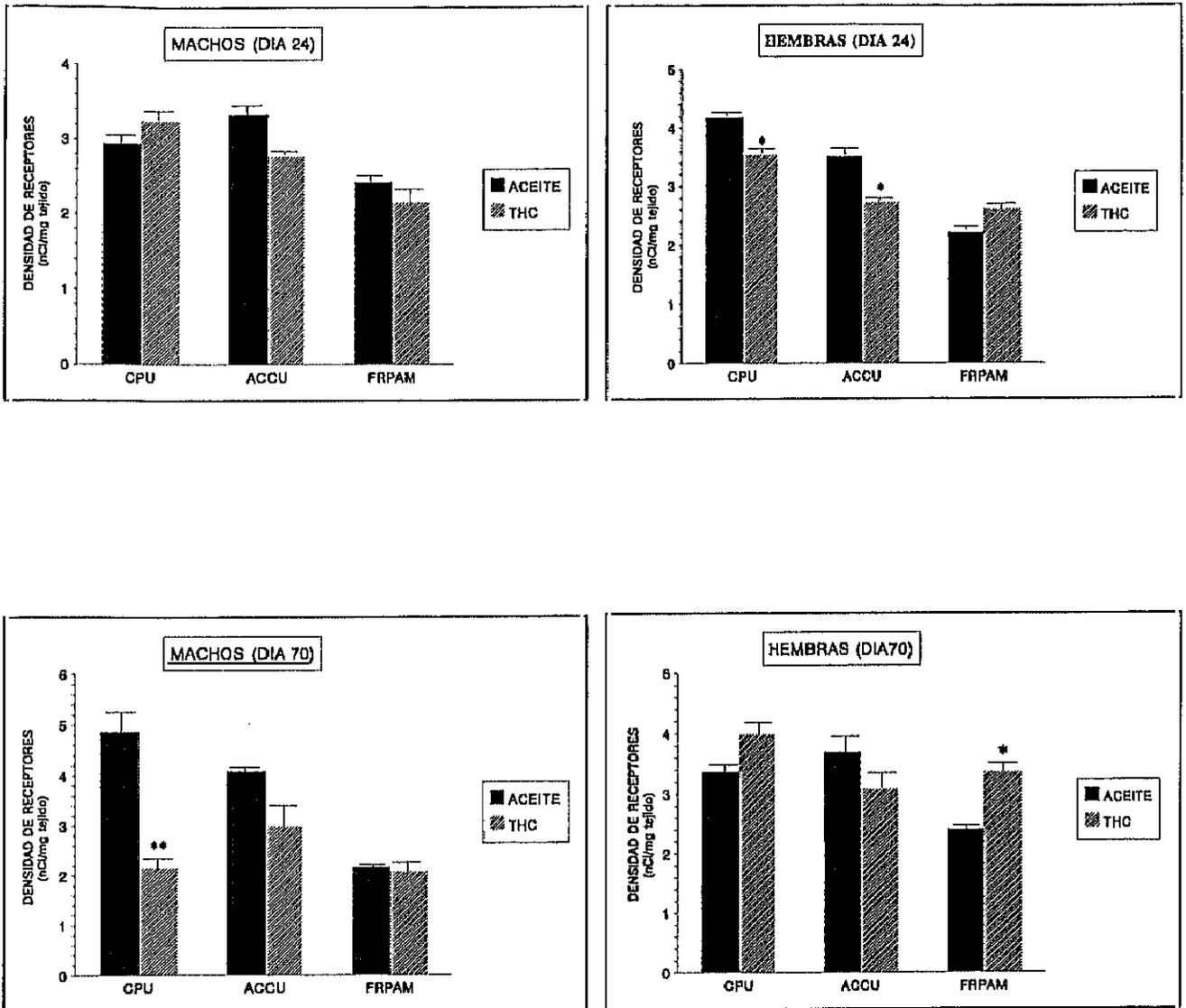


En la Tabla 6 y en la Figura 6, aparece reflejado que los machos de 24 días de edad expuestos a Δ^9 -THC, presentaron un aumento en la densidad de receptores opiáceos μ en el área CA1 del hipocampo, en el núcleo lateral de la amígdala, en el área ventral-tegmental, en la sustancia gris periacueductal y en el núcleo geniculado medio-dorsal. Las hembras de esta misma edad expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC, mostraron una disminución en el número de receptores en el caudado-putamen, en el núcleo accumbens y en diferentes núcleos talámicos (centro-medial, medio-dorsal, latero-dorsal, ventro-lateral, núcleo reuniens), así como en los núcleos medial y posteromedial-cortical de la amígdala y en el núcleo interpeduncular.

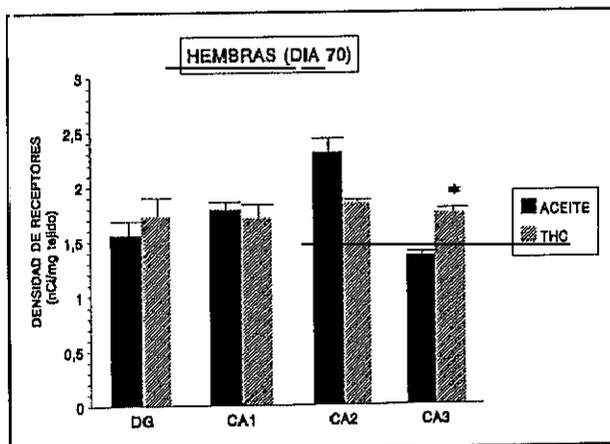
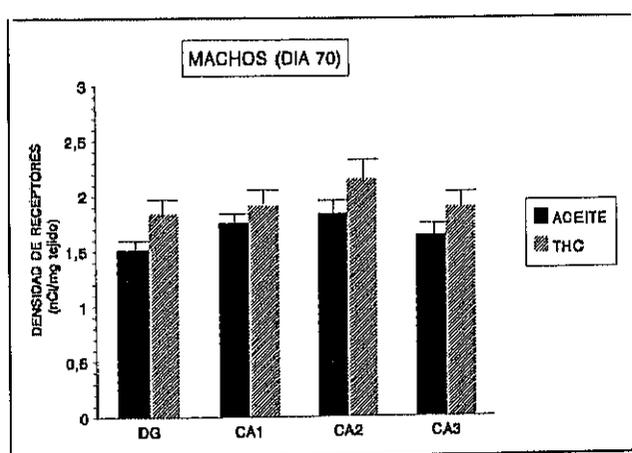
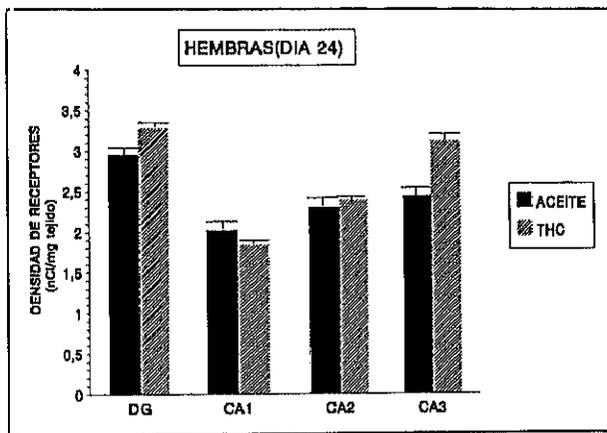
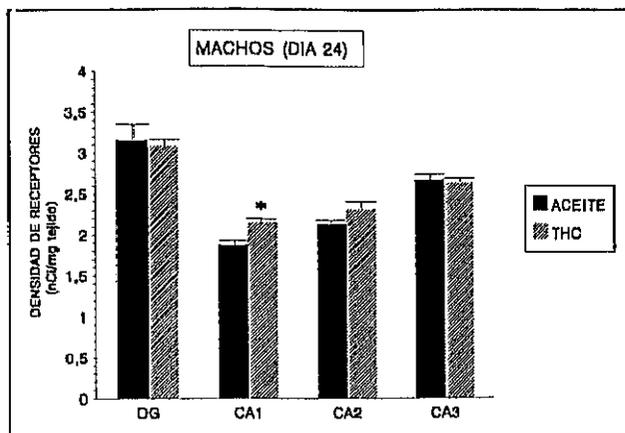
En los animales de 70 días expuestos perinatalmente a Δ^9 -THC (Tabla 7, Fig. 6), los machos mostraron una disminución en la densidad de receptores opioides μ en el caudado-putamen, en el núcleo posteromedial-cortical de la amígdala y en el núcleo interpeduncular. En cambio, se detectó un aumento en la densidad de receptores μ en los núcleos talámicos centro-medial, medio-dorsal y latero-dorsal. En las hembras, este tratamiento produjo un incremento de receptores opiáceos μ en el cortex prefrontal, en el área CA3 del hipocampo, en el núcleo posteromedial-cortical de la amígdala, en la sustancia negra, en el área ventral-tegmental, en la sustancia gris-periacueductal, en el núcleo interpeduncular y en el núcleo geniculado medio-dorsal. En la habénula se detectó una disminución en la densidad de receptores μ .

En las tablas 8 y 9, el análisis de varianza de doble vía (ANOVA II), muestra que el tratamiento con Δ^9 -THC tiene un efecto diferente en machos que en hembras en la mayoría de las regiones estudiadas.

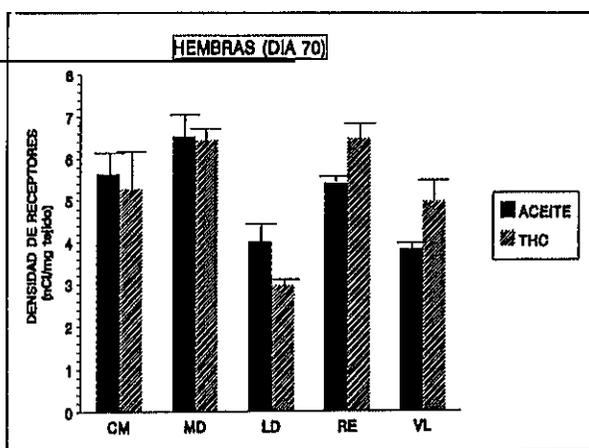
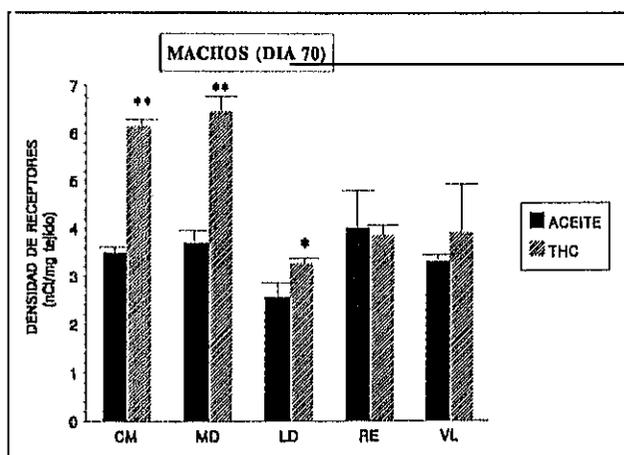
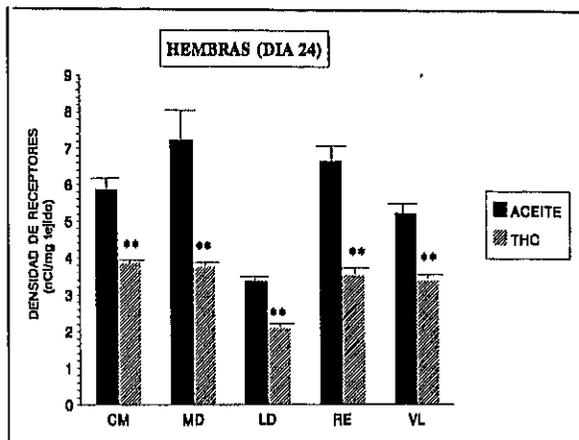
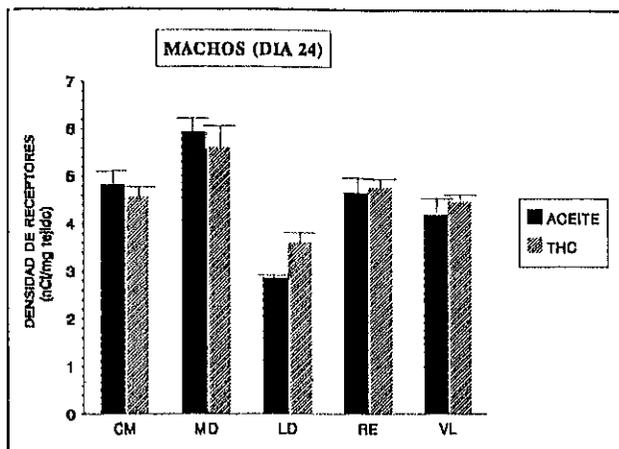
Fig.6. Efecto del tratamiento perinatal con Δ^9 -Tetrahydrocannabinol en la densidad de receptores opiáceos μ en ratas.



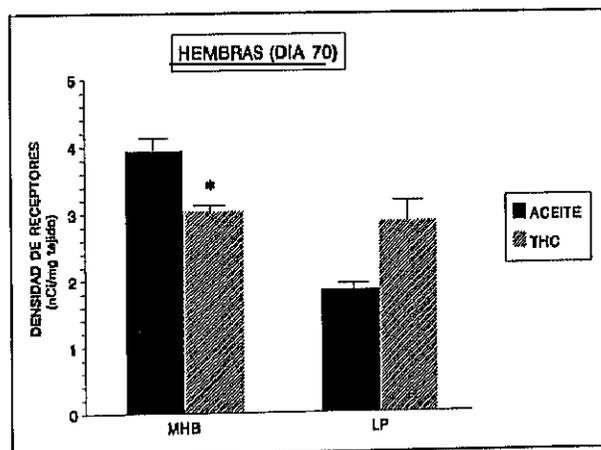
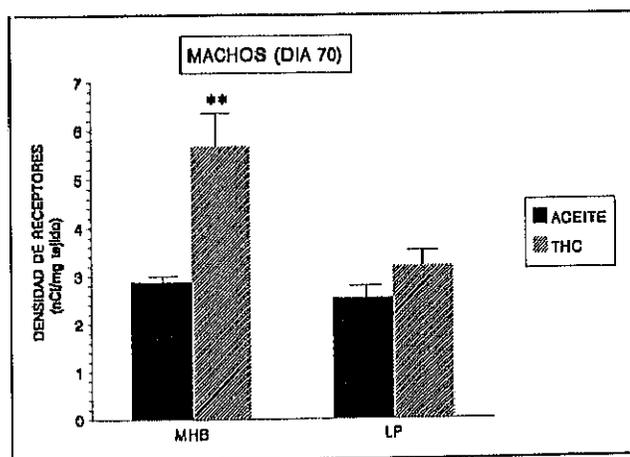
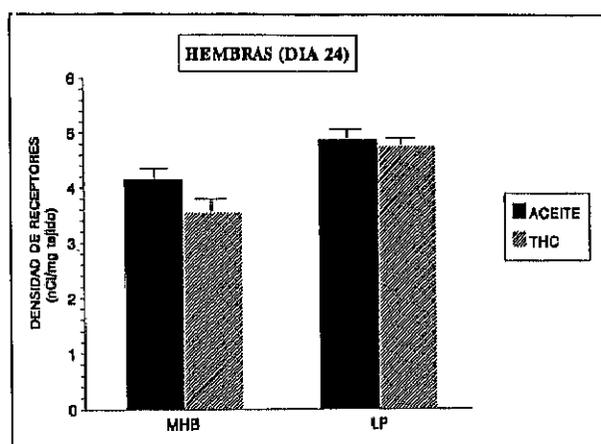
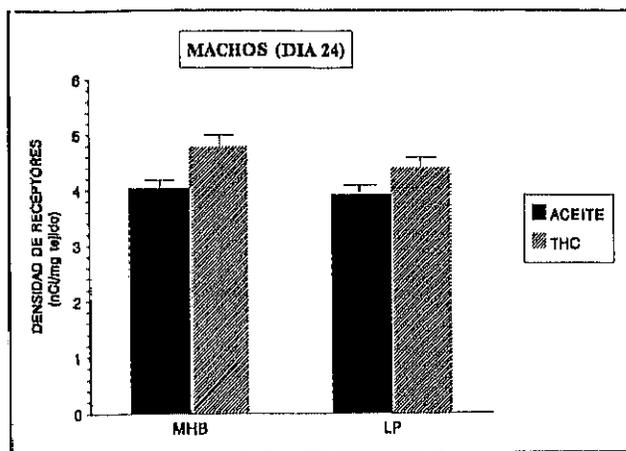
CPU = Caudado Putamen, ACCU = Núcleo Accumbens, FRPAM = Cortex Prefrontal.



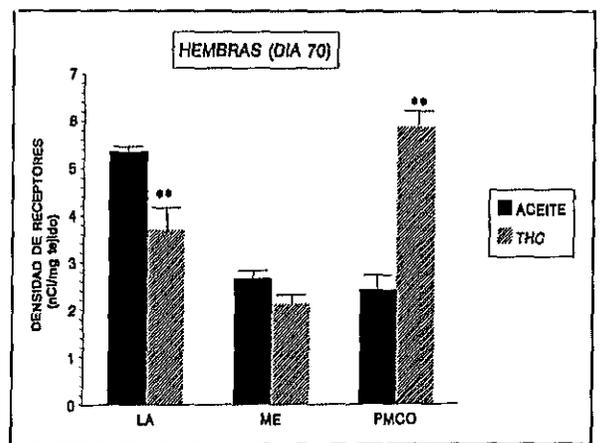
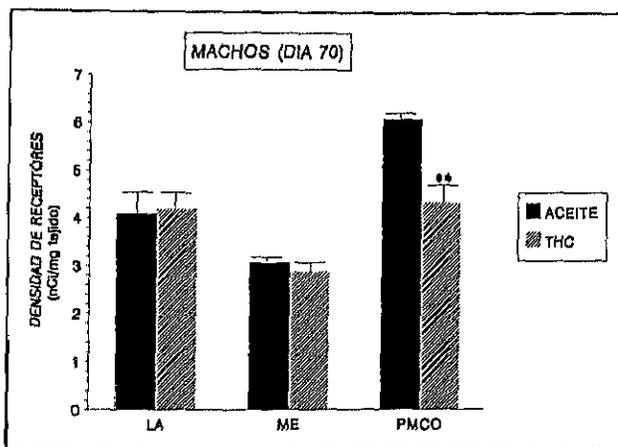
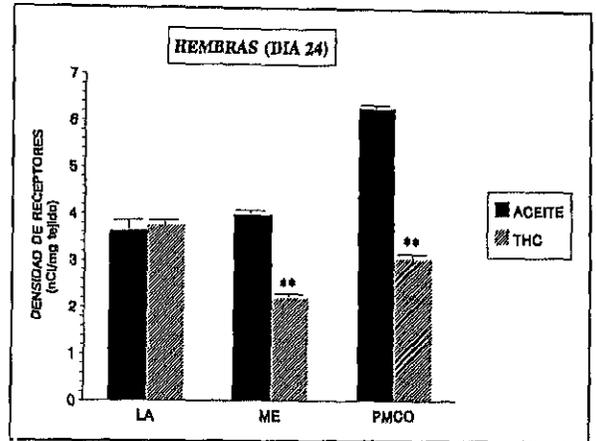
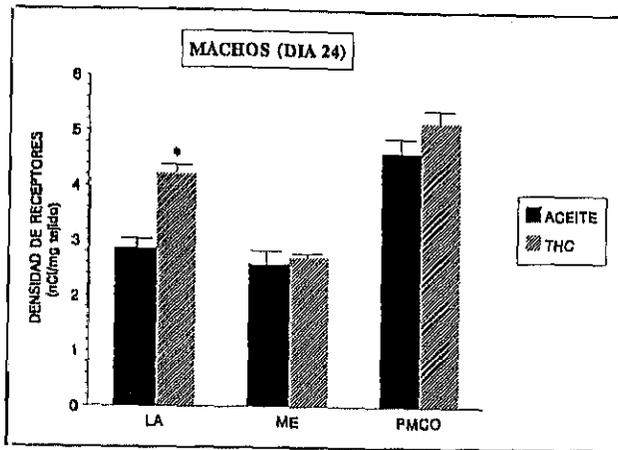
HIPOCAMPO: DG = Giro Dentado, CA1 = Capa Molecular CA1, CA2 = Capa Molecular CA2, CA3 = Capa Molecular CA3.



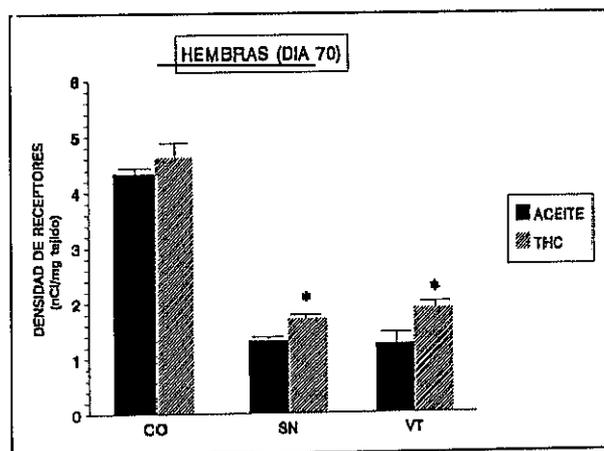
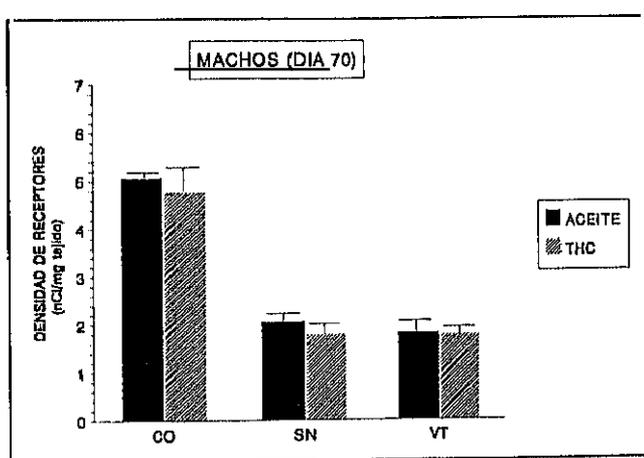
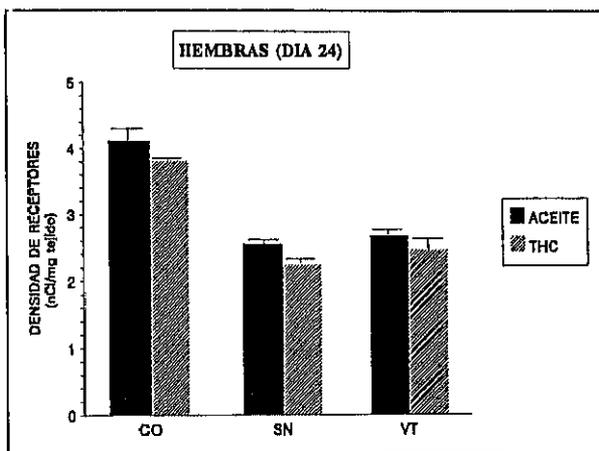
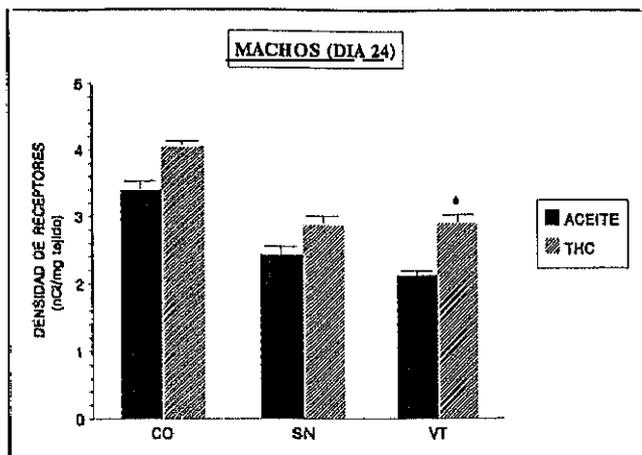
TÁLAMO: CM = Núcleo Centro-Medial, RE = Núcleo Reuniens,
 MD = Núcleo Medio-Dorsal, LD = Núcleo Latero-Dorsal, VL = Núcleo
 Ventro-Lateral.



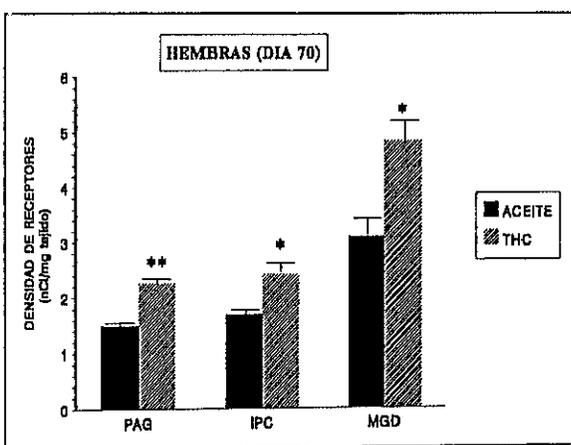
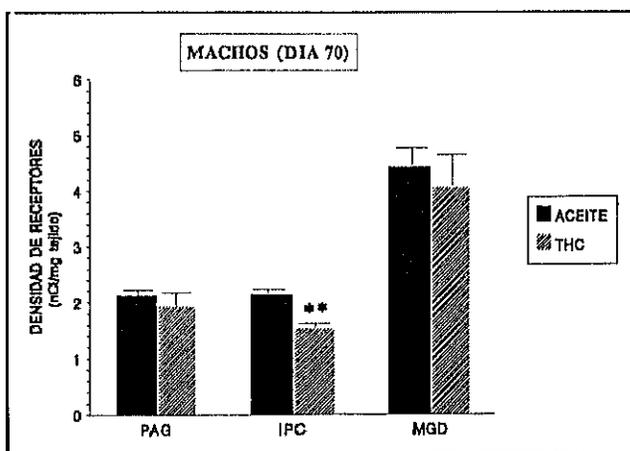
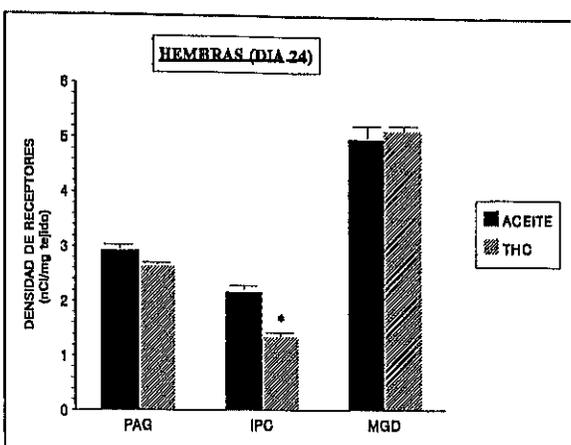
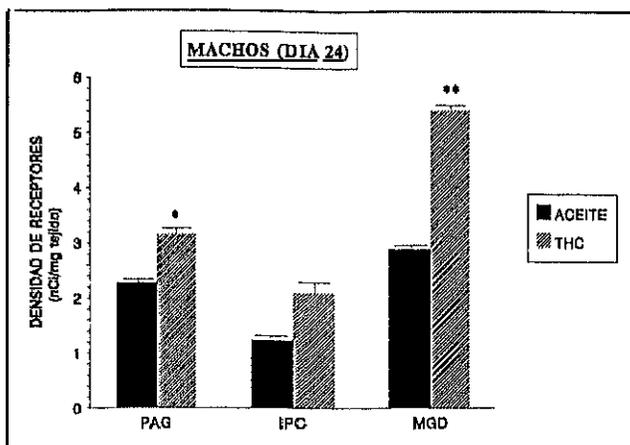
MHB = Habénula, LP = Núcleo Latero-posterior talámico



AMÍGDALA: LA = Núcleo Lateral, ME = Núcleo Medial, PMCO = Núcleo Posteromedial-Cortical.



CO = Colículos, SN = Sustancia Negra, VT = Área Ventral-Tegmental



PAG = Sustancia Gris Periacueductal, IPC = Núcleo Interpeduncular
 MGD = Núcleo Genuculado medio-dorsal.

DIA 24	MACHOS				HEMBRAS			
	ESTRUCTURA	ACEITE	THC	t STUDENT	p	ACEITE	THC	t STUDENT
CPU	2.94±0.35	3.2±0.30	0.564	NS	4.18±0.10	3.54±0.24	2.669	<0.05
ACCU	3.33±0.35	2.77±0.11	1.534	NS	3.51±0.30	2.72±0.09	2.626	<0.05
FRPAM	2.42±0.23	2.15±0.41	1.089	NS	2.22±0.14	2.61±0.13	2.211	NS
DG	3.16±0.43	3.08±0.20	0.395	NS	2.95±0.20	3.28±0.12	1.442	NS
CA1	1.87±0.08	2.14±0.12	2.859	<0.05	2.02±0.20	1.84±0.11	0.963	NS
CA2	2.13±0.14	2.31±0.19	0.777	NS	2.30±0.21	2.39±0.16	0.337	NS
CA3	2.67±0.20	2.63±0.16	0.226	NS	2.44±0.29	3.12±0.17	1.987	NS
CM	4.82±0.26	4.55±0.37	0.728	NS	5.88±0.35	3.86±0.16	5.255	<0.01
RE	4.66±0.38	4.76±0.26	0.211	NS	6.68±0.61	3.54±0.24	4.782	<0.01
MD	5.93±0.31	5.60±0.64	0.474	NS	7.25±0.87	3.76±0.15	3.974	<0.01
LD	2.86±0.16	3.60±0.29	2.257	NS	3.38±0.15	2.10±0.09	13.44	<0.01
VL	4.21±0.30	4.47±0.19	1.358	NS	5.25±0.30	3.40±0.12	6.292	<0.01
MHB	4.03±0.24	4.77±0.31	1.873	NS	4.16±0.41	3.54±0.48	1.281	NS
LP	3.91±0.27	4.39±0.31	1.17	NS	4.89±0.26	4.76±0.14	0.506	NS
LA	2.86±0.32	4.21±0.21	3.518	<0.05	3.64±0.32	3.75±0.25	0.284	NS
ME	2.58±0.38	2.70±0.11	0.842	NS	3.99±0.13	2.19±0.17	13.439	<0.01
PMCO	4.62±0.41	5.18±0.35	1.028	NS	6.29±0.10	3.05±0.26	11.487	<0.01
CO	3.39±0.33	4.04±0.12	1.833	NS	4.12±0.44	3.81±0.16	1.785	NS
SN	2.43±0.20	2.87±0.32	1.167	NS	2.55±0.19	2.24±0.19	1.19	NS
VTA	2.13±0.10	2.90±0.20	3.436	<0.05	2.68±0.21	2.46±0.36	0.516	NS
PAG	2.28±0.16	3.16±0.26	2.824	<0.05	2.93±0.16	2.63±0.12	1.501	NS
IPC	1.24±0.10	2.10±0.39	0.914	NS	2.18±0.23	1.35±0.2	3.621	<0.05
MGD	2.89±0.15	5.41±0.17	14.04	<0.01	5.00±0.42	5.14±0.11	0.997	NS

Tabla 6. Efecto de la exposición perinatal a Δ^9 -THC en la densidad de receptores opioides μ en ratas de 24 días de edad. Para cada región, cada valor corresponde a la media \pm E.S.M. de 4 animales. Para cada animal, la densidad se calculó a partir de 4-8 medidas del mismo cerebro.

DIA 70	MACHOS				HEMBRAS			
	ESTRUCTURA	ACEITE	THC	t STUDENT	p	ACEITE	THC	t STUDENT
CPU	4.86±0.53	2.14±0.24	4.67	<0.01	3.37±0.23	3.99±0.30	1.77	NS
ACCU	4.08±0.21	2.98±0.60	2.01	NS	3.69±0.41	3.08±0.42	1.03	NS
FRPAM	2.17±0.14	2.07±0.23	0.37	NS	2.4±0.11	3.36±0.26	3.42	<0.05
DG	1.52±0.11	1.84±0.22	1.82	NS	1.56±0.21	1.73±0.32	0.94	NS
CA1	1.76±0.12	1.91±0.21	0.92	NS	1.79±0.10	1.71±0.21	0.45	NS
CA2	1.84±0.14	2.15±0.33	1.13	NS	2.31±0.22	1.84±0.12	1.95	NS
CA3	1.64±0.12	1.89±0.24	1.05	NS	1.36±0.11	1.75±0.10	3.36	<0.05
CM	3.49±0.11	6.15±0.24	10.81	<0.01	5.63±0.52	5.3±0.90	0.32	NS
RE	4.02±0.57	3.86±0.32	0.24	NS	5.42±0.20	6.50±0.44	2.32	NS
MD	3.71±0.24	6.47±0.30	7.55	<0.01	6.53±0.50	6.45±0.32	0.14	NS
LD	2.57±0.32	3.27±0.12	2.51	<0.05	4.01±0.40	2.98±0.23	2.30	NS
VL	3.32±0.21	3.92±0.68	0.86	NS	3.84±0.13	4.99±0.51	2.25	NS
MHB	2.88±0.13	5.67±0.61	4.32	<0.01	3.94±0.32	3.04±0.12	2.78	<0.05
LP	2.52±0.26	3.19±0.35	1.87	NS	1.85±0.10	2.87±0.46	2.15	NS
LA	4.1±0.61	4.19±0.40	0.23	NS	5.35±0.15	3.69±0.44	3.90	<0.01
ME	3.08±0.11	2.88±0.28	0.63	NS	2.66±0.21	2.12±0.23	2.30	NS
PMCO	6.1±0.09	4.33±0.47	3.71	<0.01	2.43±0.32	5.88±0.31	7.74	<0.01
CO	5.07±0.16	4.78±0.52	0.53	NS	4.34±0.14	4.63±0.33	0.8	NS
SN	2.06±0.22	1.79±0.31	1.78	NS	1.32±0.08	1.71±0.10	3.45	<0.05
V1	1.82±0.34	1.77±0.21	0.22	NS	1.25±0.15	1.89±0.17	3.45	<0.05
PAG	2.13±0.13	1.93±0.42	1.47	NS	1.50±0.15	2.26±0.12	4.63	<0.01
IPC	2.15±0.14	1.53±0.11	4.60	<0.01	1.69±0.14	2.42±0.26	2.47	<0.05
MGD	4.43±0.48	4.06±0.73	0.50	NS	3.10±0.41	4.84±0.47	2.65	<0.05

Tabla 7. Efecto de la exposición perinatal a Δ^9 -THC en la densidad de receptores opioides μ en ratas de 70 días de edad. Para cada región, cada valor corresponde a la media \pm E.S.M. de 4 animales. Para cada animal, la densidad se calculó a partir de 4-8 medidas del mismo cerebro.

DIA 24	SEXO		TRATAMIENTO		INTERACCION SEXO x TRATAMIENTO	
	F ANOVA	P	F ANOVA	P	F ANOVA	P
ESTRUCTURA						
CPU	9.43	<0.01 **	0.57	0.46	3.04	0.11
ACCU	0.09	0.77	8.18	<0.05 *	0.25	0.62
ERPAM	0.72	0.41	0.20	0.66	4.81	<0.05 *
DG	0.00	0.97	0.79	0.39	1.89	0.19
CA1	0.45	0.51	0.14	0.72	4.44	0.06
CA2	0.48	0.50	0.58	0.46	0.06	0.80
CA3	0.45	0.52	2.84	0.12	3.55	0.08
CM	0.48	0.50	18.12	<0.01 **	10.47	<0.01 **
RE	0.98	0.34	14.34	<0.01 **	16.24	<0.01 **
MD	0.58	0.46	9.87	<0.01 **	17.19	<0.01 **
LD	8.39	<0.01 **	2.55	0.14	35.16	<0.01 **
VL	0.01	0.94	20.75	<0.01 **	36.31	<0.01 **
MHB	3.09	0.10	0.04	0.84	4.76	<0.05 *
LP	7.67	<0.05 *	0.51	0.49	1.58	0.23
LA	0.31	0.58	6.89	<0.05 *	4.89	<0.05 *
ME	20.74	<0.01 **	71.85	<0.01 **	94.41	<0.01 **
EMCO	0.58	0.46	19.40	<0.01 **	38.78	<0.01 **
CO	1.65	0.22	0.74	0.41	5.91	<0.05 *
SN	1.21	0.29	0.07	0.79	2.69	0.12
VTA	0.06	0.81	1.37	0.26	4.32	0.06
PAG	0.11	0.75	2.36	0.15	10.24	<0.01 **
IP	0.16	0.70	0.01	0.94	13.64	<0.01 **
MGD	64.92	<0.01 **	135.06	<0.01 **	108.56	<0.01 **

Tabla 8. Análisis de varianza de doble vía (ANOVA II) del efecto del tratamiento perinatal con Δ^9 -THC en la densidad de receptores opioides μ en ratas de 24 días de edad.

DIA 70	SEXO		TRATAMIENTO		INTERACCION SEXO x TRATAMIENTO	
ESTRUCTURA	F ANOVA	P	F ANOVA	P	F ANOVA	P
CPU	0.28	0.60	9.69	<0.01 **	24.18	<0.01 **
ACCU	0.07	0.80	4.63	0.05	0.46	0.51
FRPAM	15.47	<0.01 **	4.91	<0.05 **	7.47	<0.05 *
DG	0.09	0.77	3.77	0.07	0.35	0.56
CA1	0.49	0.50	0.08	0.79	0.90	0.36
CA2	0.21	0.65	0.20	0.66	4.62	0.05
CA3	2.45	0.14	5.81	<0.05 *	0.27	0.61
CM	1.48	0.25	4.83	<0.05 *	7.96	<0.05 *
RE	25.0	<0.01 **	1.29	0.28	2.36	0.15
MD	17.80	<0.01 **	16.23	<0.01 **	18.23	<0.01 **
LD	4.93	<0.05 *	0.38	0.55	10.82	<0.01 **
VL	2.78	0.12	19.86	<0.01 **	0.06	0.81
MHB	4.74	<0.05 *	6.24	<0.05 *	12.06	<0.01 **
LP	2.84	0.12	8.06	<0.05 *	0.37	0.55
LA	1.17	0.30	7.47	<0.05 *	9.28	<0.01 **
ME	9.65	<0.01 **	3.68	0.08	0.83	0.38
PMCO	14.11	<0.01 **	5.43	<0.05 *	88.28	<0.01 **
CO	1.88	0.19	0.00	0.99	0.80	0.39
SN	18.91	<0.01 **	0.42	0.53	12.27	<0.01 **
VIA	2.34	0.15	4.26	0.06	5.81	<0.05 *
PAG	1.92	0.19	6.93	<0.05 *	20.37	<0.01 **
IPC	1.76	0.21	0.12	0.74	17.23	<0.01 **
MGD	0.30	0.59	1.91	0.19	4.53	0.05

Tabla 9. Análisis de varianza de doble vía (ANOVA II) del efecto del tratamiento perinatal con Δ^9 -THC en la densidad de receptores opioides μ en ratas de 70 días de edad.

DISCUSIÓN

1.-SÍNDROME DE ABSTINENCIA A OPIACEOS EN EL RATÓN

La dependencia física es un estado que adquiere un organismo tras el contacto repetido con un fármaco o sustancia, merced al cual aparecen un conjunto de signos y síntomas en el momento en el que el fármaco, o sustancia en general, deja de actuar sobre el organismo. Este conjunto de signos y síntomas es lo que se denomina síndrome de abstinencia. La aparición de este síndrome define la existencia de dependencia física.

Para la inducción de la dependencia física a morfina en el ratón, utilizamos dos protocolos distintos, la implantación s.c. de un pellet de morfina (San Martin Clark y cols., 1993), o bien la administración s.c. durante 5 días de dosis crecientes de morfina (Maldonado y cols., 1992).

1.1.- EFECTO DEL Δ^9 -THC Y LA ANANDAMIDA

Nuestros resultados muestran que tanto la anandamida como el Δ^9 -THC, reducen los signos típicos del síndrome de abstinencia a opiáceos en ratón. Este efecto lo hemos observado con los dos protocolos de inducción de dependencia física a morfina. En ambos casos, la AnNH a la dosis de 5 mg/kg, reduce de forma significativa los signos típicos del síndrome de abstinencia a morfina. Por otra parte, la AnNH, a esta dosis, está exenta de efectos significativos sobre la locomoción. Esto indica que la reducción de los signos típicos del síndrome de abstinencia a opiáceos, no es debida a una inhibición indiscriminada de la actividad locomotora.

La disminución de los signos típicos del síndrome de abstinencia a opiáceos observada en animales tratados con AnNH, sugieren que este compuesto endógeno, al igual que el Δ^9 -THC, puede

modular la actividad de vías neuronales implicadas en la expresión de los signos físicos de la dependencia a opiáceos. Las propiedades tanto farmacológicas como bioquímicas de la AnNH, parecen indicar que esta molécula pudiera ser el ligando endógeno del receptor central de cannabinoides (Smith y cols., 1994). Nuestros resultados podrían ser interpretados tomando como base los efectos neuroquímicos y comportamentales producidos por el Δ^9 -THC en roedores. Entre estos efectos podemos destacar que Holtzman y cols (1969) han demostrado una disminución en la actividad noradrenérgica cerebral, tras la administración de bajas dosis de Δ^9 -THC. De hecho, los signos de abstinencia opioide se han relacionado con una exacerbación de la actividad noradrenérgica en *locus coeruleus*. Por esta razón, en determinadas ocasiones, se emplean en clínica agonistas adrenérgicos del tipo de la clonidina para atenuar los síntomas del síndrome de abstinencia a opiáceos. La acción de este fármaco sobre el SNC consiste en inhibir la actividad de neuronas noradrenérgicas por estimulación de los autorreceptores α_2 adrenérgicos (Gold y cols., 1978; Meyer y Sparber, 1976). Por otro lado, hay ciertas evidencias de la existencia de una interacción entre los sistemas opioide y cannabinoide, cuyo estudio ha constituido el objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral. En el año 1987, Vaysse y cols. pusieron de manifiesto la existencia de una modulación alostérica de los receptores opiáceos μ y δ por los cannabinoides. Welch (1993) ha demostrado que la analgesia producida por los cannabinoides es atenuada por la administración i.t. del antagonista del receptor opiáceo κ nor-binaltorfimina. De hecho, en nuestro laboratorio (Reche y cols., 1996), se ha puesto de manifiesto que la naloxona bloquea parcialmente la respuesta analgésica del Δ^9 -THC, y que además la administración i.t. de un antisuero de conejo de antidinorfina A(1-8) también produce un bloqueo de la analgesia inducida por Δ^9 -THC. Por otro lado, se ha demostrado que la analgesia inducida por Δ^9 -THC es potenciada por morfina y DAGO

(Reche y cols., 1996). Welch y Stevens (1992), propusieron que como los receptores opiáceos y cannabinoides están ligados a sistemas efectores similares, es posible que exista una colocalización de ambos receptores en las mismas neuronas. Aunque todavía la colocalización neuronal de ambos tipos de receptores no se ha demostrado (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Mansour y cols., 1988, para la distribución de receptores cannabinoides y opiáceos respectivamente), sí se ha visto que ambos tipos de receptores coexisten en estructuras cerebrales implicadas en la nocicepción y en el desarrollo de dependencia a opiáceos como son por ejemplo las células granulosas del cerebelo (Childers y cols., 1992) y la sustancia gris periacueductal (Maldonado y cols., 1992). En consecuencia, una interacción entre AnNH y morfina a nivel de sus sistemas de transducción podría considerarse como responsable de la disminución del síndrome de abstinencia que se produce en los animales pretratados con morfina. Otra posibilidad es que el Δ^9 -THC ó la AnNH produzca una estimulación del sistema opioide endógeno, ya que se ha demostrado (Kumar y cols., 1990) que ratas que han recibido un tratamiento neonatal con Δ^9 -THC presentan un aumento en los niveles diencefálicos de péptidos opioides endógenos.

Por otro lado, el efecto de la AnNH/ Δ^9 -THC sobre el síndrome de abstinencia podría interpretarse como resultado de la disminución de la actividad locomotora (Villarreal y cols., 1973). Fride y Mechoulam (1993) han demostrado que tanto la AnNH como el Δ^9 -THC producen una marcada hipolocomoción en el ratón cuando son administrados i.p. a una dosis de 3 mg/kg. Nosotros encontramos que la dosis de 5 mg/kg i.v., que es la dosis efectiva para disminuir los signos de abstinencia opioide, produce una ligera hipolocomoción, pero que no es estadísticamente significativa. Esto se muestra de acuerdo con los resultados de Smith y cols. (1994).

Por tanto, nuestros resultados apoyan el papel de la AnNH como

un agonista endógeno del receptor central de cannabinoides y proporcionan un soporte adicional a la supuesta interrelación entre los sistemas opioide endógeno y cannabinoide.

Es posible que los agonistas cannabinoides puedan modular el sistema opioide endógeno y en consecuencia, si extrapoláramos a humanos, los cannabinoides podrían ser utilizados como una terapia alternativa en el tratamiento de la deshabituación a opiáceos, siempre empleando dosis que per se estén, por su parte, del todo exentas de actividad alucinógena.

2.- EXPOSICIÓN PERINATAL A Δ^9 -TETRAHIDROCANNABINOL EN LA RATA

El tratamiento perinatal con Δ^9 -THC consiste en la administración de este compuesto disuelto en aceite de sésamo a ratas preñadas desde el día 5° de la gestación hasta el día 24 postnatal, día aproximado del destete de las crías. Este tratamiento corresponde a una estimación corregida en función de la superficie corporal, peso y ruta de administración, del consumo crónico moderado de preparados de *Cannabis sativa* en humanos (Nahas, 1984).

Los cannabinoides son transferidos a través de la barrera placentaria desde la sangre materna a la fetal (Hutchings y cols., 1989) y excretados en la leche materna durante la lactancia (Jakubovic y cols, 1977). Así se ha demostrado que la progenie de madres que han sido expuestas a cannabinoides durante los periodos de gestación y lactancia, presenta múltiples alteraciones neuroquímicas y comportamentales. La mayoría de estos estudios experimentales se han llevado a cabo en roedores (Mokler y cols., 1987; Dalterio y cols., 1984; Dalterio 1986; Nahas y Frick, 1986).

En cuanto a la validación de este modelo de tratamiento, el equipo de investigación del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la U.C.M. dirigido por el Dr. Ramos, ha demostrado que la dosis de Δ^9 -THC utilizada no produce cambios significativos en la ingesta de agua y comida de la madre, ni tampoco en la ganancia de peso progresiva a lo largo de la gestación y lactancia. Por tanto, se puede descartar que los efectos observados sean consecuencia de una malnutrición de la madre, inducida por la administración del Δ^9 -THC, hecho que a su vez, podría afectar a las crías. Tampoco se ha encontrado que el tratamiento perinatal con Δ^9 -THC, en estas condiciones experimentales, produzca diferencias en el tamaño de la camada, duración de la gestación, proporción en el número de hembras/machos y mortalidad prenatal y postnatal. Otros autores sí han encontrado cambios en estas variables aunque en sus estudios se utilizaba una dosis mayor de Δ^9 -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 extracto crudo de hachís, como por ejemplo, alcaloides, terpenos, fenoles y flavonoides, puede ser mucho más tóxica que la administración única de Δ^9 -THC, ya que se sabe que existen acciones sinérgicas e incluso antagónicas entre estos compuestos. Walters y Carr (1986) están a favor de este argumento, ya que han observado que la exposición perinatal a extracto crudo de hachís induce un aumento de la mortalidad prenatal de las crías, así como una disminución de su peso corporal. Sin embargo, estos efectos no se han observado cuando se tratan a los animales con los diferentes cannabinoides por separado.

2.1.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA NALOXONA EN RATAS DE 24 DÍAS

El antagonista opioide naloxona provoca un síndrome de abstinencia parecido al opioide en ratas macho recién destetadas expuestas a un tratamiento perinatal con Δ^9 -THC.

La inducción de un "síndrome de abstinencia opioide" por naloxona en ratas recién destetadas, apunta indirectamente a una alteración del sistema opioide endógeno producido por la exposición perinatal del cannabinoide. Sin embargo, hay que decir que las respuestas comportamentales "dominantes" en el síndrome de abstinencia a opiáceos, tales como el número de saltos (Maldonado y cols., 1992), no se observaron en los animales perinatalmente expuestos a Δ^9 -THC y posteriormente tratados con naloxona. Estamos pues, ante un síndrome de abstinencia más débil que el opioide. Quizás esto pueda ser debido a que el Δ^9 -THC, al ser un compuesto altamente lipófilo, tiende a acumularse en tejido adiposo desde donde se va liberando lentamente. Por esta razón, la caída de la concentración plasmática no es tan brusca como en el caso de los opiáceos, y podría explicar la existencia de este síndrome de abstinencia más débil (Aguirell y cols, 1986).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la interacción entre receptores opioides y cannabinoides. Según se apuntó con anterioridad, se postula una modulación alostérica de la fijación de los opioides (Vaysse y cols., 1987) o una interacción de ambos tipos de drogas con un sistema neuroefector común (Welch, 1993). Es posible que una interacción del Δ^9 -THC, en estados ontogénicos tempranos, con los receptores opioides o, alternativamente, con sus sistemas efectores pueda resultar en cambios permanentes en la funcionalidad del sistema opioide. Ambos tipos de receptores, opioides y cannabinoides, están acoplados a sistemas neuroefectores

similares a través de proteínas G_i . Sharma y cols (1975) demostraron que la administración crónica de opiáceos, producía un aumento en la actividad de la adenilatociclasa de carácter compensatorio. Dicho aumento es una consecuencia del cambio en la proporción de las formas activa e inactiva de la enzima más que en la cantidad total de la misma (Wilkening y Nirenberg, 1980). Como se apuntó en el apartado 1.1 de esta discusión, una hipótesis es que si ambos tipos de receptores estuvieran colocalizados en las mismas neuronas, un tratamiento crónico con morfina ó Δ^9 -THC podría implicar un mecanismo celular adaptativo, que se podría materializar en un aumento en la actividad de la adenilatociclasa. Por tanto, la administración de naloxona en estas condiciones, podría inducir un incremento brusco en los niveles de AMP_c que podría ser responsable de las alteraciones comportamentales y neuroquímicas observadas en los machos de 24 días expuestos perinatalmente a Δ^9 -THC. Aunque la colocalización de ambos tipos de receptores no se ha demostrado, estos receptores están localizados en estructuras cerebrales tales como la sustancia gris periacueductal (PAG) la cual parece jugar un papel importante en el desarrollo de la dependencia física a opiáceos (Maldonado y cols., 1992).

Por otro lado, Kumar y cols (1983, 1984) demostraron una elevación en los niveles diencefálicos de met-enkefalina y β -endorfina después de la administración aguda y crónica de Δ^9 -THC a ratas adultas. También, Kumar (1990), demostró que ratas macho adultas que habían recibido un tratamiento neonatal con Δ^9 -THC (2 mg/kg), presentaban un aumento en los niveles de met-enkefalina y β -endorfina en el área diencefálica (área anterior hipotalámica-preóptica e hipotálamo medio-basal). Esto podría justificar que ratas expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC desarrollen un síndrome de abstinencia al administrar naloxona.

2.2.- UMBRALES NOCICEPTIVOS Y EFECTO DE LA MORFINA EN ANIMALES EXPUESTOS PERINATALMENTE A Δ^9 -THC

La exposición perinatal a Δ^9 -THC produce una disminución en la sensibilidad basal a un estímulo térmico (test de foco calorífico) en machos de 24 y 50 días expuestos perinatalmente a Δ^9 -THC. En animales adultos, observamos que los que habían estado expuestos a Δ^9 -THC mostraban tolerancia al efecto analgésico de la morfina (5 mg/kg i.p).

El incremento de los umbrales nociceptivos se observa en los machos de 24 y 50 días pero no en el día 70. Esto nos lleva a pensar, en primer lugar, que la disminución en la sensibilidad al dolor podría ser debida al propio Δ^9 -THC, que tiene una semivida plasmática muy larga debido a que se almacena en tejido adiposo. Sin embargo, las hembras tratadas perinatalmente con Δ^9 -THC no mostraron cambios en la respuesta al estímulo térmico. Esta diferencia en cuanto al sexo podría ser interpretada teniendo en cuenta la distinta sensibilidad de las hembras comparadas con machos y hembras ovariectomizadas a los efectos analgésicos de la morfina o al efecto analgésico que se observa en el test de natación forzada (Baamonde y cols., 1989).

Por otro lado, estos resultados sugieren que el tratamiento crónico con Δ^9 -THC durante el desarrollo del SNC podría modificar la funcionalidad de circuitos neuronales relacionados con la percepción del dolor, como por ejemplo las vías monoaminérgicas o el sistema opioide endógeno. Se ha demostrado que los cannabinoides pueden alterar el recambio de catecolaminas en áreas hipotalámicas e inhibir los mecanismos de recaptación de monoaminas *in vitro* (Poddar y Dewey, 1980). También se ha comprobado que la exposición perinatal a extractos de hachís modifica la ontogenia de neuronas

dopaminérgicas cerebrales (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991). Esto está de acuerdo con la implicación de las catecolaminas en las respuestas antinociceptivas de los cannabinoides (Ferri y cols., 1986). De hecho, se ha comprobado que el antagonista noradrenérgico α_2 yohimbina (i.t.), es capaz de atenuar la respuesta analgésica del Δ^9 -THC (Lichtman y Martin, 1991). En nuestro laboratorio, Reche y cols (1996) han demostrado que el antagonista del receptor opiáceo κ nor-binaltorfimina y la administración de un antisuero de antidinorfina A(1-8) bloquean la respuesta analgésica de Δ^9 -THC. Esto sugiere que el Δ^9 -THC podría inducir la liberación de dinorfina en médula espinal. Estos resultados están en consonancia con los experimentos de Mason y Welch (1996), en los que se demuestra la presencia de dinorfina y Leu-encefalina en líquido cefalorraquídeo de animales tratados con Δ^9 -THC. Por otra parte, en nuestro laboratorio, también se ha puesto de manifiesto un aumento en la expresión de prodinorfina en médula espinal en animales sometidos a un tratamiento subcrónico con Δ^9 -THC (datos no publicados).

Por otro lado, cuando examinamos el efecto antinociceptivo de la morfina en ratas macho adultas (75 días) que recibieron tratamiento perinatal con Δ^9 -THC, observamos que los animales tratados con Δ^9 -THC mostraban una menor sensibilidad al efecto de la morfina. Resultados de alguna manera relacionados, han sido descritos por otros autores. Así ratas macho que habían recibido Δ^9 -THC durante el periodo neonatal, mostraban un incremento en met-enkefalina y β -endorfina en el hipotálamo (Kumar y cols., 1990). Esto sugiere que el tratamiento perinatal con Δ^9 -THC podría implicar, a largo plazo, cambios en mecanismos que intervienen en el dolor, y que están relacionados con el sistema opioide.

2.3.- AUTORRADIOGRAFIA DE RECEPTORES OPIOIDES μ

La exposición perinatal a Δ^9 -THC produce cambios en la densidad de receptores opioides μ en ratas de 24 y 70 días de edad. Estos cambios se originan en diferentes áreas cerebrales que están relacionadas directamente con comportamientos modulados por el sistema opioide y con la percepción del dolor.

El tratamiento crónico con Δ^9 -THC en ratones que reciben la droga ya en estado adulto, no modifica la fijación de [3 H]-DAGO a los receptores opioides μ en cerebro y médula espinal (Thorat y Bhargava, 1994). Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación y por otros autores, han demostrado que tanto la exposición perinatal como la exposición en una etapa temprana del desarrollo a Δ^9 -THC, origina en ratas adultas profundos cambios en la percepción dolorosa, así como en parámetros neuroquímicos relacionados con el sistema opioide. La mayoría de los cambios observados se caracterizan por un marcado dimorfismo sexual. Así, nosotros hemos puesto de manifiesto que machos adultos (75 días de edad), y no hembras, expuestos a Δ^9 -THC, muestran tolerancia al efecto analgésico de la morfina sin modificación en la sensibilidad basal ante un estímulo doloroso (Vela y cols., 1995). Por otro lado, como ya se ha apuntado varias veces a lo largo de esta discusión, se ha demostrado que el tratamiento neonatal con Δ^9 -THC incrementa los niveles hipotalámicos de los péptidos opioides met-enkefalina y β -endorfina en ratas macho adultas (Kumar y cols., 1990). Estos resultados han sugerido, que la exposición a Δ^9 -THC durante la ontogenia y maduración del SNC, produce efectos a largo plazo en la funcionalidad del sistema opioide endógeno. El hecho de existir diferencias significativas en la densidad de receptores opiáceos μ en ratas expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC, proporciona un soporte neuroanatómico que podría servir para interpretar la

influencia del Δ^9 -THC en una serie de comportamientos relacionados con el sistema opioide.

Para la discusión de estos resultados autorradiográficos, nos podemos hacer dos preguntas distintas. Una cuestión sería si el efecto del tratamiento perinatal con Δ^9 -THC puede ser debido a una interacción específica con receptores opiáceos en estadios muy tempranos de la ontogenia. Otra posibilidad es que el efecto del Δ^9 -THC sea debido a una alteración inespecífica del proceso de maduración del SNC.

Los receptores opioides μ se detectan en el SNC embrionario de rata en el día 14 de gestación (Kent y cols., 1982; Kornblum y cols., 1987; Spain y cols., 1985; De Vries y cols., 1990). Aunque la afinidad del Δ^9 -THC por receptores opiáceos es muy baja, como se apuntó con anterioridad, los cannabinoideos pueden inhibir la unión de los opioides a sus receptores por un mecanismo alostérico (Vaysse y cols., 1987), y por tanto, los receptores opiáceos μ podrían ser una diana susceptible para el Δ^9 -THC. Por otro lado, el Δ^9 -THC puede estimular la actividad del sistema opioide endógeno ya que los antagonistas opioides bloquean la mayoría de las acciones farmacológicas del Δ^9 -THC (Dewey 1988).

También la exposición perinatal a Δ^9 -THC produce tolerancia a los efectos analgésicos de la morfina en ratas macho adultas (Vela y cols., 1995). Por último, para justificar el hecho de que el Δ^9 -THC pudiera estimular la actividad del sistema opioide endógeno, es importante destacar que existe un mecanismo opioide endógeno que media la acción euforizante de la marihuana, ya que la naloxona bloquea el incremento en la liberación presináptica de dopamina en numerosos núcleos cerebrales relacionados con mecanismos de recompensa (Gardner y Lowinson, 1991).

Adicionalmente, se ha sugerido que los receptores opioides y cannabinoides es posible que estén acoplados al mismo sistema de segundos mensajeros (Welch, 1993). Teniendo en cuenta este hecho, se podría explicar que la interacción, en estadios ontogénicos o postnatales, del Δ^9 -THC con los receptores opioides o, alternativamente, con sus sistemas efectores, podría implicar cambios permanentes en la funcionalidad del sistema opioide.

Aunque no se ha demostrado el efecto del Δ^9 -THC en la ontogenia y desarrollo postnatal de las neuronas opioidérgicas y de los receptores opiáceos, sí que existen datos en la literatura que demuestran que el tratamiento perinatal con Δ^9 -THC produce alteraciones dependientes del sexo en la funcionalidad de la transmisión dopaminérgica (Bonnin, 1993a, 1993b, 1994). La dopamina juega un importante papel en el desarrollo y maduración de otros sistemas de neurotransmisión, incluyendo el sistema opioide. Se ha sugerido, que la dopamina, regula la organización y la densidad de receptores opiáceos μ ya que las lesiones por 6-hidroxidopamina, en ratas neonatales, se traducen en efectos a largo plazo en la distribución de receptores opioides μ en el estriado de rata (Caboche y cols., 1991). De acuerdo con estos resultados, el tratamiento postnatal con haloperidol disminuye la densidad de receptores opioides μ (Trovero y cols., 1990). Además, la activación de receptores opioides μ también altera la actividad dopaminérgica (De Vries y cols., 1990; De Vries y cols., 1991), sugiriendo que la dopamina y los receptores opiáceos μ están integrados en el mismo circuito regulador durante la maduración del SNC, y por tanto, la alteración de uno de ellos produciría importantes cambios en el otro.

Con respecto a las diferencias observadas entre machos y hembras, el dimorfismo sexual también se ha observado en otros

patrones comportamentales relacionados con el sistema opioide, como por ejemplo la sensibilidad y los efectos analgésicos de la morfina (Vela y cols., 1995). También, hemos observado que sólo en machos recién destetados expuestos perinatalmente a Δ^9 -THC, la naloxona produce un síndrome de abstinencia parecido al opioide (Vela y cols., 1995). Recientemente, se ha demostrado (Martín y cols., 1996) la existencia de una diferencia en el patrón de autoadministración de morfina en ratas adultas expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC, siendo las hembras expuestas a Δ^9 -THC las que presentan una mayor frecuencia de autoadministración de morfina. Utilizando el mismo protocolo experimental, Martín y cols han observado que cuando se trata de un reforzador natural como es el alimento, no existen diferencias en la frecuencia de autoadministración entre los animales expuestos a Δ^9 -THC y los controles. Por tanto, se trata de un efecto aparentemente específico de alteración del sistema opioide endógeno. Estos resultados, se pueden justificar, en parte, por el aumento en la densidad de receptores opiáceos μ en regiones cerebrales de gran importancia en los fenómenos de recompensa como es por ejemplo el área ventral-tegmental. Estos datos, confirman en cierta medida el conocido como "efecto trampolín" de las "drogas blandas" hacia el consumo de las "drogas duras", ya que las hembras expuestas perinatalmente a Δ^9 -THC se muestran más proclives a la autoadministración de opiáceos.

El origen del dimorfismo sexual que observamos siempre en todos estos efectos, todavía no se conoce. Una hipótesis es que puede existir una relación con un potencial efecto estrogénico, mediado por receptor, de los cannabinoides. Así, se ha visto que los estrógenos producen un aumento en la densidad de receptores opioides μ en el tálamo e hipocampo de ratas ovariectomizadas y una disminución en la densidad de receptores μ en hipotálamo y estriado. También, se ha demostrado que la densidad de receptores

opiáceos μ está expuesta a cambios en ratas hembras en función del ciclo menstrual (Martini y cols., 1989). Existe amplia literatura sobre el fenómeno de la existencia de respuestas sexualmente dimórficas tras la exposición perinatal a drogas de abuso (Robinson y cols., 1993; Forgie y Stewart, 1994; Snyder-Keller, 1995).

En consecuencia, el tratamiento perinatal con Δ^9 -THC produce cambios considerables en la densidad de receptores opiáceos μ a corto y largo plazo existiendo siempre un marcado dimorfismo sexual. Estos cambios sirven de base para explicar muchos de los efectos comportamentales que produce el Δ^9 -THC y que están relacionados con el sistema opioide.

Los resultados presentados en esta memoria aportan más evidencias de la existencia de una interacción del Δ^9 -Tetrahidrocannabinol, principal principio activo de la marihuana, con el sistema opioide central en roedores. Así, se ha puesto de manifiesto, que la anandamida es capaz de reducir los signos típicos del síndrome de abstinencia a opiáceos en ratones. Por otro lado, la exposición perinatal a Δ^9 -THC induce importantes efectos sobre el sistema opioide, ya que la naloxona es capaz de provocar un síndrome de abstinencia en ratas de 24 días expuestas perinatalmente a dicho cannabinoide. Además, otros parámetros comportamentales como el efecto analgésico de la morfina, se muestran modificados como consecuencia de la exposición perinatal a Δ^9 -THC. Por último, hemos comprobado que la exposición perinatal a Δ^9 -THC, produce cambios considerables en la densidad de receptores opioides μ en ratas de 24 y 70 días de edad en distintas regiones cerebrales relacionadas directamente con comportamientos modulados por el sistema opioide y con la percepción del dolor.

Todos estos resultados, se pueden interpretar considerando que el Δ^9 -THC produce una activación del sistema opioide endógeno, o

bien se pueden justificar como consecuencia de la existencia de una modulación alostérica de la fijación de los opiáceos ó una interacción de ambos tipos de agonistas, opiáceos y cannabinoides, con un sistema neuroefector común.

Hay que indicar que el fenómeno de la drogodependencia ha experimentado en los últimos años un notable incremento en nuestro medio, destacando especialmente el aumento del número de mujeres consumidoras. Dado, que la mayor parte de las mujeres consumidoras, se encuentra en edad fértil, es fácil imaginar un elevado número de mujeres embarazadas adictas, cuyo uso de tóxicos propiciaría una situación de alto riesgo durante la gestación. Los resultados presentados en esta memoria amplían el conocimiento sobre la interacción del *Cannabis* con un sistema de neurotransmisión concreto, el sistema opioide. Teniendo en cuenta los escasos datos de que se dispone sobre la peligrosidad del uso de las llamadas "drogas blandas" en mujeres embarazadas, consideramos de gran importancia la profundización en el estudio de drogas que se vienen considerando como poco nocivas, como es el caso de la marihuana, analizando su interacción con distintos sistemas de neurotransmisión, así como las repercusiones posibles para la progeñie.

CONCLUSIONES

1) El cannabinoide endógeno anandamida es capaz de prevenir el síndrome de abstinencia a opiáceos en ratón. Esta observación sugiere la existencia de tolerancia cruzada entre opioides y cannabinoides en esta especie animal.

2) La exposición perinatal de la rata a Δ^9 -Tetrahydrocannabinol produce alteraciones funcionales y neuroquímicas del sistema opioide, que se manifiestan a lo largo de la vida del animal, tanto a corto como a largo plazo.

3) Funcionalmente, las ratas expuestas a cannabinoides muestran una distorsión en la percepción dolorosa, así como una sensibilidad alterada al efecto analgésico de la morfina.

4) Neuroquímicamente, la exposición perinatal a Δ^9 -Tetrahydrocannabinol da lugar a variaciones de la densidad de receptores μ opioides en distintas áreas cerebrales, tanto en ratas recién destetadas como adultas.

5) Los efectos de la exposición perinatal a Δ^9 -THC sobre el sistema opioide en la rata, presentan un dimorfismo sexual, con una mayor incidencia en machos con respecto a las hembras.

6) Las observaciones experimentales descritas en esta memoria confirman la existencia de una interacción de los sistemas centrales opioide y cannabinoide en roedores.

BIBLIOGRAFÍA

- Abood ME; Martin BR. Neurobiology of marijuana abuse. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 201-206, 1992.
- Agurell S; Halldin M; Lindgren J; Ohlsson A; Widman M; Gillespie H; Hollister L. Pharmacokinetics and metabolism of delta-9-THC and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacological Reviews*, 38, 21-42, 1986.
- Alvárez J; Royo J; Viladrich C; Guirado V; Hernández F; Bayes R. Estudio, evaluación y factores innovadores de un programa de intercambio de jeringuillas para usuarios de drogas en Barcelona. *Intervención psicosocial*, 9, 125-137, 1994.
- Andréasson S; Allebeck P; Engström A; Rydberg U. Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of swedish conscripts. *Lancet*, 1483-1485, 1987.
- Arenander AT; De Vellis J. Development of the nervous system. *Basic Neurochemistry 4^a Ed.* Siegel G; agranoff B; albers RW; Molinoff P (Eds.) Raven Press, New York, 479-506, 1989.
- Aulakh CS; Bhattacharyya AK; Hossain MA; Pradham SN. Behavioral and neurochemical effects of repeated administration of Δ^9 -THC in rats. *Neuropharmacology*, 19, 97-102, 1980.
- Baamonde A; Hidalgo A; Andrés-Telles F. Sex-related differences in the effect of morphine and stress on visceral pain. *Neuropharmacology*, 28, 967-970, 1989.
- Bell J; Hall W; Byth K. Changes in criminal activity after entering methadone maintenance. *British Journal of Addiction*, 87, 251-258, 1992.

Belue RC; Howlett A; westlake TM; Hutchings DE. The ontogeny of cannabinoid receptors in the brain of postnatal and aging rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 17, 25-30, 1995.

Bhargava HN. Effect of some cannabinoids on naloxone-precipitated abstinence in morphine-dependent mice. *Psychopharmacology* 49, 267-270, 1976.

Bidaut_Russell M; Howlett AC. Cannabinoid receptor-regulated cyclic AMP accumulation in the rat striatum. *Journal of Neurochemistry*, 57, 1769-1773, 1991.

Bonnin A; De Miguel R; Rodriguez-Manzaneque JC; Fernández Ruiz JJ; Santos A; Ramos JA. 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.

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

Bowers M; Hoffman Jr FJ. Regional homovanillic acid following Δ^9 -THC and cocaine. *Brain Research*, 366, 405-407, 1986.

Caboche J; Rogard M; Besson MJ. Comparative development of D₁-dopamine and μ -opiate receptors in normal and in 6-hydroxydopamine-lesioned neonatal rat striatum: dopaminergic fibers regulate μ but not D₁ receptor distribution. *Developmental Brain Research*, 58, 111-122, 1991.

Chen J; Paredes W; Li J; Smith D; Lowinson J; Gardner EL. Δ^9 -THC produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology (Berlin)*, 102, 156-162, 1990.

Cherek DR; Roache JD; Egli M; Davis C; Spiga R; Cowan K. Acute effects of marijuana smoking on aggressive, escape and point-maintained responding of male drug users. *Psychopharmacology*, 111, 163-168, 1993.

Chesselet MF. Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: Facts and hypothesis. *Neuroscience*, 12, 347, 1984.

Childers SR; Fleming L; Konkoy C; Marckel D; Pacheco M; Sexton T; Ward S. Opioid and cannabinoid receptor inhibition of adenylylcyclase in brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 654, 33-51, 1992.

Clark JA; Liu L; Price M; Hersh B; Edelson M; Pasternak GW. κ opiate receptor multiplicity: Evidence for two U50.488-sensitive kappa₁ subtypes and a novel kappa₂ subtype. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 251, 461-468, 1989.

Cochetto DM; Owens SM; Perez-Reyes M; Diguseppi S; Miller LL. Relationship between plasma Δ^9 -tetrahydrocannabinol concentration and pharmacologic effects in man. *Psychopharmacology*, 75, 158-164,

1981.

Cooper JD; Rudden PK. Alterations in regional catecholamine content and turnover in the male rat brain in response to in utero ethanol exposure. *Alcoholism (N.Y.)*, 12, 282-285, 1988.

Dalterio SL. Cannabinoid exposure: effects on development. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, 8, 345-352, 1986.

Dalterio SL; Badr F; Bartke A; Mayfield D. Cannabinoids in mice: effects on fertility and spermatogenesis. *Science*, 216, 315-316, 1982.

Dalterio S; Steger RW; Bartke A. Maternal or paternal exposure to cannabinoids affects central neurotransmitter levels and reproductive function in male offspring. En: *The cannabinoids: chemical, pharmacologic and therapeutics aspects*. S Agurell, WL Dewey y RE Willette (eds). Orlando: Academic Press, 649-655, 1984.

Delay-Goyet P. Tesis Doctoral. *Differenciación bioquímica y farmacológica de los receptores opioides μ y δ* , 1989. Universidad René Descartes. París.

Devane WA; Hanus L; Breuer A; Pertwee RG; Stevenson LA; 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.

Dewey WL. Cannabinoid Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 38, 151-178, 1986.

De Vries TJ; Hogenboom F; Mulder AH; Schoffelmeer ANM. Ontogeny of μ -, δ -, and κ -opioid receptors mediating inhibition of neurotransmitter release and adenylate cyclase activity in rat brain. *Developmental Brain Research*, 54, 63-69, 1990.

De Vries TJ; Van Vliet BJ; Hogenboom F; Wardeh G; Van der Laan JW; Mulder AH; Schoffelmeer ANM. Effect of chronic prenatal morphine treatment on μ -opioid receptor regulated adenylate cyclase activity and neurotransmitter release in rat brain slices. *European Journal of Pharmacology. Molecular Pharmacology Section*, 208, 97-104, 1991.

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

Dow-Edwards DL; Freed LA; Fico TA. Structural and functional effects of prenatal cocaine exposure in adult rat brain. *Developmental Brain Research*, 57, 263-268, 1990.

Fan P. Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT₃ in rat nodose ganglion neurons. *Journal of Neurophysiology*, 73, 907-910, 1995.

Felder CC; Briley EM; Axelrod J; Simpson JT; Mackie K; Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulated receptor-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 90, 7656-7660, 1993.

Fernández-Ruiz JJ; Rodríguez de Fonseca F; Navarro M; Ramos JA. Maternal cannabinoid exposure and brain development: Changes in the ontogeny of dopaminergic neurons. *Marihuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*, Murphy LL; Bartke A, eds., CRC

Press, Boca Ratón, FL, 119-164, 1992.

Ferri S; Cavicchini E; Romualde P; Speroni E; Murari G. Possible mediation of catecholaminergic pathways in the antinociceptive effect of an extract of Cannabis Sativa L. *Psychopharmacology*, 89, 244-247, 1986.

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. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 272, 699-707, 1995.

Fride E; Mechoulam R. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *European Journal of Pharmacology*, 231, 313-314, 1993.

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

Gardner EL; Lowinson JH. Marijuana's interaction with brain reward systems:update 1991. *Pharmacology Biochemistry and behavior*, 40, 571-580, 1991.

Gardner EL; Paredes W; Smith D; Donner A; Milling C; Cohen D; Morrison D. Facilitation of brain stimulation reward by Δ^9 -THC. *Psychopharmacology*, 96, 142-144, 1988.

Gérard CM; 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.

Gold MS; Redmond DE; Kleber Hd. Clonidine blocks acute opiate withdrawal symptoms. *Lancet*, 2, 599-602, 1978.

Hanus L; Gopher A; Almong 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.

Harvey DJ. Mass spectrometry of the cannabinoids and their metabolites. *Mass Spectrometry Reviews*, 6, 135-229, 1987.

Harvey DJ. Oxidative cleavage of the pentyl side-chain of cannabinoids. *Drug metabolism and disposition*, 18, 350-355, 1990.

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.

Herkenham M; Lynn AB; Johnson MR; Levin LS; de Costa BR; Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptor in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*, 11, 563-583, 1991.

Herkenham M; Lynn AB; Little MD; Johnson MR; Melvin LS; De Costa BR; Rice KC. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 87, 1932-1936, 1990.

Hillard CJ; Bloom AS. Further studies of the interaction of Δ^9 -THC with the beta-adrenergic receptor. *The cannabinoids: chemical, pharmacologic and therapeutics aspects*. Agurell S; Dewey WL; Willette RE (eds). Orlando: Academic Press, 591-603, 1984.

Hine B; Friedman E; Torrelío M; Gershon S. Morphine-dependent rats: Blockade of precipitated abstinence by tetrahydrocannabinol. *Science*, 187, 443-445, 1975.

Holtzman D; Bowell RA; Jaffe JH; Freedman DX. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol: neurochemical and behavioral effects in the mouse. *Science*, 163, 1464-1467, 1969.

Howlett AC. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular Pharmacology*, 27, 429-436, 1985.

Howlett AC; Bidaut-Russell M; Devane WA; Melvin LS; Johnson MR; Herkenham M. The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends in Neurosciences*, 13, 420-423, 1990.

Hutchings DE; Martin BR; Gamagaris Z; Miller N; Fico T. Plasma concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. *Life Sciences*, 44, 697-701, 1989.

Jakubovic A; Hattori T; Mc Geer PL. Radioactivity in suckled rats after giving 14 -C-tetrahydrocannabinol to the mother. *European Journal of Pharmacology* 22, 221-223, 1977.

Kaymakçalan S, Ayhan IH; Tulunay FC. Naloxone-induced or postwithdrawal abstinence signs in Δ^9 -THC-tolerant rats. *Psychopharmacology* 55, 243-249, 1977.

Kent J; Pert C; Herkenham M. Ontogeny of opiate receptors in rat forebrain visualization by in vitro autoradiography. *Developmental Brain Research*, 2, 487-504, 1982.

Khachaturian H; Lewis ME; Schafer MKH; Watson SJ. Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends in Neurosciences*, 8, 111-119, 1985.

Kornblum HI; Hurbult DE; Leslie FM. Postnatal development of multiple opioid receptors in rat brain. *Developmental Brain Research*, 37, 21-41, 1987.

Kumar MSA; Chen CL. Effect of an acute dose of THC on hypothalamic LHRH and methionine content and serum levels of testosterone, corticosterone and LH in rats. *Substance and Alcohol Actions/Misuse*, 4, 37-43, 1983.

Kumar AM; Solomon J; Patel V; Kream RM; Brieze JM; Millard WJ. Early exposure to Δ^9 -THC influences neuroendocrine and reproductive functions in female rats. *Neuroendocrinology*, 44, 260-264, 1986.

Kumar AM; Haney M; Becker T; Thompson ML; Kream RM; Miczek K. Effect of early exposure to Δ^9 THC on the levels of opioid peptides, gonadotropin-releasing hormone and substance P in the adult male rat brain. *Brain Research*, 525, 78-83, 1990.

Kumar MSA; Patel V; Millard WJ. Effect of chronic administration of THC on endogenous opioid peptide and catecholamine levels in the diencephalus and plasma of the rat. *Substance and Alcohol Actions/Misuse*, 5, 201-210, 1984.

Landauer MR; Balster RL; Harris LS. Attenuation of cyclophosphamide-induced taste aversions in mice by prochlorperazine, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, nabilone and levonantradol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 23, 259-266, 1985.

Le Moal M; Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiological Reviews*, 71, 155-234, 1991.

Lester MD; Bakalar JB. *Marihuana, the forbidden medicine*. Yale University, 1993.

Levenson S; French ED. Effects of Δ^9 -THC on ventral-tegmental A 10 dopamine neurons in the rat. *Society of Neuroscience Abstracts*, 16, 2, 1100, 1990.

Lichtman AH; Martin BR. Cannabinoid-induced antinociception is mediated by a spinal α_2 -noradrenergic mechanism. *Brain Research*, 559, 309-314, 1991.

Mackie K; Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 89, 3825-3829, 1992.

Mailleux P; Vanderhaeghen JJ. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 48, 655-668, 1992.

Maldonado R; Fournié-Zaluski MC; Roques BP. Attenuation of the morphine withdrawal syndrome by inhibition of catabolism of endogenous enkephalins in the periaqueductal gray matter. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 345, 466-472, 1992.

Mansour A; Khachaturian H; Lewis ME; Akil H; Watson SJ. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends in Neurosciences*, 11, 308-314, 1988.

Martin BR. Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacological Reviews*, 38, 45-75, 1986.

Martín S; Crespo JA; Ferrado R; Garcia-Lecumberri C; Gil L; Ramos JA; Fernández-Ruiz JJ; Diez N; Manzanares J; Ambrosio E. Effects of Δ^9 -THC perinatal treatment of mothers on morphine and food operant reinforced behaviors in the adult offspring. *Society for Neurosciences Abstracts*, 1996.

Martini L; Dondi D, Limonta P; Maggi R; Piva F. Modulation by sex steroids of brain opioid receptors: Implications for the control of gonadotropins and protein secretion. *Journal of Steroid Biochemistry*, 33, 673-681, 1989.

Mason DJ; Welch SP. Δ^9 -THC induces increases in spinal dynorphin A (1-17) and leucine-enkephalin. *International Cannabinoid Research Society. Symposium on Cannabis and the Cannabinoids*, 1996.

Matsuda LA; Lolait SJ; Brownstein MJ; Young AC; Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-564, 1990.

McCarthy LE; Flora KP; Vishnuvajjala BR. Disparities in the antiemetic and behavioral actions of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and its 11-hydroxy metabolite in the cat. *Res Commun Subst Abuse*, 5, 103-114, 1984.

McDougall SA; Crawford CA; Nouneman AJ. Effects of irreversible dopamine receptor inactivation on locomotor activity and grooming in the 17- and 90 day-old rat. *Psychopharmacology*, 106, 502-510, 1992.

Mechoulam R. *Marihuana Chemistry*. *Science* 168, 1159-1166, 1970.

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 WA; 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 AR; Gopher A; Almong S; Martin BR; Compton DR; Pertwee RG; 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.

Mendelson JH. Marihuana. Psychopharmacology. the Third Generation of Progress. Meltzer HY. Ed. Raven Press, New York, 1565-1571, 1987.

Meyer DR; Sparber SB. Clonidine antagonized body weight loss and other symptoms used to measure withdrawal in morphine-pelleted rats given naloxone. Pharmacologist, 18, 236, 1976.

Middaugh LD. Prenatal amphetamine effects on behavior: possible mediation by brain monoamines. Annals of the New York Academy of Sciences, 562P, 308-318, 1989.

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

Mokler DA; Robinson SE; Johnson JH; Hong JS; Rosecrans JA. Neonatal administration of Δ^9 -THC alters the neurochemical response to stress in the adult F-344 rat. Neurotoxicology and Teratology, 9,

321-327, 1987.

Molina-Holgado F; Gonzalez MI; Leret ML. Effect of Δ^9 -THC on short-term memory in the rat. *Physiology and Behavior*, 57, 177-179, 1995.

Molina-Holgado F; Molina-Holgado E; Leret ML; Gonzalez MI; Reader TA. Distribution of indolamines and [3 H]paroxetine binding in rat brain regions following acute or perinatal Δ^9 -THC treatments. *Neurochemical Research*, 18, 1183-1191, 1993.

Morgan B; Brake SC; Hutchings DE; Miller N; Gamagaris Z. Δ^9 -THC during pregnancy in the rat: effects on development of RNA, DNA and protein in offspring brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 31, 365-369, 1988.

Moss DF; manderscheid PZ; Kobayasi H; Montgomery SP. Evidence for the nicotinic cholinergic hypothesis of cannabinoid action within the central nervous system: Extrapyramidal motors behaviors. *Marijuana: an international research report. Proceedings of the Melbourne symposium on cannabis, Melbourne, 2-4 septiembre, 359-364, 1987.*

Munro S; Thomas KL; Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-65, 1993.

Nahas GG. Toxicology and pharmacology. En *Marihuana in Science and Medicine*. GG Nahas (eds). Raven Press, New York, 102-247, 1984.

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

Navarro M; Fernández-Ruiz JJ; de Miguel R; Hernández ML; Cebeira M; Ramos JA. Motor disturbances induced by an acute dose of Δ^9 -THC: Possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations.

Pharmacology Biochemistry and Behavior, 45, 291-298, 1993a.

Navarro M; Fernández-Ruiz JJ; de Miguel R ; Hernandez ML; Cebeira M; Ramos JA. An acute dose of Δ^9 -THC affects behavioral and neurochemical indices of mesolimbic dopaminergic activity. Behavioral Brain Research, 57, 37-46, 1993b.

Navarro M; Rodriguez de Fonseca F; Hernández ML; Ramos JA; Fernández-Ruiz JJ. Motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity in adult rats perinatally exposed to cannabinoids. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 47, 47-58, 1994.

Negri L; Potenza RL; Corsi R; Melchiorri P. Evidence for two subtypes of δ opioid receptors in rat brain. European Journal of Pharmacology, 196, 335-336, 1991.

Noisin EL; Thomas W. Ontogenic of dopaminergic function in the rat midbrain tegmentum, corpus striatum and frontal cortex. Developmental Brain Research, 41, 241-252, 1988.

Ochoa-Mangado E. Tratamiento farmacológico de la drogadicción. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud, 16, 7, 161-169, 1992.

Paria BC; Das SK; Dey SK. The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 92, 9460-9464, 1995.

Paton WDM; Pertwee RG. The pharmacology of cannabis in animals, en Marijuana: Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects ed. by R. Mechoulam, Academic Press, New York, 191-265, 1973.

Perez-Reyes M; Wall ME. Presence of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in

human milk. *New England Journal of Medicine*, 307, 819-820, 1982.

Pertwee RG; Greentree SG. Δ^9 -THC induced catalepsy in mice is enhanced by pretreatment with flurazepam or chlordiazepoxide. *Neuropharmacology*, 27, 485-491, 1988.

Pertwee RG; Stevenson LA; Elrick DB; Mechoulam R; Corbett AD. Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse *vas deferens* and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *British Journal of Pharmacology*, 105, 980-984, 1992.

Poddar MK; Dewey WL. Effects of cannabinoids on catecholamine uptake and release in hypothalamic and striatal synaptosomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 214, 63-67, 1980.

Rang HP; Dale MM. *Farmacología*. Alhambra Longman, S.A., 1992.

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

Reche I; Fuentes JA; Ruiz-Gayo M. A role for central cannabinoid and opioid systems in peripheral Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-induced analgesia in mice. *European Journal of Pharmacology*, 301, 75-81, 1996.

Reche I; Fuentes JA; Ruiz-Gayo M. Potentiation of Δ^9 -THC induced analgesia by morphine in mice: Involvement of μ and κ opioid receptors. *European Journal of Pharmacology*, en prensa, 1996.

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

Rodríguez de Fonseca F; Cebeira M; Fernández-Ruiz JJ; Navarro M; Ramos JA. 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; Fernández-Ruiz JJ; Murphy LL; Eldridge JC; Steger RW; Bartke A. Effects of Δ^9 -THC exposure on adrenal medullary function: evidence of an acute effect and development of tolerance in chronic treatments. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 40, 593-598, 1991.

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

San Martín Clark O; Leza JC; Lizasoain I; Lorenzo P. Changes induced by sodium cromoglycate on brain serotonin turnover in morphine dependent and abstinence mice. *Psychopharmacology-Berlin*, 111, 2, 233-238, 1993.

Schuel H; Goldstein E; Mechoulam R; Zimmerman AM, 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 Sciences of the USA*, 91, 7678-7682, 1994.

Shan-Ching S; Jakubovic A. Interaction of a water derivative of Δ^9 -THC with [3 H]-diazepam and [3 H]-flunitrazepam binding to rat brain membranes. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and biological psychiatry*, 1, 335-340, 1987.

Sharma SK; Klee WA; Nirenberg M. Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 72, 3092-3096, 1975.

Slikker W; Cunny HC; Bailey JR; Paule MG. Placental transfer and fetal disposition of delta-9-tetrahydrocannabinol during late pregnancy in the Rhesus monkey, en Marijuana: an international research report. Proceedings of the Melbourne symposium on cannabis, Melbourne, 2-4 septiembre, 97-102, 1987.

Slipetz DM; Oneill GP; Favreau L; Dufresne C; Gallant M; Gareau Y; Guay D; Labelle M; Metters KM. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. Molecular Pharmacology, 48, 2, 352-361, 1995.

Smith PB; Compton DR; Welch SP; Razdan RK; Mechoulam R; Martin BR. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 270, 219-227, 1994.

Smith PB; Welch SP; Martin BR. Interactions between Δ^9 -tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 268, 1381-1387, 1994.

Spain JW; Roth BL; Coscia CJ. Differential ontogeny of multiple opioid receptors μ , δ and κ . The Journal of Neuroscience, 5, 3, 584-588, 1985.

Steele FR. Keeping a lid on marijuana research. Nature Medicine, 1, 853-854, 1995.

Swonger AK; Constantine LL. Drogas y Terapia. Ed Alhambra 1985.

Thorat SN; Bhargava HN. Evidence for a bidirectional cross-tolerance between morphine and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in mice. *European Journal of Pharmacology*, 260, 5-13, 1994.

Traynor JR; Elliot J. δ -opioid receptor subtypes and cross-talk with μ -receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14, 84-86, 1993.

Trovero F; Herve D; Desvan M; Glowinski J; Tassin JP. Striatal opiate μ receptors are not located on dopamine nerve endings in the rat. *Neuroscience*, 39, 2, 313-321, 1990.

Tsou K; Patrick LP; Walker JM. Physical withdrawal in rats tolerant to Δ^9 -tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, 280, R13-R15, 1995.

Tulunay FC; Ayman IH; Portoghese PS; Takemori AE. Antagonism by chlornaltrexamine of some effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rats. *European Journal of Pharmacology*, 70, 219-224, 1981.

Vaysse PJJJ; Gardner EL; Zukin RS. Modulation of rat brain opioid receptors by cannabinoids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 241, 2, 534-539, 1987.

Vela G; Fuentes JA; Bonnin A; Fernandez-Ruiz 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.

Villarreal JE; Guzman M; Smith CB. A comparison of the effects of d-amphetamine and morphine upon the locomotor activity of mice treated with drugs which alter brain catecholamine content. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 187, 1-7, 1973.

Vogel Z; Barg J; Rivka L; Saya D; Heldman E; Mechoulam R. Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *Journal of Neurochemistry*, 61, 352-355, 1993.

Walters DE; Carr LA. Perinatal exposure to cannabinoids alters neurochemical development in the rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 29, 213-216, 1988.

Waksman G; Hamel E; Fournié-Zaluski MC; Roques BP. Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and μ and δ opioid receptors in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83, 1523-1527, 1986.

Welch SP. Blockade of cannabinoid-induced antinociception by norbinaltorphimine, but not N,N-diallyltyrosine-Aib-phenylalanine-leucine, ICI 174,864 or naloxone in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 265, 633-640, 1993.

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

Wilkening D; Nirenberg M. Lipid requirement for long-lives morphine-dependent activations of adenylate cyclase of neuroblastome x glioma hybrid cells. *Journal of Neurochemistry*, 34, 321-326, 1980.

Wilson RS; May EL. Analgesic properties of the tetrahydrocannabinol, their metabolites, and analogs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18, 700-703, 1975.

Wolozin BL; Pasternak GW. Clasificación of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 78, 6181-6185, 1981.