



**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS**

Facultat de Ciències. Departament de Biologia  
Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut Laboratori  
de Neurofarmacologia

TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS CONDUCTUALES Y MODULACIÓN  
DE LA SÍNTESIS DE MONOAMINAS Y DE LA  
VÍA DE QUINASAS MITOGÉNICAS EN  
CEREBRO DE RATA TRAS TRATAMIENTOS  
CON CANNABINOIDES Y ETANOL**

**DAVID MORANTA MESQUIDA**

Palma de Mallorca, 2005



**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS  
FACULTAT DE CIÈNCIES  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA  
INSTITUT UNIVERSITARI D'INVESTIGACIONS  
EN CIÈNCIES DE LA SALUT**

Memoria que presenta David Moranta Mesquida  
para optar al título de Doctor en Biología

Firmado: David Moranta Mesquida



Los Doctores Susana Esteban Valdés y Jesús A. García Sevilla, como directores de la Tesis Doctoral titulada “Efectos conductuales y modulación de la síntesis de monoaminas y de la vía de quinasas mitogénicas en cerebro de rata tras tratamientos con cannabinoides y etanol”, realizada en el laboratorio de Neurofarmacología del Departamento de Biología de la Universitat de les Illes Balears, por el doctorando David Moranta Mesquida, autorizan la presentación de la mencionada Tesis Doctoral puesto que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Palma de Mallorca, septiembre 2005

Dra. Susana Esteban Valdés  
Profesora Titular de Fisiología

Dr. Jesús A. García Sevilla  
Catedrático de Farmacología



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda económica de una Beca de investigación predoctoral del programa de Formación de Personal Investigador (2001-2005) otorgada por el antiguo Ministerio de Ciencia y Tecnología y enmarcada dentro del proyecto de investigación BFI2000-0306, cuyo investigador principal fue el Dr. Jesús A. García Sevilla.

Sanofi-Synthelabo donó generosamente una pequeña cantidad del compuesto SR 141716A para poder realizar este estudio.



## **Agraïments**

Hi ha moltes persones, a les que m'agradaria mostrar el meu agraïment, sense les que aquest treball no hagués arribat a bon port. Ja no només per la seva ajuda directa o indirecta en la realització d'aquesta tesi, sinó pel seu suport i sobretot per la seva companyia en aquest llarg camí i que ha estat el que m'ha fet tirar endavant quan faltaven les forces. Per desgràcia, en aquest darrer any d'aclaparaments he expressat poc el meu agraïment a totes les persones que s'ho mereixien, per això vull aprofitar aquest moment per fer-ho. Si em deix qualcú segurament serà per una mala jugada del meu cap... que no són poques.

Primer de tot a les persones que més s'ho mereixen, en Biel i na Maria, pel seu suport altruista i incondicional en tot moment i per la tranquil·litat i seguretat que em transmeten.

Molt sincerament, a la Dra. Susana Esteban, la responsable directa de que aquest projecte comencés i que la tesi hagi tirat endavant. Pel seu suport i ajuda en tot moment, per la seva gran dedicació i la seva inestimable direcció científica. Perquè ha estat la principal font de les coses que he après durant aquests anys. Per la seva franquesa, proximitat, la seva implicació completa, per ser tan pràctica, per la seva força i perquè si no hi hagués estat tot hagués segut molt diferent.

Al Dr. Jesús A. García Sevilla per la seva direcció i ajuda, i per donar-me l'oportunitat de fer el treball al seu laboratori. Al Dr. Antoni Miralles per la seva ajuda científica i personal. Al Dr. Toni Sastre per la seva paciència.

Al meus germans per estimar-me incondicionalment. A na Xisca i en Paco, en Juan i na Mar, en Pep i n'Agnès, per acollir-me en tot moment i per ser el meu refugi, uns a Palma i altres a Barcelona. A na Mimà i en Pedro, per ser com són, per la seva complicitat i per estimar-me tant.

A na Laura, na Clara, na Mariona, en Nil i el que ha de venir, perquè m'ensenyen sempre quines són les coses importants de la vida i perquè han estat els estels que més brillaven indicant el nord en els mals moments.

A sa padrina, per ser tant forta i caparruda, per acollir-me i tenir sempre sa taula parada.

A na Marga i na Cati per moltes coses, però sobretot per estimar-me.

A na Celia i na Sara per estar allà en tot moment i pel seu suport en les males èpoques... entre d'altres moltes coses. A en Pere, per la seva energia, el seu entusiasme,

capacitat de feina i la seva ajuda a l'estabulari. A na Noelia, per la seva frescor, energia i entusiasme.

Agrair també als companys de laboratori que al llarg d'aquest any han compartit moltes hores amb mi, tant a dins com a fora del laboratori. Als Drs. Pablo Escrivà i Francisca Barceló pel seus consells i ajuda. A na Julia per ajudar-me en la feina d'estabulari sempre que ho he necessitat encara que ella no s'hagi deixat ajudar. A en Víctor pel seu suport, la seva ajuda, tot el que m'ha ensenyat i per la seva amistat. A en Jorge i Oliver pel seu caràcter extravertit i bon humor. A en Prades per la seva presència. A na Sílvia pels seus cigarrets, cafès i companyia. A na Carmela per moltes coses però sobretot per ensenyar-me el cel i l'infern per aquest ordre. A na Regina, na Tünde, na Viky, en Jesús, na Asun, na Maite, n'Esther, etc. per la seva companyia al laboratori.

Al laboratori del Dr. Maldonado de la Universitat Pompeu Fabra de Barcelona per acollir-me i integrar-me tant a Barcelona com a Sevilla. Especialment a na Ana Catañé per la seva paciència i a la Dra. Olga Valverde per la seva amabilitat.

A la gent del país Basc i altres universitats per fer els congressos més animats. Especialment a na Aitziber per compartir i fer l'estada a Barcelona més curta i per venir-me a veure i a na Guada a qui no varem fer molt de cas i esper que torni per Mallorca.

A la família "micro" per acollir-me, encara que ells no saben que els hi he deixat. Especialment a na Mar pels seus ànims, a na Micki per ser com és i a na Balbina.

A la gent de San Francesc: Marta, Tita, Amalia, Xisca, Marteta, Marga, Lluís, Jordi, Gori, David, Juan, Albert, Sofia, etc. per confiar encara amb jo. Especialment a en Jesús encara que mai m'entengui i molt especialment a sa meva "compi", n'Elisa, per tantes coses que no sé per ón començar.

Als biòlegs, Vicent, Gabi, Guillermo, Roberto, Dani, Cèlia, Tere, Mari, etc. per compartir aquest viatge encara que en alguns casos hagi estat d'enfora.

A en Diego, na Juana, en Tomeu, en Toni, na Laura, en Damià i na Julia, pels vespres truquers.

I als que han compartit les aventures de cap de setmana que han mantingut la meva cordura: Tito, Edu, Mateo, Àngela, Emma, Silvia, Damià, Enri, Toni, Guillem, Damon, etc.

A tots, gràcies per la vostra paciència.

A sa padrina



## ABREVIATURAS

Ach	acetilcolina		
ADH	alcohol deshidrogenasa	IPSC	inhibición de las corrientes postsinápticas
ALDH	aldehído deshidrogenasa		
2-AG	2-araquidonilglicerol	K <sup>+</sup>	iones potasio
5-HIAA	ácido 5-hidroxi indolacético	MAPK	proteína quinasa activada por señales mitógenas
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina		
5-HTP	5-hidroxitriptófano		
AEA	anandamida	NA	noradrenalina
AM	AM 281; antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB <sub>1</sub>	NAD(P)	nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)
AMPC	adenosina monofosfato cíclico	NAE	N-acetiletanolamina
ARNm	ácido ribonucleico mensajero	NAPE	N-acilfosfatidil etanolamina
ATP	adenosina trifosfato		
Ca <sup>2+</sup>	iones calcio	NMDA	N-metil-D-aspartato
CB	receptor cannabinoide	NO	óxido nítrico
CRF	factor de liberación de corticotropinas	NOSi/c	isoformas inducibles y constitucional de la óxido nítrico sintasa
DA	dopamina		
DSI	supresión de la inhibición inducida por la despolarización	NSD	NSD 1015; inhibidor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
DSE	supresión de la estimulación inducida por la despolarización	PI3K	fosfatidil inositol 3 quinasa
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina	PKA	proteína quinasa A
DOPAC	ácido hidroxifenilacético	PKB	proteína quinasa B
EDTA	ácido etilenediamino tetraacético	PKC	proteína quinasa C
FAAH	amidohidrolasa de ácidos grasos	PLA	fosfolipasa A
G <sub>αi/o/s</sub>	proteínas G compuestas por distintos tipos de subunidades tipo α	PLC	fosfolipasa C
GABA	ácido γ-aminobutírico	REM	movimientos oculares rápidos
GIRK	canales de potasio activados por proteínas G	SNC	sistema nervioso central
Gly	glicina	SR	SR141716A; antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB <sub>1</sub>
GTP	guanosina trifosfato		
HPLC	cromatografía líquida de alta presión	THC	Δ <sup>9</sup> -tetrahidrocannabinol
HVA	ácido homovanílico	T <sup>a</sup>	temperatura
		TH	tirosina hidroxilasa
		TPH	triptófano hidroxilasa
		VTA	área ventrotegmental
		WIN	WIN 55,212-2; agonista de receptores cannabinoides



# ÍNDICE



## ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 CANNABIS</b> .....	3
<b>1.1.1 Importancia y características de su consumo</b> .....	3
<b>1.1.2 Compuestos cannabinoides</b> .....	4
<b>1.1.3 Farmacocinética y metabolismo del THC</b> .....	8
<b>1.1.4 Efectos farmacológicos del consumo de cannabis</b> .....	9
<b>1.1.5 Receptor cannabinoide</b> .....	11
<b>1.1.6 Endocannabinoides</b> .....	17
<b>1.1.7 Mecanismos de transducción de señal a través del receptor         cannabinoide CB<sub>1</sub></b> .....	22
<b>1.1.8 Características del consumo continuado de cannabis</b> .....	29
<b><i>1.1.8.1 Fenómeno de tolerancia</i></b> .....	29
<b><i>1.1.8.1.1 Mecanismos implicados en la tolerancia cannabinoide</i></b> .....	29
1.1.8.1.1.1 Mecanismos de tipo farmacocinético .....	29
1.1.8.1.1.2 Mecanismos de tipo farmacodinámico .....	30
<b><i>1.1.8.2 Potencial adictivo de los cannabinoides</i></b> .....	32
<b><i>1.1.8.3 Dependencia a cannabinoides</i></b> .....	35

<b>1.2 ETANOL (ALCOHOL ETÍLICO)</b> .....	38
<b>1.2.1 Consumo de etanol</b> .....	38
<b>1.2.2 Efectos farmacológicos del consumo de etanol</b> .....	39
<b>1.2.3 Absorción y distribución del etanol</b> .....	41
<b>1.2.4 Metabolismo y eliminación del etanol</b> .....	42
<i>1.2.4.1 Papel del acetaldehído</i> .....	44
<b>1.2.5 Mecanismo de acción para los efectos psicoactivos del etanol</b>	44
<i>1.2.5.1 Receptor GABA<sub>A</sub></i> .....	46
<i>1.2.5.2 Receptor NMDA</i> .....	47
<i>1.2.5.3 Otros mecanismos</i> .....	49
<b>1.2.6 Propiedades reforzantes del etanol</b> .....	51
<b>1.2.7 Cambios tras la exposición crónica a etanol</b> .....	52
<b>1.2.8 Componente genético de las acciones del etanol</b> .....	54
<b>1.3 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MONOAMINAS POR RECEPTORES</b>	
<b>PRESINÁPTICOS</b> .....	55
<b>1.3.1 Identificación y caracterización de los receptores</b>	
<b>presinápticos</b> .....	55
<b>1.3.2 Regulación de la síntesis de catecolaminas</b> .....	57
<b>1.3.3 Regulación de la síntesis de serotonina</b> .....	60
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	63

<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1 MATERIALES .....</b>	<b>69</b>
<b>3.1.1 Animales de experimentación .....</b>	<b>69</b>
<b>3.1.2 Fármacos y productos utilizados .....</b>	<b>69</b>
<i>3.1.2.1 Fármacos cannabinoides .....</i>	<i>69</i>
<i>3.1.2.2 Otros fármacos utilizados .....</i>	<i>70</i>
<i>3.1.2.3 Clorhidrato de 3-hidroxibenzil-hidrazina (NSD 1015) .....</i>	<i>70</i>
<i>3.1.2.4 Anticuerpos .....</i>	<i>71</i>
<i>3.1.2.5 Otros reactivos .....</i>	<i>73</i>
<b>3.2 MÉTODOS .....</b>	<b>74</b>
<b>3.2.1 Tratamientos farmacológicos.....</b>	<b>74</b>
<b>3.2.1.1 Tratamientos con fármacos cannabinoides .....</b>	<b>74</b>
<i>3.2.1.1.1 Tratamientos agudos con fármacos cannabinoides .....</i>	<i>75</i>
<i>3.2.1.1.2 Tratamientos crónicos con fármacos cannabinoides ....</i>	<i>76</i>
<i>3.2.1.1.3 Tratamientos para el estudio de la sensibilidad de</i> <i>receptores presinápticos .....</i>	<i>77</i>
<b>3.2.1.2 Tratamientos con etanol .....</b>	<b>77</b>
<i>3.2.1.2.1 Tratamientos agudos y crónicos con etanol .....</i>	<i>77</i>
<i>3.2.1.2.2 Tratamientos para el estudio de la sensibilidad de</i> <i>receptores presinápticos .....</i>	<i>78</i>
<i>3.2.1.2.3 Tratamiento combinado etanol y cannabinoides .....</i>	<i>78</i>

<b>3.2.2 Análisis conductual</b> .....	78
<b>3.2.2.1 Determinación de la actividad analgésica (Tail flick test)</b> .....	78
<b>3.2.2.2 Determinación de la temperatura rectal</b> .....	80
<b>3.2.2.3 Cuantificación de la actividad locomotora espontánea</b> .....	80
<b>3.2.2.4 Valoración de la abstinencia a cannabinoides precipitada por SR141716A</b> .....	82
<b>3.2.3 Determinación cromatográfica de la actividad tirosina hidroxilasa (síntesis de DOPA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HTP) in vivo</b> .....	84
<b>3.2.3.1 Disección y preparación de muestras</b> .....	84
<b>3.2.3.2 Análisis cromatográfico</b> .....	85
<b>3.2.4 Detección y cuantificación de la inmunoreactividad de proteínas mediante la técnica de western blot</b> .....	87
<b>3.2.4.1 Preparación de la muestra</b> .....	87
<b>3.2.4.2 Electroforesis</b> .....	88
<b>3.2.4.3 Electrotransferencia (western blot)</b> .....	90
<b>3.2.4.4 Sistema de detección</b> .....	92
<b>3.2.4.5 Cuantificación fotodensitométrica</b> .....	93
<b>3.2.5 Determinación del contenido proteico de las muestras. Método del ácido biciconínico (BCA)</b> .....	94
<b>3.2.6 Análisis matemático de los resultados</b> .....	95

<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>97</b>
<b>4.1 EFECTOS CONDUCTUALES DE TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES .....</b>	<b>99</b>
<b>4.1.1 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos     cannabinoides sobre la sensibilidad al dolor y la T<sup>a</sup> rectal .....</b>	<b>99</b>
<b>4.1.2 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos     cannabinoides sobre la actividad locomotora espontánea .....</b>	<b>102</b>
<b>4.1.3 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 sobre la     actividad locomotora espontánea .....</b>	<b>108</b>
<b>4.1.4 Síndrome de abstinencia precipitado por SR141716A tras     tratamiento crónico con WIN 55,212-2 .....</b>	<b>111</b>
<b>4.2 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS .....</b>	<b>116</b>
<b>4.2.1 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos     cannabinoides sobre la síntesis de monoaminas .....</b>	<b>116</b>
<b><i>4.2.1.1 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos         cannabinoides sobre la síntesis de noradrenalina en el         cerebro de rata .....</i></b>	<b>116</b>
<b><i>4.2.1.1.1 Efecto de los agonistas cannabinoides .....</i></b>	<b>116</b>
<b><i>4.2.1.1.2 Efecto del pretratamiento con antagonistas selectivos             del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> sobre el efecto agudo             de los agonistas cannabinoides .....</i></b>	<b>119</b>

<b>4.2.1.2 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos cannabinoides sobre la síntesis de dopamina en el cerebro de rata</b> .....	120
4.2.1.2.1 Efecto de los agonistas cannabinoides .....	120
4.2.1.2.2 Efecto del pretratamiento con antagonistas selectivos del receptor cannabinoide CB <sub>1</sub> sobre el efecto agudo de los agonistas cannabinoides .....	121
<b>4.2.1.3 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos cannabinoides sobre la síntesis de serotonina en el cerebro de rata</b> .....	121
4.2.1.3.1 Efecto de los agonistas cannabinoides .....	121
4.2.1.3.2 Efecto del pretratamiento con antagonistas selectivos del receptor cannabinoide CB <sub>1</sub> sobre el efecto agudo de los agonistas cannabinoides .....	123
<b>4.2.2 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la síntesis de monoaminas en el cerebro de rata</b> .....	123
<b>4.2.2.1 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la síntesis de noradrenalina en el cerebro de rata</b> .....	124
4.2.2.1.1 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 .....	124
4.2.2.1.2 Efecto de la abstinencia provocada por SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2 .....	124

4.2.2.2 <i>Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la síntesis de dopamina en el cerebro de rata</i> .....	126
4.2.2.2.1 <i>Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2</i> .....	126
4.2.2.2.2 <i>Efecto de la abstinencia provocada por SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2</i> .....	126
4.2.2.3 <i>Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la síntesis de serotonina en el cerebro de rata</i> .....	126
4.2.2.3.1 <i>Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2</i> .....	126
4.2.2.3.2 <i>Efecto de la abstinencia provocada por SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2</i> .....	128
<b>4.2.3 Modulación de la funcionalidad de receptores presinápticos por tratamientos crónicos con el agonista cannabinoide WIN 55,212-2</b> .....	128
4.2.3.1 <i>Modulación de la funcionalidad de los receptores presinápticos adrenérgicos <math>\alpha_2</math></i> .....	128
4.2.3.2 <i>Modulación de la funcionalidad de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub></i> .....	131
4.2.3.3 <i>Modulación de la funcionalidad de los receptores presinápticos serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub></i> .....	134

<b>4.3 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON ETANOL SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS .....</b>	<b>137</b>
<b>4.3.1 Efectos de los tratamientos con alcohol sobre la síntesis de monoaminas .....</b>	<b>137</b>
<b>4.3.2 Modulación de la funcionalidad de los receptores serotonina 5-HT<sub>1A</sub> tras la exposición crónica a alcohol .....</b>	<b>138</b>
<b>4.4 DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB<sub>1</sub> TRAS TRATAMIENTOS CON ETANOL .....</b>	<b>141</b>
<b>4.5 EFECTOS DE TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES Y ETANOL SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE QUINASAS MITOGÉNICAS (MAPK) DE LA SUBFAMILIA DE ERK.....</b>	<b>144</b>
<b>4.5.1 Efecto de tratamientos con WIN 55,212-2 sobre la vía de señalización intracelular de ERK.....</b>	<b>144</b>
<i>4.5.1.1 Efecto agudo del WIN 55,212-2 sobre los niveles de fosforilación de los distintos componentes de la cascada ERK (c-Raf, MEK1/2 y ERK1/2) a través del receptor CB<sub>1</sub></i>	<b>144</b>
<i>4.5.1.2 Efecto agudo del pretratamiento con un inhibidor selectivo de MEK1/2 sobre el efecto agudo del WIN 55,212-2 .....</i>	<b>147</b>
<i>4.5.1.3 Efecto agudo del pretratamiento con un antagonista selectivo de receptores para NMDA sobre el efecto agudo del WIN 55,212-2 .....</i>	<b>147</b>
<i>4.5.1.4 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la vía de señalización de ERK .....</i>	<b>150</b>

<b>4.5.2 Modulación de la vía de señalización intracelular de ERK por           tratamientos agudos y crónicos con etanol .....</b>	<b>152</b>
<b>5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>155</b>
<b>5.1 EFECTOS CONDUCTUALES DE LOS TRATAMIENTOS CON       COMPUESTOS CANNABINOIDES .....</b>	<b>157</b>
<b>5.1.1 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos           cannabinoides sobre la sensibilidad al dolor y la temperatura           rectal .....</b>	<b>157</b>
<b>5.1.2 Efecto de los tratamientos agudos sobre la actividad           locomotora espontánea .....</b>	<b>158</b>
<b>5.1.3 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 sobre la           actividad locomotora espontánea .....</b>	<b>162</b>
<b>5.1.4 Síndrome de abstinencia precipitado por SR141716A tras           tratamiento crónico con WIN 55,212-2 .....</b>	<b>164</b>
<b>5.2 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS       CANNABINOIDES SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS .....</b>	<b>165</b>
<b>5.2.1 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos           cannabinoides sobre la síntesis de monoaminas .....</b>	<b>165</b>
<b>5.2.2 Efecto de los tratamientos crónicos con compuestos           cannabinoides sobre la síntesis de monoaminas en el cerebro           de rata .....</b>	<b>169</b>
<b>5.2.3 Modulación de la funcionalidad de los receptores           presinápticos adrenérgico <math>\alpha_2</math> y serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-           HT<sub>1B</sub> tras tratamientos crónicos con el agonista cannabinoide           WIN 55,212-2.....</b>	<b>171</b>

<b>5.3 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON ETANOL SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS .....</b>	<b>176</b>
<b>5.3.1 Efectos de los tratamientos con etanol sobre la síntesis de monoaminas .....</b>	<b>176</b>
<b>5.3.2 Modulación de la funcionalidad de los receptores serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> tras la exposición crónica a etanol .....</b>	<b>178</b>
<b>5.4 DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB<sub>1</sub> TRAS TRATAMIENTOS CON ETANOL .....</b>	<b>179</b>
<b>5.5 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES Y ETANOL SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE ERK</b>	<b>181</b>
<b>5.5.1 Efecto del tratamiento agudo con WIN 55,212-2 sobre la vía de señalización de quinasas mitogénicas (MAPK) de la subfamilia de ERK .....</b>	<b>181</b>
<b>5.5.2 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la vía de señalización de quinasas mitogénicas (MAPK) de la subfamilia de ERK .....</b>	<b>183</b>
<b>5.5.3 Modulación de la vía de señalización de las MAPK por tratamientos agudo y crónico con etanol.....</b>	<b>184</b>
<b>5.5.4 Modulación de la vía de señalización de las MAPK y síntesis de monoaminas .....</b>	<b>186</b>
<b>6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>187</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>191</b>

# **INTRODUCCIÓN**



## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 CANNABIS

#### 1.1.1 Importancia y características de su consumo

El consumo de derivados de la planta del cáñamo (*Cannabis sativa*) como sustancia psicotropa es muy antiguo (Fig. 1.1). Su uso era ya especialmente importante en culturas del norte de África y de Oriente Medio. Inicialmente, su consumo buscaba las propiedades curativas que se le han asociado a lo largo de la historia aunque, en dichas culturas, siempre llevaba asociados aspectos sociales o religiosos. Actualmente, el consumo de cannabis está ampliamente extendido por todo el mundo y, desde hace ya años, se ha convertido en una de las drogas ilegales más consumidas en muchos países. Junto con el Reino Unido y Dinamarca, España se encuentra a la cabeza europea del consumo de cannabis (Bobes y Calafat, 2000), donde según el Plan Nacional sobre Drogas de 1998 casi un 22% de los españoles de entre 15 y 65 años referían haber consumido cannabis en alguna ocasión, mientras que casi un 1% lo hace diariamente.



**Fig. 1.1** Planta del cáñamo (*Cannabis sativa*), foto de la izquierda, utilizada para obtener los distintos preparados que se consumen, foto de la derecha.

La planta del cáñamo que se utiliza para usos textiles e industriales y la que se utiliza como droga recreacional son de la misma especie pero de distintas variedades. Las variedades india y americana de la planta del cáñamo son las que presentan las propiedades psicoactivas más potentes (Bobes y Calafat, 2000). Contienen gran cantidad de productos químicos distintos, muchos de los cuales son compuestos que se pueden denominar cannabinoides. Entre ellos se encuentra el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) que es el responsable de la mayor parte de los efectos psicoactivos derivados del

consumo de cannabis. Las formas más habituales en que encontramos estos productos para el consumo son: la marihuana, que consiste en una preparación triturada y seca de las inflorescencias de la planta femenina, y el “hachís” que consiste en el exudado resinoso de la planta presentado en bloques de consistencia pétrea (Fig. 1.1). Tanto uno como otro suelen fumarse mezclados con tabaco. También suelen consumirse por vía oral, aunque es menos común, mezclados con distintos alimentos o en infusiones. Estas diferentes vías de consumo influyen en el grado de absorción y la velocidad de difusión de los compuestos. Además, las propiedades farmacológicas de los derivados del cannabis están determinadas por la distinta proporción de los diversos compuestos cannabinoides en las diferentes preparaciones.

### 1.1.2 Compuestos cannabinoides

El término cannabinoide inicialmente describía aquellas sustancias que tienen estructura carbocíclica con 21 carbonos formados por tres anillos, ciclohexano, tetrahidropirano y benceno (estructura de dibenzopirano) (Fig. 1.2). Son compuestos muy hidrofóbicos que se disuelven bien en lípidos por lo que sus características de distribución en el organismo y eliminación presentan diferencias importantes con otras drogas de abuso. Entre ellos se encuentran los responsables del poder psicoactivo de los diversos preparados procedentes de la planta, principalmente el THC (Mendelson, 1987; Pertwee, 1999a).

También se han sintetizado diversos análogos sintéticos del THC (Fig. 1.3), como el dronabinol o marinol, y la nabilona que han sido utilizados en algunos países con fines terapéuticos (Pertwee, 1999a), aprovechando por ejemplo su marcado poder antiemético o su efecto reductor de la presión intraocular.

Las propiedades farmacológicas de estos compuestos cannabinoides dependen de su estructura química. Pequeñas modificaciones en esta estructura pueden provocar cambios importantes en su actividad. Así, el estudio de estas relaciones entre estructura y actividad ha permitido diseñar análogos estructurales, modificando su marcado carácter hidrofóbico o aumentando la afinidad por sus receptores (ver apartado “Receptor cannabinoide”), que han resultado de gran utilidad para su estudio farmacológico y fisiológico (Howlett y cols., 2002). De esta forma, se han obtenido análogos no clásicos como los compuestos bicíclicos y tetracíclicos (Fig. 1.3), como por

ejemplo el compuesto bicíclico CP-55,940; y los aminoalquilindoles (Fig. 1.3), como por ejemplo el WIN 55,212-2 de gran afinidad por los receptores cannabinoides (Bell y cols., 1991; Howlett y cols., 2002), que tienen una estructura química derivada de la pravadolina. Son compuestos que no están relacionados estructuralmente con los cannabinoides pero que presentan un perfil farmacológico cannabimimético que en roedores se define por la llamada tétrada conductual (reducción de la actividad motora, analgesia, hipotermia y catalepsia) (Martin y cols., 1991). Al parecer el sitio de unión de los distintos tipos de ligandos al receptor cannabinoide es el mismo. De hecho se ha descrito que los tres tipos de compuestos son capaces de desplazarse mutuamente en su unión a los distintos receptores para cannabinoides identificados hasta el momento (Pertwee, 1999a).

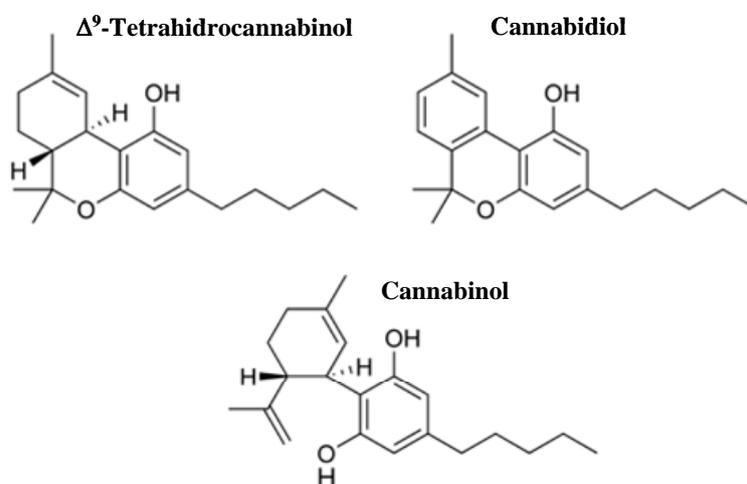


Fig. 1.2 Agonistas cannabinoides naturales

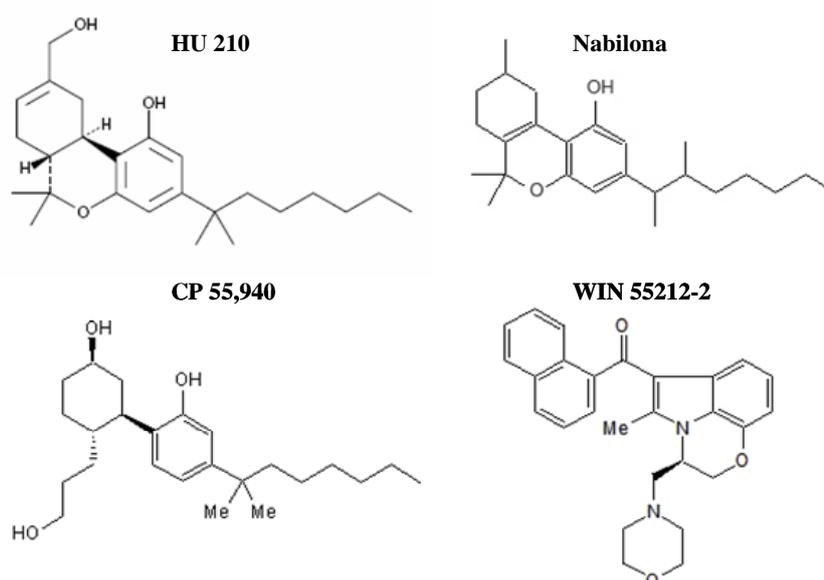
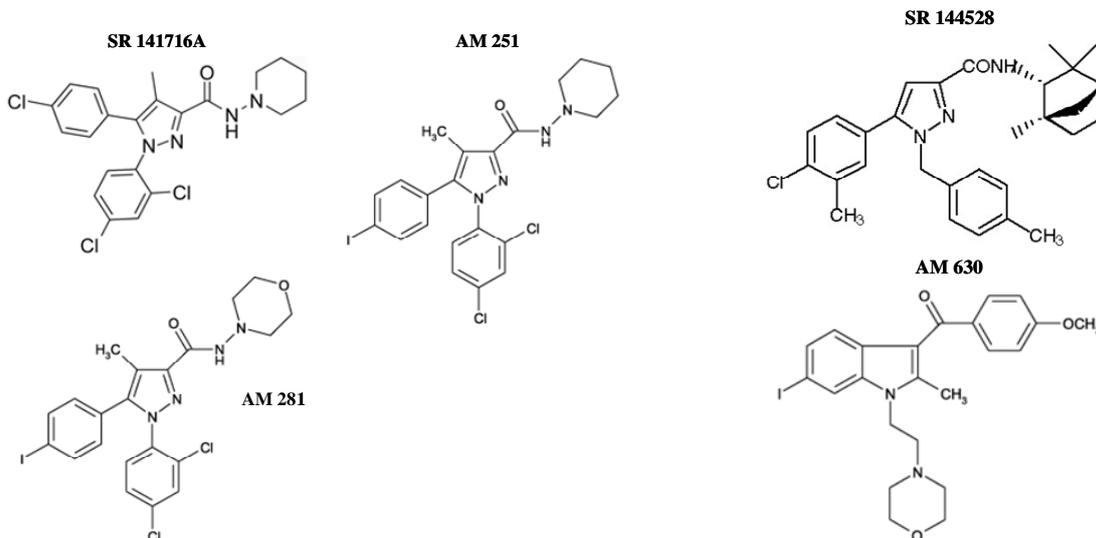


Fig. 1.3 Otros agonistas cannabinoides



**Fig. 1.4** Antagonistas del receptor CB<sub>1</sub>

**Fig. 1.5** Antagonistas del receptor CB<sub>2</sub>

Un avance importante en el estudio de los mecanismos de acción de los cannabinoides consistió en la síntesis de antagonistas selectivos (Fig. 1.4 y Fig. 1.5), una vez clonados sus receptores (hasta la fecha el CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>) (Matsuda y cols., 1990; Munro y cols., 1993). El primero de ellos fue el diarilpirazol SR141716A, desarrollado por Sanofi (Rinaldi-Carmona y cols., 1994; Pertwee, 1999a). Se trata de un antagonista muy potente y extraordinariamente selectivo para el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> que realmente previene o incluso revierte los efectos mediados por este receptor tanto *in vitro* como *in vivo* (Rinaldi-Carmona y cols., 1994). Hay evidencias que demuestran que este compuesto produce efectos por si solo y que van al contrario de los efectos que producen agonistas sobre el receptor CB<sub>1</sub>. Al parecer se comporta realmente como un agonista inverso de este receptor (Bouaboula y cols., 1997; MacLennan y cols., 1998; Mato y cols., 2002). También se han sintetizado distintos análogos estructurales, entre los que se encuentra el AM281 también muy selectivo por el receptor CB<sub>1</sub> y que también se comporta como un agonista inverso (Gatley y cols., 1998; Cosenza y cols., 2000). Para el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> también se han obtenido antagonistas selectivos (Rinaldi-Carmona y cols., 1998) y muchos de estos también parece que actúan como agonistas inversos (Fig. 1.5).

Además, el clonaje de los receptores para cannabinoides permitió identificar una serie de moléculas propuestas como sus ligandos endógenos. Son los denominados cannabinoides endógenos o “endocannabinoides” (Fig. 1.6) que, aunque son estructuralmente diferentes a los cannabinoides presentes en las preparaciones de la planta *Cannabis sativa*, forman parte de un sistema de modulación del organismo que contiene las dianas sobre las que actúan los cannabinoides vegetales. El aislamiento del primer ligando endógeno de los receptores cannabinoides se realizó a partir de un extracto lipídico de cerebro de cerdo del que se obtuvo la araquidoniletanolamina, más conocida como anandamida (Devane y cols., 1992); y más tarde, se aisló el 2-araquidilglicerol (Mechoulam y cols., 1995). Estos son dos de los cannabinoides endógenos mejor caracterizados, aunque recientemente también se han aislado nuevos candidatos endocannabinoides como el 2-araquidil gliceril éter (Hanus y cols., 2001). Estos compuestos presentan una estructura química muy diferente de la de los cannabinoides vegetales y sintéticos, por lo que muchos efectos fisiológicos pueden diferir. Se trata de compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, concretamente son etanolaminas del ácido araquidónico; compuestos muy sensibles a la hidrólisis enzimática (ver apartado “Endocannabinoides”). A esta familia de compuestos pertenecen unos derivados sintéticos más estables a la hidrólisis enzimática (Fig. 1.7), entre los que encontramos la metanandamida (Pertwee, 1999a).

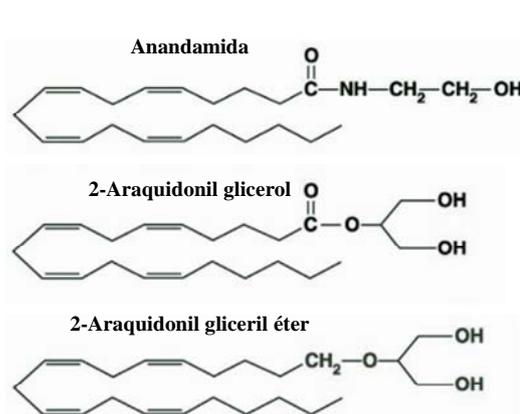


Fig. 1.6 Endocannabinoides

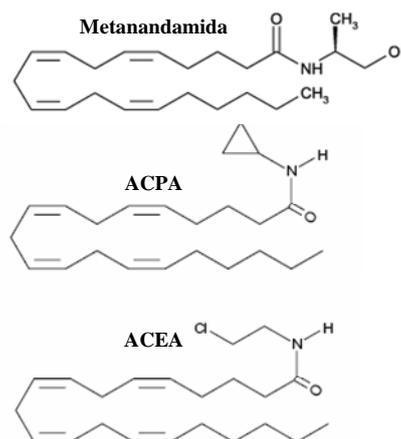


Fig. 1.7 Análogos de los endocannabinoides

### 1.1.3 Farmacocinética y metabolismo del $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC)

El THC es bastante inestable pudiendo ser degradado por el calor, la luz, los ácidos y el oxígeno atmosférico. Por vía oral, el THC es captado principalmente por coabsorción con lípidos y su biodisponibilidad se ve reducida debido a su sensibilidad a la acidez gástrica y por el metabolismo hepático e intestinal (Bobes y Calafat, 2000). En cambio, por vía inhalatoria su biodisponibilidad es mayor, apareciendo rápidamente en sangre. La entrada del THC en sangre y su posterior distribución en tejidos es muy rápida y su cinética es muy parecida tanto en administraciones intravenosas como inhalatoria. Tras aspirar el humo de un cigarrillo de marihuana o hachís, los efectos son inmediatos, alcanzan un máximo sobre los 20-30 min y puede durar unas 2-3 horas; en cambio por vía oral se necesitan unas 3 horas para que se alcancen los niveles máximos en sangre (Bobes y Calafat, 2000).

Tras la administración aguda de THC se acumula en tejidos como el pulmón, riñón, hígado, corazón, bazo, corteza adrenal, tiroides, tejido adiposo marrón; sin embargo, en testículos y cerebro se encuentra en baja cantidad. La proporción que pasa al cerebro es alrededor de un 0,6%. Esta poca penetración en el tejido cerebral, a pesar de la elevada liposolubilidad del THC, parece depender de su firme unión a lipoproteínas plasmáticas. Solo alrededor de un 3% del THC que viaja en sangre se encuentra en forma libre. Posteriormente, debido a su marcado carácter hidrófobo, se acumula en tejido adiposo, siendo este, junto con el bazo, los principales depósitos tres días después del cese de la administración. Desde el tejido adiposo, la droga se libera lentamente, por eso, aún se puede detectar en orina varias semanas después de su consumo (Bobes y Calafat, 2000).

El THC se metaboliza principalmente en el hígado por el sistema microsómico hepático, originando gran variedad de metabolitos. Otros órganos como el pulmón y el intestino también participan en menor medida en su metabolismo. La primera enzima que actúa en el catabolismo del THC es el citocromo P-450 que lo oxida a derivados mono-, di- o trihidroxilados (Matsunaga y cols., 1995). Estos compuestos hidroxilados son transformados, posteriormente, en otros metabolitos más polares, por rotura de la cadena lateral y oxidación al correspondiente ácido carboxílico. El 9-carboxi-THC es el principal compuesto que se elimina por la orina y por eso suele utilizarse como marcador biológico del consumo de cannabinoides (Huestis y cols., 1996; Gustafson y

cols., 2004). La vida media del THC en el organismo varía en función de si se ha expuesto previamente a un tratamiento prolongado con este compuesto, siendo en humanos alrededor de unas 50 horas aunque se ve reducida en usuarios crónicos de marihuana. Estas variaciones, podrían relacionarse con una inducción de enzimas que lo metabolizan o con un mayor secuestro por parte de los distintos tejidos tras la exposición crónica (Bobes y Calafat, 2000; Gustafson y cols., 2004).

La farmacocinética y el metabolismo de otros cannabinoides exógenos pueden variar sensiblemente sobretodo en el caso de los derivados aminoalquilindoles (como el WIN 55,212-2) que son los que difieren más en su estructura. Se trata de compuestos que aunque tienen un carácter hidrofóbico bastante marcado, son más polares y por tanto se disuelven mejor en un medio acuoso y son eliminados más rápidamente del organismo.

#### **1.1.4 Efectos farmacológicos del consumo de cannabis**

Los efectos del cannabis varían según la diferente proporción de cannabinoides existente en la preparación. Los efectos conductuales de los cannabinoides en humanos son muy complejos y dependen de muchas variables. Además de la dosis y de la vía de administración, los efectos sobre la conducta y el estado mental también dependen de la personalidad, las expectativas y la experiencia del consumidor, así como de las condiciones ambientales en que se realiza su consumo. En general, el consumo de cannabis suele producir un estado de relajación. A dosis bajas los efectos predominantes son de tipo depresor pero se convierten en excitatorios tras estímulos mínimos mientras que a dosis altas los efectos son claramente depresores (Ameri, 1999). En roedores ocurre algo parecido; tras la administración de cannabinoides los animales se encuentran aparentemente tranquilos e inmóviles, pero si alguno de ellos es estimulado con un leve ruido o movimiento, responde de forma exagerada en forma de vocalizaciones, saltando, etc. (Pertwee, 1997). Cuando se consume en solitario, predominan efectos depresores, como la apatía y somnolencia, pero en un ambiente social apropiado el efecto eufórico puede manifestarse como logorrea, gregarismo y aparente hilaridad. También existe, generalmente, una sobreestimulación sensorial y pueden llegar a producirse alucinaciones auditivas, visuales o táctiles en las que el juicio de la realidad se mantiene intacto. Se pierde la capacidad de realizar pequeñas tareas que requieren cierto número de procesos y aparecen trastornos en la capacidad de

concentración y en la memoria inmediata. Al final, la intoxicación termina en sedación, letargia y somnolencia, como con la mayoría de depresores del SNC (Perez-Reyes y cols., 1991; Ameri, 1999). Los cannabinoides también aumentan el apetito y alteran la coordinación motora; producen taquicardia y dilatación de los vasos conjuntivales y esclerales, lo que produce el característico efecto de ojos rojos. A veces, también se observa cierta ptosis palpebral, sequedad de boca e inhibición de la sudoración. Además, el consumo de cannabis puede precipitar ataques de pánico y de ansiedad; y también se han descrito psicosis agudas, caracterizadas por alucinaciones paranoides con la percepción de la realidad intacta, así como recaídas en pacientes esquizofrénicos. Su consumo como droga recreacional suele estar muy frecuentemente acompañado por alcohol, lo que aumenta la incoordinación motora y la sedación, entre otros (Bobes y Calafat, 2000). En modelos animales también se han descrito otros efectos farmacológicos como son hipoquinesia, catalepsia, hipotermia y efectos cardiovasculares (Pertwee, 1997; Pertwee, 1999a; Howlett y cols., 2002).

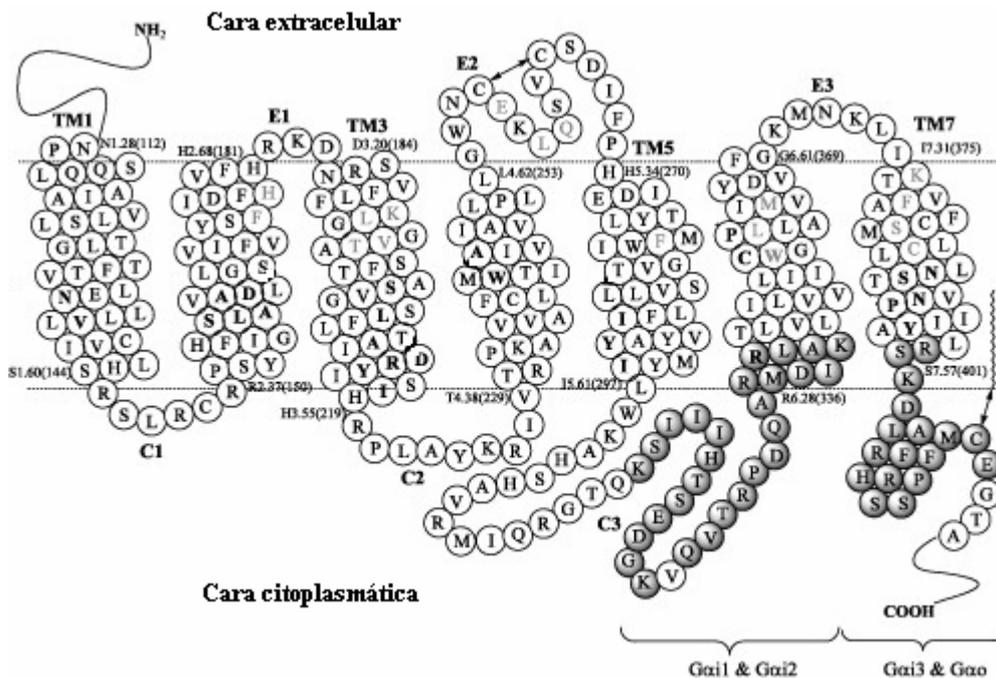
**Tabla 1.1** Procesos cerebrales en los que se ha propuesto una función para los endocannabinoides a través de sus receptores

Proceso cerebral	Función atribuida a los endocannabinoides
Control de la actividad motora	Generalmente inhibición motora e incluso catalepsia
Control del dolor	Efectos analgésicos
Memoria y aprendizaje	Alteración de la respuesta motivacional, emocional, la recompensa cerebral y otros procesos cognitivos
Regulación neuroendocrina	Modificación de secreción de hormonas adenohipofisarias
Procesos neurovegetativos	Actuación sobre los centros nerviosos reguladores de la émesis, de la temperatura y del apetito
Desarrollo cerebral	Efectos sobre la proliferación de neuronas y/o células gliares, sobre la migración y elongación axonal, sobre la sinaptogénesis y/o sobre la mielinogénesis.

El posible uso terapéutico de los cannabinoides se basa en sus propiedades como antieméticos, analgésicos, antiinflamatorios, anticonvulsivantes, broncodilatadores, en la estimulación del apetito, en la disminución de la presión intraocular, etc. Pero su falta de especificidad es el mayor obstáculo en su uso terapéutico. La aparición de efectos neurológicos, como el vértigo, la confusión, el adormecimiento, la euforia, etc., limita a menudo la actividad normal del paciente. A pesar de esto, su índice terapéutico es muy superior al de otras sustancias de abuso. De hecho no se han descrito muertes atribuibles inequívocamente a sobredosis de cannabis (Bobes y Calafat, 2000).

### 1.1.5 Receptor cannabinoide

El carácter altamente lipofílico de los cannabinoides naturales dificultó durante años la identificación de receptores específicos para este tipo de sustancias. De hecho, algunos autores atribuían inicialmente los efectos farmacológicos del THC a su interacción con la membrana celular alterando sus propiedades (Bobes y Calafat, 2000). A pesar de que esta teoría no puede descartarse totalmente, actualmente está claro que la mayoría de los efectos que producen los cannabinoides están mediados por receptores específicos, de los que hasta el momento se han descrito dos tipos, denominados CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Se tratan de proteínas de la familia de receptores con 7 pasos transmembrana acoplados a proteínas G, y constan de un dominio amino-terminal extracelular, un dominio carboxi-terminal intracelular y en su estructura se encuentran residuos específicos típicos como sustratos de fosforilación, lugares de fijación de ligandos, de proteínas G, etc. (Fig. 1.8).



**Fig. 1.8** Estructura secundaria del receptor CB<sub>1</sub> humano. Se representan tres regiones extracelulares (E1, E2 y E3), tres intracelulares (C1, C2 y C3) y los siete pasos transmembrana (TM1-7). También están representadas las regiones importantes para la interacción con proteínas G<sub>ai1</sub> y G<sub>ai2</sub> (*loop* intracelular C3) y para la interacción con proteínas G<sub>ao</sub> y G<sub>ai</sub> (región C terminal) (Mukhopadhyay y cols., 2002)

El CB<sub>1</sub> (Matsuda y cols., 1990) se distribuye predominantemente en el SNC, de hecho su densidad en el cerebro es mucho mayor que la de otros receptores para neurotransmisores (Herkenham y cols., 1991b; Tsou y cols., 1998), y en menor medida se encuentra en terminales nerviosos periféricos y en testículos (Herkenham y cols., 1991b; Galiegue y cols., 1995).

En cambio, el CB<sub>2</sub> (Munro y cols., 1993) está distribuido de forma periférica, principalmente en células del sistema inmune (Galiegue y cols., 1995); tiene una homología de un 44% con el CB<sub>1</sub> que llega a un 68% en las regiones transmembrana, y se le atribuyen fundamentalmente los efectos inmunomoduladores de los cannabinoides (Mukhopadhyay y cols., 2002; Xie y cols., 2003).

**Tabla. 1.2** Principales características de los receptores para cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Howlett, 1995; Pertwee, 1997)

	<b>Receptor CB<sub>1</sub></b>	<b>Receptor CB<sub>2</sub></b>
<b>Localización</b>	Sistema nervioso central Terminales nerviosos periféricos Testículos	Células del sistema inmune
<b>Ligandos endógenos</b>	Anandamida 2-araquidonilglicerol	2-araquidonilglicerol
<b>Otros agonistas</b>	$\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol cannabinol, cannabidiol CP55,940, WIN55,212-2	La mayoría son similares al CB <sub>1</sub> pero con diferencias en la relación estructura-actividad.
<b>Antagonistas</b>	SR141716A LY320135 AM281 AM251	SR144528
<b>Mecanismo intracelular</b>	Inhibición adenilato ciclasa Inhibición de canales de K <sup>+</sup> y de Ca <sup>2+</sup> Activación de la cascada de las MAPK Inducción de genes de transcripción temprana	Inhibición adenilato ciclasa Activación de la cascada de las MAPK Inducción de genes de transcripción temprana

La mayoría de agonistas cannabinoides tienen afinidad muy parecida para ambos tipos de receptores. El THC tiene además afinidad por otros receptores y ejerce algunos de sus efectos de forma independiente al receptor CB<sub>1</sub>. En cambio, el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 es muy selectivo para los receptores cannabinoides, no tiene afinidad por otros receptores para neurotransmisores o canales iónicos. En cambio, entre los antagonistas si que se han sintetizado ligandos altamente selectivos para uno u otro receptor cannabinoide (Pertwee, 1997). A pesar de que existen diferencias sustanciales entre las distintas familias de agonistas cannabinoides parece que se unen al receptor en el mismo sitio y de una forma similar. Además, hay una excelente correlación entre las

potencias farmacológicas de los distintos cannabinoides y su afinidad por los receptores cannabinoides (Compton y cols., 1993).

El receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> media los efectos psicoactivos de los cannabinoides tanto en humanos (Gerard y cols., 1991) como en rata (Matsuda y cols., 1990), de hecho en ratones a los que se ha suprimido el gen de este receptor los cannabinoides no producen la mayoría de estos efectos (Ledent y cols., 1999). La proteína contiene 472-473 aminoácidos organizados en una estructura típica que está altamente conservada en las distintas especies estudiadas (Fig. 1.8). Está presente a lo largo de toda la escala vertebrada con un patrón de distribución que también está bastante conservado (McPartland y Glass, 2003). Se expresa de forma importante en poblaciones neuronales de mamíferos (Herkenham y cols., 1991b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Pettit y cols., 1998; Tsou y cols., 1998; Moldrich y Wenger, 2000; Hermann y cols., 2002) donde se les atribuye un papel importante en la modulación de la liberación de distintos neurotransmisores. En humanos, su gen se encuentra en la región q14-q15 del cromosoma 6 y presenta una homología del 97,3% con el de rata (McPartland y Glass, 2003).

La distribución neuronal del CB<sub>1</sub> se encuentra en estrecha relación con muchos de los efectos farmacológicos que producen los cannabinoides (Tabla 1.1 y Tabla. 1.3). Mediante distintas técnicas autorradiográficas, estudios inmunohistoquímicos e hibridación *in situ* se ha descrito de forma detallada la distribución regional de este receptor en el cerebro de rata (Herkenham y cols., 1990; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Pettit y cols., 1998; Tsou y cols., 1998). La mayor densidad se encuentra en los ganglios basales (sustancia negra, globo pálido, núcleo entopeduncular y caudado-putamen lateral), en la capa molecular del cerebelo y en ciertas partes del hipocampo (región CA3 del asta de Ammón y capa molecular del giro dentado); lo que explica, entre otros, los efectos de los cannabinoides sobre la actividad motora, y sobre la memoria y el aprendizaje. La densidad de este receptor es más moderada en las capas I y IV de la corteza cerebral, mientras que un escaso número de receptores se encuentra en el hipotálamo, tronco encefálico y médula espinal, receptores que se relacionan con los efectos moduladores neuroendocrinos y con el control nociceptivo, respectivamente. A pesar de la baja densidad de receptores en el hipotálamo, los cannabinoides inducen hipotermia después de una administración intracerebroventricular o tras una inyección directamente en el área preóptica (Fitton y Pertwee, 1982). De todas formas, esta baja

densidad de receptores en el tallo cerebral (área que controla las funciones cardiovasculares y respiratorias) explica la baja toxicidad y ausencia de letalidad de la marihuana. También se han encontrado receptores CB<sub>1</sub> de forma periférica aunque en menor proporción, en el bazo y las amígdalas, en el corazón, la próstata, los testículos, el útero, los ovarios y en terminales nerviosos simpáticos a nivel presináptico (Galiegue y cols., 1995; Ishac y cols., 1996).

Los receptores CB<sub>1</sub> aparecen en edades tempranas del desarrollo, presentando en el cerebro una distribución transitoria que va variando durante el periodo de maduración hasta alcanzar el perfil clásico del estado adulto (Berrendero y cols., 1998b). La naturaleza transitoria de este fenómeno podría estar relacionada con eventos del desarrollo como la proliferación y migración celular, la elongación axonal y la sinaptogénesis (Fernandez-Ruiz y cols., 2000).

**Tabla. 1.3** Niveles de sitios de unión a cannabinoides y distribución de anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) en diferentes regiones cerebrales de rata (Bisogno y cols., 1999)

Región	CB <sub>1</sub>	AEA	2-AG
Médula espinal	++	+++	++++
Corteza cerebral	++	+	++
Núcleos límbicos	++	++	++++
Tallo cerebral	++	++++	+++++
Cuerpo estriado	++++	++++	++++
Hipocampo	++++	+++	++++
Diencéfalo	+++	+	+
Cerebelo	+++++	+	++
Mesencéfalo	+++	++	++

Receptor CB<sub>1</sub> (Bmax; fmoles/g de tejido): + (<250); ++ (250-500); +++ (500-750); ++++ (750-1000); +++++ (>1000)

Anandamida (pmoles/g de tejido): + (<20); ++ (20-40); +++ (40-60); ++++ (60-80); +++++ (>80)

2-AG (nmoles/g de tejido): + (<3); ++ (3-6); +++ (6-9); ++++ (9-12); +++++ (>12)

De forma más detallada, la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en el cerebro adulto es particularmente densa en fibras presinápticas y en terminales. Por el contrario, la expresión de este receptor no es prominente en los cuerpos celulares ni en las dendritas de las neuronas principales (Herkenham y cols., 1990; Herkenham y cols., 1991b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Pettit y cols., 1998; Tsou y cols., 1998). De acuerdo con la morfología de las células donde se localizan los receptores CB<sub>1</sub> y la co-localización con otros tipos de receptores en roedores adultos, muchas neuronas inmunoreactivas para el CB<sub>1</sub> (sobre todo las que poseen un marcaje elevado) parecen

ser GABAérgicas en varias regiones cerebrales (Tsou y cols., 1998; Katona y cols., 1999; Tsou y cols., 1999), sugiriendo que este sistema es una importante diana para los efectos centrales de los cannabinoides.

Además, existen muchas evidencias electrofisiológicas que sugieren la localización preferentemente presináptica de los receptores CB<sub>1</sub>, donde su activación causa inhibición de la liberación de distintos neurotransmisores (Schlicker y Kathmann, 2001), por ejemplo GABA (Katona y cols., 1999; Hajos y cols., 2000), glutamato (Gerdeman y Lovinger, 2001), etc. Además el THC y otros cannabinoides se ha visto que modulan la actividad neuronal y la liberación de dopamina (Cadogan y cols., 1997; Tanda y cols., 1997; Kathmann y cols., 1999; Cheer y cols., 2003), noradrenalina (Schlicker y cols., 1997; Kathmann y cols., 1999; Trendelenburg y cols., 2000; Tzavara y cols., 2001) y serotonina (Nakazi y cols., 2000; Egashira y cols., 2002) con algunas diferencias regionales. La activación del CB<sub>1</sub> induce mayoritariamente efectos inhibitorios en las neuronas sobre las que se localiza (Schlicker y Kathmann, 2001).

Por lo que respecta al receptor CB<sub>2</sub>, ha sido localizado principalmente en células mieloides, macrófagos y monocitos del bazo y en zonas relacionadas con el sistema inmune como el bazo y las amígdalas (Galiegue y cols., 1995; Schatz y cols., 1997). Se ha relacionado el efecto inmunomodulador de los cannabinoides con estos receptores (Klein y cols., 1998). Algunos autores también han indicado su posible presencia en neuronas y astrocitos (Skaper y cols., 1996; Sagan y cols., 1999).

Además, últimamente está tomando cada vez más fuerza la hipótesis de la existencia de más tipos o subtipos del receptor cannabinoide a nivel cerebral, sobre todo para explicar efectos producidos por los cannabinoides para los que aun no hay una explicación a nivel molecular (Pertwee, 1999b). Como por ejemplo, para explicar los efectos provocados por ciertos agonistas cannabinoides en ratones a los que se les ha suprimido el gen que codifica el receptor CB<sub>1</sub>, y para explicar incongruencias en la fijación de determinados ligandos cannabinoides en el cerebro, entre ellos el WIN 55,212-2 (Wiley y Martin, 2002). Aunque la existencia de estos receptores todavía no ha sido confirmada en cerebro humano, se ha descrito la existencia de dos sitios de fijación de alta afinidad distintos para el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 en membranas cerebelosas que podría tratarse del receptor CB<sub>2</sub> (Skaper y cols., 1996). En relación con estos datos se ha sugerido la presencia de sitios de fijación con perfil

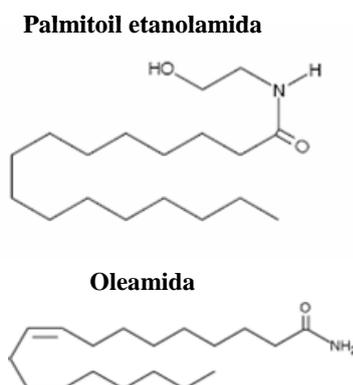
cannabimimético y distintos al CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en cerebro de ratones en los que se ha generado genéticamente la ausencia de receptores CB<sub>1</sub> (Breivogel y cols., 2001; Hajos y cols., 2001). Se ha postulado la existencia de un nuevo receptor cannabinoide que podría explicar los efectos que ejercen los cannabinoide sobre las neuronas glutamatérgicas (Shen y cols., 1996; Misner y Sullivan, 1999; Sullivan, 1999) ya que no ha sido confirmada la localización del CB<sub>1</sub> sobre estas neuronas (Katona y cols., 1999; Marsicano y Lutz, 1999; Hajos y cols., 2000). Además, se ha observado que en ratones genéticamente modificados y a los que les falta el receptor CB<sub>1</sub>, los cannabinoide siguen afectando la transmisión excitatoria mientras que la inhibitoria ya no se ve afectada aunque al parecer el SR141716A sigue antagonizando estos efectos (Hajos y cols., 2001; Hajos y Freund, 2002a; Hajos y Freund, 2002b; Kofalvi y cols., 2003). Por otra parte se ha observado que tanto el WIN 55,212-2 como la anandamida siguen estimulando la fijación de GTP $\gamma$ s en membranas de cerebro de ratones deficientes en el CB<sub>1</sub>; efecto que no es antagonizado por el SR141716A y que parece que no se traduce en una inhibición de la adenilato ciclasa (Breivogel y cols., 2001; Monory y cols., 2002). Estudios farmacológicos han demostrado que las características de los efectos que producen el WIN 55,212-2 sobre la transmisión excitatoria e inhibitoria es distinta lo que parece corroborar la existencia de distintos receptores (Hajos y Freund, 2002a; Hajos y Freund, 2002b; Ohno-Shosaku y cols., 2002b). Además, se ha observado en sinaptosomas hipocampales de roedores que el WIN 55,212-2 o la metanandamida inhiben la liberación de glutamato también de forma independiente de CB<sub>1</sub> (Kofalvi y cols., 2003). También se ha descrito una variante del ARN mensajero del receptor CB<sub>1</sub> resultante de un procesamiento (*splicing*) alternativo que posee un modelo de distribución muy similar al del receptor CB<sub>1</sub> (Shire y cols., 1995). Esta variante resulta ser una isoforma con 61 aminoácidos menos en el extremo amino-terminal. La distribución del ARNm que codifica este receptor es similar a la del CB<sub>1</sub>, tanto dentro como fuera del SNC, si bien su nivel de expresión es mucho menor. *In vitro*, la proteína presenta propiedades farmacológicas y transduccionales similares a las del CB<sub>1</sub>, aunque ligeramente atenuadas; sin embargo, hasta el momento esta proteína no ha sido detectada *in vivo*.

Además, en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral y estriado se observó una reducción de los niveles de AMPc por parte del WIN 55,212-2 mediado por proteínas G pero independiente del receptor CB<sub>1</sub> (Sagan y cols., 1999). También se

ha descrito un sitio de unión a aminoalkilindoles no acoplados a proteínas G en células de neuroglioma (Stark y cols., 1997). Por último, en cultivos de neuroglioma, la metanandamida activa ERK por un mecanismo independiente de CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> e independiente de proteínas G (Ramer y cols., 2001).

### 1.1.6 Endocannabinoides

Una vez clonados los receptores cannabinoides se consiguió aislar y caracterizar un derivado etanolamida del ácido araquidónico que se fija al receptor cannabinoide y que comparte algunas propiedades farmacológicas del THC. Este posible ligando endógeno del receptor cannabinoide es la araquidoniletanolamina, más conocida como anandamida (Devane y cols., 1992) (Fig. 1.6). De hecho, existe toda una familia entera de ligandos endógenos derivados de ácidos grasos que tienen afinidad por los receptores cannabinoides. Son todos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, como el 2-araquidonil glicerol, segundo ligando endógeno aislado (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995) o el 2-araquidonil gliceril éter (Hanus y cols., 2001). Otro miembro de esta familia de lípidos, la palmitoiletanolamida (Fig. 1.9), comparte con los cannabinoides endógenos diversos efectos fisiológicos aunque no es capaz de unirse a ninguno de los dos tipos de receptores cannabinoides caracterizados hasta el momento (Lambert y Di Marzo, 1999).



**Fig. 1.9** Otros cannabinoides endógenos

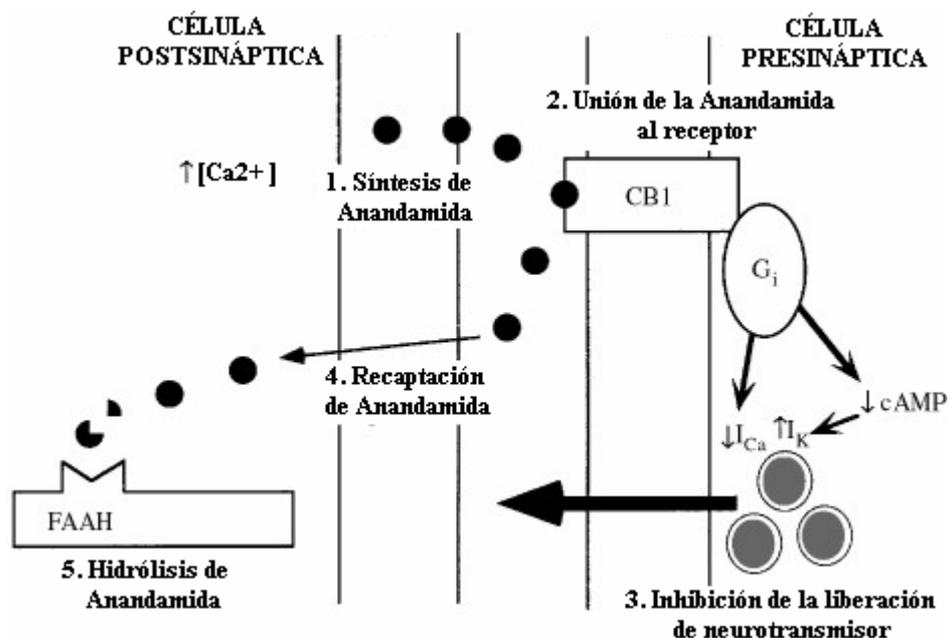
Por último, vale la pena comentar otro componente de esta familia de lípidos; la oleamida (Fig. 1.9), amida del ácido oleico que aparece en el líquido cefalorraquídeo de gatos, ratas y humanos, y tiene propiedades cannabimiméticas además de ser un potente inductor del sueño (Lambert y Di Marzo, 1999). Este efecto hipnótico parece que está también mediado por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> (Mendelson y Basile, 1999). De esta

forma el sistema endocannabinoide podría participar en la regulación del ciclo “sueño-vigilia”. De hecho, se sabe que la intoxicación por marihuana produce modorra o somnolencia; aunque algunos autores han descrito reducción del sueño en humanos (Freemon, 1982) y ratas (Moreton y Davis, 1973) por el THC. En cambio se ha descrito un aumento del sueño provocado por la anandamida y mediado por el CB<sub>1</sub> (Murillo-Rodriguez y cols., 1998; Murillo-Rodriguez y cols., 2001a; Murillo-Rodriguez y cols., 2003). También se ha visto que el SR141716A aumenta el tiempo que se permanece despierto a costa tanto del sueño de onda lenta como del sueño REM (movimiento rápido de los ojos) (Santucci y cols., 1996).

La anandamida aunque es capaz de unirse a los dos tipos de receptores cannabinoides se une con mayor afinidad al CB<sub>1</sub> (Felder y cols., 1995); pero también produce algunos efectos adicionales a los que producen los cannabinoides exógenos y que no son mediados por los receptores cannabinoides conocidos hasta el momento. De hecho, otros receptores diferentes, los receptores de vanilloides de tipo 1 (VR1), pueden ser activados por la anandamida y mediar algunos de sus efectos (Zygmunt y cols., 1999). Se ha observado que el SR141716A revierte los efectos de la anandamida con menor potencia que los de otros agonistas cannabinoides en determinados sistemas *in vitro* y parece que no es capaz de bloquear algunos de sus efectos farmacológicos en ensayos *in vivo*, a concentraciones que revierte totalmente las acciones de otros agonistas. En los sistemas *in vivo*, esta discrepancia se ha atribuido a la capacidad de la anandamida para activar receptores para vanilloides, además de receptores para cannabinoides (Smart y Jerman, 2000).

Existe cierta polémica a la hora de denominar a los cannabinoides como neurotransmisores o como neuromoduladores (Fig. 1.10). De hecho, el sistema endocannabinoide presenta características comunes a otros sistemas clásicos de neurotransmisión pero con algunas diferencias notables. Las concentraciones en el cerebro del endocannabinoide más estudiado hasta la fecha, la anandamida, son muy bajas ya que, dada su naturaleza lipofílica, no es almacenado en las células en su forma biológicamente activa sino que es sintetizado en respuesta a un determinado estímulo a partir de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular, la N-acil-fosfatidil etanolamina (NAPE), por acción de la fosfolipasa D (Di Marzo y cols., 1994) (Fig. 1.11). De esta forma, la anandamida y otras N-acetiletanolaminas (NAEs) podrían ser liberadas al espacio intersináptico por un mecanismo de difusión facilitada

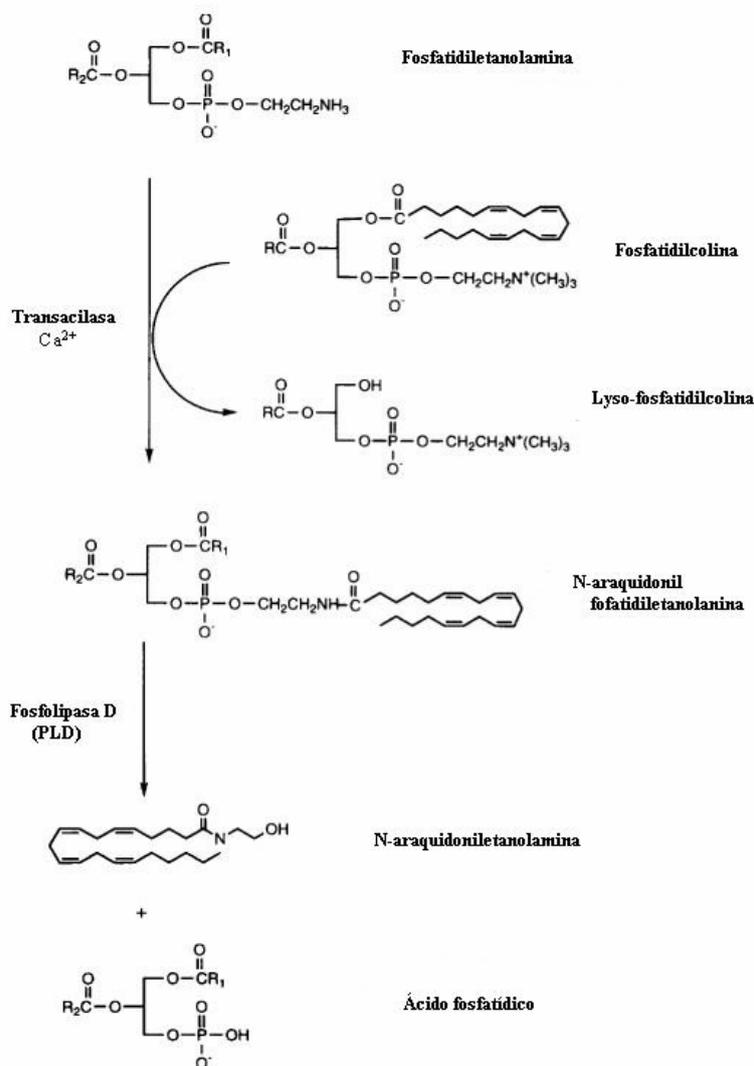
bidireccional, realizado a favor de gradiente (Hillard y cols., 1997). Sin embargo la liberación de endocannabinoides es parecida a la de los neurotransmisores clásicos, ya que es estimulada por la despolarización de la membrana y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la neurona (Di Marzo y cols., 1994; Stella y cols., 1997).



**Fig. 1.10** Modelo de la transmisión sináptica cannabinoide en la que la anandamida se comporta como una molécula de transmisión retrógrada que inhibe la liberación de distintos neurotransmisores clásicos de terminales presinápticos. La anandamida se sintetiza y libera de la neurona postsináptica y difunde al espacio sináptico donde se une a los receptores  $\text{CB}_1$  localizados en las neuronas presinápticas donde inhibe la liberación del neurotransmisor. La anandamida es eliminada del espacio sináptico por el recaptador de anandamida de la neurona postsináptica y es hidrolizada intracelularmente por el enzima FAAH (Elphick y Egertova, 2001)

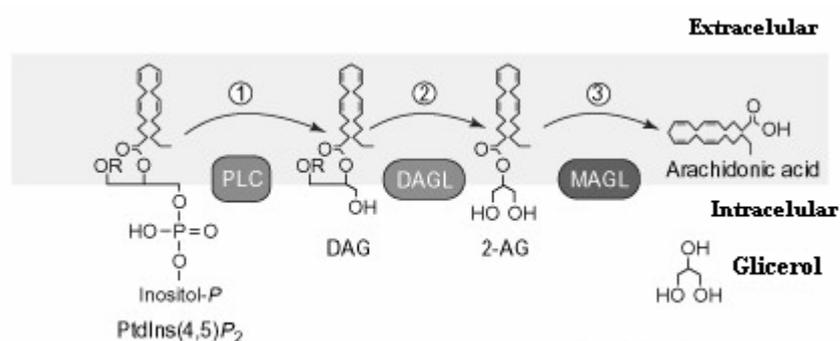
El N-araquidonilfosfatidiletanolamina representa el depósito de almacenaje para la anandamida que va a ser sintetizada y liberada en el momento que sea necesaria (Di Marzo y cols., 1994). La vida media de la anandamida es muy corta ya que es rápidamente recaptada por un transportador de alta afinidad que está presente tanto en neuronas como en células glias. Se trata de un transporte facilitado a través de membrana, rápido, saturable, específico, dependiente de la temperatura e independiente de iones sodio o de ATP (Beltramo y cols., 1997). Una vez en el interior de la célula, la anandamida es degradada por la acción de una amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH; EC 3.5.1.4.) que cataliza la hidrólisis de este endocannabinoide dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina (Di Marzo y Deutsch, 1998; Ueda y cols., 2000).

La ruta de síntesis más probable para el 2-araquidonilglicerol implica una diacilglicerol lipasa o fosfolipasa C que lo obtiene a partir del diacilglicerol (Stella y cols., 1997) (Fig. 1.12). Y también está activada por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona. Tras su liberación el 2-araquidonil glicerol puede ser recaptado por el mismo transportador que la anandamida (Piomelli y cols., 1999) y posteriormente degradado a ácido araquidónico y glicerol por la enzima monoacilglicerol lipasa (Stella y cols., 1997).



**Fig. 1.11** Mecanismo propuesto para la síntesis celular de anandamida a partir de fosfatidiletanolamina a través de una transacilasa y una fosfolipasa D (Hillard y cols., 1997)

Al parecer en el cerebelo y el hipocampo, pero probablemente en muchas otras áreas cerebrales, los cannabinoides endógenos están implicados en una regulación retrógrada de distintas sinapsis. Estudios recientes indican que los endocannabinoides median el suceso conocido como supresión de la inhibición inducida por la despolarización tanto de sinapsis inhibitorias (DSI) como la excitación en sinapsis excitatorias (DSE). Este suceso ocurre después de la despolarización de la neurona postsináptica y consiste en una supresión transitoria y presináptica de las corrientes postsinápticas (IPSCs). Ocurre en respuesta a un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona postsináptica y requiere de la participación de un mensajero retrógrado liberado por esta célula postsináptica y de la activación de proteínas G en la neurona presináptica (Pitler y Alger, 1994); lo que se traduce finalmente en una inhibición de la liberación de distintos neurotransmisores (Schlicker y Kathmann, 2001). Este mensajero retrógrado podrían ser los endocannabinoides, al menos en el cerebelo y el hipocampo (Kreitzer y Regehr, 2001a; Kreitzer y Regehr, 2001b; Maejima y cols., 2001; Wilson y Nicoll, 2001; Diana y cols., 2002). De hecho, se ha comprobado que el fenómeno de DSI en el hipocampo no ocurre en ratones a los que se ha eliminado el gen del  $\text{CB}_1$  (Varma y cols., 2001; Wilson y Nicoll, 2001). Además, agonistas cannabinoides producen una inhibición presináptica de las sinapsis involucradas en este fenómeno, tanto en sinapsis inhibitorias como excitatorias (Levenes y cols., 1998; Hajos y cols., 2000; Hoffman y Lupica, 2000).



**Fig. 1.12** Formación e inactivación del 2-araquidonilglicerol (2-AG). Hidrólisis de la fosfatidilinositol-(4,5)-bisfosfato [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] por la fosfolipasa C que produce el segundo mensajero 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato [Ins(1,45)P<sub>3</sub>]. El DAG sirve como sustrato para la DAG lipasa (DAGL) que cataliza la producción de 2-AG; reacción que es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El 2-AG puede ser liberado al exterior e interactuar con los receptores  $\text{CB}_1$ . Su efecto puede ser terminado a través del recaptador de anandamida. Una vez en el interior celular el 2-AG puede ser hidrolizado a ácido araquidónico y glicerol por una esterasa como la monoacilglicerol lipasa (MAGL)

El metabolismo de los endocannabinoides puede ser alterado por la administración de cannabinoides exógenos. De hecho, se ha visto en microsomas de cerebro de ratón que la actividad de la FAAH es inhibida en orden decreciente por distintos cannabinoides presentes en la preparaciones de cannabis, como el THC (Watanabe y cols., 1996), lo que podría prolongar la presencia de endocannabinoides en el cerebro.

### **1.1.7 Mecanismos de transducción de señal a través del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>**

La transducción de señales a través de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> ocurre fundamentalmente a través de proteínas G del subtipo G<sub>i/o</sub>, lo que produce una inhibición del enzima adenilato ciclasa que da lugar a un descenso en los niveles de AMPc intracelular (Pertwee, 1997). Además, el receptor CB<sub>1</sub> modula la actividad de distintos canales iónicos: inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> del tipo -N y -P/Q y activación de corrientes rectificadoras de K<sup>+</sup>, aumentando la conductancia del K<sup>+</sup> (Pertwee, 1997; Howlett y cols., 2002). Efectos que se relacionan con la inhibición que producen los cannabinoides sobre la liberación de distintos neurotransmisores (Schlicker y Kathmann, 2001). La activación de este receptor también provoca la estimulación de la vía de las MAPK, vía involucrada en los fenómenos proliferativos y de diferenciación (Bouaboula y cols., 1995b). En cambio, el receptor CB<sub>2</sub> no es capaz de modificar las corrientes de los canales de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> (Felder y cols., 1995).

Las vías de señalización más importantes moduladas por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> son:

- *Actividad adenilato ciclasa.* En la mayoría de tejidos analizados el receptor cannabinoide se acopla a distintos efectores mediante proteínas G inhibitorias G<sub>i/o</sub> (sensibles a proteína pertúsica), y a través de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G<sub>i/o</sub> inhibe la adenilato ciclasa y disminuye los niveles de AMPc intracelular, inhibiendo la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA (Childers y Deadwyler, 1996). A pesar de esto, en algunos casos también se han descrito acoplamiento a proteína G estimuladora G<sub>s</sub> (Childers y cols., 1993). En estos casos, estimula la actividad adenilato ciclasa incrementando los niveles de AMPc intracelular (Bonhaus y cols., 1998). La explicación de esta paradoja podría radicar en la existencia de varios subtipos diferentes

del enzima adenilato ciclasa que se ven afectados de forma distinta por la activación de los receptores para cannabinoides; lo que también podría explicar, en parte, diferencias regionales en el cerebro para los efectos de los cannabinoides (Maneuf y Brotchie, 1997; Rhee y cols., 1998).

- *Canales de  $K^+$* . También se ha comprobado que el receptor cannabinoide está acoplado a través de proteínas G a distintos tipos de canales de  $K^+$  (Mackie y cols., 1995), lo que se traduce en un aumento de la conductancia al  $K^+$  (Deadwyler y cols., 1995) y una disminución de la excitabilidad neuronal provocando la reducción de la liberación del neurotransmisor presente en el terminal presináptico (Deadwyler y cols., 1995). Por el contrario, también se ha descrito que los cannabinoides pueden ejercer un papel en la célula postsináptica disminuyendo la salida de iones  $K^+$ , aumentando la excitabilidad de la membrana (Schweitzer, 2000).

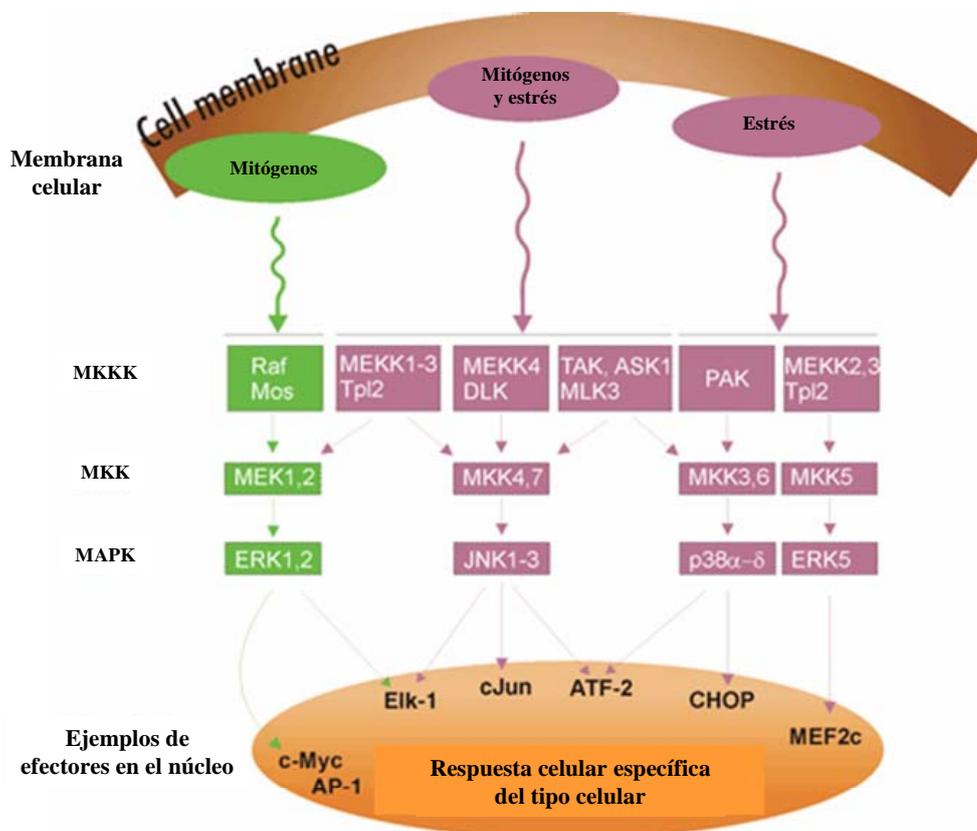
- *Canales de  $Ca^{2+}$* . A través del dímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G el receptor  $CB_1$  también puede estar acoplado de forma negativa a distintos tipos de canales de  $Ca^{2+}$  (Mackie y Hille, 1992; Twitchell y cols., 1997), muchos de los cuales son de localización preferentemente presináptica y que están implicados en la exocitosis, lo que origina en el terminal presináptico una disminución de la liberación de neurotransmisores.

- *PI3K/PKB*. El receptor cannabinoide puede activar la vía de las quinasas PI3K/PDK/PKB que también pueden participar en la regulación del metabolismo de la glucosa y del crecimiento celular (Gomez del Pulgar y cols., 2000).

- *Fosfolipasa C (PLC)*. Otro efector que puede estar regulando a través de la proteína G es la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza el fosfatidil inositol (uno de los lípidos de la membrana plasmática) para escindirlo en diacilglicerol (DAG) y el inositol fosfato (IP) y a través del diacilglicerol produce la activación de la PKC. La activación de esta vía PLC/PKC parece que también se produce a través del dímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G pero implicando la vía de señalización de ERK perteneciente a las MAPK (Shi y cols., 2003).

- *Cascada de señalización de las proteínas quinasas activadas por señales mitógenas (MAPK)*. La cascada de MAPK es un mecanismo de señalización clave que transduce señales extracelulares al núcleo y regula muchos aspectos de las funciones

celulares (por ejemplo, el crecimiento, la diferenciación celular y la apoptosis) (Grewal y cols., 1999; Pearson y cols., 2001; Sweatt, 2001). Esta vía de señalización consiste en una activación secuencial de proteínas quinasas, capaces de fosforilar residuos serina/treonina y/o tirosina (Fig. 1.13). En mamíferos hay descritos al menos 4 grupos de cascadas MAPK que se activan en respuesta a distintos estímulos y tiene diferentes funciones biológicas, dos de ellas son activadas por señales extracelulares (entre ellas la subfamilia de la quinasa ERK) y están relacionadas con la regulación del crecimiento y de la diferenciación celular, mientras que las otras dos son activadas por estímulos de estrés y están relacionadas con la regulación de muerte neuronal (apoptosis), transformación tumoral e inflamación (Hagemann y Blank, 2001).



**Fig. 1.13** Representación esquematizada de las distintas subfamilias de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y principales efectores nucleares

En muchos tipos celulares se ha descrito que la activación del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> pueden activar tanto la vía de MAPK activada por señales extracelulares como las activadas por señales de estrés, y mediante este mecanismo controlar la supervivencia o muerte celular (Guzman y cols., 2001). También se ha

descrito que el receptor CB<sub>2</sub> produce la activación de MAPK (Bouaboula y cols., 1996). En el caso concreto de la subfamilia de quinasas de la ERK, existen muchos trabajos realizados en cultivos celulares que describen una estimulación por parte de los cannabinoides a través del receptor CB<sub>1</sub> y de proteínas G (Bouaboula y cols., 1995b; Bouaboula y cols., 1999; Roche y cols., 1999; Galve-Roperh y cols., 2002), aunque otros trabajos muestran una inhibición de esta vía por cannabinoides (Rueda y cols., 2002; Faubert Kaplan y Kaminski, 2003; Ellert-Miklaszewska y cols., 2005)

El primer componente de esta vía de señalización Raf-1 (una serina/treonina quinasa, MAPKKK) comunica la señal extracelular desde el complejo receptor/Ras (proteína G de bajo peso molecular) con una cascada de quinasas citosólica por fosforilación y activación de MEK (MAPKK), que a su vez fosforila y activa (exclusivamente) ERK1/2 (p44 y p42 MAPK) la cual finalmente regula distintas proteínas citoplasmáticas (cdk5, proteínas del citoesqueleto) y nucleares (CREB, Elk-1) alterando su expresión génica (Pearson y cols., 2001; Pouyssegur y Lenormand, 2003). ERK1/2 se expresa en neuronas maduras siendo la quinasa más abundante de esta cascada, lo que provee de un mecanismo de amplificación de señal (Derkinderen y cols., 1999; Pouyssegur y Lenormand, 2003) y juega un papel fundamental en muchas formas de plasticidad sináptica (Grewal y cols., 1999; Sweatt, 2001; Adams y Sweatt, 2002; Mazzucchelli y cols., 2002).

Aunque muchos receptores acoplados a proteínas G activan diferentes miembros de la familia de las MAPK por transactivación de receptores tirosina quinasa (Gschwind y cols., 2001), este no es el caso del receptor CB<sub>1</sub>. Al parecer, la activación de ERK por este receptor tampoco es a través de proteínas de la familia Src (protooncogen identificado en el virus del sarcoma de Rous) que son proteínas que participan en el proceso de internalización de receptores a través de  $\beta$ -arrestina y que en algunos casos puede llevar a activar ERK (Marinissen y Gutkind, 2001; Pierce y cols., 2001). Probablemente, la activación de ERK a través de CB<sub>1</sub> depende de la disociación de las proteínas G<sub>i/o</sub> y la subsiguiente activación de PI3K (Galve-Roperh y cols., 2002; Sanchez y cols., 2003).

Todos estos trabajos *in vitro* fueron realizados en cultivos de líneas celulares no neuronales. Por su parte, en cultivos celulares de neuroblastoma, también se observó la activación de ERK a través de CB<sub>1</sub> y proteínas G<sub>i/o</sub>, aunque en este caso el resultado

parece ser la combinación de distintas vías de señalización intracelular donde juegan un papel la proteína Src y la enzima PI3K, pero el efecto predominante y necesario se produce a través del AMPc y la activación de la PKA (Davis y cols., 2003). En cambio, pocos estudios se han centrado en la modulación *in vivo* de esta vía de señalización en el sistema nervioso central adulto y los que lo han hecho solo estudian la modulación de la proteína mejor caracterizada de esta vía, la proteína ERK1/2.

- *Ceramidas*. En algunos tipos celulares se ha demostrado que el receptor cannabinoide puede estar acoplado a otro sistema efector a través de la proteína FAN (Sanchez y cols., 2001). En este caso el sistema efector es una enzima, la esfingomielinasa neutra, que hidroliza uno de los lípidos de membrana plasmática, la esfingomielina, para producir ceramidas. Estas moléculas están implicadas en procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis. Este aumento de ceramidas producido por los cannabinoides produce una estimulación sostenida de la cascada ERK quinasa a través de la estimulación de Raf-1. Al parecer la cascada ERK quinasa, dependiendo de las características de su activación, puede mediar tanto paradas de ciclo, antiproliferación, como muerte apoptótica o no apoptótica en muchos tipos celulares, como por ejemplo células neuronales (Galve-Roperh y cols., 2000).

- *Óxido nítrico (NO)*. El NO es un radical libre que se forma por la acción de la enzima, óxido nítrico sintasa (NOS). A concentraciones bajas puede actuar como mensajero intercelular, mientras que a elevadas concentraciones tiene efectos perjudiciales a través de la generación de radicales libres. Hay dos tipos de enzimas NOS: la que se expresa constitutivamente en algunas células (cNOS) como en neuronas y células endoteliales, y la enzima inducible (iNOS) que se genera en respuesta a determinados estímulos, generalmente relacionados con la inflamación. Se ha descrito que la unión de la anandamida al receptor de cannabinoides está acoplada a la liberación de óxido nítrico en el sistema nervioso central de invertebrados y en las células del sistema inmune de invertebrados y de humanos (Stefano y cols., 1996). De hecho, se ha visto que los cannabinoides aumentan la producción de NO principalmente a través de la cNOS (Fimiani y cols., 1999; Stefano, 2000). Esto podría explicar algunas acciones de los cannabinoides como la vasodilatación que produciría hipotensión, disminución de la función inmunovascular y, de nuevo, inhibición de la liberación de neurotransmisores. En algunos casos también se ha visto que podría atenuar la

producción de NO producida por la iNOS, lo que podría atribuirles un papel antiinflamatorio (Esposito y cols., 2001).

- *Fosfolipasa D y fosfolipasa A<sub>2</sub> con producción de ácido araquidónico.* Otra posible vía de actuación de los cannabinoides es la producción de ácido araquidónico. Este ácido graso poliinsaturado puede formarse por la acción de la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) o de la enzima fosfolipasa D. Ambas pueden ser activadas por los cannabinoides, aunque no en todos los tipos celulares, produciéndose una acumulación de ácido araquidónico (Burstein y cols., 1994). El ácido araquidónico puede ejercer un efecto directo activando enzimas, canales iónicos y receptores nucleares. También puede metabolizarse en la célula dando lugar a prostaciclina, tromboxanos e hidroperoxiácidos que tienen sus propias actividades fisiológicas; o puede utilizarse para la formación de diversos eicosanoides, como las prostaglandinas y los leucotrienos. Estos eicosanoides producen diversos efectos sobre la función cerebral, entre ellos se encuentra la alteración en la percepción del tiempo y el aumento del ritmo cardíaco que aparecen en humanos tras el consumo de cannabinoides (Perez-Reyes y cols., 1991).

- *Regulación de genes.* La mayoría de las cascadas de transducción intracelulares desembocan en la producción de proteínas que son factores de transcripción que se translocan al núcleo donde regulan la expresión de determinados genes y modulan la producción de determinadas proteínas. Dada la gran cantidad de cascadas de transcripción que son moduladas por los cannabinoides, es evidente que el potencial regulador de los cannabinoides es muy grande. En este sentido la cascada de la ERK es importante ya que su activación y translocación al núcleo provoca la expresión de genes de respuesta temprana (los llamados *immediate early genes*) importantes en procesos de plasticidad (Bouaboula y cols., 1995a; Kaminski, 1998; Herring y cols., 2001).

Por lo que respecta a los fenómenos de regulación del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, se ha visto que puede inactivarse por fosforilación. Cuando es fosforilado en su serina 317 por la proteína-quinasa C, pierde su capacidad de activar los canales de K<sup>+</sup> y de inhibir los de Ca<sup>2+</sup> (García y cols., 1998). También sufre procesos de internalización del receptor por mecanismos en los que interviene la β-arrestina, aunque el THC y la anandamida son poco efectivos en este sentido (Hsieh y cols., 1999; Jin y cols., 1999).



## 1.1.8 Características del consumo continuado de cannabis

### 1.1.8.1 Fenómeno de tolerancia

En el hombre es difícil observar efectos de tolerancia a los distintos efectos farmacológicos derivados del consumo de preparados de cannabis. Sin embargo, diversos estudios clínicos han demostrado que se desarrolla tolerancia a diversas acciones farmacológicas del THC en humanos cuando se consume en grandes cantidades. Además, el grado de tolerancia está directamente relacionado con la cantidad de THC consumido (Compton y cols., 1990; Haney y cols., 1997; Bobes y Calafat, 2000).

En estudios realizados en diferentes especies animales se ha comprobado que se desarrolla un fenómeno de tolerancia a la mayor parte de las respuestas farmacológicas tras la administración crónica de diferentes agonistas cannabinoides (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991; Abood y Martin, 1992; Hutcheson y cols., 1998; Maldonado, 2002; Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002). El desarrollo de esta tolerancia en animales de experimentación es particularmente rápido. Ya se observa una importante disminución del efecto farmacológico tras la segunda administración de una dosis elevada de agonistas cannabinoides (Abood y Martin, 1992; Hutcheson y cols., 1998) y se obtiene el máximo grado de tolerancia cannabinoide también con cierta rapidez tras la administración crónica (Bass y Martin, 2000).

De todas formas, hay que tener en cuenta que las dosis utilizadas en estos animales de experimentación son masivas en comparación con las que se suelen utilizar por el uso humano. Por tanto, considerando la relación directa que existe entre la dosis de THC y el desarrollo de tolerancia, el grado de tolerancia obtenido en estas condiciones experimentales en el animal resultaría difícil de alcanzar en las condiciones de consumo humano.

#### 1.1.8.1.1 Mecanismos implicados en la tolerancia cannabinoide

##### 1.1.8.1.1.1 Mecanismos de tipo farmacocinético

Se han sugerido mecanismos de tipo farmacocinético que pueden participar en el desarrollo de la tolerancia cannabinoide, tales como cambios en la absorción, distribución, biotransformación y excreción de los compuestos. Compuestos que

bloquean la actividad enzimática microsomal hepática atenúan en cierta forma la aparición de tolerancia (Bobes y Calafat, 2000). De hecho, se ha observado que el tratamiento crónico con distintos cannabinoides es capaz de inducir la citocromo P450 hepática (Bornheim y cols., 1994; Costa y cols., 1996). Además, los niveles plasmáticos de THC tras tratamiento crónico, se reducen de forma significativa (Rodríguez de Fonseca y cols., 1991). A pesar de esto, hay evidencias que indican que el papel de estos mecanismos farmacocinéticos en el desarrollo de la tolerancia a agonistas cannabinoides es secundario o incluso inexistente (Bobes y Calafat, 2000).

#### 1.1.8.1.1.2 Mecanismos de tipo farmacodinámico

Parece que el papel fundamental en el desarrollo de tolerancia a los efectos farmacológicos de los cannabinoides, lo juegan mecanismos farmacodinámicos que afectan al sistema cannabinoide endógeno (expresión, características de fijación y actividad funcional de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub>). Se ha comprobado que la exposición crónica a cannabinoides produce un fenómeno de desensibilización, lo que sugiere que la aparición de tolerancia para algunos de los efectos producidos por estos compuestos puede deberse a una disminución del número de receptores CB<sub>1</sub> cerebrales (Rodríguez de Fonseca y cols., 1994; Romero y cols., 1997). El fenómeno de desensibilización no es igual en todo el cerebro, existen regiones particularmente sensibles al tratamiento crónico con cannabinoides, como el hipocampo, y regiones más resistentes, como el hipotálamo y algunas estructuras de los ganglios basales (Romero y cols., 1997; Romero y cols., 1998). Así, la administración crónica de agonistas cannabinoides disminuye el número total de receptores en diversas estructuras cerebrales, incluyendo el estriado, partes del sistema límbico (como la amígdala), distintas regiones de la corteza cerebral y el cerebelo (Oviedo y cols., 1993; Rodríguez de Fonseca y cols., 1994; Rubino y cols., 1994; Fan y cols., 1996; Romero y cols., 1997; Romero y cols., 1998; Rubino y cols., 2000b). En algunas estructuras de los ganglios basales, el núcleo acumbens entre otros, los niveles de CB<sub>1</sub> también disminuyen significativamente tras tratamiento con agonistas cannabinoides (Oviedo y cols., 1993; Rodríguez de Fonseca y cols., 1994; Romero y cols., 1997; Romero y cols., 1998), lo que se correlaciona con una reducción en la magnitud de la inhibición motora (Rodríguez de Fonseca y cols., 1994).

La exposición prolongada a compuestos cannabinoides también produce una reducción en los niveles de ARNm para el receptor CB<sub>1</sub> con variaciones regionales; aunque al parecer este efecto es secundario a la desaparición de la proteína (Rubino y cols., 1994; Romero y cols., 1998). Sin embargo, otros estudios no han encontrado cambios en el número de receptores CB<sub>1</sub> ni en sus niveles de ARNm durante la administración crónica de THC (Abood y cols., 1993), e incluso se han descrito aumentos en la densidad de la proteína (Romero y cols., 1995b) y de su ARNm (Zhuang y cols., 1998) a nivel del hipocampo y del cerebelo.

También se ha descrito una reducción en la capacidad de agonistas cannabinoides de activar proteínas G tras tratamiento crónico. La fijación de [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γs</sub> (marcador de actividad de proteínas G) tras la administración de un agonista cannabinoide también se vio reducida en un amplio número de estructuras cerebrales de animales que habían recibido un tratamiento crónico con cannabinoides; entre las principales regiones encontramos el hipocampo (de nuevo la zona más susceptible y donde aparece antes), el estriado, la corteza, la sustancia negra, el cerebelo y distintas estructuras del tronco encefálico. Al parecer distintas estructuras del sistema límbico son las menos susceptibles a sufrir modulaciones de este tipo (Sim y cols., 1996; Zhuang y cols., 1998), incluso con tratamientos crónicos con anandamida (Rubino y cols., 2000b). La administración crónica de cannabinoides también produjo una disminución de los niveles de ARNm que codifica las proteínas G<sub>αi</sub> y G<sub>αs</sub> en muchas estructuras cerebrales, así como una reducción más localizada del ARNm de las proteínas G<sub>αo</sub>. A pesar de estas alteraciones en la expresión génica, no se observaron modificaciones cerebrales en la cantidad total de estas proteínas (Rubino y cols., 1997). También se han descrito alteraciones en la vía del AMPc. El tratamiento crónico con agonistas cannabinoides produjo un aumento de los niveles de AMPc y de la actividad PKA en áreas donde se produce desensibilización del CB<sub>1</sub>, sobretodo en el cerebelo y en menor proporción en corteza y estriado (Rubino y cols., 2000c; Rubino y cols., 2000d).

La duración temporal de estos cambios bioquímicos inducidos por la administración crónica de cannabinoides es muy corta, lo que va en concordancia con la corta duración del fenómeno de tolerancia farmacológica a cannabinoides (Westlake y cols., 1991; Rubino y cols., 1998; Bass y Martin, 2000).

### ***1.1.8.2 Potencial adictivo de los cannabinoides***

La adicción es un fenómeno biológico y psicosocial propio de los seres humanos, cuya característica principal es la búsqueda compulsiva de la sustancia adictiva. El estudio de la dependencia física o psicológica a un determinado compuesto en humanos no es una tarea sencilla ya que sobre el consumidor influyen toda una serie de fenómenos sociales y legales, a lo que hay que añadir que la mayoría no se autoadministra un único tipo de droga (Bobes y Calafat, 2000). Por su parte, los animales de experimentación también son susceptibles de sufrir adicción, por esto se han desarrollado toda una serie de modelos animales que nos permiten evaluar este tipo de conductas. Los conceptos de recompensa, motivación y refuerzo, fenómenos que acompañan a un proceso adictivo, son difíciles de estudiar desde una perspectiva neurobiológica ya que se definen de modo operativo. Un refuerzo se podría definir como cualquier suceso que incrementa la probabilidad de respuesta; mientras que los fenómenos de recompensa se definen frecuentemente de modo similar pero se introducen matices afectivos positivos como por ejemplo el placer.

No existen muchos trabajos donde se evidencien claramente comportamientos de autoadministración de cannabinoides. Los animales de experimentación no se autoadministran THC de forma espontánea (Mansbach y cols., 1994; Parker y Gillies, 1995) e incluso, los cannabinoides han resultado ser sustancias aversivas en este tipo de estudios (Maldonado, 2002). En primates solo se consiguió que se autoadministraran THC tras una historia previa de autoadministración de cocaína (Tanda y cols., 2000). En cambio, tanto con el agonista sintético CP 55,940 (Braida y cols., 2001) como con el WIN 55,212-2 (con el que también se ha observado un síndrome de abstinencia espontáneo; ver apartado “Dependencia a cannabinoides”) sí que se han conseguido reproducir pautas de autoadministración en roedores (Martellotta y cols., 1998; Fattore y cols., 2001), probablemente debido a sus características farmacocinéticas. En el test de condicionamiento preferencial de plaza, que pone de manifiesto las propiedades reforzantes, los resultados son desiguales, controvertidos y poco concluyentes (Lepore y cols., 1995; McGregor y cols., 1996; Sanudo-Pena y cols., 1997; Chaperon y cols., 1998; Braida y cols., 2001; Maldonado, 2002). EL THC y otros agonistas cannabinoides parece que producen aversión de plaza (McGregor y cols., 1996; Sanudo-Pena y cols., 1997; Chaperon y cols., 1998) que se hace más evidente cuando las dosis utilizadas son elevadas (Lepore y cols., 1995). Si se utilizan dosis bajas, se consigue eliminar este

componente aversivo cuando se somete a los animales a la exposición de THC previa al condicionamiento (Valverde y cols., 2000). De todas formas, se ha observado que la administración aguda de THC disminuye la frecuencia de autoestimulación eléctrica intracraneal (Lepore y cols., 1996; Gardner y Vorel, 1998) y es capaz de producir sensibilización conductual como hacen otras sustancias adictivas (Rubino y cols., 2001). Se cree que el sistema endocannabinoide podría formar parte del sistema de recompensa cerebral (Arnone y cols., 1997; Ledent y cols., 1999; Manzanares y cols., 1999; Mascia y cols., 1999), y se ha comprobado que el consumo crónico de cannabinoides produce cambios conductuales y/o moleculares equivalentes a los que se producen en los estados de tolerancia/dependencia/abstinencia a otras drogas de abuso (Gardner y Vorel, 1998; Maldonado, 2002).

El área ventrotegmental y el núcleo acumbens son los principales centros de recompensa cerebral y la dopamina se considera el neuromodulador principal de las respuestas del sistema de recompensa aunque también se encuentran implicados otros neurotransmisores como la serotonina, el glutamato, la acetilcolina y los péptidos opioides (Koob, 1992; Koob y cols., 1998). Por lo que se refiere al sistema cannabinoide endógeno, determinados estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* evidencian niveles bajos e incluso ausencia de CB<sub>1</sub> en estos dos núcleos. Sin embargo, otras regiones cerebrales como la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala, que inervan de forma importante al núcleo acumbens, presentan niveles entre moderados y altos de este receptor (Herkenham y cols., 1991b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Pettit y cols., 1998; Tsou y cols., 1998; Moldrich y Wenger, 2000). Esto sugiere al menos una implicación indirecta del sistema endocannabinoide en la modulación de la ruta dopaminérgica mesocorticolímbica que podría ser la responsable de las acciones de los cannabinoides en los procesos de refuerzo y otras respuestas motivacionales. De hecho, el tratamiento agudo con cannabinoides produce una activación de las neuronas dopaminérgicas del área ventrotegmental (French, 1997; Tanda y cols., 1997; Gardner y Vorel, 1998) como ocurre con la mayoría de drogas de abuso (Koob y cols., 1998). Sin embargo, en ratas existen diferencias entre las distintas cepas por lo que respecta a la activación de este sistema de recompensa cerebral por parte de los cannabinoides, y lo mismo ocurre con la autoestimulación cerebral provocada por el THC (Gardner, 2002; Tanda y Goldberg, 2003). De hecho, en el caso de la cepa Sprague-Dawley existen evidencias conflictivas; Rodríguez de Fonseca y

cols. (1992) no describieron cambios provocados por tratamientos con THC en el contenido de dopamina o de su metabolito de degradación (DOPAC) en el estriado u otras regiones cerebrales de esta cepa de ratas. En cambio, en las mismas regiones cerebrales de esta misma cepa de ratas, Navarro y cols. (1993) describieron aumentos en el contenido de dopamina y de DOPAC provocado por el THC. Al parecer, estas diferencias son debidas a efectos selectivos de los cannabinoides sobre determinadas neuronas dopaminérgicas. De hecho, hay evidencias que indican que dentro del núcleo acumbens los agonistas cannabinoides aumentan la liberación de dopamina en la porción del *shell* y en cambio no varía en el *core* del núcleo acumbens de ratas Sprague-Dawley (Tanda y cols., 1997). Los estudios realizados en la cepa Sprague-Dawley demuestran que estas neuronas dopaminérgicas mesencefálicas no presentan CB<sub>1</sub> (Matsuda y cols., 1990; Herkenham y cols., 1991a; Herkenham y cols., 1991b; Tsou y cols., 1998), al igual que las neuronas dopaminérgicas del estriado (Mailleux y Vanderhaeghen, 1993); y estudios electrofisiológicos han sugerido un efecto indirecto sobre estas neuronas (Gueudet y cols., 1995; French, 1997). Probablemente debido a la acción de los cannabinoides sobre los terminales GABAérgicos y/o glutamatérgicos que inervan el núcleo acumbens y el VTA (Schlicker y Kathmann, 2001). A pesar de esto, algunos autores han postulado una activación directa de la neurotransmisión dopaminérgica del núcleo acumbens o que su efecto sea a través de un bloqueo de la recaptación de dopamina (Gardner y Vorel, 1998; Gardner, 2002).

Por último es importante añadir que hay datos que sugieren que las sustancias que actúan sobre el sistema endocannabinoide, sobre todo bloqueando la actividad de los receptores CB<sub>1</sub>, pueden resultar efectivos en atenuar tanto el comportamiento de búsqueda compulsiva de otras drogas de mayor poder adictógeno (Arnone y cols., 1997; Chaperon y cols., 1998; Fattore y cols., 1999; Ledent y cols., 1999), como la intensidad del síndrome de abstinencia (Vela y cols., 1995; Ledent y cols., 1999; Rubino y cols., 2000a) u otros signos de dependencia a cocaína, opiáceos o alcohol (Manzanares y cols., 1999; Hungund y Basavarajappa, 2000). También se ha postulado que el sistema opioide endógeno podría participar activamente en las propiedades reforzantes de los cannabinoides al igual que ocurre con otras sustancias adictivas (Tanda y cols., 2000).

### *1.1.8.3 Dependencia a cannabinoides*

Durante la abstinencia a distintas drogas de abuso, la falta de la sustancia tras una exposición prolongada, conduce al sistema nervioso central a una nueva neuroadaptación que produce efectos contrarios a los que se producen con el tratamiento agudo con la droga. Así, el consumo crónico de cannabinoides podría conllevar la aparición de elementos de dependencia física y desarrollar un fenómeno de abstinencia con respuestas adaptativas moleculares y/o comportamentales puestas de manifiesto por la ausencia de droga, como ocurre en el caso del alcohol, la cocaína o los opiáceos (Koob y cols., 1998).

En el caso de los cannabinoides, este es un aspecto ampliamente debatido hasta hace poco tiempo. De hecho, en general, la experiencia clínica parece indicar que la privación de cannabinoides apenas produce sintomatología de dependencia. En humanos es difícil observar la aparición de un síndrome de abstinencia severo como ocurre con otras muchas drogas de abuso, y cuando lo hace, este síndrome es poco intenso y relativamente inespecífico. En general, los consumidores exclusivos de dosis moderadas de cannabinoides pueden abandonar el hábito con facilidad y son raros los casos de demanda de ayuda sanitaria por problemas relacionados solo con el consumo de cannabis. Estudios clínicos indican que los grandes consumidores de cannabis no padecen un síndrome de abstinencia con sintomatología severa y, a diferencia de otras drogas de abuso, solo una pequeña parte de consumidores habituales de cannabis desarrollan patrones de dependencia significativos (Abood y Martin, 1992; Perkonig y cols., 1999). A pesar de esto, otras revisiones confirman que la marihuana tiene poder adictivo y produce un síndrome de abstinencia aunque en menor grado que el alcohol, la cocaína, la heroína y la nicotina. Distintos autores han descrito un síndrome de abstinencia moderado en consumidores habituales de preparaciones de cannabis con elevadas concentraciones de principios activos, al interrumpir el consumo. Aunque este síndrome de abstinencia no parece ser suficientemente severo como para alterar la vida cotidiana del individuo (Haney y cols., 1997; Haney y cols., 1999a; Haney y cols., 1999b; Kouri y cols., 1999; Bobes y Calafat, 2000; Haney y cols., 2004). Estos signos o síntomas de abstinencia aparecen a las pocas horas de abandonar el consumo y la mayoría desaparece en 24-48 horas. Los síntomas más habituales incluyen: ansiedad, irritabilidad, trastornos del sueño que a veces duran más de una semana, alteraciones del humor, pérdida del apetito, sudoración, escalofríos ocasionales, temblor y síntomas

menos comunes que incluyen náuseas, vómitos, nistagmo, diarrea, hipersalivación y temblores (Wiesbeck y cols., 1996). También se ha descrito en voluntarios sanos incluidos en estudios de doble ciego con placebo, la aparición de un síndrome de abstinencia tras pocos días de consumo de THC que desaparece o aminora si se vuelve a consumir THC, y la severidad de esta abstinencia depende de la dosis de THC, la frecuencia de consumo y la duración del uso (Haney y cols., 1997; Haney y cols., 1999a; Haney y cols., 1999b; Bobes y Calafat, 2000).

En modelos animales también ha sido difícil observar un síndrome de abstinencia derivado de la retirada del cannabinoide después de una administración continuada de cannabinoides (Costa y cols., 2000). Es difícil observar un síndrome espontáneo, posiblemente debido a las particulares características farmacocinéticas de los cannabinoides derivadas de sus propiedades químicas (Maldonado, 2002), ni siquiera tras la administración de dosis elevadas en distintas especies animales (Abood y Martin, 1992; Aceto y cols., 1996; Diana y cols., 1998; Aceto y cols., 2001). En cambio, se ha conseguido precipitar un síndrome de abstinencia a cannabinoides utilizando dosis masivas de agonistas cannabinoides durante el tratamiento crónico y precipitando el síndrome de abstinencia con el antagonistas selectivo para el receptor CB<sub>1</sub>, SR141716A (Aceto y cols., 1995; Cook y cols., 1998; Hutcheson y cols., 1998; Ledent y cols., 1999; Tzavara y cols., 2000). Hay que destacar que las dosis de agonista que se requieren para inducir dependencia en estudios con animales de experimentación son muy altas y en ningún caso comparables con las dosis consumidas por los humanos. Finalmente, también se consiguió observar un síndrome de abstinencia espontáneo tras la administración crónica del agonista sintético WIN 55,212-2 (Aceto y cols., 2001), posiblemente por sus distintas propiedades de solubilidad y distribución que le confieren una menor vida media en el organismo. En roedores este síndrome de abstinencia se caracteriza por la presencia de un gran número de manifestaciones somáticas, principalmente motoras, sin cambios importantes a nivel neurovegetativo. Las manifestaciones somáticas más características de la abstinencia a cannabinoides en roedores son: movimientos de sacudida de tronco (*wet dog shakes*) y cabeza, temblor de patas, ataxia, posturas anormales, temblor generalizado, ptosis, piloerección, disminución de la actividad locomotora, masticación, lameteo, fricción y rascado (Aceto y cols., 1996; Cook y cols., 1998; Hutcheson y cols., 1998; Lichtman y cols., 1998; Ledent y cols., 1999; Tzavara y cols., 2000). En el perro si que se han observado signos

vegetativos, tales como diarrea, vómitos, salivación, disminución del comportamiento social, temblores e incremento del periodo de vigilia (Lichtman y cols., 1998). La aparición de este síndrome de abstinencia y su manifestación somática está mediada principalmente por los efectos de los cannabinoides a través del receptor CB<sub>1</sub> ya que en ratones modificados genéticamente deficientes de este receptor la administración de SR141716A tras tratamiento crónico con THC no precipitó un síndrome de abstinencia apreciable (Ledent y cols., 1999).

Además, durante la abstinencia a cannabinoides también se han visto cambios a nivel molecular en elementos que también son afectados por otras drogas de abuso. Se ha observado inducción de c-FOS e incremento de la liberación del factor de liberación de corticotropinas (CRF) en el núcleo central de la amígdala, lo que podría estar relacionado con la aparición de síntomas de estrés y de disforia (Rodríguez de Fonseca y cols., 1997). Durante el síndrome de abstinencia a cannabinoides también aparece localmente, principalmente a nivel del cerebelo, un incremento en los componentes de la vía de señalización de la adenilato ciclasa (Hutcheson y cols., 1998; Rubino y cols., 2000d) que siguen el mismo ritmo que las manifestaciones somáticas de la abstinencia cannabinoide. Además, estas manifestaciones somáticas resultaron atenuadas por la microinyección local a nivel del cerebelo de un inhibidor selectivo de la vía adenilato ciclasa (Tzavara y cols., 2000).

Hay que considerar que estos efectos que se observan al administrar el antagonista después de tratamiento crónico pueden ser debidos al bloqueo del tono endocannabinoide en general o a la actividad como agonista inverso del SR141716A y no reflejar manifestaciones concretas de abstinencia. De hecho, la administración del antagonista a animales no tolerantes ya provoca la aparición de cierta sintomatología, aunque distinta o en proporción más ligera que la que parece tras tratamiento crónico con agonistas (aumenta sobre todo el rascado) (Gonzalez y cols., 2004a).

## 1.2 ETANOL (ALCOHOL ETÍLICO)

### 1.2.1 Consumo de etanol

El etanol o alcohol etílico (Fig. 1.15) se encuentra en el organismo de forma endógena a concentraciones mínimas. En cambio, el hombre ha consumido alcohol desde hace miles de años. Ya en manuscritos del antiguo Egipto se encuentra la primera referencia escrita de una bebida alcohólica. El etanol se obtiene por fermentación anaeróbica (fermentación alcohólica) de los hidratos de carbono normalmente por la acción de algún tipo de levadura. Así, la primera bebida alcohólica no destilada debió surgir de la fermentación natural de algún producto almacenado y una vez descubiertas las propiedades de estas bebidas, seguramente se empezaron a preparar de forma más sistemática, apareciendo los distintos tipos de bebidas alcohólicas.

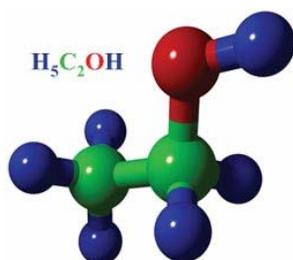


Fig. 1.15 Representación de la estructura tridimensional del etanol

El etanol es un líquido claro, volátil, inflamable, muy hidrosoluble y a la vez soluble en cloroformo y éter (30 veces menos liposoluble que hidrosoluble). Es una molécula pequeña y algo polar, que químicamente pertenece al grupo de alcoholes alifáticos de cadena corta, y por tanto interacciona fácilmente tanto con grupos polares como no polares lo que le confiere una gran capacidad de difusión en medio acuoso y lipídico.

Es el principal alcohol que se encuentra en cervezas (obtenidas generalmente de la fermentación de la cebada), vinos (de la fermentación de la uva) y demás licores (obtenidos muchos de ellos por destilación de distintos fermentados y que suelen tener una composición alcohólica mayor). Es, con mucha diferencia, la droga más consumida en muchos países, sobre todo países occidentales, siendo en la mayoría una droga recreacional de uso y comercio legal (Gual, 2002).

Encuestas domiciliarias sobre drogas realizadas en España por el Observatorio Español sobre Drogas durante los años 2000 y 2001 ponen de manifiesto que el 87% de la población de edad comprendida entre 15 y 65 años refiere haber probado una bebida alcohólica en alguna ocasión, mientras que cerca de la mitad lo consume con frecuencia semanal y alrededor de un 14% lo hace casi diariamente. En muchos casos en los que la frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas es semanal, se concentra principalmente en los fines de semana.

El consumo de alcohol lleva asociado un impacto sanitario muy importante. Alrededor del 3,4% del total de defunciones registradas durante el año 1997 en España se podían asociar de alguna forma más o menos directa al consumo de alcohol. Entre estas causas hay que destacar los accidentes de tráfico provocados por el consumo excesivo de alcohol y en los que suelen verse involucrados mayoritariamente hombres y mujeres menores de 30 años (Gual, 2002).

### **1.2.2 Efectos farmacológicos del consumo de etanol**

El etanol produce una gran variedad de efectos fisiológicos y conductuales (Tabla 1.4). El perfil farmacológico depende de la dosis y se puede establecer una graduación que podría ser (de menor a mayor dosis): ansiolisis, miorelajación, analgesia, sedación, amnesia, hipotermia y anestesia.

En humanos, a dosis bajas, se suele experimentar una leve excitación, un aumento de la sociabilidad y locuacidad y una conducta más espontánea. Suele ir acompañado de una disminución del estrés y la ansiedad subjetiva y de una ligera euforia. A dosis ligeramente más altas el individuo se vuelve más optimista, ruidoso, con una sobrevaloración personal y aparece una marcada desinhibición. La memoria, la concentración, la atención y la percepción empeoran, acompañado además de incoordinación motora y cambios en la función sensorial. De hecho, las funciones sensitivo-motoras son las primeras que muestran signos de deterioro por el etanol, especialmente la estabilidad y el equilibrio, que se manifiesta en la característica ataxia o marcha tambaleante. El etanol también aumenta el umbral del dolor y todos estos efectos suelen ir seguidos o acompañados de cierta somnolencia. A dosis altas, se observan signos notables de trastorno neurológico, acompañado de nistagmo, anormalidad en el reflejo pupilar a la luz y suelen experimentarse náuseas y vómitos;

seguido de letargia y malestar general. Cuando se ha ingerido una gran cantidad de etanol se llega a perder el conocimiento y aparece una intensa anestesia, hasta llegar a la parada bulbar y depresión de los centros respiratorios.

**Tabla 1.4** Fases de la intoxicación alcohólica (Gual, 2002)

<b>Alcoholemia (mg/100 ml)</b>	<b>Efectos y alteraciones en la conducta</b>
20-30	Sensación de bienestar, reducción del tiempo de reacción, ligera alteración del juicio y memoria
30-60	Desinhibición, relajación, sedación leve, alteración de la coordinación y del tiempo de reacción. Sobrevaloración personal y confianza en la propia capacidad
80-90	Dificultad en la discriminación auditiva y visual, alteraciones de la marcha, de la coordinación, sentimientos de tristeza o de exaltación, deseo de seguir bebiendo, enlentecimiento del habla
110-120	Torpeza motriz evidente, dificultad en las actividades mentales como memoria y juicio, disminución de la desinhibición, aparición de estados emocionales de agresividad
140-150	Deterioro de todas las funciones intelectuales y físicas, conducta irresponsable, sentimiento general de euforia, dificultad para permanecer levantado, andar y hablar. Alteración de la percepción y del juicio
200	Sentimiento de confusión o aturdimiento, dificultad para deambular o permanecer levantado
300	Disminución importante en la percepción y comprensión, así como de la sensibilidad
400	Anestesia casi completa, ausencia de percepción, confusión y coma
500	Coma profundo
600	Muerte por falta de respuesta del centro respiratorio

El etanol es tóxico para la mayoría de tejidos del organismo. Su consumo crónico además del desarrollo de dependencia, también se ha asociado a numerosas enfermedades inflamatorias y degenerativas que pueden acabar con la vida del individuo que las padece, como la cirrosis hepática. Sin embargo, consumido de forma esporádica, los efectos del etanol sobre la fisiología humana son rápidamente reversibles.

Los efectos principales sobre el aparato digestivo son la alteración de la motilidad, reflujo gastro-esofágico, gastritis aguda por un efecto deletéreo sobre la mucosa gástrica y alteración de la secreción pancreática. Aunque a nivel local provoca una vasoconstricción sanguínea, dosis moderadas de etanol producen vasodilatación en piel y vías digestivas por depresión del centro neuronal vasomotor. Esta vasodilatación cutánea produce un aumento de la pérdida de calor. Además, dosis altas de etanol deprimen directamente el mecanismo regulador de la temperatura en el tallo cerebral con lo que la disminución de la temperatura puede llegar a ser muy intensa. De forma crónica también puede producir alteraciones cardíacas e hipertensión arterial. El etanol también actúa sobre el sistema hipotálamo-hipófisis disminuyendo la secreción de la

hormona antidiurética lo que provoca la disminución de la reabsorción de agua por parte del riñón, con lo que aumenta la diuresis (Gual, 2002).

El etanol además provoca una profunda depresión de las funciones neuronales con una concomitante depresión del metabolismo energético cerebral (Zhu y cols., 2004). El alcohol es una droga psicótropa con capacidad de crear dependencia física, tolerancia y dependencia. Su efecto primario sobre el sistema nervioso central es depresor, sin embargo, a dosis bajas parece ser un estimulador. El aumento en el ánimo y la conducta extrovertida deben ser resultado de la desinhibición por anulación de las inhibiciones que ocurren normalmente. Conductas que normalmente están suprimidas por miedo o ansiedad son liberadas por los efectos inhibitorios del etanol. Se ha asociado este efecto con la formación reticular que controla la actividad asociativa o integrativa sobre la corteza. Consecuentemente parte de la corteza queda liberada de mecanismos de control inhibitorios.

Otro efecto asociado al consumo de etanol es la llamada resaca. Estado de malestar que aparece tras el consumo y metabolización completa del alcohol y que se caracteriza por cefalea, diarrea, temblor, fatiga, náuseas, alteraciones cognitivas, hemodinámicas, hormonales, disminución de la actividad ocupacional, etc. Se puede correlacionar con un síndrome de abstinencia agudo y su prevalencia es muy elevada. Paradójicamente es mayor en bebedores de consumo bajo o moderado de alcohol que en grandes bebedores. Algunos estudios han postulado que el acetaldehído resultante de la metabolización del alcohol podría ser el responsable de algunos de los efectos que se producen durante la resaca (ver apartado “Metabolismo y eliminación del etanol”).

### **1.2.3 Absorción y distribución del etanol**

El etanol es consumido por el hombre casi exclusivamente por vía oral. Es una molécula que no puede ser ionizada y por tanto su absorción no se verá afectada por el pH. Se absorbe por difusión simple a través de las membranas a nivel de la cavidad bucal, del esófago, del estómago (donde la presencia de alimentos retrasa esta absorción) y de forma más intensa en el intestino debido a su mayor superficie (Gual, 2002). La rapidez de absorción es parecida a la del agua y aumenta con la concentración, hasta alcanzar concentraciones elevadas (alrededor del 40% de etanol) en las que se inhiben el peristaltismo gástrico y se retrasa el vaciamiento hacia el

intestino y por tanto su absorción. Una vez en el torrente sanguíneo, el etanol se distribuye uniformemente por todos los tejidos del cuerpo según su contenido acuoso. Aunque se trata de una molécula anfipática, se disuelve mucho mejor en agua que en lípidos y se distribuye preferentemente en medio acuoso. Por tanto los niveles de etanol en sangre también dependerán de la proporción de grasa del individuo que ingiera el alcohol; será mayor cuanto más proporción de grasa.

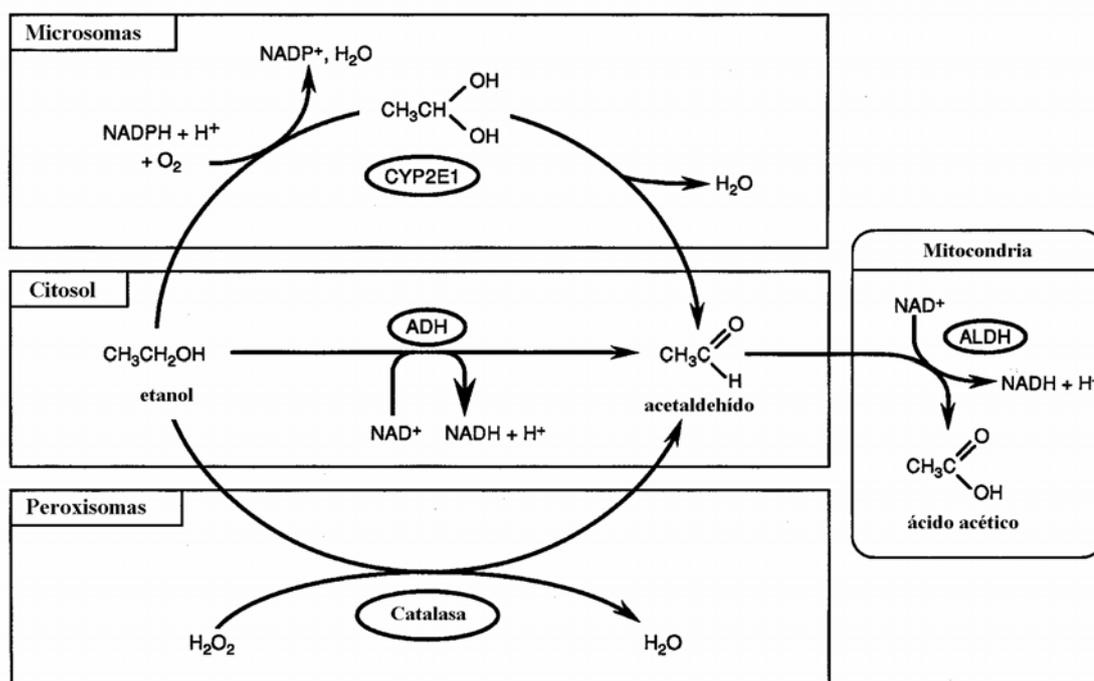
El etanol cruza sin dificultad la barrera hematoencefálica, estudios con resonancia magnética nuclear en humanos y ratas han demostrado que tanto en animales como en humanos el alcohol se puede detectar en el cerebro al cabo de pocos minutos de su ingesta (Mendelson y cols., 1990; Petroff y cols., 1990). También accede fácilmente a los pulmones desde el torrente sanguíneo y se vaporiza en el aire a una velocidad constante, siendo por ello posible determinar la concentración sérica de etanol a partir de los niveles contenidos en el aire exhalado.

#### **1.2.4 Metabolismo y eliminación del etanol**

Solo alrededor del 2-10% del etanol se elimina sin cambio principalmente por riñones y pulmones, el resto es metabolizado mayoritariamente por el hígado. Se metaboliza por oxidación transformándose finalmente, después de varios procesos, en dióxido de carbono y agua. La oxidación incluye tres etapas principales (Fig. 1.16). En la primera el etanol se oxida dando acetaldehído por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (etanol:NAD oxidorreductasa, EC 1.1.1.1.) que se encuentra en el citosol de células y que requiere NAD como coenzima. Tienen lugar principalmente en el hígado y en pequeño grado en los riñones. Una parte de la oxidación del etanol también depende del sistema microsómico por la acción del sistema de oxidorreducción dependiente de NADPH/citocromo P450. Este metabolismo microsomal se ve inducido por la ingesta de etanol y suele ser más importante cuando las concentraciones de etanol son elevadas (Koob y Weiss, 1992; Gual, 2002). En menor grado también puede intervenir la enzima catalasa (E.C. 1.11.1.6), que interviene en la oxidación de etanol a acetaldehído sobre todo a nivel del riñón y en menor proporción en corazón, estómago y cerebro. Es importante destacar también que esta catalasa cerebral también es inducida por la ingesta de etanol (Salmela y cols., 1996; Lands, 1998; Upadhyya y cols., 2000; Gual, 2002).

En la segunda etapa, que también tiene lugar principalmente en el hígado, el acetaldehído se transforma en acetato libre o acetilcoenzima A por efecto de la enzima aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.3.), principalmente mitocondrial, y que también requiere NAD como coenzima. Existe una mutación bastante frecuente en este enzima (sobre todo en individuos orientales) que produce una isoforma prácticamente inactiva, lo que provoca una gran acumulación de acetaldehído si se consume etanol. La acumulación de acetaldehído provoca fuertes efectos tóxicos y da lugar al llamado síndrome de sensibilidad al alcohol (ver apartado “Papel del acetaldehído”). Finalmente, este acetato producido puede entrar en distintos procesos catabólicos del organismo, como el ciclo del ácido tricarboxílico o el ciclo de Krebs y transformarse en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , o participar en distintas vías sintéticas y entrar a formar parte de determinados lípidos.

El etanol se metaboliza con una cinética de orden cero y con un ritmo medio en humanos de unos 100 mg/kg peso corporal por hora.



**Fig. 1.16** Representación esquemática del metabolismo del etanol produciendo finalmente ácido acético. Abreviaciones: alcohol deshidrogenasa (ADH); aldehído deshidrogenasa (ALDH)

#### ***1.2.4.1 Papel del acetaldehído***

Tradicionalmente, el acetaldehído se ha implicado en los efectos aversivos que produce el etanol, sobre todo la resaca, aunque la resaca también se puede considerar como la expresión de una sintomatología aguda de abstinencia y por tanto también puede ser consecuencia de los mecanismos compensatorios que explican el desarrollo de tolerancia farmacocinética (ver apartado “Cambios tras la exposición crónica a etanol”), o de la deshidratación y el desequilibrio de electrolitos que produce la intoxicación etílica. Se ha postulado que algunos de los efectos psicofarmacológicos que se atribuyen al etanol podrían ser debidos a la acción del acetaldehído (Aragon y cols., 1986; Chao y cols., 1995; Gual, 2002). Pero hay que tener en cuenta que el acetaldehído que puede afectar al cerebro debe sintetizarse aquí mismo ya que la barrera hematoencefálica impide de forma muy importante su paso desde la sangre, donde, de todas formas se encuentra a concentraciones muy bajas incluso después de un consumo elevado de alcohol (Zimatkin, 1991; Hunt, 1996).

#### **1.2.5 Mecanismo de acción para los efectos psicoactivos del etanol**

A pesar de la larga historia y el amplio uso del etanol, así como del largo tiempo que se lleva investigando en sus efectos, los mecanismos de acción en el cerebro aun son poco conocidos en comparación con los de otras drogas psicoactivas. Observando los diferentes efectos que produce el etanol y los distintos perfiles farmacológicos que produce en función de la dosis, parece claro que aunque debe existir una base molecular común para todos estos efectos, los mecanismos neuronales y neuroquímicos deben ser diferentes. En general, el etanol produce una profunda depresión de las funciones neuronales con una concomitante depresión del metabolismo energético cerebral (Zhu y cols., 2004). Pero, al contrario de cómo actúan la mayoría de sustancias psicoactivas las cuales producen sus efectos por unión a receptores específicos localizados sobre las neuronas, no se conoce una diana específica para los efectos del etanol. Inicialmente, se propuso que el etanol podría realizar sus efectos fisiológicos modificando las membranas de las neuronas. De hecho, como en el caso de los anestésicos generales, el alcohol se intercala en la capa lipídica de las membranas celulares, causando un aumento en la fluidez de estas (Goldstein y Chin, 1981; Rottenberg, 1986), mientras que el etanol crónico altera la composición de lípidos de estas membranas celulares (Sun y cols., 1984; Taraschi y cols., 1986). Este cambio en la fluidez podría modificar la acción

de receptores específicos o canales iónicos lo que podría ser la causa de muchos de los efectos del alcohol alterando la función sináptica. Aunque no está claro cómo las alteraciones que produce el alcohol sobre las membranas pueden producir los característicos efectos sobre el sistema nervioso central a corto y largo plazo, algunos trabajos muestran que el aumento de la fluidez de las membranas lipídicas celulares por etanol correlaciona con la sedación inducida (Chin y Goldstein, 1977; Harris y Hitzemann, 1981; Goldstein y cols., 1982). En cambio, diversos autores han indicado una significativa especificidad en los efectos del etanol a nivel molecular (Diamond y Gordon, 1997). Además, la relación molecular de fosfolípidos de membrana y etanol a concentraciones intoxicantes son demasiado altas como para explicar los efectos que producen solo a través de una fluidez de las membranas. Asimismo, un aumento en solo un grado de temperatura produce una alteración similar en la fluidez de la membrana a la que producen concentraciones anestésicas de etanol (Diamond y Gordon, 1997); y otros fármacos como las benzodiazepinas y barbitúricos que aumentan la función de receptores inhibitorios GABA<sub>A</sub> a través de una interacción molecular bien definida, así como anestésicos disociativos, tipo dizocilpina, que bloquea receptores estimulatorios de NMDA, producen acciones conductuales parecidas al etanol en animales y humanos.

En la actualidad se sabe que el etanol interactúa con determinadas proteínas situadas en la membrana neuronal y la alteración de su función es la responsable de la mayoría de efectos sobre el sistema nervioso, principalmente receptores para GABA y NMDA. Se cree que los efectos inhibitorios del etanol sobre el cerebro deben ser el resultado del aumento de la función del receptor GABA<sub>A</sub>, aumentando los efectos inhibitorios de este receptor, y de un bloqueo de la función del receptor de NMDA, interfiriendo con sus efectos excitatorios. Sin embargo, localizar exactamente el sitio de acción o un mecanismo único para los efectos del alcohol es difícil porque esta droga afecta virtualmente a todos los sistemas neuroquímicos y endocrinos (Diamond y Gordon, 1997). Tanto los receptores NMDA, como GABA<sub>A</sub> (así como otros receptores afectados por el etanol) son canales iónicos y la alteración de su función puede afectar al balance eléctrico de la neurona (Harris, 1999).

Este efecto directo del etanol sobre receptores de membrana toma fuerza si se tiene en cuenta que al aumentar la cadena de carbonos de una serie de alcoholes homólogos, la potencia de este alcohol para modular la abertura del canal iónico por sus ligandos aumenta hasta un determinado número de carbonos en el que se alcanza un

máximo de efecto a partir del cual si se aumenta la cadena de carbonos el efecto se reduce o incluso desaparece (Li y cols., 1994); es el llamado efecto *cut-off*. En anestésicos que perturban la fluidez de membrana también se observa este efecto de *cut-off* pero este máximo ocurre al llegar a cadenas carbonadas de unos 12 carbonos. Este punto de *cut-off* para los distintos alcoholes ha sido determinado para la mayoría de canales iónicos sensibles a ligandos (Tabla 1.5) y se ha comprobado que aunque en algunos casos no se puede descartar un efecto de los alcoholes sobre la fluidez de la membrana en otros casos queda claro que se trata de un efecto directo del alcohol sobre el propio receptor (Li y cols., 1994; Peoples y Weight, 1995; Korpi y Seppala, 1998).

**Tabla 1.5** Características de los efectos del etanol sobre algunos canales iónicos abiertos por ligandos

Receptor	Efecto del etanol sobre la respuesta al agonista	Punto de <i>cut-off</i> (n° de carbonos en la cadena)	Subunidad propuesta que confiere la sensibilidad al etanol
GABA <sub>A</sub>	Potenciación	12-13	γ2L
GlyR	Potenciación	13	α1
NMDA	Inhibición	9	NR2B
5-HT <sub>3</sub>	Potenciación	7	5-HT <sub>3</sub>
ATP	Inhibición	4	PX2

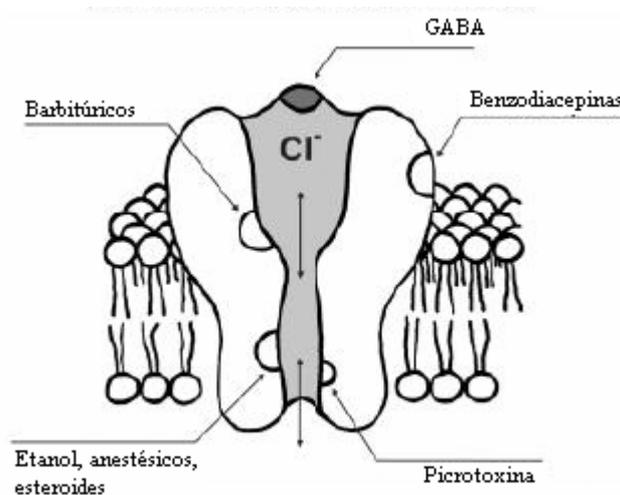
GABA<sub>A</sub>, receptor para el GABA tipo A; GlyR, receptor para la glicina; NMDA, receptor para el glutamato tipo NMDA; nAChR, receptor par la acetilcolina nicotínico; 5-HT, serotonina. (Diamond y Gordon, 1997)

### 1.2.5.1 Receptor GABA<sub>A</sub>

El complejo receptor GABA<sub>A</sub> es una proteína constituida por cinco subunidades, ensambladas formando un canal en su interior para iones cloro (Cl<sup>-</sup>), que atraviesa la membrana neuronal. Además del GABA (principal neurotransmisor inhibitor cerebral), existen otras muchas sustancias que interaccionan con este complejo fijándose a distintos lugares de su estructura preferentemente localizados en la región extracelular o en el dominio que forma el canal aniónico modulando su actividad (Fig. 1.17). La activación del receptor produce la apertura del canal, lo que permite la entrada de iones de cloro, produciéndose una hiperpolarización de la membrana y la consecuente disminución de la excitabilidad neuronal. Por su parte, el etanol potencia la acción del GABA, o de cualquier otro activador de este receptor como las benzodiazepinas o los barbitúricos (Grobin y cols., 1998; Aguayo y cols., 2002), favoreciendo el flujo de cloro inducido en estos receptores GABA<sub>A</sub>. Este hecho explica por qué se produce tolerancia cruzada entre el etanol, benzodiazepinas y barbitúricos y su capacidad cruzada de paliar

sintomatología de abstinencia (Suzdak y cols., 1986; Harris y cols., 1995b; Mehta y Ticku, 1999a; Mehta y Ticku, 1999b).

La potenciación GABA no ocurre en todas las regiones cerebrales, ni en todos los tipos celulares de una misma región, ni siquiera en todos los receptores GABA<sub>A</sub> de una misma neurona (Grobin y cols., 2000). Este efecto se atribuye a la heterogeneidad de las subunidades que componen los receptores GABA<sub>A</sub>, ya que el receptor está compuesto de 5 subunidades, de las que al menos tres son distintas y que provienen de una de las cinco familias de subunidades estructuralmente diferentes dentro las que además existen también distintos subtipos (Olsen y Tobin, 1990; McKernan y Whiting, 1996). Solo determinados subtipos de algunas subunidades parecen ser sensibles al etanol (Wafford y cols., 1991; Criswell y cols., 1993; Sigel y cols., 1993).



**Fig. 1.17** Representación esquemática del complejo receptor GABA<sub>A</sub>-ionóforo cloro y algunos lugares de unión

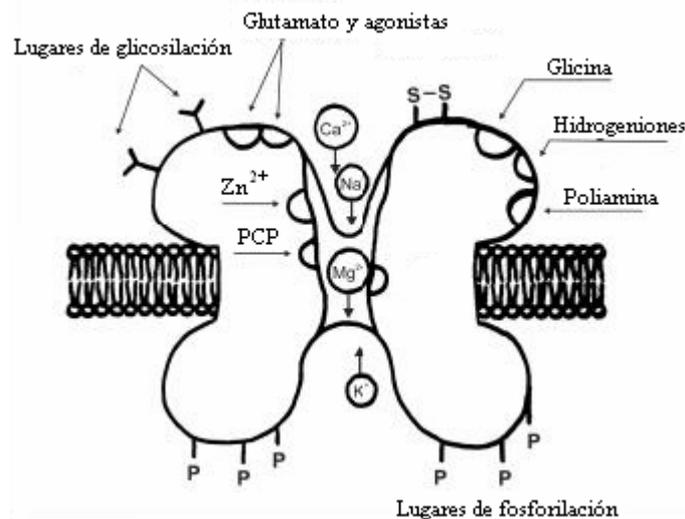
### 1.2.5.2 Receptor NMDA

El receptor NMDA es uno de los principales receptores para el principal neurotransmisor excitador cerebral, el glutamato. Forma un canal catiónico y su activación da lugar a un aumento de la permeabilidad para el Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y principalmente para el Ca<sup>2+</sup>, que se traduce en una despolarización de la membrana neuronal (Fig. 1.18). La acción aguda del etanol sobre este receptor consiste en disminuir el flujo a través del canal, es decir, una inhibición del canal (Wirkner y cols., 1999). Esta alteración del flujo principalmente de Ca<sup>2+</sup> puede alterar muchas funciones celulares,

como por ejemplo la función sináptica al inhibir la liberación de neurotransmisores. De esta forma, se ha descrito una inhibición por parte del etanol de los fenómenos de potenciación a largo plazo (LTP) importantes en los fenómenos de aprendizaje y memoria probablemente a través de receptores NMDA (Givens y McMahon, 1995; Givens, 1995). Además, se cree que esta acción antagónica del etanol sobre los receptores NMDA puede ser responsable de muchos efectos que ocurren durante la intoxicación etílica severa como las lagunas o pérdidas de memoria (Lima-Landman y Albuquerque, 1989; Lovinger y cols., 1989; Hoffman y Tabakoff, 1994).

No se conoce exactamente el mecanismo por el que el etanol altera la funcionalidad de este receptor ya que no parece que ejerza ninguna acción directa sobre los distintos sitios moduladores hasta ahora conocidos, ni parece interaccionar con el  $Mg^{2+}$  que normalmente se encuentra bloqueando el canal iónico. Son más probables cambios en la fosforilación y la compartimentación de este receptor (Ron, 2004).

Al igual que en el caso del receptor  $GABA_A$  existe una gran variedad local y regional en las acciones del etanol sobre este receptor NMDA. El etanol no parece inhibir la respuesta a NMDA en todas las regiones cerebrales y en las que si lo hace el etanol inhibe la respuesta a NMDA solo en un subgrupo de neuronas (Yang y cols., 1996).



**Fig. 1.18** Representación esquemática del receptor glutamatergico NMDA y diversos lugares de fijación

Esta variabilidad depende también de las distintas subunidades que pueden formar parte de estos receptores NMDA pentaméricos (Mirshahi y Woodward, 1995; Wirkner y cols., 1999), de las que al parecer únicamente una podría ser la responsable de la sensibilidad al etanol (Nagy y cols., 2004).

### ***1.2.5.3 Otros mecanismos***

Existen muchos otros neurotransmisores de interés que se han relacionado de alguna forma (directa o indirectamente) con los efectos del alcohol. Así, se ha observado que la administración de alcohol, al igual que ocurre con otras drogas de abuso, provoca la liberación de dopamina en el núcleo acumbens lo que se ha relacionado con su poder adictivo (Rassnick y cols., 1992; Yoshimoto y cols., 1992b; Brodie y cols., 1999). Además, el consumo de alcohol también afecta la actividad de los péptidos opioides, sistema que parece intervenir en las propiedades reforzantes del alcohol (Benjamin y cols., 1993; Faingold y cols., 1998; Roberts y cols., 2000a). El alcohol también induce la activación de subtipos específicos de receptores para serotonina, concretamente el 5-HT<sub>3</sub> (otro canal catiónico pero estructuralmente similar a los receptores GABA<sub>A</sub>) (Lovinger y White, 1991; Lovinger, 1991). Al parecer esta modulación de la transmisión serotoninérgica juega un papel importante en la estimulación de la actividad dopaminérgica en el núcleo acumbens producida por el etanol y podrían participar en la tolerancia, abstinencia y en la intoxicación por alcohol (Valenzuela, 1997). Así, el etanol de forma dosis dependiente aumenta también la liberación de serotonina en el núcleo acumbens (Yoshimoto y cols., 1992b) y la ingesta de alcohol se ve reducida por drogas que interfieren con el sistema serotoninérgico central (Monti y Alterwain, 1991; Sellers y cols., 1992). También se ha observado incremento de la transmisión noradrenérgica a dosis bajas y un efecto inhibitorio a dosis altas (Fink y cols., 1992; Rossetti y cols., 1992), así como un incremento de la transmisión noradrenérgica durante el síndrome de abstinencia (Lynch y Littleton, 1985; Eisenhofer y cols., 1990).

El etanol también puede modular otros tipos de canales de calcio, sobre todo tipo L, inhibiendo su función (Diamond y Gordon, 1997; Catlin y cols., 1999). También se han observado efectos inhibitorios del etanol sobre el receptor inhibitorio a la glicina (Mascia y cols., 1996) o sobre la respuesta a nicotina en un subtipo de receptores

nicotínicos para la acetilcolina seguramente interaccionando también con la región N-terminal extracelular de estos receptores (Yu y cols., 1996).

Últimamente, también están surgiendo evidencias sobre la participación del sistema endocannabinoide en las acciones farmacológicas a nivel del sistema nervioso central y en los efectos conductuales del alcohol incluyendo la preferencia y las propiedades reforzantes del alcohol. En este contexto, ratones genéticamente modificados a los que les falta el receptor CB<sub>1</sub> muestran una marcada reducción del consumo voluntario de etanol (Hungund y cols., 2003). De la misma forma, el antagonista selectivo de estos receptores, el SR141716A también reduce la ingesta o la preferencia a alcohol (Arnone y cols., 1997; Colombo y cols., 1998; Gallate y McGregor, 1999; Lallemand y cols., 2004; Cippitelli y cols., 2005; Gessa y cols., 2005).

El alto carácter hidrofóbico del etanol también podría permitirle atravesar directamente la membrana celular y actuar sobre componentes citoplasmáticos, por ejemplo a nivel de segundos mensajeros, lo que podría sumarse a los efectos directos del etanol sobre receptores o mediar algunos de estos efectos (Pandey y cols., 1998). Así se ha visto que la proteína quinasa C (sobre todo algunas isoformas) está implicada en muchas de las respuestas celulares del etanol, por ejemplo regulando la sensibilidad al etanol de diversos canales y receptores (por ejemplo receptores para GABA y NMDA) (Diamond y Gordon, 1997; Stubbs y Slater, 1999; Guizzetti y Costa, 2002). También potencia la producción de AMPc mediada por estos receptores, sobre todo a través de la adenosina (Diamond y Gordon, 1997; Pandey y cols., 1998) y modula distintos tipos de tirosinas quinasas (PI3K, PKC) (Pandey y cols., 1998; Yang y cols., 2002). También se ha descrito la modulación *in vitro* de la vía de señalización de MAPK en distintos tipos celulares y entre ellas la subfamilia de la ERK. En algunos casos se ha descrito una inhibición (Hendrickson y cols., 1998; Davis y cols., 1999; Kalluri y Ticku, 2002a; Sanna y cols., 2002; Roberto y cols., 2003) y en otros casos activación (Roivainen y cols., 1995; Chen y cols., 1998; Weng y Shukla, 2000; Smith y Navratilova, 2003).

### 1.2.6 Propiedades reforzantes del etanol

El etanol tiene propiedades reforzantes y es una sustancia capaz de generar dependencia (Di Chiara y cols., 1996; Koob, 2000; Gonzales y cols., 2004; Tupala y Tiihonen, 2004). Pero al igual que ocurre con otros compuestos (como el THC o el éxtasis), el etanol no parece ser muy adictivo en modelos animales de autoadministración y este poder reforzante o adictivo es mayor en las situaciones asociadas a estados anímicos negativos, especialmente si son crónicos (Altman y cols., 1996). De todas formas, administrado de forma aguda, el etanol baja el umbral de las conductas de autoadministración eléctrica y, activa los circuitos cerebrales de recompensa. De esta forma, directa o indirectamente, el etanol aumenta las descargas de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, así como la liberación de dopamina en el núcleo acumbens (Brodie y cols., 1990; Yoshimoto y cols., 1992a; Weiss y cols., 1996). También se ha observado una mayor liberación de dopamina en el núcleo acumbens de determinadas cepas de ratas con alta preferencia por etanol que en ratas con baja preferencia (Noble, 1996; Hodge y cols., 1997). Además, al igual que ocurre con otras drogas que crean dependencia, la abstinencia a etanol ocasiona una disminución en la liberación de dopamina en el núcleo acumbens, efecto que es revertido por la autoadministración de etanol (Diana y cols., 1996).

La ubicua distribución cerebral de aminoácidos inhibidores y excitatorios, y la actuación del etanol sobre algunos de sus receptores, sugiere que la acción reforzadora del etanol podría estar mediada, al menos en parte, por estos aminoácidos. Así, se ha observado que agonistas GABA<sub>A</sub> aumentan la autoadministración de etanol en ratas, mientras que los antagonistas GABA<sub>A</sub> o antagonistas benzodiazepínicos la reducen (Eckardt y cols., 1998; Morales y cols., 1998). Por su parte el antagonismo de receptores NMDA también podría estar involucrado en las propiedades reforzantes ya que se ha visto que la estimulación de estos receptores ejerce una influencia negativa sobre el refuerzo, mientras que sus antagonistas producen pautas de autoadministración en primates (Faingold y cols., 1998). También se ha observado que los sistemas opioide (Ulm y cols., 1995; Di Chiara y cols., 1996; Roberts y cols., 2000a) y cannabinoide (Arnone y cols., 1997; Colombo y cols., 1998; Gallate y McGregor, 1999; Gonzalez y cols., 2004b; Cippitelli y cols., 2005; Gessa y cols., 2005) endógenos intervienen de forma importante en el refuerzo provocado por el etanol.

Además de estos claros mecanismos, otros sistemas podrían participar en las propiedades reforzantes del etanol. Así, los receptores nicotínicos centrales (sobre todo los localizados en el área tegmental ventral) también parecen ser importantes en las acciones reforzantes del etanol, ya que la exposición crónica a nicotina aumenta las propiedades reforzantes del etanol en animales de experimentación (Soderpalm y cols., 2000). Por su parte, el sistema serotoninérgico también podría tener un papel en estas propiedades reforzantes (Yoshimoto y cols., 1992a), ya que fármacos que interaccionan con el sistema serotoninérgico reducen la ingesta de etanol (Naranjo y cols., 1987; Monti y Alterwain, 1991; Rassnick y cols., 1992). La ingesta de etanol también se ve reducida por drogas que interfieren con el sistema dopaminérgico central (Monti y Alterwain, 1991; Sellers y cols., 1992; Rassnick y cols., 1993b; Rassnick y cols., 1993c).

### **1.2.7 Cambios tras la exposición crónica a etanol**

La administración repetida de etanol también produce una disminución en la intensidad de sus efectos, es decir, se produce tolerancia. Aunque en comparación con otros analgésicos narcóticos como la heroína, el grado de tolerancia que se adquiere para el etanol es limitado. Esta tolerancia puede deberse a distintos mecanismos. Mecanismos farmacocinéticos, que consisten en la inducción enzimática de los sistemas que metabolizan el etanol por la exposición a éste y que se traducen en la presencia de unos niveles plasmáticos menores tras la administración de una misma dosis (ver apartado “Metabolismo y eliminación del etanol”). Y mecanismos farmacodinámicos, que consisten en una menor respuesta al etanol en igualdad de niveles plasmáticos producida mayoritariamente por adaptaciones celulares a la exposición crónica y que generalmente se relacionan con las funciones que son alteradas por la administración aguda de etanol. Muchas de estas alteraciones también son responsables de la dependencia física que produce la exposición crónica a etanol. Además, la adicción a etanol también se caracteriza por una pérdida progresiva del control de su ingesta y una vulnerabilidad a largo plazo para las recaídas (Tabakoff y Hoffman, 1996). La presencia de sintomatología de abstinencia puede ser también responsable en parte del fenómeno de dependencia y de las conductas de autoadministración con el fin de aliviar el malestar que ocasiona. En líneas generales, el síndrome de abstinencia alcohólico se caracteriza por unos síntomas contrarios a los producidos por la exposición aguda del etanol unido a una activación simpática; y refleja, en parte, las consecuencias de los cambios celulares responsables de la tolerancia (Altman y cols., 1996; Diamond y

Gordon, 1997). En humanos suele aparecer a partir de las 24 horas del cese de la ingesta de etanol y puede durar algunos días. La severidad de los síntomas aumenta después de episodios de abstinencia repetidos (Becker, 1998). Cuando se elimina el alcohol de la sinapsis, se ponen de manifiesto cambios adaptativos que conllevan al aumento de la transmisión excitatoria y a la disminución de la transmisión inhibitoria resultando en la hiperexcitabilidad cerebral característica del síndrome de abstinencia (Littleton, 1998). Se ha observado en personas alcohólicas una reducción en el número de sitios de fijación GABA<sub>A</sub> de la corteza frontal y en otras áreas, así como una menor respuesta a agonistas GABA, y una tolerancia cruzada con benzodiazepinas (Hunt, 1983; Diamond y Gordon, 1997; Grobin y cols., 2000). La exposición crónica también produce un aumento del número de receptores NMDA (Gulya y cols., 1991; Sanna y cols., 1993; Snell y cols., 1993; Trevisan y cols., 1994) que puede servir para contrarrestar los efectos del etanol cuando éste está presente pero que en su ausencia produce una hiperfunción glutamatérgica. Esto podría explicar la hiperexcitabilidad que se observa durante la abstinencia alcohólica y podría ser responsable de fenómenos excitotóxicos (Diamond y Gordon, 1997; Wirkner y cols., 1999). De hecho, la exposición crónica a alcohol produce un aumento del flujo de calcio mediado por el receptor de NMDA (Iorio y cols., 1992; Ahern y cols., 1994) y una mayor excitotoxicidad por NMDA en cultivos neuronales (Chandler y cols., 1993; Ahern y cols., 1994; Hoffman, 1995).

El incremento de canales de calcio tras la exposición crónica a etanol también podría participar en la modulación de otros neurotransmisores y en la abstinencia a alcohol (Little y cols., 1986; Lynch y cols., 1986; Little, 1999), pero este aumento de receptores se relaciona de alguna forma con el aumento de determinadas isoenzimas de PKC que ocurre tras la exposición crónica a alcohol (Messing y cols., 1990).

Al igual que ocurre con otras drogas de abuso, la abstinencia a etanol incluye efectos motivacionales; conlleva además un aumento masivo del factor de liberación de corticotropinas (CRF) en el núcleo central de la amígdala (Rassnick y cols., 1993a) y una reducción de la vía dopaminérgica mesolímbica (Diana y cols., 1996), lo que se relaciona con la aparición de estrés y disforia.

### 1.2.8 Componente genético en las acciones del etanol

La vulnerabilidad genética también juega un papel importante en el alcoholismo (Ball y Murray, 1994) y quizás en los trastornos médicos provocados por el etanol. Al parecer existen muchos sistemas cerebrales implicados en esta predisposición o sensibilidad al alcohol, determinando además los efectos agudos y crónicos que produce el etanol. Algunos autores han relacionado alteraciones en el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> y una transmisión dopaminérgica reducida (McBride y cols., 1993a; Lawford y cols., 1995; Noble, 1996) con una mayor predisposición al alcoholismo, aunque muchos otros autores no pudieron corroborar este fenómeno (Diamond y Gordon, 1997). Por otro lado se han seleccionado determinadas cepas de ratas por su mayor preferencia a ingerir alcohol y otras por su baja sensibilidad al etanol. Se ha corroborado que muchas de las cepas preferentes a alcohol tienen menor contenido de serotonina (Murphy y cols., 1987; Gongwer y cols., 1989; Yoshimoto y cols., 1992b; McBride y cols., 1995) y una reducida inervación serotoninérgica (Wong y cols., 1993). Este sistema serotoninérgico responde distinto en cepas de ratas preferentes a alcohol comparado con cepas no preferentes, seguramente debido a cambios en los niveles de receptores. Así se han encontrado reducidos niveles de receptores 5-HT<sub>2</sub> (McBride y cols., 1993b) y niveles aumentados de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Wong y cols., 1993; McBride y cols., 1994; Chen y Lawrence, 2000) en determinadas regiones cerebrales, lo que parece indicar un papel importante de la transmisión serotoninérgica en la preferencia y las propiedades reforzantes del alcohol, así como en la modulación de su ingesta (Naranjo y cols., 1986). Además, neuronas serotoninérgicas parecen degenerar en ratas que muestran preferencia al alcohol (Halliday y cols., 1995) y en alcohólicos crónicos (McBride y cols., 1994). Así, antagonistas de receptores de serotonina reducen la ingesta de alcohol en ratas condicionadas o en cepas de ratas preferentes a alcohol (Kostowski y cols., 1993; Jankowska y Kostowski, 1995; Tomkins y cols., 1995). Además, ratones mutantes para determinadas isoformas de la PKC muestran una respuesta conductual al etanol alterada lo que se ha relacionado con una reducción de la sensibilidad de receptores GABA<sub>A</sub> entre otros (Harris y cols., 1995a). El aumento de canales de calcio (Guppy y cols., 1995) y de las corrientes de calcio activadas por voltaje tras la exposición crónica a alcohol (Perez-Velazquez y cols., 1994) también es mucho mayor en ratones seleccionados por presentar un síndrome de abstinencia a alcohol más severo.

### 1.3 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MONOAMINAS POR RECEPTORES PRESINÁPTICOS

#### 1.3.1 Identificación y caracterización de los receptores presinápticos

Hace aproximadamente tres décadas se descubrió que en la membrana citoplasmática de los terminales nerviosos presinápticos se localizan receptores que modulan la liberación de neurotransmisores desde el mismo terminal nervioso (Langer, 1974; Starke y cols., 1977; Westfall, 1977; Starke, 1981; Starke, 1987; Starke y cols., 1989). Esta hipótesis constituyó en su momento un concepto revolucionario en la neurotransmisión.

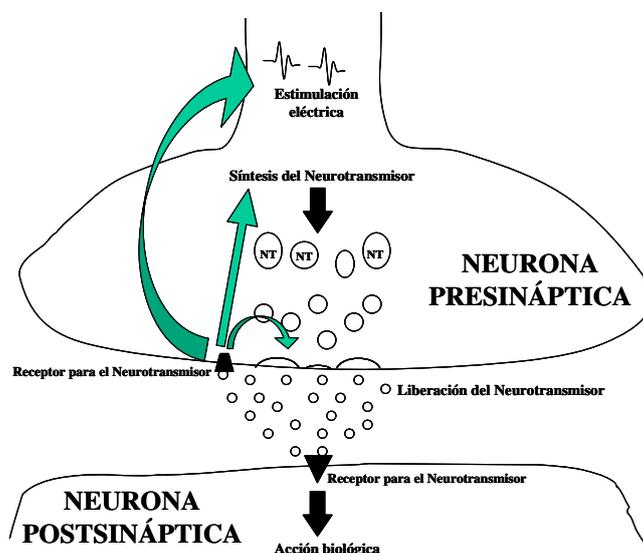
Así, el descubrimiento de los receptores presinápticos produjo un cambio radical en el punto de vista de la comunicación neuronal que hasta este momento había sido considerada unidireccional, del terminal nervioso al receptor postsináptico. Introdujo un nuevo concepto ya que se podía conducir la información en la dirección contraria, desde el espacio sináptico hasta los terminales nerviosos presinápticos.

Los receptores presinápticos pueden modular la liberación de neurotransmisor al producir una hiperpolarización de la membrana celular (Fig. 1.19). Además, las neuronas también poseen receptores presinápticos que pueden inhibir la síntesis de neurotransmisor (Anden y cols., 1976; Starke y cols., 1989; Pi y Garcia-Sevilla, 1992).

El término receptor presináptico se utilizó para definir a aquellos receptores localizados en los terminales nerviosos, los cuales, en respuesta a un neurotransmisor, co-transmisor u hormona podría modular la liberación del neurotransmisor dependiente de  $Ca^{2+}$ . Estos receptores presinápticos pueden ser estimulados por el transmisor endógeno de la neurona, lo que supone la introducción del término autorreceptor, que estaría involucrado en el mecanismo de autocontrol a través del cual la neurona regula su propia liberación.

Por otro lado, el término de heterorreceptor presináptico fue introducido para identificar una segunda categoría de receptores presinápticos que modulan la liberación y/o síntesis de neurotransmisor, en este caso como respuesta a señales químicas de diferente naturaleza al transmisor de la propia neurona, presentes en espacios sinápticos (Laduron, 1985). Estos heterorreceptores presinápticos son sensibles a transmisores liberados desde terminales adyacentes. Mediante la existencia de heterorreceptores se

establecen relaciones funcionales entre distintos tipos de neuronas (Yoshioka y cols., 1992a; Johnson y cols., 1993; Esteban y cols., 1996).



**Fig. 1.19** Resumen esquematizado de funciones que son moduladas a través de receptores presinápticos

La evidencia de la existencia de autorreceptores en terminales presinápticos que inhiben la liberación de neurotransmisores se basó principalmente en una serie de descubrimientos: primero, la liberación de neurotransmisor dependiente de  $Ca^{2+}$  provocada por un potencial de acción fue inhibida por agonistas del receptor; segundo, antagonistas de estos receptores aumentaron la liberación de neurotransmisor; y tercero, la interacción entre los agonistas y antagonistas que modulan la liberación de transmisor es de naturaleza competitiva. Por otro lado se han obtenido evidencias de esta autorregulación de la señalización química neuronal a través de autorreceptores presinápticos inhibitorios en condiciones *in vitro* e *in vivo* en el sistema nervioso central y periférico (Langer, 1997). La caracterización farmacológica de los receptores presinápticos que modulan la liberación de neurotransmisor llevó al descubrimiento de una familia de receptores, como los adrenoceptores  $\alpha_2$  (Dubocovich y Langer, 1974).

El descrito autocontrol regula a nivel de terminal la secreción neural y representa un mecanismo de control fino de la amplitud de la señal química que se origina en el terminal sináptico. La regulación de la liberación de neurotransmisor mediada por los receptores presinápticos es altamente dependiente de la frecuencia. Estos mecanismos de *feed-back* negativos mediados por los autorreceptores inhibitorios presinápticos

operan de forma más efectiva en un rango bajo o intermedio de frecuencias de estimulación nerviosa.

Cabe destacar también que algunas neuronas poseen auto/heterorreceptores localizados no sólo en los terminales presinápticos, sino también en el soma o en las dendritas neuronales, los cuales modulan la actividad de la neurona (Aghajanian y Bunney, 1977; Cedarbaum y Aghajanian, 1977; Sprouse y Aghajanian, 1986). La activación de estos receptores somatodendríticos inhibitorios por agonistas reduce la actividad mientras que antagonistas bloquean los efectos de los agonistas.

### 1.3.2 Regulación de la síntesis de catecolaminas

La tirosina hidroxilasa (TH, E.C. 1.14.16.2) es el enzima limitante de la vía de síntesis de catecolaminas (Fig. 1.20). Se trata de un enzima oxidante, que cataliza la conversión de la L-tirosina en 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), paso inicial en la biosíntesis de catecolaminas. Su distribución en cerebro es variable y parece localizarse en mayor medida en neuronas dopaminérgicas que en las noradrenérgicas.

El enzima TH es estereoespecífico y requiere oxígeno molecular y una pterina reducida como cofactores para realizar su función. La pterina reducida que actúa como cosustrato es la tetrahidrobiopterina. Se clasifica como oxigenasa de acción mixta al insertar un átomo de oxígeno en el sustrato, L-tirosina, a partir del  $O_2$ . Parece que es necesaria la presencia de un ión  $Fe^{2+}$  para que se lleve a cabo una óptima actividad TH. Por otro lado, la TH es capaz de hidroxilar tanto la L-tirosina como la fenilalanina para producir tirosina (Ikeda y cols., 1965; Ikeda y cols., 1967; Shiman y cols., 1971). El enzima se activa por fosforilación, que puede ser provocada por proteínas quinasas dependientes de AMPc o de  $Ca^{2+}$ .

La DOPA es descarboxilada de forma rápida por el enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos para formar dopamina (DA), y ésta posteriormente es transformada en noradrenalina (NA).

Debido a que la TH cataliza la reacción inicial y autolimitante en la biosíntesis de DA, NA y adrenalina, los niveles tisulares de catecolaminas están determinados en gran medida, por la actividad de este enzima.

Entre las sustancias que pueden modular la actividad del enzima tirosina hidroxilasa se encuentran tanto substratos, cofactores, productos de reacción y distintos neurotransmisores, así como diversos fármacos.

El precursor L-tirosina puede provocar alteraciones de la afinidad de la TH aunque este hecho no parece tener gran relevancia fisiológica, ya que la TH se encuentra prácticamente saturada por el substrato (Udenfriend, 1966).

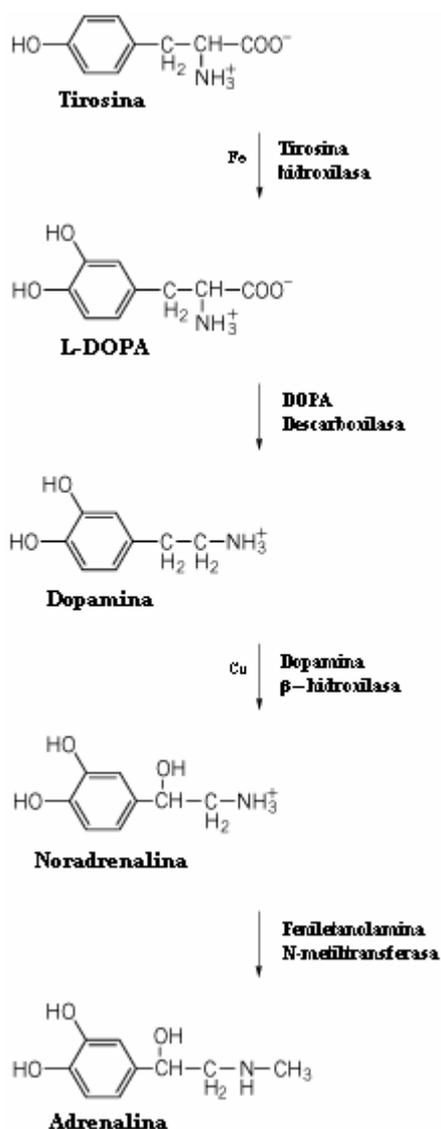


Fig. 1.20 Esquema de la síntesis de catecolaminas

Por otro lado, en condiciones fisiológicas, los niveles tisulares del cofactor reducido pteridina se hallan por debajo de los necesarios para saturar el enzima, por lo que un aumento en la afinidad por el cofactor reducido, puede constituir un eficaz mecanismo fisiológico para incrementar la velocidad de síntesis de catecolaminas (Roth y cols., 1975; Masserano y Weiner, 1981).

A su vez, un importante mecanismo regulador de la actividad tirosina hidroxilasa lo constituye la inhibición por catecolaminas y metabolitos que mantienen el grupo catecol y que inhiben la enzima a través de un mecanismo competitivo por el cofactor (Nagatsu y cols., 1964; Udenfriend y cols., 1965; Laschinski y cols., 1986).

El producto de la reacción catalizada por la TH, la L-dopa (DOPA), es un eficaz inhibidor de este enzima (Nagatsu y cols., 1964; Ikeda y cols., 1966) aunque la relevancia fisiológica de este proceso probablemente es escasa, ya que la dopa es rápidamente descarboxilada a DA y prácticamente no se acumula *in vivo*. La inhibición de la actividad del enzima por la DOPA se produce de una manera no competitiva por el cofactor pterina (Shiman y cols., 1971; Kaufman y Fisher, 1974). Por otro lado, los estrógenos que contienen un grupo catecol en su estructura tienen capacidad para inhibir la actividad tirosina hidroxilasa con una potencia comparable a la NA y la DA (Panek y cols., 1987). Además, la actividad TH también se regula en respuesta a modificaciones en el flujo de impulsos nerviosos. El aumento del flujo de impulsos conlleva a una mayor liberación y metabolización del neurotransmisor, lo cual produciría el vaciamiento de un depósito de NA que ejerce de regulador, accesible a la TH, mientras que en los periodos de reposo, en los que la utilización de este neurotransmisor disminuye, la NA se acumularía disminuyendo la actividad TH (Weiner, 1970). Además, tras el bloqueo del metabolismo de la NA mediante fármacos inhibidores de la actividad monoamino oxidasa, se han determinado descensos en la actividad TH (Neff y Costa, 1966).

Por otro lado, un importante mecanismo de regulación lo constituye el mediado por receptores presinápticos, por ejemplo, en el caso de las neuronas noradrenérgicas, los adrenoceptores  $\alpha_2$  modulan tanto la síntesis como la liberación del neurotransmisor.

En el sistema nervioso central, los adrenoceptores  $\alpha_2$  son receptores acoplados a proteínas G que regulan la liberación de NA a través de un mecanismo de retroalimentación negativa mediada por el propio neurotransmisor (Langer, 1974). Durante la liberación de NA provocada por la estimulación nerviosa, el incremento de su concentración en la hendidura sináptica activa al adrenoceptor  $\alpha_2$  provocando una inhibición en su liberación (Starke, 1981).

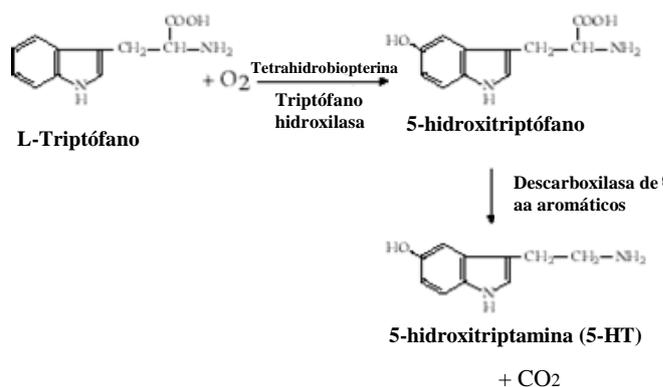
Terminales dopaminérgicos contienen receptores que modulan la síntesis y la liberación de dopamina, a nivel de la TH, en respuesta a agonistas de receptores dopaminérgicos así como a la misma dopamina secretada por los mismos terminales (Kehr y cols., 1972; Christiansen y Squires, 1974a; Christiansen y Squires, 1974b; Iversen y cols., 1976; Westfall y cols., 1976; Kehr y cols., 1977b; Kehr y cols., 1977a;

Waggoner y cols., 1980; Lehmann y Langer, 1982). Este subtipo de receptor dopaminérgico, D<sub>2</sub>, es distinto del receptor postsináptico, D<sub>1</sub> (Kebabian y Calne, 1979).

### 1.3.3 Regulación de la síntesis de serotonina

El enzima triptófano hidroxilasa (THP, EC 1.14.16.4, L-triptófano-5-monooxigenasa) transforma el triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Este enzima se encuentra sólo en el citoplasma de células serotoninérgicas, siendo su distribución idéntica a la de la 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT). Para llevar a cabo su función requiere, como en el caso de la TH, oxígeno y una pteridina reducida como cofactor (Fig. 1.21).

El 5-HTP es rápidamente descarboxilado y transformado en 5-HT por el enzima descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (Lovenberg y cols., 1962). La actividad de este enzima es mucho mayor que la de la TPH, por lo que sólo se encuentran cantidades mínimas de 5-HTP, ya que es rápidamente descarboxilado.



**Fig. 1.21** Esquema de la síntesis de serotonina

En condiciones fisiológicas, este enzima no se encuentra saturado por el sustrato, por lo que la formación de 5-HT en el cerebro se ve afectada por cambios en la disponibilidad de triptófano ya que el paso de triptófano a TPH es limitante de la síntesis de 5-HT (Young y Gauthier, 1981).

La actividad neuronal también puede regular la síntesis de 5-HT. Así, aumentará la síntesis de manera dependiente de la frecuencia, en respuesta a la estimulación somática de las neuronas serotoninérgicas (Eccleston y cols., 1970; Shields y Eccleston, 1972; Hamon y Glowinski, 1974).

Aunque en condiciones fisiológicas la concentración de 5-HT no regula la actividad de la triptófano hidroxilasa, en ciertas condiciones experimentales, como tras un tratamiento con determinados fármacos que aumente la concentración de 5-HT, si que provocará una inhibición de la síntesis de 5-HT (Hamon y cols., 1973); ya que las monoaminas liberadas al espacio sináptico participan en la regulación de la propia síntesis de neurotransmisor por parte de la neurona liberadora, a través de la interacción con receptores presinápticos que modulan la actividad TPH, el paso limitante de la síntesis.



# **OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

Existen evidencias de que los fármacos cannabinoides modulan la actividad de distintos sistemas de neurotransmisión cerebral aunque con diferencias regionales, entre ellos los distintos sistemas monoaminérgicos. La mayoría de estos efectos de los cannabinoides a nivel del Sistema Nervioso Central están mediados por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. Existe cierta controversia sobre si los distintos tipos neuronales monoaminérgicos expresan este receptor cannabinoide. Estos distintos sistemas monoaminérgicos juegan papeles importantes tanto en los efectos agudos como en los fenómenos que se suceden durante la adicción a distintas drogas de abuso, como por ejemplo los opiáceos y el alcohol. Sin embargo, en el caso de los cannabinoides estos efectos todavía no están bien caracterizados, y en particular, el papel de los distintos sistemas monoaminérgicos en los fenómenos asociados al proceso de dependencia a cannabinoides.

A su vez, la administración de etanol también afecta a una gran variedad de sistemas neuronales. Entre ellos, la transmisión noradrenérgica parece verse alterada por el etanol y además se ha postulado que el sistema serotoninérgico puede mediar algunas acciones del etanol, concretamente las propiedades reforzantes, la preferencia a alcohol y las conductas compulsivas de búsqueda de etanol; aunque el sistema dopaminérgico es el principal sistema implicado, entre otras, en estas acciones reforzantes del etanol así como de otras muchas otras drogas de abuso. Así mismo, también se ha propuesto que los cannabinoides endógenos pueden mediar algunos efectos cerebrales del etanol y que la exposición crónica a etanol puede producir cambios en el sistema cannabinoide.

Por otra parte, estudios *in vitro* han mostrado claramente que los cannabinoides son capaces de modular a través del receptor CB<sub>1</sub> la subfamilia de las ERK pertenecientes a la vía de señalización de las MAPK. Evidencias emergentes sugieren que el THC también puede modular de forma indirecta esta vía de señalización *in vivo*, pero todavía es poco conocido el mecanismo a través del cual produce estos efectos. La vía de señalización de las ERK podría ser importante en el desarrollo de los cambios adaptativos y en los procesos adictivos que se producen durante el abuso de distintas drogas, entre ellas el cannabis y el etanol, y que conducen al desarrollo de los característicos fenómenos de tolerancia y dependencia. Hasta el momento son pocos los

trabajos que analizan la modulación *in vivo* de esta vía de señalización en el sistema nervioso central adulto por parte de estas drogas de abuso.

Por ello, los objetivos del presente trabajo fueron:

1 Realizar un análisis conductual de efectos ampliamente descritos en la literatura (efectos sobre la actividad locomotora espontánea, la temperatura corporal, la sensibilidad al dolor y el análisis de distintos signos comportamentales) y otros menos estudiados que permitan, entre otras cosas, corroborar la bondad de los distintos tratamientos con compuestos cannabinoides.

2 Analizar simultáneamente la modulación de la síntesis de noradrenalina, dopamina y serotonina en distintas regiones cerebrales en las que se ha descrito la presencia del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, por tratamientos agudos con compuestos cannabinoides (agonistas y antagonistas), así como por la administración crónica del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 y la abstinencia precipitada por la administración del antagonista selectivo CB<sub>1</sub>, SR141716A, tras este tratamiento crónico.

3 Analizar el efecto agudo y crónico del etanol simultáneamente sobre la síntesis de noradrenalina, dopamina y serotonina en distintas regiones cerebrales ricas en estas monoaminas, así como de la abstinencia espontánea tras el tratamiento crónico.

4 Analizar la sensibilidad de distintos receptores presinápticos monoaminérgicos durante los tratamientos crónico con WIN 55,212-2 y etanol en diferentes regiones cerebrales, así como durante la abstinencia tras dichos tratamientos crónicos para analizar si se producen cambios adaptativos en estos sistemas monoaminérgicos.

5 Analizar el estado funcional del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> tras tratamientos agudos y crónicos con etanol.

6 Y por último, analizar la modulación de distintos componentes de la vía de señalización de la ERK por tratamientos agudos y crónicos con WIN 55,212-2 y por tratamiento agudo y crónico con etanol, así como durante la abstinencia tras dichos tratamientos crónicos en la corteza frontal de rata (una de las regiones cerebrales en la que se producen cambios adaptativos durante la adicción a distintas drogas de abuso).

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas albinas (*Rattus norvegicus*) macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso comprendido entre 220-300 g criadas en el estabulario de la Facultat de Ciències de la Universitat de les Illes Balears. Los animales se mantuvieron en cajas de polipropileno translúcidas en grupos de tres, con ciclos de 12 h de luz/oscuridad, bajo condiciones controladas de temperatura (20-22 °C) y humedad (50-65 %). Recibieron agua y una dieta estándar tipo A04 (Panlab®) *ad libitum* con un contenido calórico teórico de 3000 kcal/kg y la siguiente composición en bruto:

Humedad	.....	12 %
Proteína	.....	15,4 %
Grasa	.....	2,9 %
Glúcidos	.....	60,5 % (de los que un 41 % es almidón)
Fibra	.....	3,9 %
Cenizas	.....	5,3 %

Todos los procedimientos con animales siguieron un protocolo humanitario de acuerdo con los principios para el cuidado de los animales (*Principles of laboratory animal care*; publicación de NIH N° 85-23, revisado 1996) y fueron aprobados por el comité bioético de la Universitat de les Illes Balears.

##### 3.1.2 Fármacos y productos utilizados

###### 3.1.2.1 Fármacos cannabinoides

Se realizaron tratamientos con los agonistas cannabinoides:  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Mesilato de (R)-(+)-[2,3-dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenil-metanona (WIN 55,212-2; Tocris Cookson, Ellisville, MO, USA).

También se utilizaron los antagonistas selectivos del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>: 1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-4-morfolinil-1H-Pirazole-3-carboxamida

(AM281; Tocris Cookson); N-piperidinil- 5-(4-clorofenil)- 1-(2,4-diclorofenil) -4-metilpirazol -3-carboxamida (SR141716A, fue una donación generosa de Sanofi-Synthelabo, Montpellier, France).

### 3.1.2.2 Otros fármacos utilizados

Para la administración de etanol de forma aguda y crónica, se utilizó una disolución al 20% de etanol realizada a partir de otra solución de etanol al 96% (Scharlau, España).

Se utilizaron diferentes fármacos para estudiar la sensibilidad o la participación de distintos receptores. Se utilizó el agonista selectivo del receptor adrenérgico  $\alpha_2$ , la 2-(2,6-dicloroanilino)-2-imidazolina hydrochloride (clonidina; Sigma-Aldrich), el agonista selectivo del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, el ( $\pm$ )8-hidroxi-2-di-n-propilamino-tetralin (8-OH-DPAT; Sigma-Aldrich), el fármaco mixto agonista 5-HT<sub>1A</sub> y antagonista del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>, la n-[4-[4-(2-Pirimidinil)- 1-piperazinil]butil]- 8-azaspiro [4,5]decano-7,9-dione hydrochloride (Buspirona; Sigma-Aldrich), el agonista selectivo del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1B</sub>, el 5-propoxi-3-(1,2,3,6-tetrahydro-4-piridinil)-1H-pirrolol[3,2-b]piridin hydrochloride (CP94253; Sigma-Aldrich) y el antagonista selectivo del receptor glutamatérgico NMDA, la dizocilpina o (5S, 10R) (+)-5-metil- 10,11-dihidro -5H-debenzo[a,d] ciclohepten-5, 10-imina maleato (MK801; Tocris-Cookson).

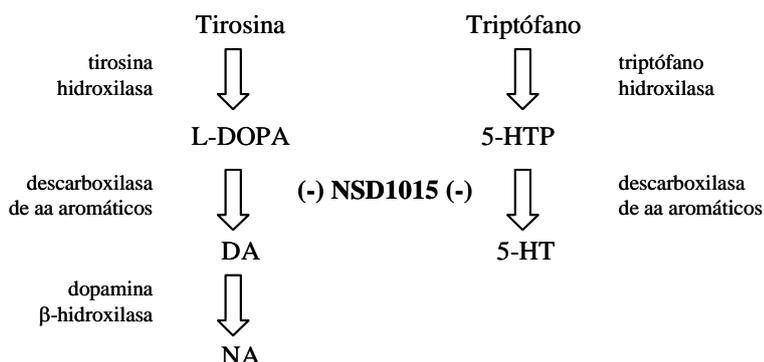
Además se utilizó el inhibidor selectivo de la enzima MEK1/2, el  $\alpha$ -[amino [(4-aminofenil)thio] metilen]-2-(trifluorometil) benzoacetoneitrilo (SL327; Tocris Cookson), que se ha visto que es activo a nivel cerebral mediante administración sistémica ya que atraviesa la barrera hematoencefálica.

### 3.1.2.3 Clorhidrato de 3-hidroxibenzil-hidrazina (NSD 1015)

Para la determinación *in vivo* de la actividad tirosina hidroxilasa (tirosina-3-monooxigenasa, E.C. 1.14.16.2) y triptófano hidroxilasa (triptófano-monooxigenasa, E.C. 1.14.16.4) cerebrales, enzimas limitantes en las vías metabólicas de síntesis de catecolaminas y serotonina respectivamente, los animales fueron tratados con clorhidrato de 3-hidroxibenzil-hidrazina (NSD 1015; Sigma-Aldrich), inhibidor de la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (Fig. 3.1). Al inyectar una dosis supramáxima de NSD 1015 (100 mg/kg) 30 min antes del ensayo, se consigue bloquear

la transformación de DOPA en dopamina y/o noradrenalina y de 5-HTP en serotonina. De esta forma, se acumulan niveles de DOPA y 5-HTP proporcionales al grado de actividad de dichos enzimas limitantes. Los niveles de DOPA, 5-HTP así como los de NA, DA y 5-HT se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Este método de acumulación de precursores de la síntesis de monoaminas es el que se utiliza más comúnmente para valorar la hidroxilación de la tirosina y el triptófano *in vivo* (Carlsson y cols., 1972; Nissbrandt y cols., 1988).



**Fig. 3.1** Esquema del efecto de NSD 1015 sobre las vías de síntesis de monoaminas

### 3.1.2.4 Anticuerpos

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína 74 kDa c-Raf1 fosforilada (p-Raf) fue suministrado por la casa comercial Calbiochem (Alemania). Este anticuerpo proviene de la inmunización de conejos con un fosfopéptido sintético que contiene los residuos aminoacídicos de alrededor de los residuos de tirosina (Tyr 340 y Tyr 341, ambos fosforilados) de la proteína c-Raf (Raf-1) humana. Este anticuerpo es apto para usarlo en las técnicas inmunológicas de *western blot* y se conservó alicuotado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Se utilizó a una dilución de 1:500 para incubar las membranas de nitrocelulosa.

El anticuerpo monoclonal (IgG de ratón) contra la proteína c-Raf1 (clon 53) fue suministrado por Transduction Laboratories (Lexington, U.S.A.). Para obtener este anticuerpo se utilizó un péptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la proteína c-Raf humana. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Se utilizó a una dilución 1:5000.

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína de 45 kDa MEK1/2 fosforilada (p-MEK1/2) fue suministrado por Cell Signalling Technology, Inc. (Beverly, U.S.A). Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un fosfopéptido sintético que contiene los residuos aminoacídicos de alrededor de los residuos de Serina (Ser 217 y Ser 221, ambos fosforilados) derivado de la secuencia de la proteína MEK1/2 de origen humano. Este anticuerpo es apto para usarlo en las técnicas inmunológicas de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización. Se utilizó a una dilución 1:1000.

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína MEK1/2 fue suministrado por Cell Signalling Technology, Inc. Este anticuerpo proviene de la inmunización de conejos con un péptido sintético que engloba los residuos serina (Ser 217 y Ser 221) derivado de la secuencia de MEK1/2 de origen humano. Reconoce específicamente las isoformas de la proteína MEK1/2 procedentes de humanos, ratón y rata independientemente de su estado de fosforilación. Este anticuerpo es apto para usarlo en técnicas inmunológicas de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización. Se utilizó a una concentración de 1:1000.

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra las proteínas de 44 y 42 kDa, ERK1 y ERK2 fosforiladas (p-ERK1/2) fue suministrado por Calbiochem. Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un fosfopéptido derivado de la MAP quinasa humana (p44<sup>ERK1</sup> y p42<sup>ERK2</sup>) que contiene los aminoácidos de alrededor de la treonina (Thr 202) y la tirosina (Tyr 204). Este anticuerpo es apto para ser utilizado en técnicas inmunológicas de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización. Se usó a una dilución de 1:3000.

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra las proteínas ERK1 y ERK2 fosforiladas (ERK1/2) fue suministrado por Calbiochem. Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un péptido sintético derivado de la secuencia de la MAP quinasa (p42<sup>ERK2</sup>) de rata. Reconoce de manera específica ERK1 y ERK2 de humano, de ratón y rata independientemente de su estado de fosforilación. Este anticuerpo es apto para usarlo en las técnicas inmunológicas de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización. Se utilizó a una dilución de 1:1000.

El anticuerpo secundario, conjugado con el enzima peroxidasa de rábano, constituido por inmunoglobulinas de mono anti-inmunoglobulinas de conejo, suministrado por Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK), fue utilizado con los anticuerpos primarios: anti-p-Raf, anti-p-MEK1/2, anti-MEK1/2, anti-p-ERK1/2 y anti-ERK1/2, y conservado a 4 °C hasta su utilización. La dilución que se utilizó para incubar las membranas dependió del anticuerpo primario utilizado y estuvo comprendido entre 1:1000 y 1:5000.

El anticuerpo secundario, conjugado con el enzima peroxidasa de rábano, constituido por inmunoglobulinas de oveja anti-inmunoglobulinas de conejo, suministrado por Amersham Pharmacia Biotech, fue utilizado con el anticuerpo primario anti-Raf y conservado a 4 °C hasta su utilización. Se utilizó a una dilución de 1:5000.

### **3.1.2.5 Otros reactivos**

Otros reactivos utilizados en el estudio y su fuente de obtención han sido: ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC; Sigma-Aldrich); ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA, Sigma-Aldrich); ácido homovanílico (Sigma-Aldrich); ácido perclórico 60% (HClO<sub>4</sub>; Scharlau Chemie, Barcelona); ácido octanesulfónico (Sigma-Aldrich); ácido ortofosfórico 85% (PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub>; Scharlau); acrilamida/bis-acrilamida (Pronadisa, España); albúmina sérica bovina, fracción V (BSA; Sigma-Aldrich); 4-(2-aminoetil) benzensulfonil fluoride (ABESF; Sigma-Aldrich); antipaina (Sigma-Aldrich); azul de bromofenol (Sigma-Aldrich); cantaridina (Sigma-Aldrich); L-*trans*-3-carboxioxiran-2-carbonil-L-leucilagmatina (E64; Sigma-Aldrich); cloruro sódico (Sigma-Aldrich); cloruro potásico (Sigma-Aldrich); Cremophor EL<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich); L-3,4-dihidroxifenil-alanina (L-DOPA; Sigma-Aldrich); EDTA dipotásico (K<sub>2</sub>-EDTA; Sigma-Aldrich); etanol 96% (Scharlau); fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich); fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich); fosfato monosódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich); glicerol (Sigma-Aldrich); glicina (Sigma-Aldrich); hidróxido sódico (NaOH; Sigma-Aldrich); 5-hidroxitriptófano (5-HTP; Sigma-Aldrich); 5-hidroxitriptamina (serotonin; Sigma-Aldrich); 3-hidroxi-tiramina (dopamina; Sigma-Aldrich); lauril sulfato sódico (SDS; Scharlau); leche en polvo desnatada (Asturiana S.A., España); leupeptina (Sigma-Aldrich); marcador de pesos moleculares “Prestained SDS-PAGE Standard (Broad Range)” (Bio-Rad, USA.); membrana de nitrocelulosa 0,45 m

(Schleider & Schuell, Alemania); 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich); metanol multisolvent (Scharlau); metabisulfito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ; Merck & Co. Inc., Whitehouse station, NJ, USA); (-)-norepinefrina (Sigma-Aldrich); ortovanadato sódico (Sigma-Aldrich); película fotográfica (Hyperfilm-ECL) (Amersham, Piscataway, USA); pepstatin A (Sigma-Aldrich); persulfato amónico (APS; Sigma-Aldrich); reactivo BCA (Pierce, USA.); reactivo Enhanced Chemiluminiscence (ECL) (Amersham Biosciences); Temed (Bio-Rad); Tween-20 (Sigma-Aldrich). Otros reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Tratamientos farmacológicos

Se realizaron diversos tratamientos farmacológicos tanto agudos como crónicos en ratas, en los cuales todos los fármacos fueron administrados por vía intraperitoneal (i.p.). Por un lado se realizaron tratamientos con fármacos cannabinoides, así como toda una serie de aproximaciones farmacológicas para dilucidar los mecanismos de acción y alteraciones en determinados receptores presinápticos. Y por otro lado, se procedió de forma parecida (aunque menos extensa) con el etanol. Finalmente, se realizó una breve incursión en la posible relación cruzada entre ambos cannabinoides y etanol.

#### 3.2.1.1 Tratamientos con fármacos cannabinoides

Se realizaron tratamientos agudos y crónicos con compuestos cannabinoides para estudiar simultáneamente su efecto *in vivo* sobre la síntesis de noradrenalina, dopamina y 5-HT en el SNC de rata. Para ello, se evaluó la actividad tirosina hidroxilasa (TH) y triptófano hidroxilasa (TPH), enzimas limitantes en las vías de síntesis de monoaminas. Se analizó el efecto de estos tratamientos sobre la síntesis de las distintas monoaminas en diferentes regiones del cerebro de rata: en una porción del tronco encefálico que engloba el locus ceruleus, principal centro neuronal donde se localizan los somas de las neuronas noradrenérgicas; en regiones enriquecidas en terminales nerviosos noradrenérgicos y/o serotoninérgicos: corteza parieto-occipital, hipocampo, hipotálamo y cerebelo; así como en una región rica en terminales dopaminérgicos y serotoninérgicos, el estriado.

Además, también se analizó la modulación por parte de estos tratamientos agudos y crónicos sobre la vía de señalización de la ERK (subfamilia de las MAPK) en la corteza frontal de rata mediante la técnica de *western blot*.

En los tratamientos con fármacos cannabinoides, los animales del grupo control recibieron por vía intraperitoneal (i.p.) el vehículo en el que se disolvieron estos compuestos, que consiste en una mezcla de Cremophor®:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1:18; 1 ml/kg). En el resto de tratamientos los animales control recibieron suero salino (NaCl 0,9%; 1 ml/kg).

#### 3.2.1.1.1 Tratamientos agudos con fármacos cannabinoides

Se realizaron tratamientos agudos con diferentes dosis de agonistas cannabinoides. Se analizaron 3 dosis del principal componente psicoactivo del cannabis, el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC; 5, 10 y 20 mg/kg, i.p.) y 3 dosis del agonista cannabinoide sintético WIN 55,212-2 (WIN; 2, 4 y 8 mg/kg, i.p.) y los animales fueron decapitados 1 h después. En el caso del análisis de la modulación de la vía de señalización de la ERK en la corteza frontal de rata solo se analizó el efecto de la dosis de WIN 55,212-2 de 8 mg/kg (i.p.) para compararlo con el efecto del tratamiento crónico (ver apartado siguiente).

También se realizaron tratamientos agudos con los antagonistas selectivos del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, el SR141716A y el AM 281 (10 mg/kg, i.p.), y los animales fueron sacrificados 1 h después.

Para comprobar que el efecto de los cannabinoides se lleva a cabo a través del receptor CB<sub>1</sub>, se administraron los antagonistas selectivos CB<sub>1</sub>, SR141716A ó AM281 (10 mg/kg, i.p.), 10 min antes del agonista cannabinoide (THC; 10 ó 20 mg/kg ó WIN; 4 ó 8 mg/kg, i.p.). Los animales también fueron sacrificados 1 h después de la administración del agonista.

Todos los animales utilizados para el análisis de la síntesis de monoaminas recibieron una inyección de NSD 1015 (100 mg/kg, i.p.) 30 min antes de su sacrificio para acumular niveles de DOPA y 5-HTP proporcionales al grado de actividad de los enzimas tirosina hidroxilasa y triptófano hidroxilasa, respectivamente.

### 3.2.1.1.2 *Tratamientos crónicos con fármacos cannabinoides*

Se realizaron tratamientos crónicos con el agonista sintético WIN 55,212-2 a dosis crecientes durante cinco días con un esquema parecido al que se ha descrito para inducir un síndrome de abstinencia espontáneo a cannabinoides mediante su infusión continua (Aceto y cols., 2001). El WIN 55,212-2 se administró i.p. dos veces al día (entre las 8-9 h de la mañana y las 20-21 de la noche), siguiendo el siguiente esquema: el primer día dos inyecciones de 2 mg/kg; el segundo día 2 mg/kg por la mañana y 4 mg/kg por la noche; el tercer día dos inyecciones de 4 mg/kg y el cuarto día dos inyecciones de 8 mg/kg. El quinto día solo se administró la dosis de la mañana (8 mg/kg) y los animales fueron decapitados 1 h después de esta última inyección del agonista.

Para provocar el síndrome de abstinencia, se administró el antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, SR141716A (10 mg/kg, i.p.), 4 h después de la última administración de WIN 55,212-2 tras el tratamiento crónico, siguiendo un esquema descrito previamente capaz de precipitar un síndrome de abstinencia (Cook y cols., 1998; Hutcheson y cols., 1998; Tzavara y cols., 2000). Los animales fueron sacrificados 1 h después de esta inyección de SR141716A. Para comparar con este grupo también se realizó un tratamiento agudo en el que se administró SR141716A (10 mg/kg, i.p.) 4 h después de una única inyección de WIN 55,212-2 (8 mg/kg, i.p.), y los animales se sacrificaron 1 h después. En todos estos animales se estimó la severidad del síndrome de abstinencia, observándose la aparición de determinados signos conductuales característicos.

Todos los animales utilizados para estudiar la modulación de la síntesis de monoaminas también recibieron una inyección de NSD 1015 (100 mg/kg, i.p.) 30 min antes de su sacrificio para testar la actividad de los enzimas limitantes en la síntesis de monoaminas.

### *3.2.1.1.3 Tratamientos para el estudio de la sensibilidad de receptores presinápticos*

Para el estudio de la sensibilidad de los distintos receptores presinápticos tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 (ver apartado anterior), se administraron distintos agonistas de estos receptores presinápticos 1h después de los distintos tratamientos: ratas control tratadas con salino, ratas tratadas de forma crónica con WIN 55,212-2 (ver apartado anterior; 2 mg/kg-día, i.p., durante 7 días y sacrificio a las 2h) y ratas abstinentes precipitado por la administración del SR141716A (10 mg/kg, i.p., 2h). Estos agonistas administrados fueron la clonidina (1 mg/kg, i.p., 1h) para analizar la sensibilidad del receptor adrenérgico  $\alpha_2$ , el 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., 1h) para analizar la sensibilidad del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> y el CP94253 (1,5 mg/kg, i.p., 1h) para analizar la sensibilidad del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1B</sub>.

Los animales recibieron además una inyección de NSD 1015 (100 mg/kg, i.p.) 30 min antes de su sacrificio.

### *3.2.1.2 Tratamientos con etanol*

#### *3.2.1.2.1 Tratamientos agudos y crónicos con etanol*

También se realizaron tratamientos agudos y crónicos con etanol. Para administrar el etanol se utilizó una dilución de etanol al 20% en suero salino y se administró también de forma intraperitoneal (i.p.). En el tratamiento agudo se realizó una única administración de etanol (2 g/kg, i.p.) y se sacrificaron los animales a las 2 horas. El tratamiento crónico consistió en 2 g/kg diarios de etanol (i.p.) durante 7 días, repartido en dos administraciones diarias (a las 9:00 y a las 21:00). Los animales fueron sacrificados 2 horas después de la última administración de etanol. El grupo abstinente se sacrificó 24 horas después de esta última administración de etanol y se consideró que estos animales presentaban un síndrome de abstinencia espontáneo a etanol ya que se ha observado que la aparición de la sintomatología conductual característica aparece, en animales de experimentación, de forma espontánea entre las 12-24 h después de la interrupción del tratamiento con etanol (Macey y cols., 1996). En el caso del estudio de la síntesis de monoaminas los animales recibieron además una inyección de NSD 1015 (100 mg/kg) 30 min antes de su sacrificio.

### *3.2.1.2.2 Tratamientos para el estudio de la sensibilidad de receptores presinápticos*

Para analizar la sensibilidad de los receptores los receptores serotoninérgicos se administró el agonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, el 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., 1h) y el fármaco mixto buspirona (1 mg/kg, i.p., 1h) que es un agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub> y antagonista del receptor D<sub>2</sub> a los 4 grupos de animales tratados con etanol (control, etanol agudo, etanol crónico y etanol abstinentes). Todos los animales recibieron además una inyección de NSD 1015 (100 mg/kg) 30 min antes de su sacrificio.

### *3.2.1.2.3 Tratamiento combinado etanol y cannabinoides*

Para estudiar la modulación de la funcionalidad de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> en el cerebro de rata tras tratamientos con etanol se administró una dosis aguda de vehículo (1 ml/kg, i.p., 1h) o del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (4 mg/kg, i.p., 1h) en los 4 grupos de animales tratados con alcohol: grupo tratado de forma aguda con salino (1 ml/kg, i.p., 2h), grupo tratado de forma aguda con etanol (2 g/kg, i.p., 2h), grupo crónico de etanol (ver apartado anterior; 2 mg/kg·día, i.p., durante 7 días y sacrificio a las 2h) y grupo abstinentes de etanol (24h de abstinencia espontánea después del tratamiento crónico con alcohol). Todos los animales recibieron además una inyección de NSD 1015 (100 mg/kg, i.p.) 30 min antes de su sacrificio.

## **3.2.2 Análisis conductual**

### *3.2.2.1 Determinación de la actividad analgésica (Tail flick test)*

El método de analgesimetría utilizado es el descrito por D'Amour y Smith (1941) y desarrollado posteriormente por Baas y Vander Broock, (1952). En este caso, el estímulo doloroso que se aplica consiste en un foco calorífico aplicado a unos 3-4 cm de la base de la cola de la rata. Se calcula el tiempo de latencia o tiempo que tarda la rata en retirar la cola de la fuente de calor. Con esta técnica se provoca un estímulo térmico agudo de elevada intensidad, incondicionado y no lesivo en el cual la intensidad de descarga de las fibras de sensibilidad nociceptiva aferentes, correlaciona con la activación de las neuronas de rango dinámico amplio (RDA) y marginales del asta dorsal de la médula espinal. Tras el estímulo doloroso se produce una respuesta

somática de agitación o comportamiento de evasión que es proporcional a la intensidad de dicho estímulo (Yaksh, 1999).

Se utilizó el modelo de analgesímetro *Light Beam Analgesymeter* (LE 7106) de la casa comercial LETICA<sup>®</sup>, que consiste básicamente en un sistema automático que activa un cronómetro al encenderse una lámpara halógena, situada a unos 5 cm de altura, y lo detiene cuando el animal retira la cola y deja expuesta una célula fotoeléctrica al haz de luz de la lámpara (Fig. 3.2). Antes de iniciar los experimentos, se ajustaron tanto la intensidad de luz que producía la lámpara como la sensibilidad de la célula fotoeléctrica para conseguir un tiempo de latencia basal de entre 3 y 4 segundos. Con la finalidad de no dañar la cola de la rata se estableció un tiempo de latencia máximo o *cut-off* que será el tiempo máximo de exposición al estímulo doloroso (triple del tiempo de latencia basal).



**Fig. 3.2** Analgesímetro utilizado en los experimentos

Para medir los tiempos de latencia basal para cada animal, estos fueron colocados en cepos de la casa comercial LETICA<sup>®</sup> y tapados con un paño unos 5 min antes de empezar las mediciones. Se realizaron cinco medidas del tiempo de latencia con intervalos de 20 segundos entre ellos. Se descartaron las dos primeras medidas para evitar interferencias por parte de la manipulación del animal y se consideró el tiempo de latencia basal como el promedio de las tres últimas mediciones. También se calcularon los valores de *cut-off*. Una vez calculados los valores de latencia basales se realizó el tratamiento agudo y se realizaron medidas cada cierto tiempo para comprobar la evolución temporal de la analgesia (30, 1 h y 2 h desde el tratamiento). Para cada tiempo, el esquema de mediciones fue idéntico al comentado para las medidas basales.

### ***3.2.2.2 Determinación de la temperatura rectal***

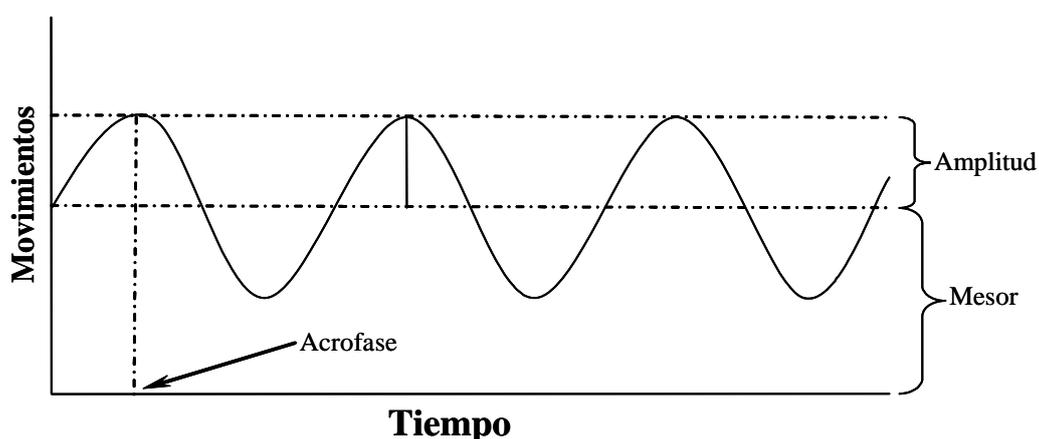
Al mismo tiempo que se analizaba la sensibilidad al dolor también se midió la temperatura rectal de los animales, insertando en el recto del animal (unos 2 cm) un termistor lubricado (10 mm largo por 2 mm ancho) conectado a un indicador digital (Hanna instruments S.L. modelo HI 93510N). Y se mantuvo en esa posición hasta que se obtuvo una señal más o menos estable (30-40 segundos). Se analizó el efecto agudo de los distintos fármacos cannabinoides sobre la temperatura rectal de las ratas. En el caso del WIN 55,212-2 también se analizó el efecto sobre la temperatura rectal tras el tratamiento crónico (ver apartados “Tratamientos crónicos con fármacos cannabinoides” y “Valoración de la abstinencia a cannabinoides precipitada por SR141716A”).

### ***3.2.2.3 Cuantificación de la actividad locomotora espontánea***

Para medir la actividad locomotora espontánea se mantuvieron los animales en una cámara aislada con unas condiciones óptimas de temperatura (20-22 °C) y humedad (50-65 %) y un fotoperiodo de 12/12 h de luz/oscuridad. Los animales se colocaron en cajas individuales que se colocaron dentro de unos marcos provistos de un sistema de detección de 2 haces de rayos infrarrojos ( $\lambda=950$  nm), perpendiculares entre sí y situados a una altura de 7 cm del plano de sustentación. Estos emisores infrarrojos se excitan a una frecuencia de 4866 Hz y los haces inciden sobre células fotoeléctricas que responden únicamente a esta longitud de onda, están sintonizados para responder únicamente a esta frecuencia para evitar la posible interferencia de otras fuentes infrarrojas. Este sistema permite trabajar tanto en condiciones de oscuridad como bajo iluminación natural o artificial. La señal de salida presenta dos niveles o estados: bajo (L) equivalente a 0 V y alto (H) equivalente a 5 V. Esta señal de salida cambia de estado cada vez que se detecta un movimiento. El sistema permite tres modos distintos de detección. El modo que se eligió porque se comprobó que se adaptaba mejor a la actividad de la rata, presenta una salida H cuando no hay ningún haz interrumpido y cambia a nivel L cuando se interrumpe un solo haz. El sistema también lleva incorporado un fotómetro y un termómetro para comprobar que se mantienen niveles constantes de luz y temperatura, y para registrar el momento de cambio de luz. De esta forma se cuantificó automáticamente los movimientos horizontales que realizaba el animal dentro de la caja, gracias al sistema de adquisición de datos DAS\_16 versión 1 desarrollado por el grupo de cronobiología de la Universidad de Barcelona (UB).

De esta forma, se monitorizó la actividad locomotora horizontal y espontánea de los animales durante las 24 h del día. Los animales se mantuvieron unos 3 días en la cámara para que se aclimataran. A continuación se empezó a registrar la actividad locomotora y se dejaron unos 3 días en los que se cuantificó la actividad basal. Seguidamente se analizó el efecto de la administración (i.p.) de salino (1 ml/kg), vehículo (1 ml/kg), THC (10 mg/kg), SR141716A (10 mg/kg) y la combinación de SR (10 mg/kg) administrado 10 min antes de la inyección de THC (10mg/kg). Estos tratamientos se realizaron durante la fase de luz (al cabo de 1-2 h del encendido de la luz) o durante la fase de oscuridad (casi al mismo tiempo del apagado de la luz). En otro grupo de animales se analizó la actividad locomotora de los animales durante los primeros 4 días del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 (ver apartado “Tratamientos crónicos con fármacos cannabinoides”), una vez se hubieron aclimatado a la cámara en la que se analizó esta actividad locomotora.

Los datos de actividad también fueron analizados con el programa “El Temps” versión 1.179 (grupo cronobiología de la UB) para obtener información sobre el ciclo circadiano de estos animales (Fig. 3.3). Los parámetros calculados fueron: mesor (valor medio de la actividad durante las 24 h del ciclo), amplitud (diferencia, en cantidad, entre el momento de máxima y mínima actividad) y acrofase (medida temporal del momento en el que se produce el máxima de actividad).



**Fig. 3.3** Parámetros descriptivos del ciclo circadiano

Los datos también fueron analizados con el programa “*Actiwatch Sleep Analysis 2001*” versión 1.16 para el cálculo de los parámetros sueño-vigilia. Para este análisis hay que determinar el inicio y final del sueño que en este caso coinciden con los cambio de luz (inició del sueño al encenderse la luz y final al apagarse). Y se calculan toda una serie de parámetros a partir de los datos de actividad:

- Tiempo asumido como sueño: la diferencia entre el final y el principio del sueño.
- Tiempo real del sueño: determinado por algoritmos y es equivalente al tiempo de sueño asumido menos el tiempo de vigilia.
- Tiempo de vigilia: determinado por algoritmos.
- Porcentajes de tiempo de sueño y de vigilia.
- Eficiencia de sueño. Porcentaje de tiempo de sueño real durante la fase de sueño.
- Número de períodos de sueño y de vigilia.
- Tiempo de inmovilidad: Número total de minutos en los que el sujeto tiene una movilidad cero, que se asume como tiempo de sueño.
- Tiempo de movilidad: Número total de minutos en los que el sujeto tiene movilidad durante los períodos presumiblemente de sueño.
- Porcentaje de tiempo de movilidad-inmovilidad: Tiempo con o sin movimiento en el período asumido como sueño.
- Número de fases de inmovilidad: Número de períodos con cero movimientos registrados de una forma consecutiva.
- Actividad total: Número total de actividad durante el sueño.

#### ***3.2.2.4 Valoración de la abstinencia a cannabinoides precipitada por SR141716A***

La valoración del grado de abstinencia a cannabinoides se realizó en ratas tratadas crónicamente con WIN 55,212-2 a dosis crecientes (ver protocolo de administración de 5 días en apartado “Tratamientos crónicos con fármacos cannabinoides”) y en los animales a los que se les precipitó el síndrome de abstinencia inyectándoles SR141716A (10 mg/kg, i.p.) 4 h después de la última dosis de WIN 55,212-2 del tratamiento crónico.

Cada animal se alojó en un cilindro de metacrilato transparente (30 cm de diámetro y 40 cm de alto) de forma que podía ser observado mientras se movía

libremente. Se observaron, siempre por la misma persona, durante 15 min antes y 45 min después de la última administración de WIN 55,212-2 (8 mg/kg, i.p.) en el caso del tratamiento crónico y la administración de SR141716A en ratas abstinentes, siguiendo un esquema descrito previamente (Hutcheson y cols., 1998; Castane y cols., 2003). Durante este tiempo se contó, durante cada intervalo de 5 min, el número de sucesos en que aparecieron los siguientes signos conductuales: arrastrado del hocico o *sniffing*, estiramientos abdominales o *writhing*, sacudidas o *wet dog shakes*, temblores de las patas delanteras o *paw tremor* y bostezos o *yawns*. Mientras que los signos de lamido genital o erección, temblor generalizado, ptosis palpebral, masticación y piloerección se cuantificaron dándoles un valor de 1, para cada intervalo de 5 min, en el caso de estar presente. Además, se calculó una puntuación global para la abstinencia provocada en cada animal, dando un peso relativo a cada signo individual siguiendo un esquema descrito previamente por (Ghozland y cols., 2002) y parecido al que se sigue en el caso de la abstinencia a opiáceos (Koob, 1992). Se le dio un peso de 0,9 a cada signo presente y un peso de 0,4 para el número de sucesos contados, durante cada periodo de 5 min. A parte de estos signos, también se contaron el número de sucesos de acicalamientos y de postura exploratoria levantada o *rearing* y se estimó el grado de actividad de los animales dando, para cada intervalo de 5 min, un valor de 0 en el caso de actividad baja (menos de 5 cruces completos del área de observación), 1 en el caso de actividad normal (entre 5 y 20 cruces completos del área de observación) o 2 para una actividad locomotora incrementada (más de 20 cruces completos del área de observación).

También se midió la temperatura rectal antes y después del cada tratamiento, tanto agudo como crónico (ver apartado “Determinación de la temperatura rectal”).

Todos estos parámetros no solo fueron valorados en animales tratados crónicamente con WIN 55,212-2 y en animales a los que se precipitó el síndrome de abstinencia mediante SR141716A, sino también en animales control, tratados con vehículo; así como en animales tratados de forma aguda con WIN 55,212-2 (8 mg/kg, i.p.) y tratados con SR141716A (10 mg/kg, i.p.) 4 h después de la administración aguda de WIN 55,212-2 (8 mg/kg, i.p.).

### 3.2.3 Determinación cromatográfica de la actividad tirosina hidroxilasa (síntesis de DOPA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HTP) *in vivo*

La actividad *in vivo* de los enzimas tirosina hidroxilasa (tirosina-3-monooxigenasa, EC 1.14.16.2) y triptófano hidroxilasa (triptófano-5-monooxigenasa, EC 1.14.16.4), enzimas limitantes de la síntesis de catecolaminas y serotonina respectivamente, fue determinada midiendo de forma simultánea la acumulación de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en los 30 min siguientes a la inhibición de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos con una dosis efectiva máxima de NSD 1015 (3-hidroxibenzilhidrazina HCl, 100 mg/kg, i.p.) (Carlsson y cols., 1972; Nissbrandt y cols., 1988). Este método de la acumulación de los precursores DOPA y 5-HTP es el más usado para evaluar la actividad *in vivo* de las enzimas tirosina y triptófano hidroxilasa cerebrales. La DOPA y el 5-HTP formados a partir de la hidroxilación por dichas enzimas endógenas fueron medidos por HPLC con un detector electroquímico (DE).

De esta forma, se determinó la síntesis de DOPA/noradrenalina en una porción de tronco encefálico en la que está englobado el locus ceruleus y en regiones cerebrales ricas en terminales nerviosos noradrenérgicos (corteza parieto-occipital, hipocampo, hipotálamo y cerebelo). La síntesis de DOPA/dopamina se determinó en el estriado, región rica en terminales dopaminérgicos. Y la síntesis de 5-HTP/5-HT se midió en regiones cerebrales ricas, en mayor o menor grado, en terminales nerviosos serotoninérgicos (locus ceruleus, corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, cerebelo y estriado).

#### 3.2.3.1 Disección y preparación de muestras

Tras decapitar las ratas, se extrajeron rápidamente los cerebros y se diseccionaron las distintas regiones a estudiar sobre una placa de aluminio a 4 °C (Fig. 3.4). Por este orden, se extrajo: el hipotálamo, la corteza frontal (que se utilizó para el análisis mediante *western blot*), el cerebelo, una porción de tronco encefálico que engloba el locus ceruleus (rodaja de alrededor de 1 mm), el hipocampo, el estriado y la corteza parieto-occipital. Y se congelaron en el menor tiempo posible a -80 °C hasta el momento de su procesamiento.

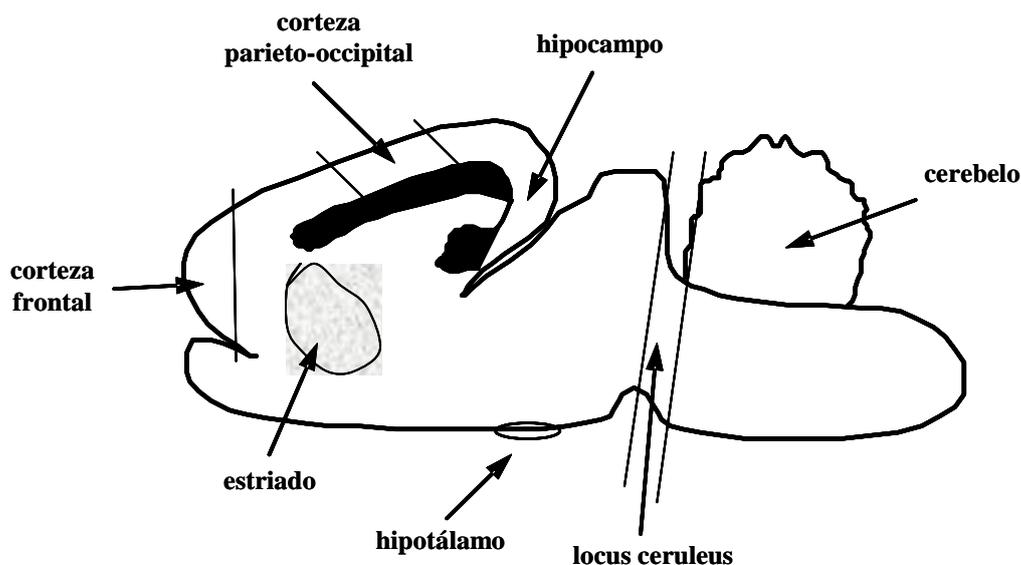
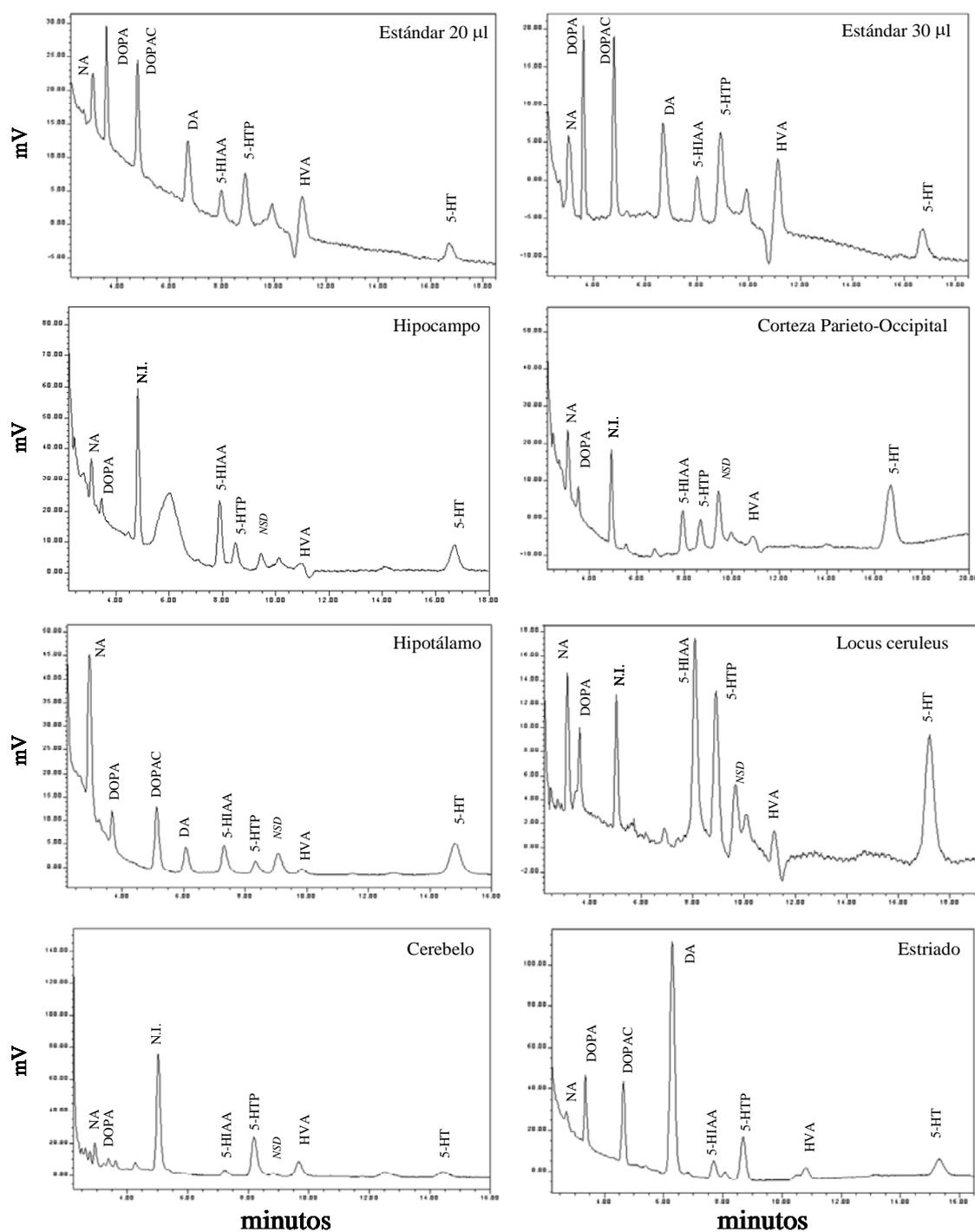


Fig. 3.4 Representación esquemática de la disección del cerebro de ratona

Las regiones fueron pesadas y colocadas individualmente en tubos fríos que contenían 1 ml de tampón de homogenización ( $\text{HClO}_4$  0,4 M,  $\text{K}_2\text{EDTA}$  0,01% y  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  0,1%). Se utilizó un homogenizador Ultraturrax (tipo Tp 18/10) a velocidad máxima durante 30 segundos. A continuación las muestras se centrifugaron a 40000g durante 15 min a 4°C (centrífuga refrigerada Sorvall RC-5C, con rotor SS-34) y el sobrenadante se filtró con un filtro de jeringa de teflón de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Spartan-3, Sigma-Aldrich; Millex<sup>®</sup>-LH; Millipore; Billerica, Mass, USA). Estos sobrenadantes filtrados se volvieron a congelar a -80 °C hasta el momento de su cuantificación por HPLC con detección electroquímica. En estas muestras, se determinó simultáneamente DOPA, dopamina, noradrenalina, dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), 5-HTP, 5-HT y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

### 3.2.3.2 Análisis cromatográfico

Los niveles de los precursores de aminoácidos, monoaminas y sus metabolitos fueron determinados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en fase reversa y con detección electroquímica (Fig. 3.5). Se inyectaron alícuotas de 10-20  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes de las muestras cerebrales.



**Fig. 3.5** Análisis cromatográficos representativos de distintas preparaciones. Los cromatogramas representan distintas preparaciones estándar (20 y 30 µl) y preparaciones de diferentes regiones del cerebro de ratas control. En estos cromatogramas se identifican los siguientes compuestos por orden de aparición: noradrenalina (NA), DOPA, ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA), 5-HTP, NSD 1015, ácido homovanílico y 5-HT. N.I. = compuesto no identificado porque no corresponde con el tiempo de retención de ningún compuesto presente en el estándar

Para separar los compuestos anteriormente citados se utilizó una columna en fase reversa Spherisorb S3 ODS1 C18 (3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 4,6 mm x 10 cm; Waters) acoplada a una precolumna Tracer ODS2 C18 (2-5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) (Teknokroma). La fase móvil ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; ácido octano sulfónico 2,1 M;  $\text{K}_2\text{EDTA}$  0,1 M y metanol 10-12% (v/v); y pH ajustado al rango 2,72-2,76 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%) fue impulsada a un flujo de 0,8 ml/min por una bomba de doble pistón tipo Waters M-510. Los compuestos fueron detectados electroquímicamente, manteniendo un potencial aplicado de +0,75V frente al electrodo de referencia *in situ* (Ag/AgCl) (Waters 460 y Concorde Electrochemical Detector). La corriente producida fue captada por un computador PC gracias al software Millennium<sup>32</sup> de Waters<sup>®</sup>, a través de una interfase tipo WAT busSAT/IN Module (Waters).

Las concentraciones de DOPA, dopamina, noradrenalina, DOPAC, HVA, 5-HTP, 5-HT y 5-HIAA de la muestra inyectada fueron calculadas interpolando la altura del pico correspondiente en la curva estándar realizada diariamente para cada compuesto con patrones externos utilizando el software Millennium<sup>32</sup>. Los valores de los compuestos se expresaron en nanogramos por gramo de tejido húmedo (ng/g).

### **3.2.4 Detección y cuantificación de la inmunoreactividad de proteínas mediante la técnica de *western blot***

#### **3.2.4.1 Preparación de la muestra**

Para la detección y cuantificación de las distintas proteínas que forman parte de la vía señalización de ERK (subfamilia de las MAPK) se procesaron las cortezas frontales de animales sometidos a distintos tratamientos con el protocolo descrito a continuación.

Se homogenizaron de 100 a 150 mg de corteza frontal con un homogenizador de aspas Ultraturax a máxima velocidad, dos veces durante 10 segundos, en una proporción 1:15 peso/volumen de tampón de homogenización (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2% SDS), que contenía los siguientes inhibidores de proteasas: ABESF (1,3 mM), leupeptina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), E64 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), pepstatina A (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y antipaina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y los siguientes inhibidores de fosfatasas: cantaridina (1mM) y ortovanadato sódico (1 mM). A continuación, las muestras fueron sonicadas tres veces durante 5 segundos. Una alícuota del homogenado fue congelado a -80 °C hasta su

utilización en la determinación del contenido proteico según el método del ácido biciconínico (ver apartado “Determinación del contenido proteico de las muestras”). El resto fue diluido 1:1 con tampón de carga (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1,5% SDS; 10% glicerol; 2,5% 2-mercaptoetanol; 0,1% azul de bromofenol) y, finalmente, desnaturalizado por baño maría a 95 °C durante 5 min.

La preparación de las muestras se llevó a cabo en tandas de unas 10 muestras de las que, al menos, dos procedían de animales control. En todo momento se controló el tiempo para que no excediera de 1 hora. La temperatura fue controlada manteniendo las muestras a 4 °C durante todo el procedimiento.

#### 3.2.4.2 *Electroforesis*

Para la separación de las proteínas se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970).

Los geles de poli(acrilamida) son soportes restrictivos que evitan la convección y minimizan la difusión, además participan directamente en el proceso de separación de las muestras. Se preparan de modo que sus poros sean de un tamaño comparable al de las proteínas de manera que produzcan un efecto de tamizado molecular. Los geles de poli(acrilamida) se preparan a partir de un compuesto monomérico de bajo peso molecular (acrilamida) que polimeriza en largas cadenas. Para unirlos se utiliza la N,N'-metileno bisacrilamida en una relación acrilamida:bisacrilamida constante de 37,5:1. El parámetro decisivo que determina el reticulado del gel es la concentración total de monómeros (acrilamida + bisacrilamida).

El SDS ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3^- \text{Na}^+$ ) interacciona con la gran mayoría de las proteínas por absorción no específica, formando complejos con características comunes independientemente de la proteína que se trate. En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, cada gramo de proteína une 1,4 g de SDS, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (debido a su grupo  $\text{SO}_4^-$ ), las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas, con lo que los complejos proteína/SDS están cargados de forma uniforme. La carga por unidad de masa es prácticamente constante para todos los complejos proteína/SDS e hidrodinámicamente

todos se comportan como elipsoides, de unos 18 Å de diámetro menor. Solo difieren en su longitud, acorde con el tamaño de cada proteína. La movilidad electroforética en estas condiciones desnaturalizantes, electroforesis SDS-PAGE, está en función de la masa molecular de cada proteína ya que la carga es uniforme para todos los complejos proteína/SDS que, además, tiene la misma forma. La separación ocurre principalmente como resultado del tamizado molecular a través del gel, de manera que cuanto menor sea la masa mayor será su recorrido. El campo eléctrico al que se someten las proteínas durante la electroforesis suministra, sencillamente, la fuerza impulsora a través del tamizado molecular. La concentración de acrilamida en el gel determinará el rango de separación de las proteínas. El peso molecular de la proteína en estudio puede determinarse comparando su movilidad electroforética con estándares de peso molecular conocido.

Se utilizaron geles con sistemas de tampón discontinuo en los que se pueden diferenciar dos zonas: un gel de concentración de muestras, no restrictivo, compuesto por 4% acrilamida-bisacrilamida, 166 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,2% persulfato amónico y 0,08% N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED); y un gel de resolución o separación compuesto por un 8% de acrilamida-bisacrilamida, 0,75 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05% persulfato amónico y 0,05% TEMED. Los geles tenían un tamaño de 7 x 10 cm con 1 mm de espesor y, en ellos, se cargaron de 5 a 20 l de muestra.

En cada gel se cargaron 5 µl de un marcador estándar de pesos moleculares adecuado para la determinación de los pesos moleculares e identificar la banda electroforética correspondiente a la proteína en estudio. Se utilizó el marcador *Prestained SDS-PAGE Standard-Broad-Range* (Bio-Rad) constituido por 8 proteínas preteñidas con azul de bromofenol que abarca un rango de pesos moleculares entre 6,4 y 200 kDa.

Una vez las muestras fueron cargadas en el gel de concentración se sometieron a una corriente continua de 70 voltios, y una vez dentro del gel de resolución la intensidad de la corriente se aumentó hasta 110 voltios. El tiempo aproximado de electroforesis fue de unos 120 min, aunque depende del peso molecular de la proteína a estudiar. El tampón de electroforesis en el que estaban inmersos los geles estaba compuesto por: 0,3% Tris base; 1,44% glicina; 0,1% de SDS, el pH de este tampón es de 8,5-8,6.

### 3.2.4.3 Electrotransferencia (*western blot*)

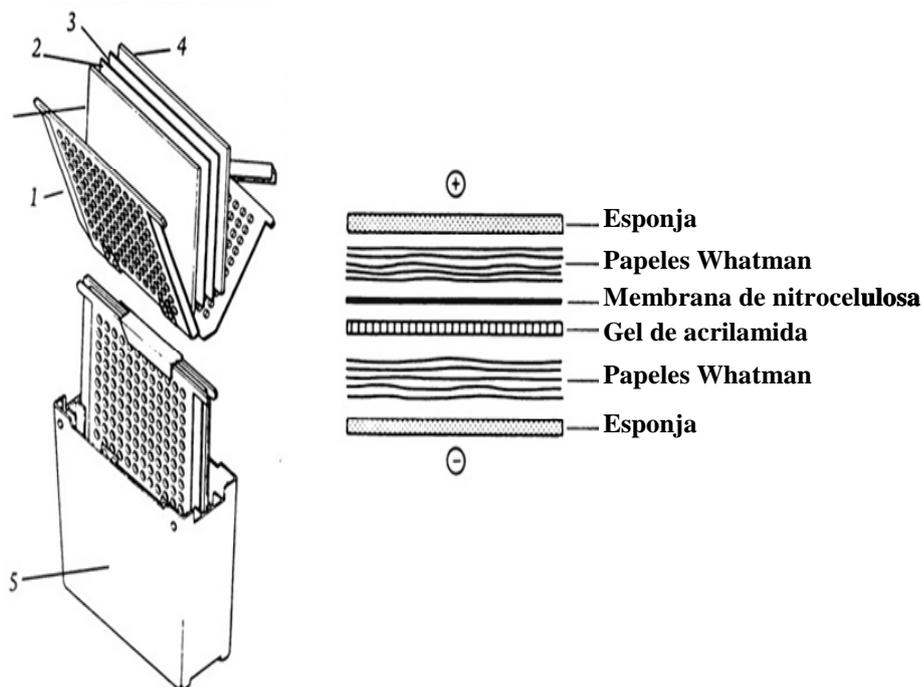
Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , un medio más estable y rígido, aplicando un campo eléctrico perpendicular al plano del gel, proceso conocido como *western blot*. Una vez en la membrana, las proteínas están accesibles (lo que no ocurre en el gel) para interactuar con otras moléculas que permitan su identificación. En este caso se utilizó anticuerpos para su identificación y la técnica recibe el nombre de *immunoblotting*. Esta técnica se basa en la capacidad que poseen los anticuerpos en reconocer de forma específica determinadas proteínas que actúan como antígenos. Es necesario poseer anticuerpos monoclonales o policlonales capaces de reconocer epítopos de antígenos desnaturalizados. Los anticuerpos se unen al epítipo mediante fuerzas de atracción no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas), de modo que el complejo antígeno-anticuerpo está en constante equilibrio con formas libres de ambos componentes.

Para realizar la electrotransferencia, el gel y la membrana de nitrocelulosa se colocan emparejados entre un conjunto de hojas de papel de filtro (3MM Whatman) y esponjas, sujeto por un armazón de plástico, y sumergido en el tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, pH 8,4; 60 mM glicina; 20% metanol). El proceso de transferencia se realizó a 110 voltios durante 2-3 horas, a 4 °C (Fig. 3.6).

Transcurrido ese tiempo, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución bloqueadora que consistió en tampón TBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6) que contenía un 5% de leche en polvo desnatada y 0,1% Tween 20 (monolaureato de polioxietilensorbitan). Las proteínas inertes de la solución bloqueadora deben unirse inespecíficamente a todas las porciones de membrana que no han adsorbido proteínas procedentes del gel tras la electrotransferencia. Este bloqueo evita la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana e incrementa la probabilidad de que solo se unan a sus respectivos antígenos.

El método de detección utilizado en estos experimentos es el método indirecto. Tras el bloqueo de las uniones inespecíficas las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante unas 13 a 16 horas, a 4 °C con una suave y continua agitación, con el anticuerpo primario contra las formas fosforiladas de cada proteína analizada, es decir,

que reconoce de forma específica un epítipo del antígeno fosforilado en los residuos responsables de su activación inmovilizado en la membrana. En este caso los epítipos utilizados forman parte de los distintos componentes de la vía de señalización intracelular de las MAPK, c-Raf1, MEK1/2 y ERK1/2 (ver apartado “Anticuerpos”). Tras una serie de lavados de las membrana (al menos 3 de 8 min) en tampón TBS, se incubaron con el anticuerpo secundario, que reconoce de forma específica el anticuerpo primario utilizado, durante 1-2 horas. Este anticuerpo secundario se obtiene contra inmunoglobulinas de la especie animal en la cual se ha obtenido el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios utilizados en estos experimentos reconocen inmunoglobulinas de conejo excepto algún caso en el que reconocía inmunoglobulinas de ratón. El anticuerpo secundario está unido covalentemente a un sistema de detección que en este caso fue un sistema enzimático. Se utilizaron anticuerpos secundarios unidos covalentemente a peroxidasa de rábano.



**Fig. 3.6** Esquema representativo de la realización de la electrotransferencia (*western blot*)

Por último, se realizaron 3 lavados de 8 min con tampón TBS y se procedió a la detección de la señal quimioluminiscente mediante el uso del sistema ECL (Amersham).

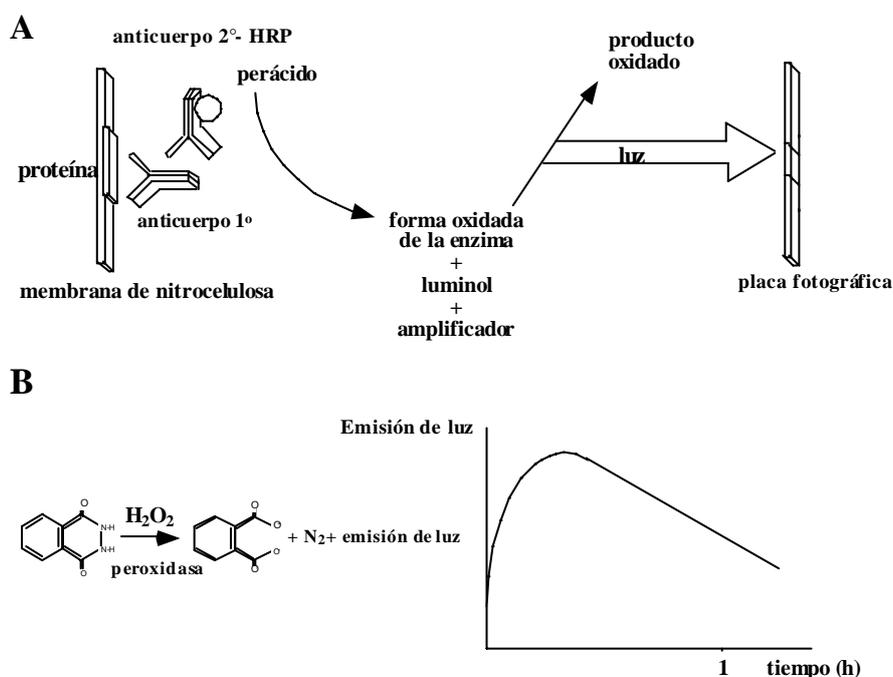
Para la detección inmunológica de las proteínas no fosforiladas (totales) c-Raf1, MEK1/2 y ERK1/2 se utilizaron las mismas membranas de nitrocelulosa en las que previamente se habían detectado, con los anticuerpos adecuados, las formas fosforiladas de estas proteínas. Para ello, se utilizó la técnica conocida con el nombre de *stripping immonoblot*, que permite eliminar el sistema de detección inmunológico utilizado previamente y reutilizar las membranas para la detección de otras proteínas. Para lo que se mantiene las membranas durante 30 min a 50 °C en el tampón de *stripping* (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM 2-mercaptoetanol; 2% SDS). Tras sucesivos lavados con tampón PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,38 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4), unos 4 o 5 lavados de unos 8 min, hasta eliminar completamente el tampón de *stripping*, se continuó con el bloqueo de uniones inespecíficas mediante una solución bloqueadora realizada con tampón PBS y que contenía 5% de leche en polvo desnatada y 0,1% Tween 20 y la inmunodetección de las proteínas mediante los anticuerpos primarios y secundarios (anti-inmunoglobulinas de conejo excepto en el caso de la c-Raf1 en el que se utilizó un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón) adecuados (ver apartado “Anticuerpos”).

#### 3.2.4.4 Sistema de detección

La inmunoreactividad fue detectada mediante un sistema de quimioluminiscencia amplificada. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante un minuto a temperatura ambiente con los reactivos de ECL *Enhanced Chemiluminescence* (Amersham). Uno de los principales componentes de estos reactivos es el luminol. La enzima peroxidasa de rábano que lleva unido el anticuerpo secundario cataliza la reacción de oxidación del luminol (diacilhidracida cíclica) en presencia de peróxido de hidrógeno (Fig. 3.7A). Tras esta reacción de oxidación, el luminol pasa a ser un compuesto intermedio inestable que decae con emisión de luz. Un agente fenólico de amplificación, incluido en los reactivos ECL, es capaz de amplificar más de cien veces la intensidad de esta luz emitida.

La señal quimioluminiscente emitida por este sistema llega a un máximo de intensidad entre los 5-20 primeros minutos y posteriormente decae lentamente con una semivida de emisión de unos 60 min (Fig. 3.7B). La luz emitida puede ser detectada al poner en contacto las membranas de nitrocelulosa con una película fotográfica sensible a la luz azul (Amersham Hyperfilm ECL) durante un periodo de tiempo variable. En el

caso de los experimentos presentados en este trabajo el tiempo de exposición fue distinto dependiendo de la proteína a determinar y los anticuerpos utilizados; entre 1 min (por ejemplo para el caso de ERK2 fosforilada) y 40 min (en el caso de c-Raf fosforilada).



**Fig. 3.7** Sistema de detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL. A) Las membranas de nitrocelulosa son incubadas primero con el anticuerpo primario y seguidamente con el anticuerpo secundario conjugado con el enzima peroxidasa de rábano. La luz emitida por quimioluminiscencia es detectada al incubar las membranas con los reactivos ECL y exponerlas a una película fotográfica. B.1) Reacción de oxidación del luminol por acción del peróxido de hidrógeno catalizado por la peroxidasa de rábano. B.2) La luz producida por este sistema llega a un máximo de emisión entre los 5-20 min y decae lentamente con una semivida de 60 min

### 3.2.4.5 Cuantificación fotodensitométrica

Las películas fotográficas fueron digitalizadas por transmitancia con una resolución de 600 ppi (puntos por pulgada) con un escáner “AGFA SnapScan 600”. El análisis de las imágenes fue realizado con el programa de dominio público “NIH Image program”, desarrollado por U.S. National Institutes of Health y accesible de forma gratuita en la página web <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>. De esta manera se obtiene los valores de densidad óptica integrada (DOI) que resulta de la suma de píxels que

forman la banda inmunoreactiva. Un píxel es un punto definido por las coordenadas (x, y, z), donde (x) e (y) son los ejes perpendiculares que sitúan al punto en un plano, y (z) el eje perpendicular a dicho plano que representa la intensidad del punto dentro de una escala de grises de 256 tonalidades.

La cantidad de proteína diana, para cada caso con el anticuerpo correspondiente, en corteza frontal de ratas sometidas a los distintos tratamientos fue comparada en el mismo gel con la de ratas control que recibieron la inyección de vehículo. La linealidad de la densidad óptica integrada (IOD) frente a la concentración de proteína total fue comprobada en un rango comprendido entre 10 y 80  $\mu\text{g}$  (usando al menos 4 puntos de diferentes de contenido proteico) para cada anticuerpo. Los experimentos se realizaron cargando alrededor de 50  $\mu\text{g}$  de proteína que entraba en el rango de linealidad para la inmunodetección de las diferentes proteínas. La cuantificación de cada muestra se realizó al menos 2 veces en diferentes geles, cada gel cargado con diferentes muestras cerebrales de ratas control o tratadas con los distintos fármacos. Finalmente, se calculó la variación en la inmunoreactividad de cada rata sometida a cada tratamiento específico respecto a las muestras control (100%) en distintos geles. Y se usó el valor medio como la estimación final.

### **3.2.5 Determinación del contenido proteico de las muestras. Método del ácido biciconínico (BCA)**

Debido a la presencia del detergente aniónico SDS en las muestras, la determinación del contenido proteico se llevó a cabo utilizando el método del ácido biciconínico que es compatible con una concentración de hasta un 1% de SDS (Smith y cols., 1985). Las proteínas reaccionan a través del enlace peptídico con el ión cobre  $\text{Cu}^{2+}$  reduciéndolo, en medio alcalino, a  $\text{Cu}^+$  (reacción de Biuret). Dos moléculas de ácido biciconínico reaccionan con una molécula de  $\text{Cu}^+$  para dar una coloración púrpura al medio. Este complejo soluble en agua posee un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm.

En un tubo de ensayo, se diluyeron 5  $\mu\text{l}$  de muestra con agua bidestilada hasta completar un volumen de 100  $\mu\text{l}$ . De forma paralela se realizó una curva patrón, a partir de una disolución conocida de albúmina bovina (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), cuyo intervalo de concentración fue de 0,05 a 0,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en un volumen total de 100  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada.

Las muestras se procesaron por triplicado y la recta patrón por duplicado. A continuación se añadieron, tanto a las muestras como a la recta patrón, 2 ml de reactivo BCA (Pierce, U.S.A.) compuesto por 50 volúmenes de reactivo A y un volumen de B. Tras la agitación de los tubos, se incubaron a 37 °C durante 30 min y, posteriormente, se dejaron reposar a temperatura ambiente. Los valores de absorbancia se midieron en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemania) a 562 nm. Este espectrofotómetro proporciona automáticamente los valores proteicos de las muestras al extrapolar sus absorbancias con las de la curva patrón mediante regresión no lineal.

### 3.2.6 Análisis matemático de los resultados

Los resultados se expresan como valores medios  $\pm$  error estándar de la media.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de los test *post hoc* de Scheffé o Bonferroni cuando se compararon más de dos grupos experimentales, o mediante el test t de Student cuando se realizó la comparación estadística de dos grupos de animales.

Para la comparación estadística de los datos de actividad se realizó una ANOVA para medidas repetitivas seguidas de un test de Scheffé ya que los distintos tratamientos agudos se realizaron sobre los mismos animales.

En todos los casos se consideró como estadísticamente significativo un nivel mínimo de probabilidad (P) igual o inferior a 0,05.



# **RESULTADOS**



## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFECTOS CONDUCTUALES DE TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES

Para comprobar que los tratamientos con compuestos cannabinoides realizados en este trabajo funcionaron correctamente, se analizó su efecto sobre la sensibilidad al dolor, sobre la temperatura rectal y sobre la actividad locomotora espontánea, efectos de los compuestos cannabinoides ampliamente conocidos y que son utilizados para definir un perfil cannabimimético en roedores (Martin y cols., 1991; Pertwee, 1997; Ameri, 1999). Además se analizaron algunos efectos conductuales de los compuestos cannabinoides no tan descritos en la literatura relacionados con la actividad locomotora y el sueño de los animales.

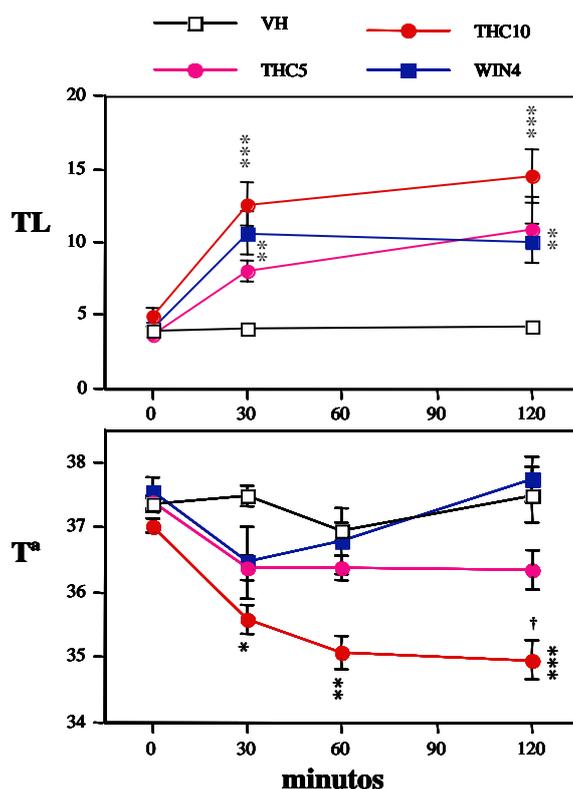
#### 4.1.1 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos cannabinoides sobre la sensibilidad al dolor y la temperatura rectal

La administración aguda de una dosis de THC (5 y 10 mg/kg, i.p.), así como de WIN 55,212-2 (4 mg/kg, i.p.), aumentó significativamente el tiempo de latencia en el test de *Tail-Flick* a los 30 min de su administración. Este aumento del tiempo de latencia aún se mantuvo elevado a las 2 h de la administración (Fig. 4.1).

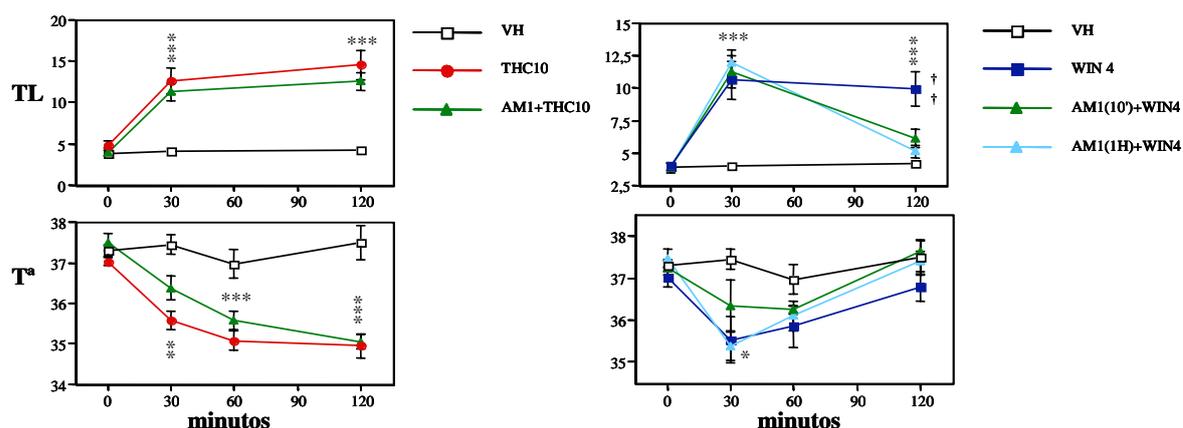
En cuanto a la temperatura rectal, se redujo a una dosis de 5 mg/kg de THC y de forma más significativa a una dosis de 10 mg/kg. Este efecto llegó al máximo entre 30 min y 1h después de la administración del fármaco y 2h después aun se mantenía. En cambio la administración de WIN 55,212-2 (4 mg/kg) redujo la temperatura rectal 30 min después de su administración, pero a la hora ya se observaron valores cercanos a los controles (Fig. 4.1).

Por su parte, ninguna de las dosis usadas en estos experimentos de los antagonistas, AM281 o SR141716A, tuvieron algún efecto significativo sobre el tiempo de latencia en el test de *Tail-Flick* ni sobre la temperatura rectal (datos no mostrados). La dosis de AM (1 mg/kg) inyectado 10 min antes de la administración de THC (10 mg/kg) tuvo un efecto antagónico muy ligero aunque no significativo sobre la analgesia y la temperatura rectal. La dosis de AM (1 mg/kg) tampoco antagonizó el efecto analgésico de una dosis de WIN 55,212-2 (4 mg/kg) a los 30 min pero sí redujo la duración temporal del efecto de WIN 55,212-2 (Fig. 4.2). Esto ocurrió tanto

administrando el AM (1 mg/kg) 10 min como 1 h antes del WIN 55,212-2. En cuanto a la temperatura rectal, la dosis de AM (1 mg/kg) volvió a mostrar un ligero efecto antagónico sobre la disminución de la temperatura provocada por el THC (10 mg/kg) y administrado 10 min antes de la de WIN 55,212-2 (4 mg/kg) también antagonizó parcialmente el efecto hipotérmico del WIN 55,212-2, en cambio administrado 1h antes no lo hizo (Fig. 4.2).

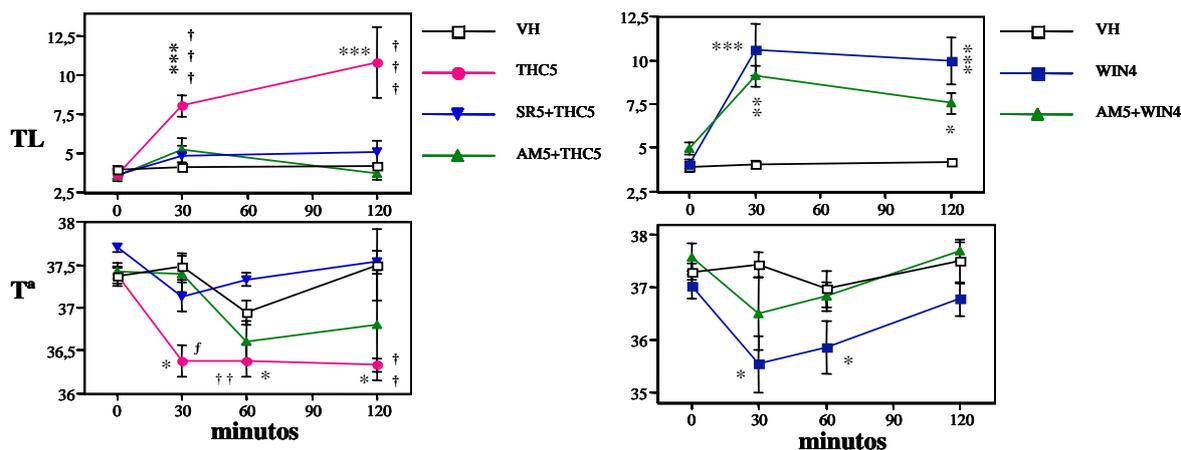


**Fig. 4.1** Efecto de la administración aguda de THC (5 y 10 mg/kg, i.p.) y WIN 55,212-2 (WIN; 4 mg/kg, i.p.) sobre el tiempo de latencia (TL) en el test de *Tail-Flick* y sobre la temperatura rectal ( $T^a$ ) de ratas. Las distintas sustancias fueron administradas de forma intraperitoneal y se realizaron medidas del tiempo de latencia a los 30 y 120 min y de temperatura rectal a los 30, 60 y 120 min de esta administración. Los animales control fueron tratados con el vehículo (VH) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). Los puntos representan las medias  $\pm$  error estándar de los valores de tiempo de latencia (expresado en segundos) y de temperatura rectal ( $^{\circ}$ C) de 4 animales por grupo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  en comparación con los valores control (ANOVA seguido del test de Scheffé)



**Fig. 4.2** Efecto del antagonista cannabinoide AM 281 (1 mg/kg. i.p.), administrado 10 min antes del THC 10 mg/kg (panel de la derecha) y administrado 10 min y 1 hora antes del WIN 55,212-2 (WIN; 4 mg/kg, i.p.) (panel de la izquierda), sobre el tiempo de latencia (TL) en el test de *Tail-Flick* y sobre la temperatura rectal ( $T^a$ ) de ratas. Las distintas sustancias fueron administradas de forma intraperitoneal y se realizaron medidas del tiempo de latencia a los 30 y 120 min y de temperatura rectal a los 30, 60 y 120 min de la administración del agonista. Los animales control fueron tratados con el vehículo (VH) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). Los puntos representan las medias  $\pm$  error estándar de los valores de tiempo de latencia (segundos) y de temperatura rectal ( $^{\circ}$ C) de 4 animales por grupo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  en comparación con los valores control y  $^{\dagger\dagger}P < 0,01$  en comparación con el grupo tratado con el antagonista (ANOVA seguido del test de Scheffé)

Por otra parte, la dosis de AM (5 mg/kg), administrada 10 min antes, antagonizó significativamente el efecto de la dosis de THC (5 mg/kg) y del WIN 55,212-2 (4 mg/kg) en el test de *Tail-Flick* y también aunque no de forma tan significativa en todos los casos el efecto sobre la temperatura rectal. Además, el antagonista SR141716A (5 mg/kg) también antagonizó, y de forma más consistente, los efectos analgésicos y sobre la temperatura rectal del THC (5 mg/kg) (Fig. 4.3).



**Fig. 4.3** Efecto de los antagonistas cannabinoideos AM 281 (5 mg/kg, i.p.), administrado 10 min antes del THC (5 mg/kg, i.p.) y del WIN 55,212-2 (WIN, 4 mg/kg, i.p.), así como del SR141716A (SR; 5 mg/kg, i.p.) administrado 10 min antes del THC, sobre el tiempo de latencia (TL) en el test de *Tail-Flick* y sobre la temperatura rectal ( $T^a$ ) de ratas. Las distintas sustancias fueron administradas de forma intraperitoneal y se realizaron medidas del tiempo de latencia a los 30 y 120 min y de temperatura rectal a los 30, 60 y 120 min. Los animales control fueron tratados con el vehículo (VH) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). Los puntos representan las medias  $\pm$  error estándar de los valores de tiempo de latencia (segundos) y de temperatura rectal ( $^{\circ}$ C) de 4 animales por grupo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  en comparación con los valores control; †† $P < 0,01$  en comparación con el grupo tratado con el antagonista SR y † $P < 0,05$  en comparación con el grupo tratado con el antagonista AM (ANOVA seguido del test de Scheffé)

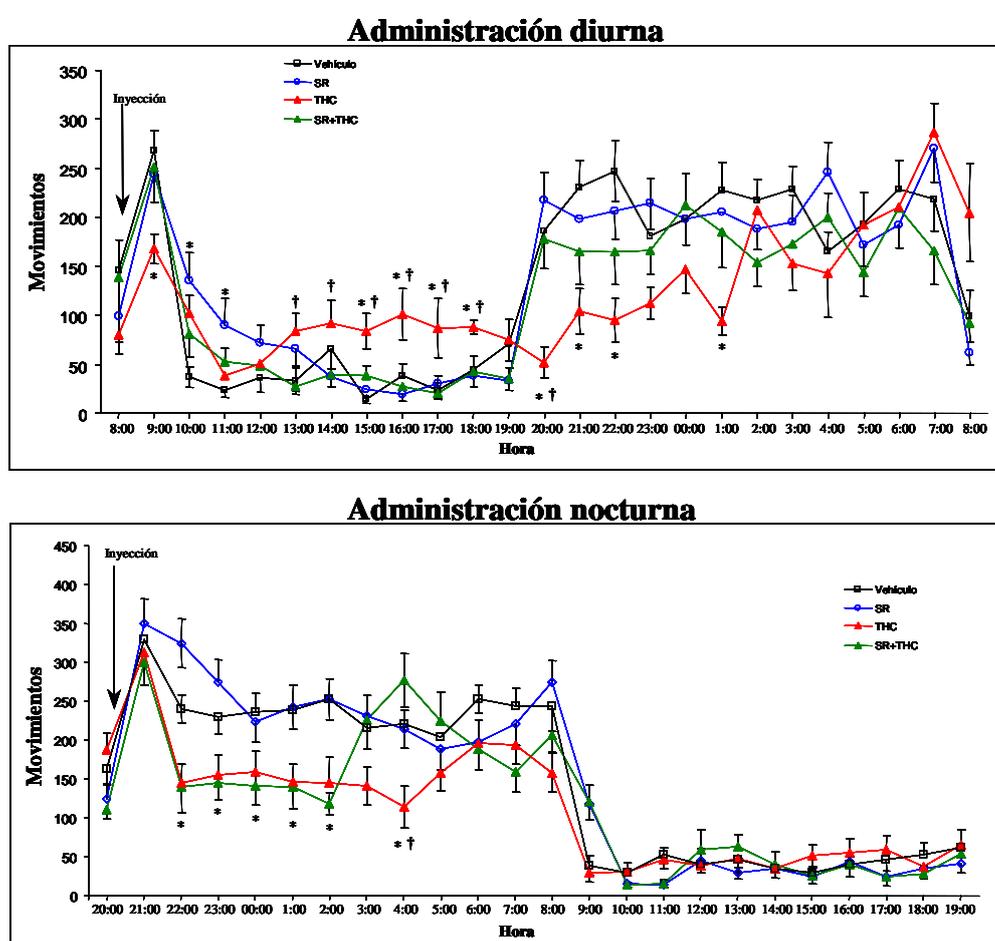
#### 4.1.2 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos cannabinoideos sobre la actividad locomotora espontánea

Se analizó el efecto de una dosis aguda de THC (5 mg/kg) y el antagonismo por parte del SR141716A (5 mg/kg), administrados durante la fase de luz o durante la fase de oscuridad, sobre la actividad locomotora espontánea durante las 24 h del día.

El tratamiento con el vehículo (1 ml/kg, i.p.), tanto administrado durante las horas de luz como de oscuridad, no provocó diferencias significativas comparado con el grupo de ratas tratadas de forma aguda con suero salino (1 ml/kg, i.p.) (datos no mostrados).

En cualquier caso, cuando el tratamiento se realizó durante las horas de luz (momento en que las ratas tienen menor actividad), el simple hecho de manipular el animal para la administración de las diversas sustancias (agarrado del animal, pesado y

administración de la sustancia correspondiente) provocó un aumento transitorio de la actividad locomotora de los animales (Fig. 4.4). La administración aguda de THC provocó una reducción de este incremento de la actividad locomotora ocasionada por el manejo del animal. En cambio, a partir de la quinta hora después del tratamiento, el grupo de ratas tratadas con THC presentó una actividad locomotora significativamente más elevada y este efecto se mantuvo hasta el apagado de la luz. Durante las horas siguientes al apagado de luz (momento en que los animales normalmente están despiertos y presentan mayor grado de actividad), este grupo de animales presentó una actividad locomotora menor que el resto de grupos y significativamente menor que el grupo tratado con vehículo (Fig. 4.4).



**Fig. 4.4** Efecto de la administración aguda de THC (5 mg/kg, i.p.), SR141716A (SR; 5 mg/kg, i.p.) o la combinación de ambos (SR administrado 10 min antes) sobre la actividad locomotora espontánea durante las 24 h del día. Los animales control fueron tratados con el vehículo (VH) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). Los puntos representan las medias  $\pm$  error estándar del acumulado de actividad durante 1 hora de 12 animales por grupo. \* $P < 0,05$  en comparación con los valores control y † $P < 0,05$  en comparación con el grupo tratado con el antagonista (ANOVA de medidas repetitivas seguido del test de Scheffé)

El tratamiento agudo con SR141716A provocó un ligero aumento de la actividad locomotora durante las horas siguientes a la administración, pero el resto del día no hubo diferencias significativas con el grupo tratado con vehículo. Además, la administración de SR141716A 10 min antes del THC antagonizó el aumento de la actividad locomotora provocada por el THC durante el día y la reducción de la actividad durante la noche, así como la reducción del aumento de actividad provocado por el manejo del animal (Fig. 4.4).

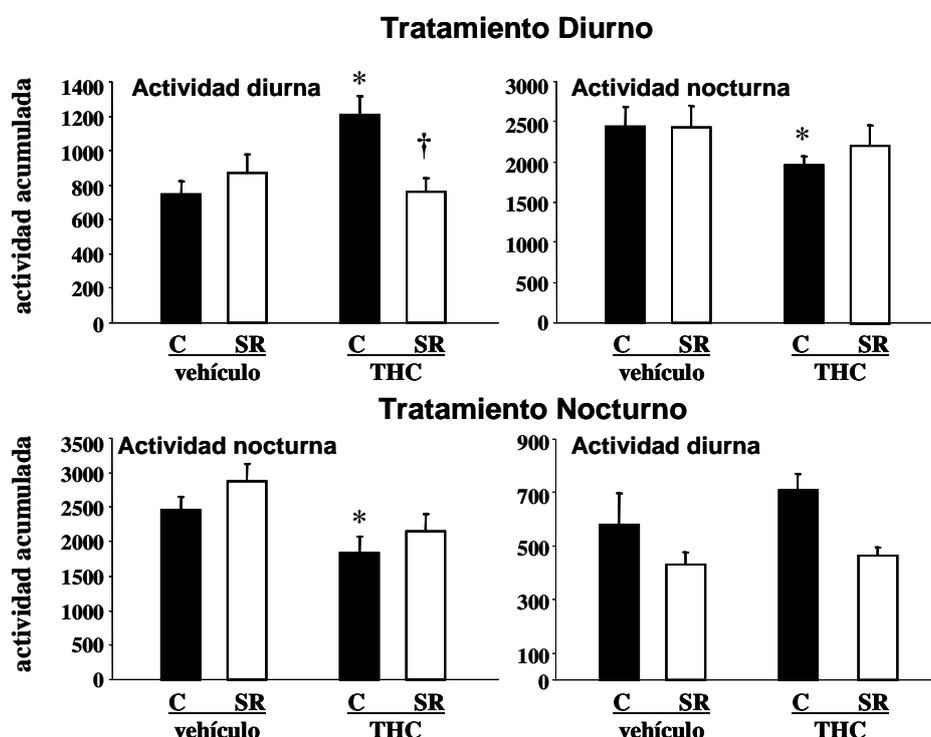
La administración nocturna de THC no produjo ninguna diferencia en el aumento de la actividad producido por el manejo del animal, pero provocó una reducción estadísticamente significativa de la actividad locomotora espontánea durante la mayor parte de la noche. En cambio, esta administración nocturna de THC no provocó cambios en la actividad locomotora del día siguiente a su administración (Fig. 4.4).

Por su parte el SR141716A provocó un ligero aumento de la actividad, aunque no significativo, durante las horas siguientes a su administración. Pero el resto de la noche o del día siguiente, no se observaron diferencias significativas comparado con el grupo control tratado con vehículo. La administración de SR141716A 10 min antes de la inyección de THC no pareció antagonizar los efectos sobre la actividad locomotora espontánea; ya que el grupo de animales tratados con la combinación de ambos fármacos también presentó una actividad locomotora reducida y del mismo orden, aunque durante menos tiempo, que la del grupo tratado únicamente con THC (Fig. 4.4).

Si analizamos la actividad total durante las horas de luz o las de oscuridad, vemos que en ningún caso existen diferencias significativas entre el grupo de animales tratados con vehículo y el grupo tratado con SR141716A. En cambio se observa un aumento de la actividad provocado por la administración diurna de THC y una disminución de la actividad durante la noche siguiente. Efectos que fueron antagonizados por la administración de SR141716A 10 min antes (Fig. 4.5).

La administración nocturna de THC también produjo una reducción significativa de la actividad locomotora. En este caso se observa una muy ligera reducción de este efecto por el tratamiento con SR141716A. No se observa ningún efecto significativo al día siguiente de esta administración, aunque parece que hay una ligera tendencia por

parte del THC a aumentar la actividad locomotora y del SR141716A a disminuirla (Fig. 4.5).



**Fig. 4.5** Efecto de la administración aguda de THC (5 mg/kg, i.p.), SR141716A (SR; 5 mg/kg, i.p.) o la combinación de ambos (SR administrado 10 min antes) sobre la actividad locomotora espontánea total durante las horas de luz (día) y las de oscuridad (noche). Los animales control fueron tratados con el vehículo (VH) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). Las barras representan las medias  $\pm$  error estándar de la actividad acumulada durante las 12 horas de luz (actividad diurna) o las 12 horas de oscuridad (actividad nocturna) de 12 animales por grupo. \* $P < 0,05$  en comparación con los valores control y † $P < 0,05$  en comparación con el grupo tratado con el antagonista (ANOVA seguido del test de Scheffé)

Los datos parecen indicar que existe una cierta alteración del ciclo circadiano de estos animales. Por ello analizamos algunas variables que describen el ritmo circadiano: mesor, amplitud y acrofase. La administración de vehículo no provocó diferencias significativas en ninguna de las variables calculadas comparando con la administración de salino o incluso con sus valores basales (datos no mostrados). Por su parte, el SR141716A tampoco provocó diferencias significativas en ninguna de las variables, tanto administrado de día como de noche, aunque parece que hay una ligera tendencia a aumentar el mesor, es decir aumentar ligeramente la actividad media de los animales (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1** Efecto agudo de la administración diurna y la administración nocturna del THC (5 mg/kg, i.p.), del SR141716A (SR; 5 mg/kg, i.p.) o la combinación de ambos (el SR administrado 10 min antes que el THC), sobre las variables que describen el ciclo circadiano de estos animales: mesor, amplitud (expresados en movimientos o cuentas) y acrofase (min). Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de 12 experimentos

ADMINISTRACIÓN DIURNA			
	Mesor	Amplitud	Acrofase
<b>Vehículo</b>	34,5 $\pm$ 3,2	26,8 $\pm$ 2,8	1118 $\pm$ 7
<b>SR</b>	35,3 $\pm$ 3,7	25 $\pm$ 2,8	1166 $\pm$ 19
<b>THC</b>	29,2 $\pm$ 2,5	17,6 $\pm$ 2,3*	1243 $\pm$ 24
<b>SR+THC</b>	31,2 $\pm$ 3,1	23,4 $\pm$ 2,9	1145 $\pm$ 20
ADMINISTRACIÓN NOCTURNA			
<b>Vehículo</b>	32,8 $\pm$ 2,6	28,1 $\pm$ 1,9	1077 $\pm$ 11
<b>SR</b>	37,1 $\pm$ 3,4	31,6 $\pm$ 2,8	1040 $\pm$ 13
<b>THC</b>	29,1 $\pm$ 2,3	13,3 $\pm$ 2,2**	1136 $\pm$ 25*
<b>SR+THC</b>	30 $\pm$ 3	21,5 $\pm$ 2,2	1178 $\pm$ 16**

\*P<0,05, \*\*P<0,01 cuando se compara con el grupo vehículo (ANOVA seguido de un test de Scheffé)

En cambio, el THC produjo una reducción del mesor que no llegó a alcanzar un nivel significativo aunque durante el tratamiento diurno se observa un valor de P<0,05 al comparar con datos basales y P=0,11 comparado con el grupo tratado con vehículo mediante el test de Fisher. Durante el tratamiento nocturno con THC también se observó un valor de P=0,15 comparándolo mediante este test con el grupo tratado con vehículo. Ambos tratamientos también redujeron la amplitud de forma significativa, lo que indica que hay menos diferencias entre el periodo de máxima actividad y el de mínima actividad, es decir que durante el periodo de máxima actividad los animales están menos activos y durante el periodo de mínima actividad los animales están más activos. Aunque parece que se ha reducido más el periodo de máxima actividad ya que el valor de mesor disminuyó ligeramente. La administración de THC provocó también un aumento en la acrofase, es decir que se retrasó la aparición del momento de máxima actividad. La administración de SR141716A (5 mg/kg) 10 min antes del THC (5mg/kg) antagonizó todos estos efectos del THC excepto el retraso de fase provocado por el tratamiento nocturno (Tabla 4.1).

**Tabla 4.2** Efecto de la administración aguda diurna (Tabla superior) y nocturna (Tabla inferior) de THC (5 mg/kg, i.p.), del SR141716A (SR; 5 mg/kg, i.p.) o la combinación de ambos (el SR administrado 10 min antes que el THC), sobre distintas características del sueño analizadas con el programa *Actiwatch Sleep Analysis*. Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de 12 experimentos

TRATAMIENTO DIURNO				
DÍA	Eficiencia de sueño (%)	Horas de sueño	Tiempo de inmovilidad (min)	Número de despertares
Salino	77 $\pm$ 1	9h 15min $\pm$ 8 min	607 $\pm$ 12	4,1 $\pm$ 0,3
Vehículo	76 $\pm$ 1	9h 5min $\pm$ 8 min	620 $\pm$ 9	4,6 $\pm$ 0,6
SR	63 $\pm$ 2 *	7h 35min $\pm$ 12 min ***	597 $\pm$ 16	5,4 $\pm$ 0,5
THC	60 $\pm$ 2 ***	7h 9min $\pm$ 12 min ***	558 $\pm$ 23 *	6,5 $\pm$ 0,5 *
SR + THC	67 $\pm$ 3	9 h $\pm$ 18 min	606 $\pm$ 12	5 $\pm$ 1
NOCHE SIGUIENTE				
Salino	35 $\pm$ 2	4h 9min $\pm$ 11 min	420 $\pm$ 30	8,4 $\pm$ 0,5
Vehículo	33 $\pm$ 2	4h $\pm$ 11 min	468 $\pm$ 29	7,6 $\pm$ 0,3
SR	31 $\pm$ 3	3h 47min $\pm$ 15 min	441 $\pm$ 51	6,9 $\pm$ 0,4
THC	55 $\pm$ 2 ***	6h 31min $\pm$ 12 min ***	558 $\pm$ 21 *	7,7 $\pm$ 0,5
SR + THC	37 $\pm$ 4	4h 26min $\pm$ 25 min	490 $\pm$ 41	6,8 $\pm$ 0,4
TRATAMIENTO NOCTURNO				
NOCHE	Eficiencia de sueño (%)	Horas de sueño	Tiempo de inmovilidad (min)	Número de despertares
Salino	35 $\pm$ 4	4h 14min $\pm$ 27 min	481 $\pm$ 28	7,2 $\pm$ 0,5
Vehículo	29 $\pm$ 1	3h 30min $\pm$ 10 min	452 $\pm$ 31	6,5 $\pm$ 0,5
SR	28 $\pm$ 2	3h 18min $\pm$ 11 min	416 $\pm$ 52	7,9 $\pm$ 0,5
THC	47 $\pm$ 3 ***	5h 35min $\pm$ 20 min ***	544 $\pm$ 25 *	7,9 $\pm$ 0,7
SR + THC	41 $\pm$ 3 ***	4h 58min $\pm$ 18 min **	505 $\pm$ 37	8,5 $\pm$ 0,7
DÍA SIGUIENTE				
Salino	63 $\pm$ 4	7h 30min $\pm$ 25 min	634 $\pm$ 23	5,4 $\pm$ 0,5
Vehículo	62 $\pm$ 1	7h 22min $\pm$ 10 min	601 $\pm$ 14	5,9 $\pm$ 0,7
SR	61 $\pm$ 4	7h 5min $\pm$ 24 min	633 $\pm$ 9	6,2 $\pm$ 0,9
THC	67 $\pm$ 3	7h 59min $\pm$ 17 min	638 $\pm$ 11	6 $\pm$ 0,7
SR + THC	62 $\pm$ 3	7h 13min $\pm$ 14 min	624 $\pm$ 7	6,2 $\pm$ 0,6

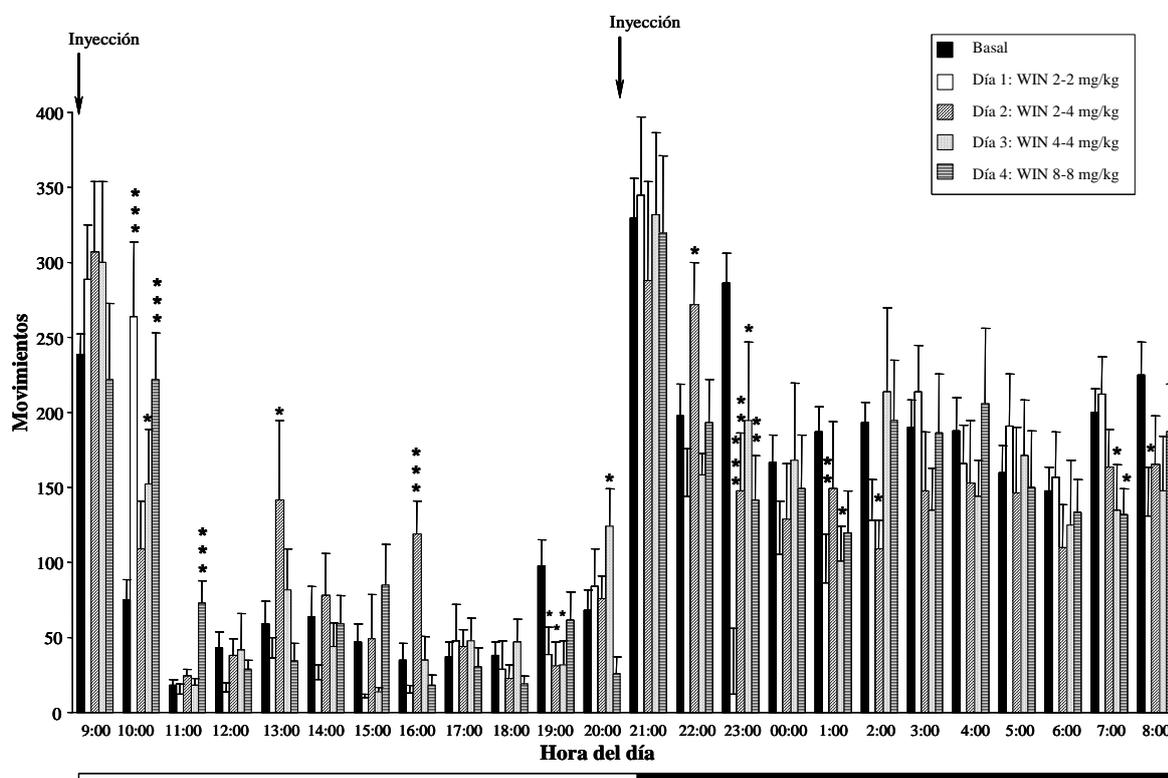
\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 cuando se compara con el grupo vehículo (ANOVA seguido de un test de Scheffé)

Los datos analizados con el programa *Actiwatch Sleep Analysis* nos indican que el tratamiento diurno (fase del ciclo en el que los animales descansan) con el THC (de forma más significativa) provocó una reducción en la eficiencia del sueño, así como de las horas totales de sueño, del tiempo que permanecieron inmóviles y un aumento del número de despertares que sufrieron los animales durante las horas de luz (Tabla 4.2). Sorprendentemente, el SR151716A también redujo, aunque no de forma tan significativa, la eficiencia de sueño y las horas totales de sueño durante las horas de luz; seguramente como reflejo del aumento de la actividad que produjo este tratamiento durante las horas siguientes a su administración (Fig. 4.4). Por otra parte, el tratamiento combinado de los dos fármacos redujo estos efectos. En cambio, la noche siguiente a este tratamiento (momento del ciclo en los que los animales se encuentran activos) el THC aumentó la eficiencia del sueño, las horas totales de sueño y el tiempo total de inactividad de los animales, sin afectar al número de despertares. Por su parte, el SR141716A no provocó ningún efecto significativo sobre estos parámetros aunque sí

antagonizó los efectos del THC (Tabla 4.2). El tratamiento nocturno con THC provocó igualmente un aumento de la eficiencia y de las horas totales de sueño durante este periodo de actividad. Efectos que no fueron antagonizados por el SR141617A. Ninguno de los tratamientos provocó efectos significativos sobre estos parámetros al día siguiente.

#### 4.1.3 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 sobre la actividad locomotora espontánea

En general, los efectos del tratamiento agudo con WIN 55,212-2 sobre la actividad locomotora espontánea fueron similares a los observados tras el tratamiento agudo con THC.



**Fig. 4.6** Efecto de la administración crónica de WIN 55,212-2 (WIN, 2-8 mg/kg, i.p., 2 veces al día, durante 4 días) sobre la actividad locomotora espontánea durante las 24 h del día. Esquema del tratamiento crónico (administraciones a las 8:00 y 20:00): □ Día 1, 2 y 2 mg/kg; ▨ Día 2, 2 y 4 mg/kg; ▤ Día 3, 4 y 4 mg/kg; ▩ Día 4, 8 y 8 mg/kg. Las barras representan las medias  $\pm$  error estándar del acumulado de actividad durante 1 hora de 10 animales por grupo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,005$  en comparación con los valores control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

Se analizó la actividad locomotora espontánea las 24h del día durante los primeros 4 días del tratamiento crónico con WIN 55,212-2. Al igual que ocurría en la administración aguda de THC al inicio de las horas de luz, el tratamiento con WIN 55,212-2 provocó, en general, un aumento de la actividad locomotora a lo largo del día (Fig. 4.6). Este efecto se observa mejor en los datos de actividad total acumulada (Tabla 4.3). Además, el máximo de actividad se observa el segundo día y se va reduciendo los días siguientes aunque la dosis de WIN 55,212-2 que se administraba fuera aumentando (Tabla 4.3).

En cuanto a la actividad nocturna, el WIN 55,212-2 (al igual que ocurría con el THC) provocó una reducción de la actividad locomotora durante el resto de la noche. La mayor proporción de efecto se observa durante los primeros días del tratamiento y se va reduciendo en los días sucesivos (Fig. 4.6). Este efecto se ve también mejor en los datos de actividad total acumulada (aunque en este caso no se observan diferencias significativas) (Tabla. 4.3).

**Tabla 4.3** Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 (WIN, 2-8 mg/kg, i.p., 2 veces al día, durante 4 días) sobre el acumulado total de actividad diurna y nocturna, y sobre las variables que describen el ciclo circadiano de estos animales: mesor, amplitud (expresados en movimientos o cuentas) y acrofase (min). Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de 10 experimentos

	Actividad Total		Mesor	Amplitud	Acrofase
	Diurna	Nocturna			
<b>Basal</b>	717 $\pm$ 30	2200 $\pm$ 102	32 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1	1064 $\pm$ 12
<b>Día 1</b> (WIN 2-2 mg/kg)	865 $\pm$ 46	1747 $\pm$ 184	30 $\pm$ 2	22 $\pm$ 2	1140 $\pm$ 28
<b>Día 2</b> (WIN 2-4 mg/kg)	1044 $\pm$ 94*	2036 $\pm$ 95	32 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2*	1110 $\pm$ 40
<b>Día 3</b> (WIN 4-8 mg/kg)	948 $\pm$ 68	1973 $\pm$ 224	31 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3	1103 $\pm$ 37
<b>Día 4</b> (WIN 8-8 mg/kg)	881 $\pm$ 98	2008 $\pm$ 214	31 $\pm$ 3	21 $\pm$ 2	1138 $\pm$ 20

\*P<0,05 cuando se compara con el grupo vehículo (ANOVA seguido de un test de Scheffé)

Al igual que ocurrió con el tratamiento con THC, el tratamiento con WIN 55,212-2 también provocó una alteración del ciclo circadiano de estos animales. Se observó una ligera reducción (aunque no estadísticamente significativa) del valor de mesor o valor medio de la curva que describe el ciclo circadiano; y se redujo la amplitud

de esta curva, esta vez alcanzando significancia estadística (Tabla 4.3). Estos datos nos indican que, al igual que ocurría con el THC, se reducen las diferencias entre el período de máxima y mínima actividad, siendo mayor el efecto de reducción durante el período de actividad (noche). En ambos casos (mesor y acrofase) se observó una reducción de los efectos del WIN 55,212-2 a medida que transcurría el tratamiento crónico. También se observó un ligero aumento (aunque no significativo) del valor de acrofase. Indicando un ligero retraso de la aparición del momento de máxima actividad. En este caso, la proporción de efecto se mantiene durante todo el tratamiento crónico (Tabla 4.3).

**Tabla 4.4** Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 (2-8 mg/kg, i.p., 2 veces al día, durante 5 días) sobre distintas características del sueño analizadas con el programa *Actiwatch Sleep Analysis*. Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de 10 experimentos

DURANTE EL DÍA				
	Eficiencia sueño (%)	Horas de sueño	Tiempo de inmovilidad (min)	Número de despertares
Basal	75 $\pm$ 0,6	9h 2min $\pm$ 4min	639 $\pm$ 7	3,9 $\pm$ 0,3
Día 1 (WIN 2-2 mg/kg)	77 $\pm$ 1	9h 14min $\pm$ 7min	631 $\pm$ 10	2,8 $\pm$ 0,6
Día 2 (WIN 2-4 mg/kg)	70 $\pm$ 1*	8h 21min $\pm$ 7min*	627 $\pm$ 18	5,1 $\pm$ 0,4
Día 3 (WIN 4-8 mg/kg)	71 $\pm$ 1,5	8h 31min $\pm$ 10min	635 $\pm$ 13	4,8 $\pm$ 0,6
Día 4 (WIN 8 mg/kg)	68 $\pm$ 1,7***	8h 13min $\pm$ 12min	652 $\pm$ 16	5,9 $\pm$ 0,6*
DURANTE LA NOCHE				
	Eficiencia sueño (%)	Horas de sueño	Tiempo de inmovilidad (min)	Número de despertares
Basal	42 $\pm$ 2,3	4h 59min $\pm$ 17min	461 $\pm$ 16	9,7 $\pm$ 0,5
Día 1 (WIN 2-2 mg/kg)	52 $\pm$ 1,3*	6h 11min $\pm$ 7min*	485 $\pm$ 19	7,7 $\pm$ 0,6
Día 2 (WIN 2-4 mg/kg)	50 $\pm$ 1,7	5h 58min $\pm$ 12min	502 $\pm$ 30	8,1 $\pm$ 0,7
Día 3 (WIN 4-8 mg/kg)	51 $\pm$ 2,8	6h 2min $\pm$ 18min	509 $\pm$ 28	8,1 $\pm$ 0,6
Día 4 (WIN 8 mg/kg)	45 $\pm$ 2,3	5h 21min $\pm$ 15min	496 $\pm$ 35	8,9 $\pm$ 0,6

\*P<0,05, \*\*\*P<0,001 cuando se compara con el grupo vehículo (ANOVA seguido de un test de Scheffé)

El análisis de los datos con el programa *Actiwatch Sleep Analysis* reveló que el tratamiento con WIN 55,212-2 también afectó a la calidad del sueño de los animales. Así, durante las horas de luz (momento en el que los animales duermen), aunque la primera administración de WIN 55,212-2 (2 mg/kg) no provocó cambios significativos, en las siguientes administraciones del tratamiento crónico se observó una marcada reducción en la eficiencia del sueño y en el tiempo que pasan los animales durmiendo.

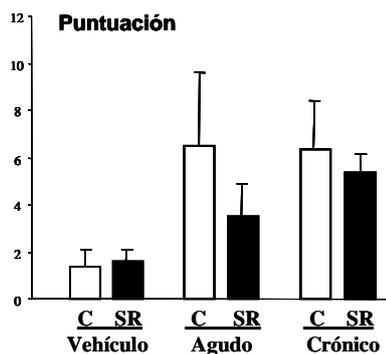
Así como un aumento del número de despertares que sufrieron (Tabla 4.4). Por tanto, no solo no se observó tolerancia al empeoramiento que provoca el WIN 55,212-2 sobre el sueño, sino que se degradó más a medida que transcurría el tratamiento crónico y aumentaba la dosis de WIN 55,212-2.

Por otra parte, durante la noche (período de actividad de estos animales) el tratamiento con WIN 55,212-2 produjo un aumento del sueño (eficiencia y tiempo de sueño) y una ligera reducción (aunque no significativa) del número de despertares. Efectos a los que se observó tolerancia por el tratamiento crónico (Tabla 4.4).

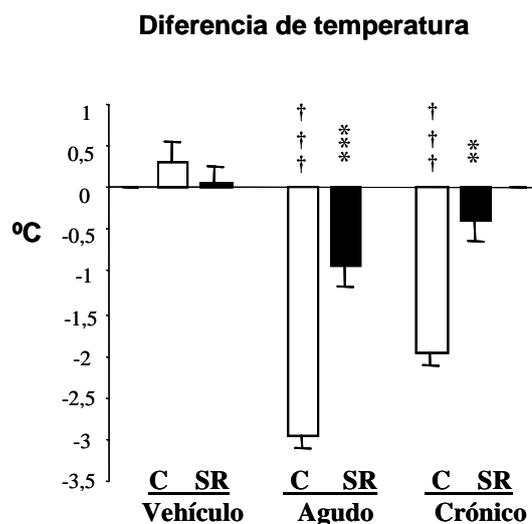
#### **4.1.4 Síndrome de abstinencia precipitado por SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2**

Para comprobar que la administración de SR141716A tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 producía un fenómeno de abstinencia, se cuantificó toda una serie de signos conductuales característicos del síndrome de abstinencia a cannabinoides. Como control de su conducta normal, se cuantificó la presencia de estos signos conductuales 15 min antes del tratamiento agudo con vehículo (1 ml/kg), con el antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> SR141716A (10 mg/kg), el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (8 mg/kg) y de la administración de SR141716A (10 mg/kg) 4 h después tanto de una inyección aguda de WIN 55,212-2 (8 mg/kg), como después de la última administración de WIN 55,212-2 (8 mg/kg) del tratamiento crónico. Además, estos datos pueden servirnos para comprobar si los animales presentaban la aparición de un síndrome de abstinencia espontáneo o si el SR141716A provocaba por sí solo la aparición de signos. Durante este periodo no aparecieron diferencias significativas en la puntuación global obtenida en ningún grupo experimental (Fig. 4.7).

También se midió la temperatura rectal 15 min antes y 45 después de cada tratamiento. En la figura 4.8 se representa la diferencia en la temperatura rectal entre estos dos momentos. Se observa un ligero efecto de tolerancia a la disminución de la temperatura provocada por una dosis de WIN 55-212-2 (8 mg/kg) tras el tratamiento crónico.

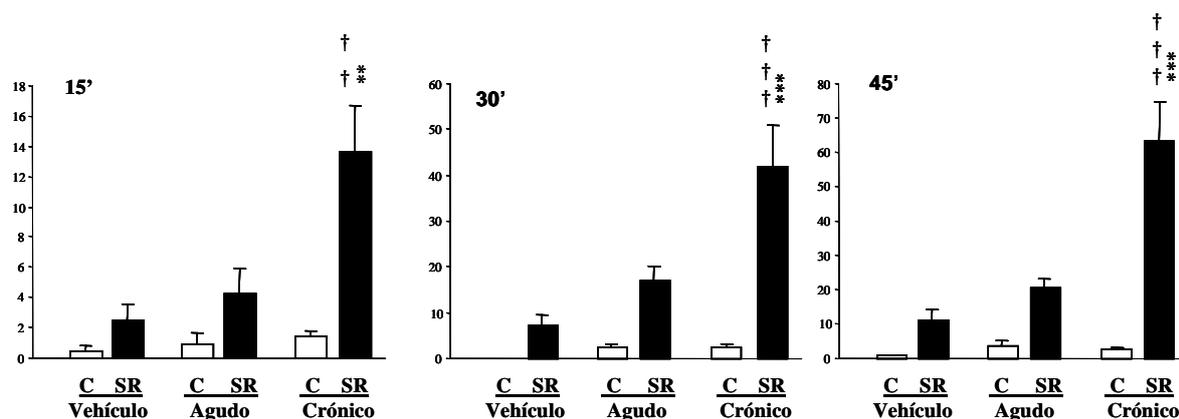


**Fig. 4.7** Puntuación total que presentaban los distintos grupos de animales antes de administrarles el antagonista selectivo del receptor cannabinoide SR141716A (10 mg/kg, i.p.). Los únicos animales que habían recibido algún tratamiento fueron los del grupo crónico que se encontraban en el último día del tratamiento crónico con WIN 55,212-2. Las barras representan las medias  $\pm$  error estándar de la puntuación global obtenida a partir de los signos observados durante 15 min, en 6 animales por grupo.  $\dagger P < 0,05$  en comparación con el grupo tratado con vehículo



**Fig. 4.8** Efecto del SR141716A (SR; 10 mg/kg, i.p.), administrado 4 horas después, sobre la acción hipotérmica del WIN 55,212-2 (WIN; 8 mg/kg, i.p.) administrado de forma aguda o tras el tratamiento crónico con WIN. Los animales control fueron tratados con el vehículo (1 ml/kg, i.p.) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). Las barras representan la medias  $\pm$  error estándar de la diferencia de temperatura entre el momento antes de realizar los tratamientos agudos y 45 min después de estos tratamientos, de 6 experimentos por grupo. \* $P < 0,05$  en comparación el grupo tratado con vehículo y  $\dagger P < 0,05$  en comparación con el grupo control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

Tras el tratamiento respectivo los animales fueron observados durante 45 min y se corroboró la aparición de un síndrome de abstinencia más severo tras administrar SR141716A (10 mg/kg) 4 horas después de la última dosis de WIN 55,212-2 del tratamiento crónico, como se puede comprobar en la puntuación global. Aunque el SR141716A por si solo y, más aún, administrado 4 horas después de una dosis aguda de WIN 55,212-2, aumentó la aparición de una serie de signos conductuales, aunque globalmente este aumento no fue significativo (Fig. 4.9 y Fig. 4.10).



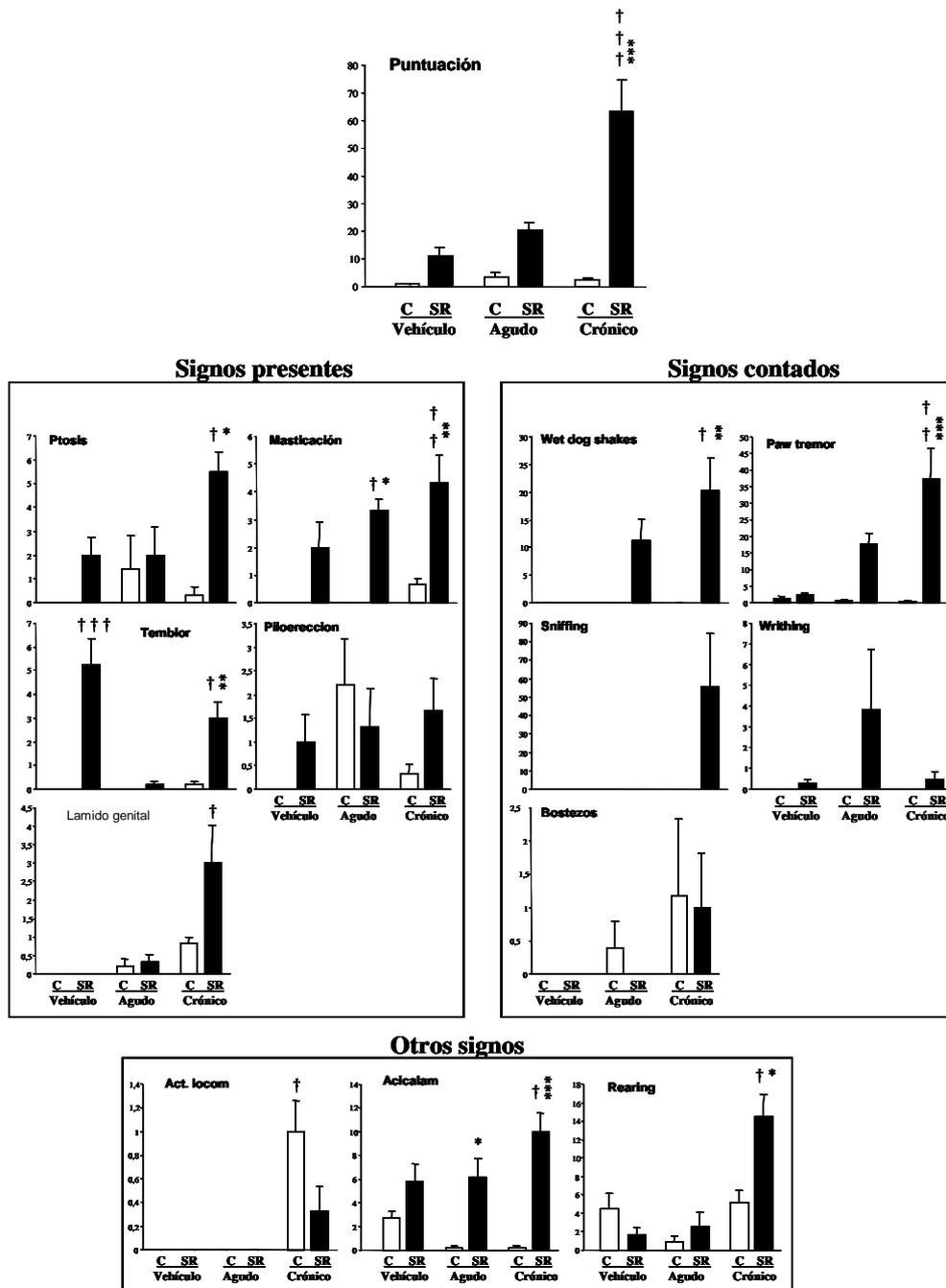
**Fig. 4.9** Puntuación global obtenida a partir de la observación de los distintos signos conductuales durante los 15, 30 y 45 min después de la administración de vehículo (mezcla de etanol, Cremophor y agua; 1:1:18), WIN 55,212-2 agudo (8 mg/kg, i.p.) o la última administración del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 (8 mg/kg, i.p.) (grupo C) o tras el tratamiento con SR141716A 4 h después de cada uno de estos tratamientos (grupo SR). Las barras representan la medias  $\pm$  error estándar de la puntuación global obtenida de 6 animales por grupo. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 en comparación con el grupo tratado con vehículo y ††P<0,01, †††P<0,001 en comparación con el grupo control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

Considerando la cuantificación realizada en los 45 min después del tratamiento, podemos observar que la administración de SR141716A después del tratamiento crónico precipitó un síndrome de abstinencia característico, como podemos ver en la puntuación global (Fig. 4.9 y Fig. 4.10). Aumentó significativamente la aparición de ptosis palpebral, de temblor, de masticación y el lamido genital durante estos 45 min. También aumentó de forma muy significativa el número de sucesos de *wet dog shakes* y de *paw tremor*. De la misma forma que hubo más episodios de acicalamientos y de

levantamientos sobre las patas traseras o *rearing*, aunque estos signos no se tuvieron en cuenta a la hora de realizar la puntuación global (Fig. 4.10).

El SR141716A solo o después de una dosis aguda de WIN 55,212-2 (8 mg/kg) también aumento ligeramente la aparición de determinados signos conductuales, aunque globalmente no fuera significativo (Fig. 4.10). Aumentó, en ambos grupos, la aparición de masticación y el número de acicalamientos. El SR141716A solo también aumento el temblor generalizado del animal y administrado después de WIN 55,212-2 agudo también provocó un aumento, aunque de forma no significativa, de los sucesos de *wet dog shakes* y *paw tremor*. El grupo tratado de forma aguda con SR141716A también presentó una conducta de rascado compulsivo bastante importante aunque este signo no se cuantificó y tampoco se tuvo en cuenta para realizar la cuantificación del síndrome de abstinencia.

Por tanto podemos asegurar que la administración de SR141716A (10 mg/kg) 4 horas después de la última dosis de este tratamiento crónico con WIN 55,212-2 en ratas, precipita un síndrome de abstinencia a cannabinoides característico.



**Fig. 4.10** Puntuación total y distintos signos conductuales observados durante los 45 min siguientes a la administración de vehículo (mezcla de etanol, Cremophor y agua; 1:1:18), WIN 55,212-2 agudo (8 mg/kg, i.p.) o la última administración del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 (8 mg/kg, i.p.) (grupo C) o tras el tratamiento con SR141716A (10 mg/kg, i.p.) 4h después de cada uno de estos tratamientos (grupo SR). Las barras representan la medias  $\pm$  error estándar de la puntuación obtenida de 6 animales por grupo. \* $P < 0,01$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  en comparación con el grupo tratado con vehículo y  $\dagger\dagger P < 0,01$ ,  $\dagger\dagger\dagger P < 0,001$  en comparación con el grupo control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

## 4.2 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS

### 4.2.1 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos cannabinoides sobre la síntesis de monoaminas

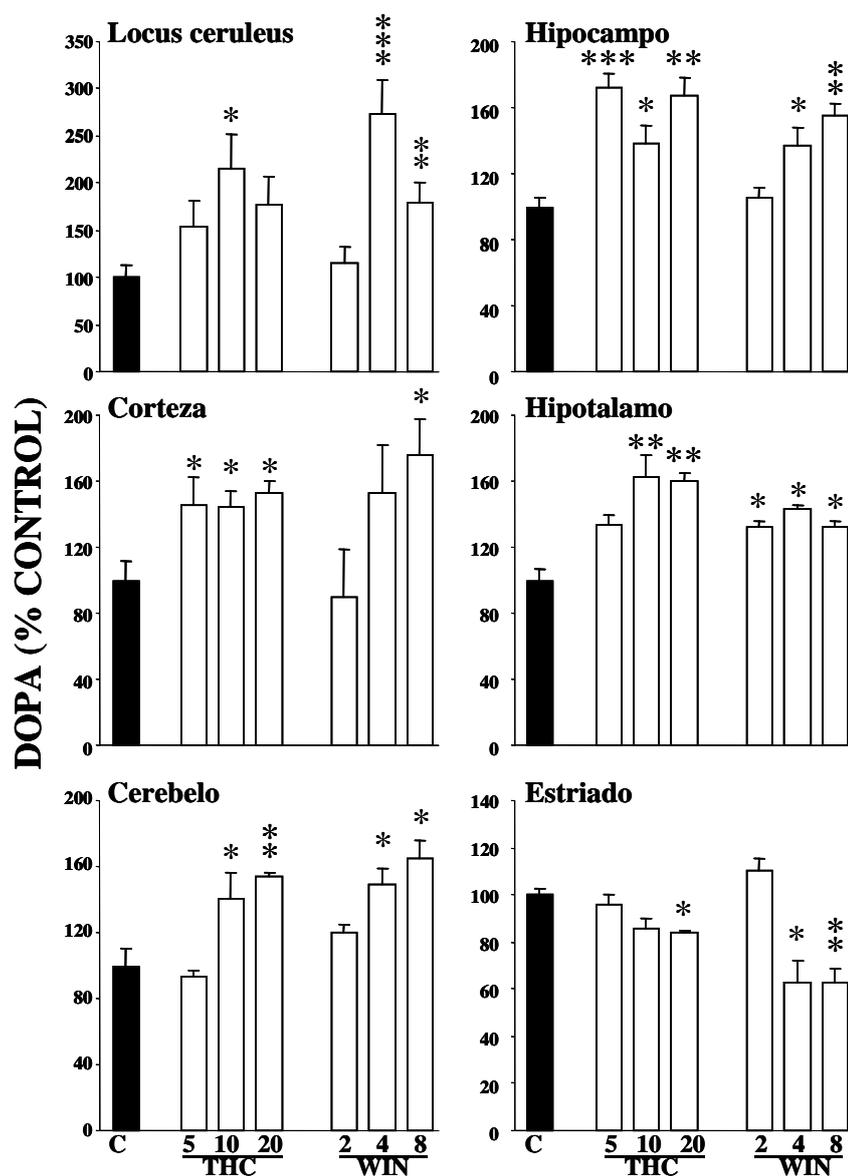
#### 4.2.1.1 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos cannabinoides sobre la síntesis de noradrenalina en el cerebro de rata

##### 4.2.1.1.1 Efecto de los agonistas cannabinoides

La administración aguda del THC (5-20 mg/kg) incrementó la síntesis de DOPA/noradrenalina en la sección cerebral que contiene el locus ceruleus (55-115%), en el hipocampo (37-70%), en la corteza parieto-occipital (45-53%), en el hipotálamo (34-60%) y en el cerebelo (40-54%) (Fig. 4.11).

De la misma forma el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (2-8 mg/kg) también indujo un aumento en la síntesis de DOPA/noradrenalina en el locus ceruleus (80-173%), en el hipocampo (35-55%), en el hipotálamo (32-43%), en la corteza parieto-occipital (53-76%) y en el cerebelo (49-65%) (Fig. 4.11).

Además el contenido de noradrenalina se vio reducido en la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas (Tabla 4.5). Así, la administración aguda de THC (10 mg/kg) y WIN 55,212-2 (4 mg/kg) redujeron significativamente el contenido de noradrenalina del hipocampo (31% y 27%), hipotálamo (28% y 30%), corteza parieto-occipital (66%) y del cerebelo (30%). Además, para los efectos del WIN 55,212-2 (2-4 mg/kg), se obtuvo una correlación inversa y significativa ( $r=-0,61$ ,  $n=12$ ,  $P=0,036$ ) entre la acumulación de DOPA y el contenido de noradrenalina en el hipotálamo, región cerebral en la que encontramos mayor concentración de esta monoamina (Fig. 4.12). Una correlación similar pero más débil ( $r=-0,42$ ,  $n=21$ ,  $P=0,049$ ) se observó para los efectos del THC en la misma región (datos no mostrados). Esta correlación nos sugiere un aumento en la liberación de noradrenalina inducida por los cannabinoides (Pi y Garcia-Sevilla, 1992).

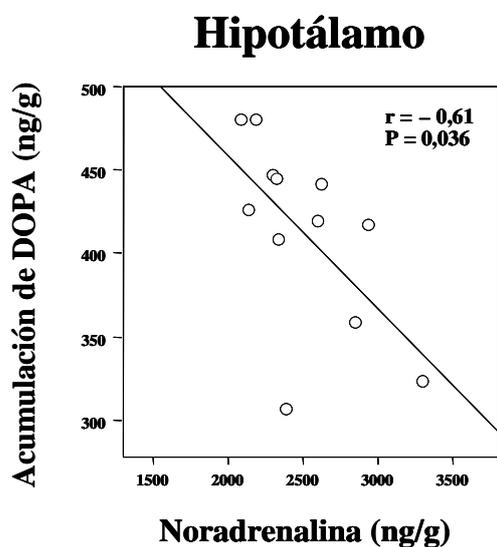


**Fig. 4.11** Efecto de la administración aguda de distintas dosis de THC (5-20 mg/kg, i.p., 1h) y de WIN 55,212-2 (WIN, 2-8 mg/kg, i.p., 1h) sobre la acumulación de DOPA en diferentes regiones del cerebro de rata. Los animales control fueron tratados con el vehículo (1 ml/kg, i.p.) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). Los distintos compuestos fueron administrados 30 min antes de la administración de NSD 1015 y los animales fueron sacrificados tras otros 30 min. Las barras representan la medias  $\pm$  error estándar del porcentaje respecto al grupo control de 4-8 experimentos cada dosis. (Valores control medios en ng/g 30 min, dopa: locus ceruleus,  $116 \pm 15$ ; hipocampo,  $47 \pm 3$ ; corteza,  $62 \pm 3$ ; hipotálamo,  $330 \pm 9$ ; cerebelo,  $38 \pm 4$ ; estriado,  $1.862 \pm 51$ ). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  en comparación con los valores control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

**Tabla 4.5** Efecto agudo del THC y del WIN 55,212-2 (WIN) sobre el contenido en noradrenalina de varias regiones cerebrales. Las ratas recibieron una inyección de vehículo (1 ml/kg, i.p.), THC (5-20 mg/kg, i.p.) o WIN (2-4 mg/kg, i.p.) 30 min antes del NSD 1015 (100 mg/kg, i.p.) y fueron sacrificadas después de otros 30 min. Cada valor representa la media  $\pm$  EEM de n experimentos por grupo

Tratamiento	n	Locus ceruleus (ng/g)	Hipocampo (ng/g)	Hipotálamo (ng/g)	Corteza (ng/g)	Cerebelo (ng/g)
Vehículo	8	760 $\pm$ 60	566 $\pm$ 47	3170 $\pm$ 289	289 $\pm$ 16	383 $\pm$ 10
THC 5 mg/kg	5	649 $\pm$ 86	556 $\pm$ 56	2531 $\pm$ 154	274 $\pm$ 60	234 $\pm$ 68
THC 10 mg/kg	8	700 $\pm$ 74	386 $\pm$ 29*	2282 $\pm$ 111*	276 $\pm$ 40	288 $\pm$ 23
THC 20 mg/kg	5	701 $\pm$ 70	467 $\pm$ 60	2389 $\pm$ 96	248 $\pm$ 69	255 $\pm$ 47
WIN 2 mg/kg	3	763 $\pm$ 206	471 $\pm$ 60	2626 $\pm$ 174	180 $\pm$ 68	373 $\pm$ 71
WIN 4 mg/kg	6	810 $\pm$ 142	411 $\pm$ 37*	2204 $\pm$ 46*	98 $\pm$ 31*	266 $\pm$ 24*
WIN 8 mg/kg	6	692 $\pm$ 121	434 $\pm$ 55*	2593 $\pm$ 326	257 $\pm$ 57	217 $\pm$ 38*

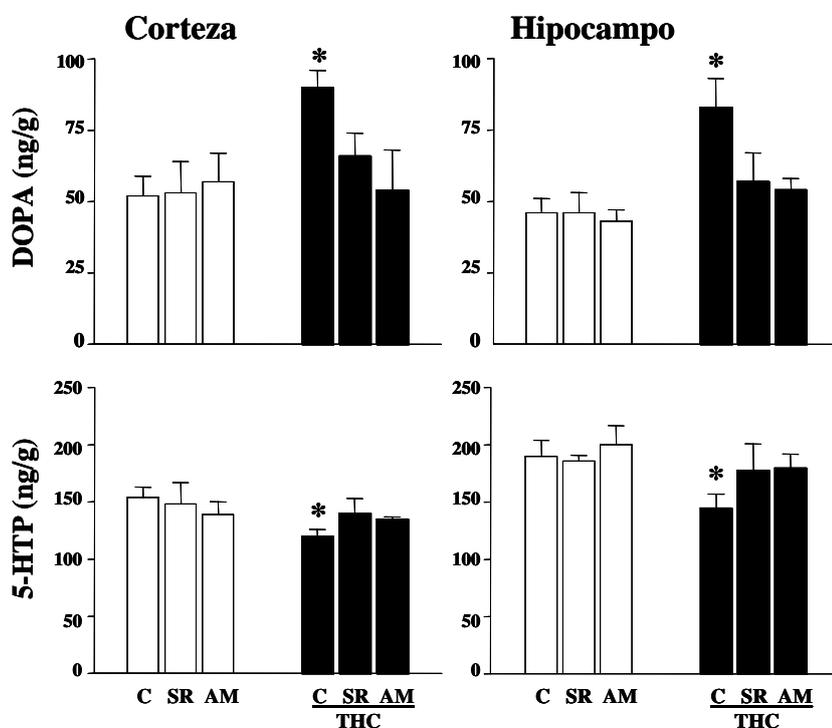
\* $P < 0,05$  cuando se compara con su grupo vehículo (ANOVA seguido de un test de Scheffé)



**Fig. 4.12** Correlación entre los cambios en la acumulación de DOPA y el contenido de noradrenalina inducido por el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (2-4 mg/kg, i.p.) en el hipotálamo de rata. La recta que describe mejor los datos es  $y = 643 - 0,092x$  ( $r = -0,61$ ,  $n = 12$ ,  $P = 0,036$ )

#### 4.2.1.1.2 Efecto del pretratamiento con antagonistas selectivos del receptor cannabinoide $CB_1$ sobre el efecto agudo de los agonistas cannabinoide

Los tratamientos agudos con los antagonistas selectivos del receptor cannabinoide  $CB_1$ , SR141716A o AM281 (10 mg/kg), no alteraron significativamente la síntesis de DOPA/noradrenalina en ninguna región estudiada. En cambio, administrados 10 min antes del agonista, antagonizaron el efecto estimulador producido por el THC (10 mg/kg) en la acumulación de DOPA tanto en la corteza parieto-occipital como en el hipocampo (Fig. 4.13), indicando que los efectos producidos por el THC están mediados por el receptor cannabinoide  $CB_1$ .

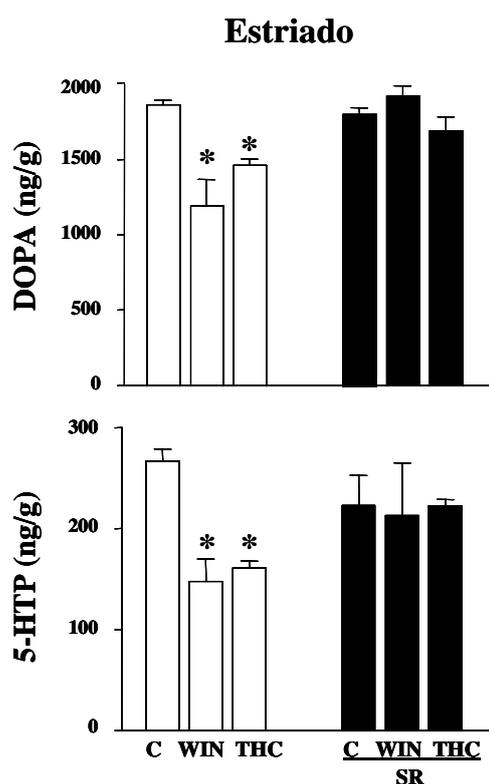


**Fig. 4.13** Efecto agudo de la administración de los antagonistas selectivos del receptor cannabinoide  $CB_1$ , SR141716A y AM 281 (SR y AM; 10 mg/kg, i.p.), inyectados 10 min antes de una inyección de vehículo o THC (10 mg/kg, i.p., 1h) sobre la acumulación de DOPA y 5-HTP en la corteza parieto-occipital y en el hipocampo de rata. Los animales control fueron tratados con el vehículo (1 ml/kg, i.p., 1h) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). El THC o el vehículo fueron administrados 30 min antes de la administración de NSD 1015 y los animales fueron sacrificados 1h después. Las barras representan la medias  $\pm$  error estándar de la acumulación de DOPA o 5-HTP (expresada en ng/g de tejido) de 4-8 experimentos por grupo. \* $P < 0,05$  en comparación con los valores control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

#### 4.2.1.2 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos cannabinoides sobre la síntesis de dopamina en el cerebro de rata

##### 4.2.1.2.1 Efecto de los agonistas cannabinoides

El tratamiento agudo con THC (5-20 mg/kg) disminuyó de forma significativa la síntesis de DOPA/dopamina en el estriado (10-16%) (Fig. 4.11 y Fig. 4.14). De la misma forma el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (4-8 mg/kg) disminuyó la síntesis de DOPA/dopamina en esta región (37%). El THC no alteró los niveles de dopamina en el estriado, pero el WIN 55,212-2 (4 mg/kg) los redujo respecto a los valores control (20%,  $P < 0.05$ ) (ratas control:  $9421 \pm 275$  ng/g,  $n=8$ ; ratas tratadas con THC 20 mg/kg:  $9234 \pm 186$  ng/g  $n=5$ ; ratas tratadas con WIN 4 mg/kg:  $7468 \pm 541$ ,  $n=6$ ; ratas tratadas con WIN 8 mg/kg:  $706 \pm 434$ ,  $n=6$ ).



**Fig. 4.14** Antagonismo del efecto agudo del THC (20 mg/kg, i.p., 1h) y el WIN 55,212-2 (WIN, 4 mg/kg, i.p., 1h) sobre la acumulación de DOPA y 5-HTP por parte de una administración aguda del SR141716A (SR; 10 mg/kg, i.p., inyectado 10 min antes) en el estriado de rata. Los animales control fueron tratados con el vehículo (1 ml/kg, i.p.) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). El THC y el WIN 55,212-2 fueron administrados 30 min antes de la administración de NSD 1015 y los animales fueron sacrificados 1h después. Las barras representan la medias  $\pm$  error estándar de la acumulación de DOPA o 5-HTP (expresada en ng/g de tejido) de 4-8 experimentos cada dosis. \* $P < 0,05$  en comparación con los valores control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

#### *4.2.1.2.2 Efecto del pretratamiento con antagonistas selectivos del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> sobre el efecto agudo de los agonistas cannabinoides*

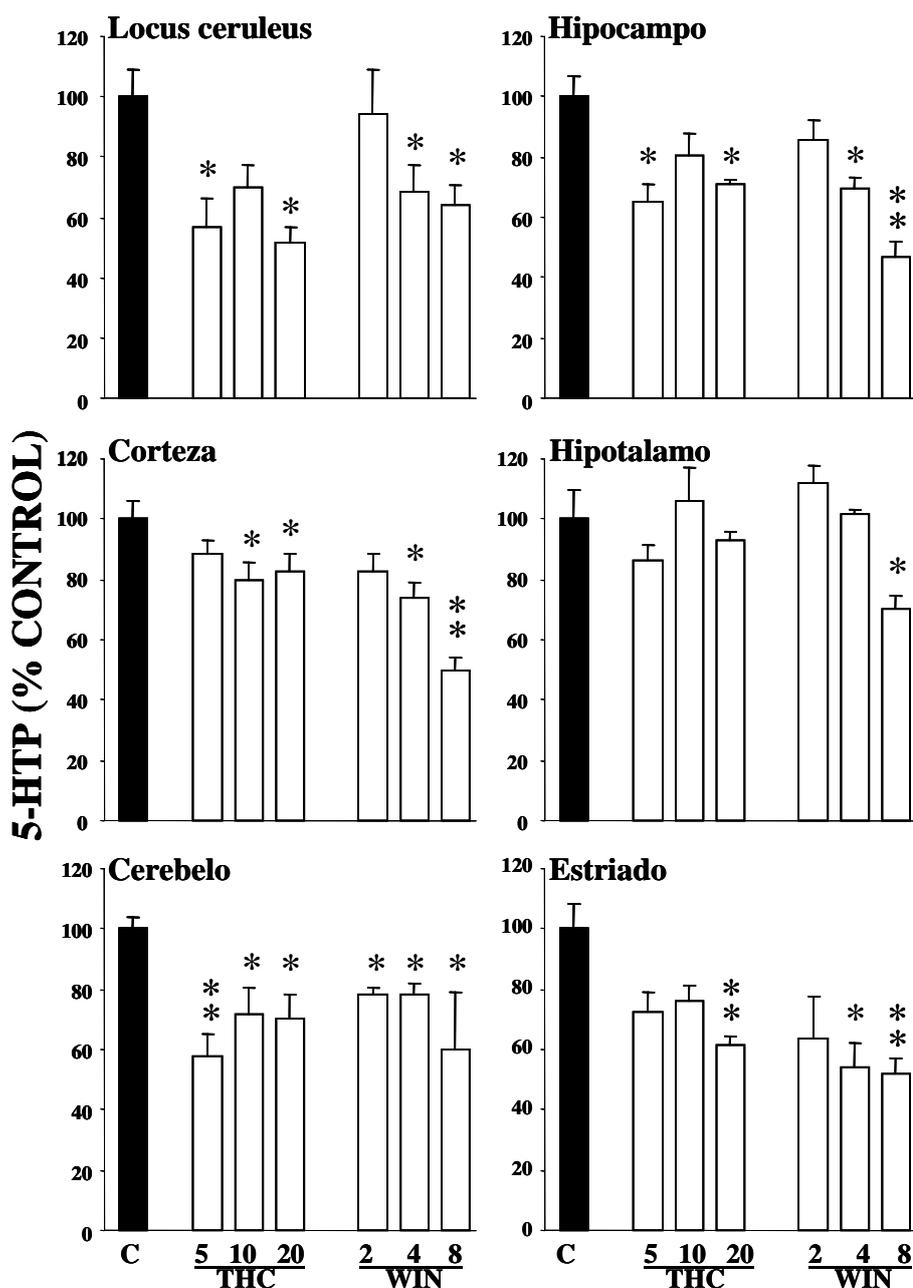
El tratamiento agudo con los antagonistas selectivos del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, SR141716A o AM281 (10 mg/kg), no alteraron significativamente la síntesis de DOPA/dopamina en el estriado. Sin embargo, el pretratamiento con el SR141716A antagonizó los efectos inhibitorios del THC (20 mg/kg) y del WIN 55,212-2 (4 mg/kg) sobre la síntesis de DOPA/dopamina en el estriado (Fig. 4.14).

#### *4.2.1.3 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos cannabinoides sobre la síntesis de serotonina en el cerebro de rata*

##### *4.2.1.3.1 Efecto de los agonistas cannabinoides*

El tratamiento agudo con THC (5-20 mg/kg, 1h) indujo una disminución de la síntesis de 5-HTP/5-HT en el locus ceruleus (32-36%), hipocampo (30-53%), corteza parieto-occipital (26-50%), cerebelo (22-40%) y en el estriado (36-48%) (Fig. 4.15). En cambio en el hipotálamo no se observó un efecto inhibitorio claro sobre la acumulación de 5-HTP tras el tratamiento con THC (Fig. 4.15).

De forma similar, el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (2-8 mg/kg, 1h) también disminuyó la síntesis de 5-HTP/5-HT en el locus ceruleus (21-31%), hipocampo (30-36%), corteza parieto-occipital (26-29%), cerebelo (22-33%), en el estriado (40-46%) y también en el hipotálamo (30%) (Fig. 4.15).



**Fig. 4.15** Efecto de la administración aguda de distintas dosis de THC (5-20 mg/kg, i.p., 1h) y de WIN 55,212-2 (WIN, 2-8 mg/kg, i.p., 1h) sobre la acumulación de 5-HTP en diferentes regiones del cerebro de rata. Los animales control fueron tratados con el vehículo (1 ml/kg, i.p., 1h) en el que se disolvieron el resto de fármacos, que consiste en una mezcla de etanol, Cremophor y agua (1:1:18). Los distintos compuestos fueron administrados 30 min antes de la administración de NSD 1015 y los animales fueron sacrificados 1h después. Las barras representan la medias  $\pm$  error estándar del porcentaje respecto al grupo control de 4-8 experimentos cada dosis. (Valores control medios en ng/g 30 min, 5-HTP [n=8]: locus ceruleus, 555 $\pm$ 61; hipocampo, 198 $\pm$ 14; corteza, 164 $\pm$ 8; hipotálamo, 355 $\pm$ 30; cerebelo, 36 $\pm$ 2; estriado, 261 $\pm$ 22). \*P<0,05; \*\*P<0,01 en comparación con los valores control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

#### *4.2.1.3.2 Efecto del pretratamiento con antagonistas selectivos del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> sobre el efecto agudo de los agonistas cannabinoides*

Los tratamientos agudos con los antagonistas selectivos del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, SR 141716A o AM281 (10 mg/kg), no alteraron la síntesis de 5-HTP/5-HT en ninguna región estudiada (Fig. 4.13 y Fig. 4.14). Sin embargo, ambos antagonizaron el efecto inhibitorio producido por el THC (10 mg/kg) sobre la síntesis de 5-HTP/5-HT en la corteza parieto-occipital y en el hipocampo (Fig. 4.13). De la misma forma, el SR141716A (10 mg/kg) también antagonizó el efecto inhibitorio que produjo la administración de WIN 55,212-2 (4 mg/kg) y de THC (20 mg/kg) sobre la acumulación de 5-HTP en el estriado (Fig. 4.14).

Ningún tratamiento agudo (THC, WIN 55,212-2, SR141716A o AM281) alteró de forma significativa el contenido de 5-HT en ninguna región del cerebro de rata estudiada (valores controles para los niveles de 5-HT (ng/g, n=8): locus ceruleus, 816±60; hipocampo, 509±24; corteza parieto-occipital, 324±23; hipotálamo, 873±48; cerebelo, 130±26; estriado, 905±58).

#### **4.2.2 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la síntesis de monoaminas en el cerebro de rata**

Como acabamos de comentar, el tratamiento agudo con el antagonista selectivo CB<sub>1</sub>, el SR141716A (10 mg/kg), por el solo o administrado 4 h después de una administración de vehículo (1 ml/kg, i.p.) no provocó cambios significativos respecto al tratamiento únicamente con vehículo, en la acumulación de DOPA o 5-HTP en ninguna de las regiones cerebrales de rata estudiadas (Fig. 4.13; Fig. 4.14 y datos no mostrados). Por su parte, la administración de este antagonista 4 h después de la administración aguda de WIN 55,212-2 (8 mg/kg, i.p.) revirtió de forma significativa el aumento en la síntesis de noradrenalina y la inhibición de la síntesis de dopamina y serotonina provocados por esta administración del agonista cannabinoide en la mayoría de regiones cerebrales de rata (datos no mostrados).

#### ***4.2.2.1 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la síntesis de noradrenalina en el cerebro de rata***

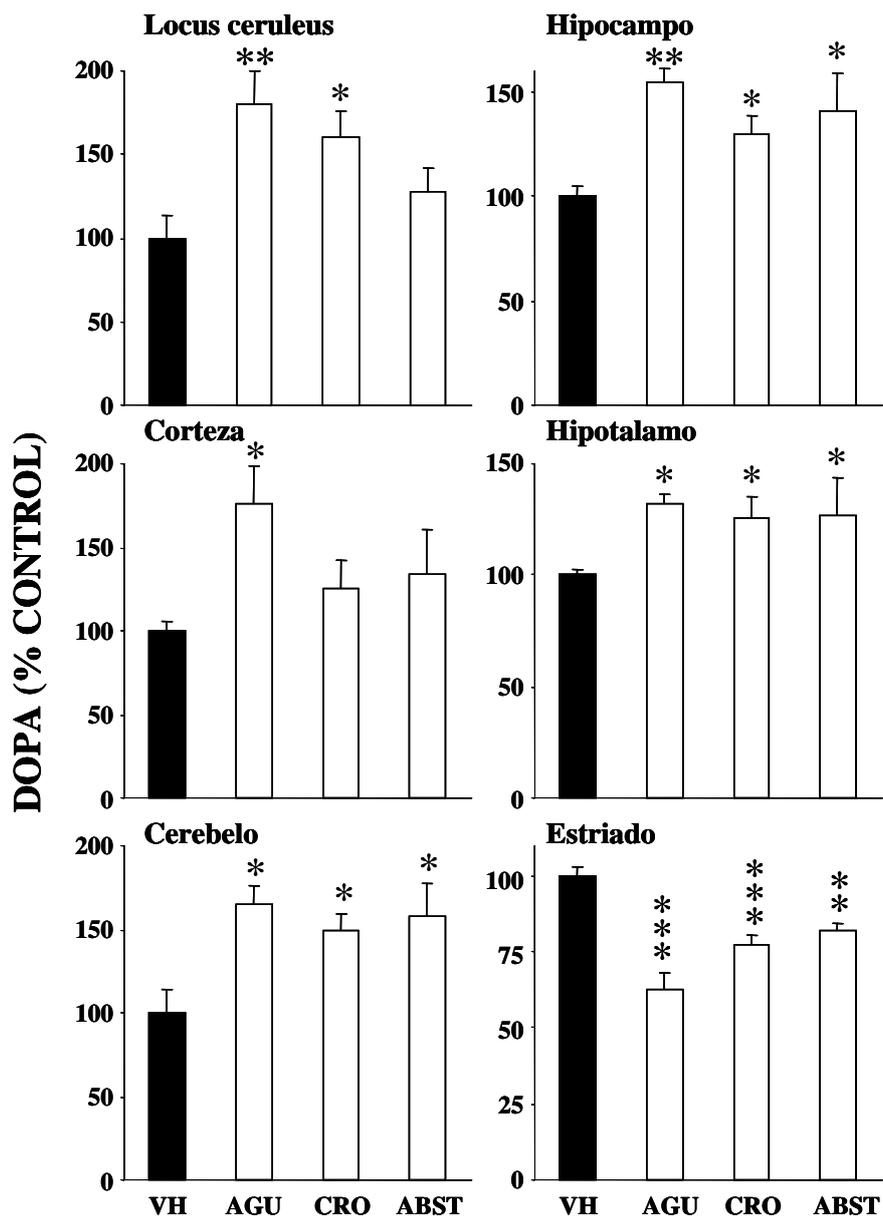
##### *4.2.2.1.1 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2*

El efecto estimulador sobre la síntesis de DOPA/noradrenalina que produjo la dosis aguda de WIN 55,212-2 (8 mg/kg) en la corteza parieto-occipital (77%) y en el locus ceruleus (180%), se redujo tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2 durante 5 días (26% y 160%, respectivamente) y de forma más ligera en el hipocampo (agudo: 55%; crónico 30%) (Fig. 4.16). Estos resultados indican que se ha producido una tolerancia a los efectos del WIN 55,212-2 sobre la síntesis de noradrenalina en estas regiones.

Este efecto no se observa ni en la estimulación que se produce en el cerebelo, ni en la del hipotálamo (65% y 32%, respectivamente) (Fig. 4.16).

##### *4.2.2.1.2 Efecto de la abstinencia provocada por SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2*

En los animales a los que se precipitó la abstinencia mediante la administración de SR141716A tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 (ver apartado “Valoración de la abstinencia a cannabinoides provocada por SR141716A”), los niveles de acumulación de dopa fueron parecidos a los valores de animales tratados únicamente con vehículo en la corteza parieto-occipital y el locus ceruleus. En el resto de regiones cerebrales, la administración de SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2 no alteraron los niveles de acumulación de DOPA y los valores se mantuvieron elevados comparados con los de los animales tratados con vehículo (Fig. 4.16).



**Fig. 4.16** Efecto del tratamiento agudo (8 mg/kg, i.p.) y crónico (2-8 mg/kg, i.p., 5 días) con WIN 55,212-2 (1h), así como de la abstinencia precipitada por la administración de SR141716A (10 mg/kg, i.p., 1h) 4 horas después de la última dosis de WIN 55,212-2 del tratamiento crónico (8 mg/kg, i.p.) sobre la acumulación de DOPA en diferentes regiones del cerebro de rata. Los animales control recibieron una administración de vehículo (mezcla de etanol, Cremophor y agua, 1:1:18; 1 ml/kg, i.p., 1h). Todos los animales recibieron además una dosis supramáxima de NSD 30 min antes de su sacrificio. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 4-8 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra negra). Los valores control (animales tratados con vehículo) en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min fueron los siguientes: locus ceruleus  $213 \pm 29$ ; hipocampo  $44 \pm 2$ ; corteza parieto-occipital  $50 \pm 3$ ; hipotálamo  $334 \pm 7$ ; cerebelo  $66 \pm 9$ ; estriado  $1986 \pm 64$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,005$  en comparación con los valores control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

#### ***4.2.2.2 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la síntesis de dopamina en el estriado de rata***

##### *4.2.2.2.1 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2*

Tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2 durante 5 días se observa una ligera tolerancia al efecto de una dosis aguda de WIN 55,212-2 (8 mg/kg) sobre la acumulación de DOPA/dopamina en el estriado. La administración aguda de WIN 55,212-2 (8 mg/kg) produjo una reducción en la síntesis de dopamina del 37% y tras tratamiento crónico esta inhibición fue ligeramente menor (22%) (Fig. 4.16).

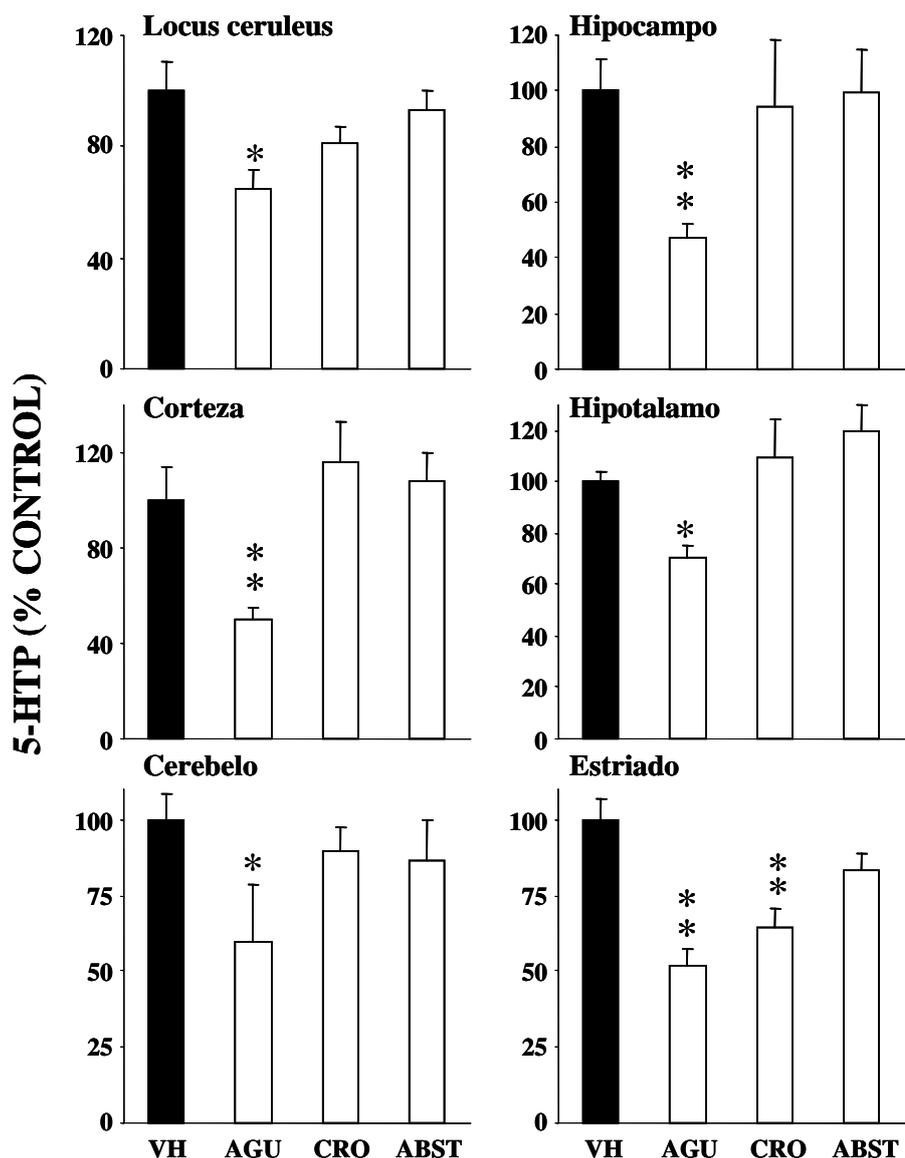
##### *4.2.2.2.2 Efecto de la abstinencia provocada por SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2*

Como resultado de la administración de SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2 los animales presentaron valores de acumulación de DOPA parecidos a los animales tratados de forma crónica con WIN 55,212-2, en ambos casos presentaron una reducción en la acumulación de DOPA de alrededor un 18% en comparación con los animales control (Fig. 4.16).

#### ***4.2.2.3 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la síntesis de serotonina en el cerebro de rata***

##### *4.2.2.3.1 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2*

En el caso de la síntesis de 5-HT, tras el tratamiento crónico se observó tolerancia al efecto agudo del WIN 55,212-2 (8 mg/kg) sobre la acumulación de 5-HTP/5-HT en todas las regiones cerebrales estudiadas (Fig. 4.17); el tanto por ciento de inhibición de la acumulación de serotonina se redujo en el locus ceruleus (agudo: 36%; crónico: 19%), hipocampo (agudo: 53%; crónico: 5%), corteza perieto-occipital (agudo: 50%; crónico: 10% de estimulación), hipotálamo (agudo: 30%; crónico: 9% de estimulación), cerebelo (agudo: 40%; crónico: 10%) y estriado (agudo: 48%; crónico: 36%).



**Fig. 4.17** Efecto del tratamiento agudo (8 mg/kg, i.p.) y crónico (2-8 mg/kg, i.p., 5 días) con WIN 55,212-2 (1h), así como de la abstinencia precipitada por la administración de SR141716A (10 mg/kg, i.p., 1h) 4 horas después de la última dosis de WIN 55,212-2 del tratamiento crónico (8 mg/kg, i.p.) sobre la acumulación de 5-HTP/5-HT en diferentes regiones del cerebro de rata. Los animales control recibieron una administración de vehículo (mezcla de etanol, Cremophor y agua, 1:1:18; 1 ml/kg, i.p., 1h). Todos los animales recibieron además una dosis supramáxima de NSD 30 min antes de su sacrificio. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 4-8 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra negra). Los valores control (animales tratados con vehículo) en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min fueron los siguientes: locus ceruleus  $889\pm90$ ; hipocampo  $278\pm32$ ; corteza parieto-occipital  $216\pm31$ ; hipotálamo  $461\pm20$ ; cerebelo  $652\pm57$ ; estriado  $293\pm19$ . \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  en comparación con los valores control (ANOVA seguido del test de Scheffé)

#### *4.2.2.3.2 Efecto de la abstinencia provocada por SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2*

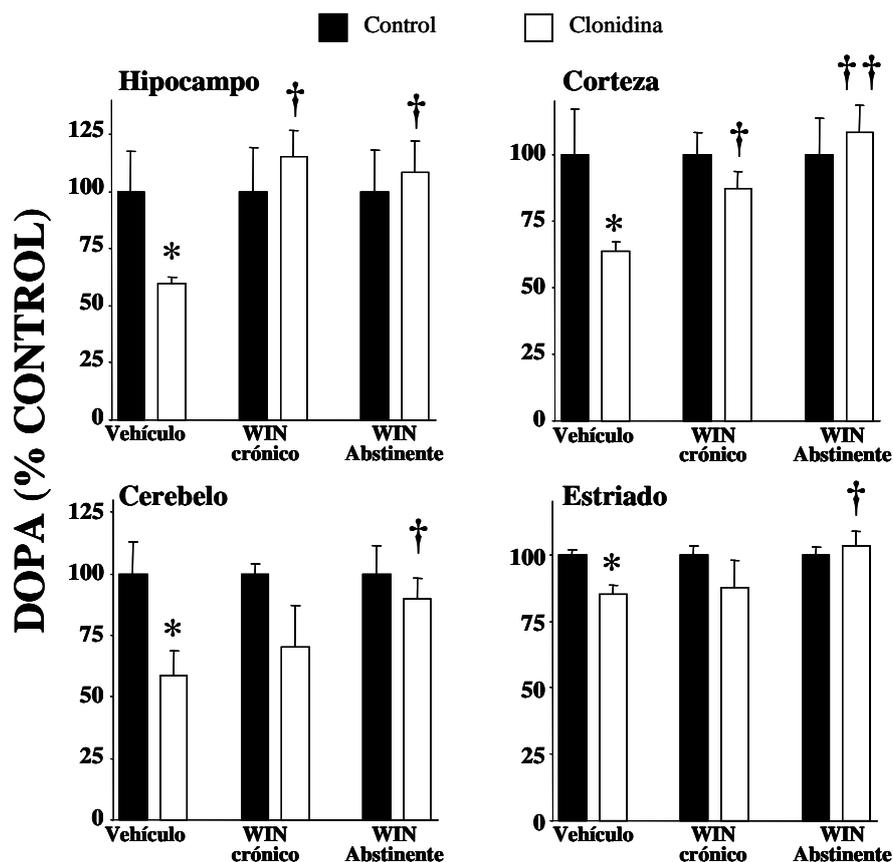
Los animales abstinentes presentaron valores de acumulación de 5-HTP parecidos a los valores de animales control tratados con vehículo en todas las regiones cerebrales estudiadas (Fig. 4.17).

### **4.2.3 Modulación de la funcionalidad de receptores presinápticos por tratamientos crónicos con el agonista cannabinoide WIN 55,212-2**

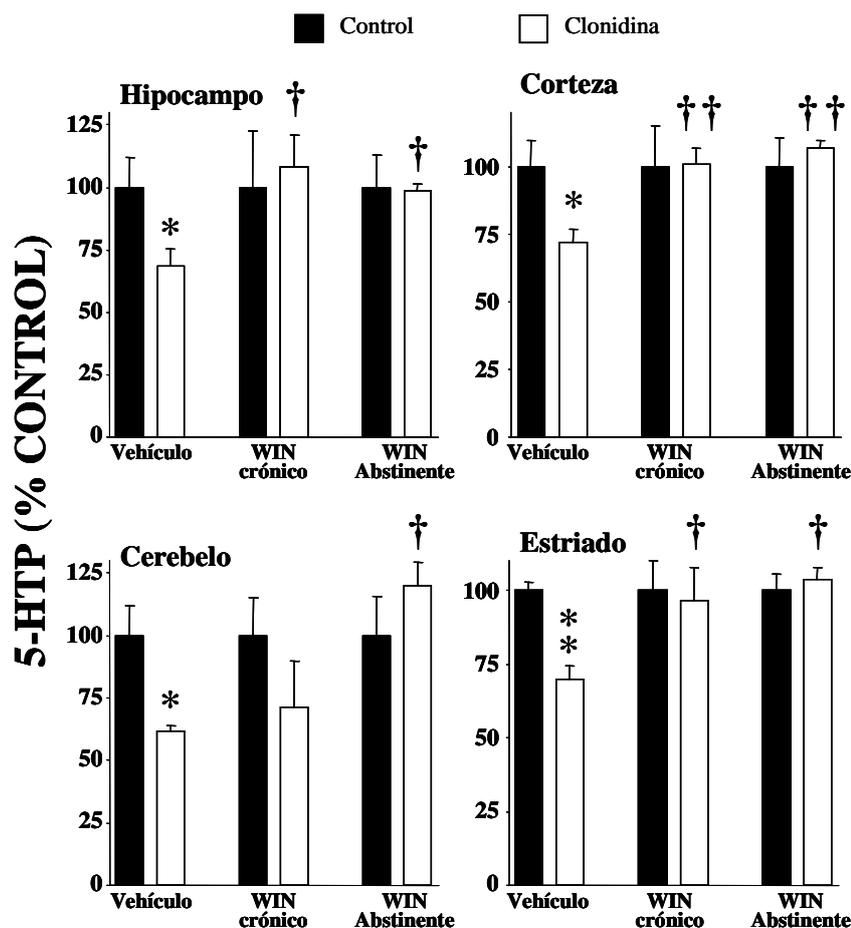
#### *4.2.3.1 Modulación de la funcionalidad de los receptores presinápticos adrenérgicos $\alpha_2$*

Mediante la administración del agonista selectivo de receptores  $\alpha_2$ , clonidina (1 mg/kg, i.p., 1h), se analizó la sensibilidad/funcionalidad de estos receptores presinápticos tanto los autorreceptores localizados sobre neuronas noradrenérgicas y que modulan la síntesis de noradrenalina en el hipocampo, corteza parieto-occipital y cerebelo, como heterorreceptores localizados tanto sobre neuronas dopaminérgicas modulando la síntesis de dopamina en el estriado, como sobre neuronas serotoninérgicas modulando la síntesis de serotonina en las cuatro regiones cerebrales comentadas.

Por lo que respecta a los autorreceptores, la administración de esta dosis aguda de clonidina 1h después de la administración del vehículo, redujo sensiblemente la acumulación de DOPA/NA en el hipocampo (41%), en la corteza parieto-occipital (36%) y en el cerebelo (42%) (Fig. 4.18). En cambio, tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de forma más significativa en animales abstinentes, el efecto agudo de esta misma dosis de clonidina sobre la síntesis de noradrenalina se vio reducido e incluso desapareció en estas tres regiones cerebrales; mostrando una reducción de la respuesta mediada por este receptor adrenérgico  $\alpha_2$  (Fig. 4.18).



**Fig. 4.18** Efecto agudo de la clonidina (1 mg/kg, i.p., 1h) sobre la síntesis de DOPA en el hipocampo, corteza parieto-occipital, cerebelo y estriado de ratas tratadas con vehículo (1 ml/kg, i.p., 2h), de forma crónica con WIN 55,212-2 (WIN; 2-8 mg/kg, i.p., 5 días y efecto a las 2h) y en ratas abstinentes por la administración de SR141716A (10 mg/kg, i.p., 2h) 4 horas después del tratamiento crónico con WIN. Las ratas recibieron salino (barras negras) o clonidina (barras blancas) 30 min antes de la administración del NSD 1015 y fueron sacrificadas después de otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 3-9 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra negra). Los valores control en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min fueron en el hipocampo: vehículo  $51 \pm 4$ , WIN crónico  $57 \pm 4$ , ratas abstinentes  $62 \pm 8$ ; en la corteza: vehículo  $50 \pm 3$ , WIN crónico  $74 \pm 6$ , ratas abstinentes  $76 \pm 14$ ; en el cerebelo: vehículo  $70 \pm 9$ , WIN crónico  $114 \pm 13$ , ratas abstinentes  $94 \pm 13$ ; y en el estriado: vehículo  $1902 \pm 29$ , WIN crónico  $1652 \pm 46$ , ratas abstinentes  $1373 \pm 28$ . \* $P < 0,05$  comparado con su respectivo control salino (test t de Student a dos vías). † $P < 0,05$ , †† $P < 0,01$  comparando el efecto agudo de la clonidina en los distintos tratamientos con el efecto de la clonidina en el grupo de ratas control tratadas con vehículo (ANOVA seguido de un test de Bonferroni)



**Fig. 4.19** Efecto agudo de la clonidina (1 mg/kg, i.p., 1h) sobre la síntesis de 5-HTP en el hipocampo, corteza parieto-occipital, cerebelo y estriado de ratas tratadas con vehículo (1 ml/kg, i.p., 2h), de forma crónica con WIN 55,212-2 (WIN; 2-8 mg/kg, i.p., 5 días y efecto a las 2h) y en ratas abstinentes por la administración de SR141716A (10 mg/kg, i.p., 2h) 4 horas después del tratamiento crónico con WIN. Las ratas recibieron salino (barras negras) o clonidina (barras blancas) 30 min antes de la administración del NSD 1015 y fueron sacrificadas después de otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 3-9 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra negra). Los valores control en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min fueron en el hipocampo: vehículo  $302 \pm 36$ , WIN crónico  $355 \pm 45$ , ratas abstinentes  $341 \pm 17$ ; en la corteza: vehículo  $224 \pm 34$ , WIN crónico  $249 \pm 38$ , ratas abstinentes  $245 \pm 25$ ; en el cerebelo: vehículo  $189 \pm 23$ , WIN crónico  $200 \pm 30$ , ratas abstinentes  $177 \pm 28$ ; y en el estriado: vehículo  $293 \pm 19$ , WIN crónico  $188 \pm 19$ , ratas abstinentes  $245 \pm 14$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  comparado con su respectivo control salino (test t de Student a dos vías). † $P < 0,05$ , †† $P < 0,01$  comparando el efecto agudo de la clonidina en los distintos tratamientos con el efecto de la clonidina en el grupo de ratas control tratadas con vehículo (ANOVA seguido de un test de Bonferroni)

En cuanto a los heterorreceptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , esta dosis de clonidina también redujo de forma significativa la síntesis de DOPA/DA en el estriado (15%) (Fig. 4.18) y de 5-HTP/5-HT en el hipocampo (31%), corteza (28%), cerebelo (38%) y estriado (30%) (Fig. 4.19). De la misma forma que ocurría para la síntesis de noradrenalina, este efecto agudo de la clonidina sobre la síntesis de dopamina y serotonina se vio reducido en la mayoría de regiones tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y abolido en todas ellas en animales abstinentes (Fig. 4.18 y Fig. 4.19). Lo que sugiere también una reducción en la funcionalidad de los heterorreceptores  $\alpha_2$  que modulan tanto la síntesis de dopamina como la síntesis de serotonina.

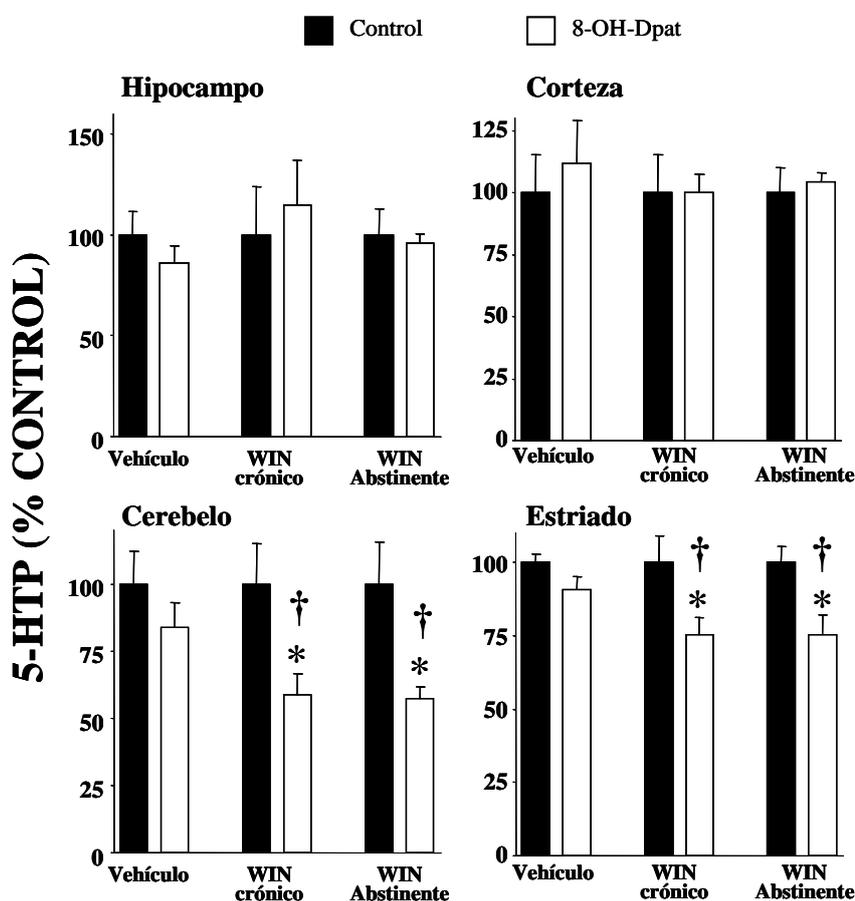
#### ***4.2.3.2 Modulación de la funcionalidad de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>***

La sensibilidad de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> fueron analizados mediante la administración aguda del agonista selectivo de estos receptores, el 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., 1h) y el análisis del efecto que produjo sobre la síntesis de las distintas monoaminas en el cerebro de rata.

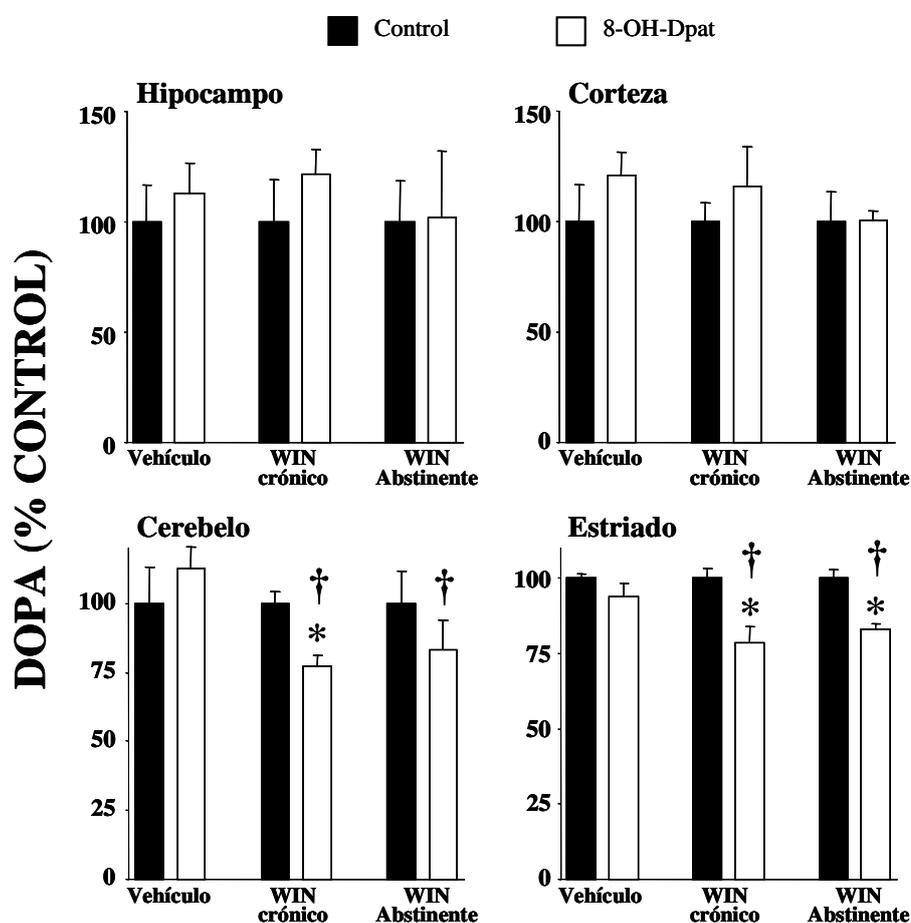
Esta dosis de 8-OH-DPAT no alteró de forma significativa la síntesis de 5-HTP/5-HT en el hipocampo, corteza parieto-occipital, cerebelo o el estriado de ratas tratadas con vehículo. En cambio, tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2, al igual que ocurrió en animales abstinentes, esta misma dosis de 8-OH-DPAT redujo de forma significativa la síntesis de serotonina en el cerebelo (41-43%) y el estriado (24-25%) (Fig. 4.20). Los resultados indican una aumento de la funcionalidad de estos autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> tras el tratamiento crónico. En el hipocampo y en la corteza parieto-occipital de ratas tratadas de forma crónica con WIN 55,212-2 o de ratas abstinentes, esta dosis de 8-OH-DPAT siguió sin producir cambios significativos sobre la síntesis de serotonina (Fig. 4.20)

Esta dosis de 8-OH-DPAT administrada a ratas control tratadas con salino, tampoco produjo efectos significativos sobre la acumulación de DOPA/NA en ninguna de las regiones estudiadas, ni sobre la acumulación de DOPA/DA en el estriado (Fig. 4.21). En cambio, tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 esta misma dosis del agonista 5-HT<sub>1A</sub> redujo de forma significativa la acumulación de DOPA/NA en el cerebelo (33%) y de DOPA/DA en el estriado (22%); observándose un efecto similar en animales abstinentes (estriado 17%) aunque en el caso del cerebelo (17%) no se alcanzó

una reducción significativa frente a los niveles que presentaron ratas abstinentes control (Fig. 4.21). En cambio en el hipocampo y en la corteza parieto-occipital el 8-OH-DPAT siguió sin producir efectos significativos tanto tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2, como en ratas abstinentes (Fig. 4.21).



**Fig. 4.20** Efecto agudo del 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., 1h) sobre la síntesis de 5-HTP en el hipocampo, corteza parieto-occipital, cerebelo y estriado de ratas tratadas con vehículo (1 ml/kg, i.p., 2h), de forma crónica con WIN 55,212-2 (WIN; 2-8 mg/kg, i.p., 5 días y efecto a las 2h) y en ratas abstinentes por la administración de SR141716A (10 mg/kg, i.p., 2h) 4 horas después del tratamiento crónico con WIN. Las ratas recibieron salino (barras negras) o 8-OH-DPAT (barras blancas) 30 min antes de la administración del NSD 1015 y fueron sacrificadas después de otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 3-9 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra negra). Ver valores control en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min en pie de la figura 4.19. \* $P < 0,05$  comparado con su respectivo control salino (test t de Student a dos vías). † $P < 0,05$  comparando el efecto agudo del 8-OH-DPAT en los distintos tratamientos con el efecto del 8-OH-DPAT en el grupo de ratas control tratadas con vehículo (ANOVA seguido de un test de Bonferroni)



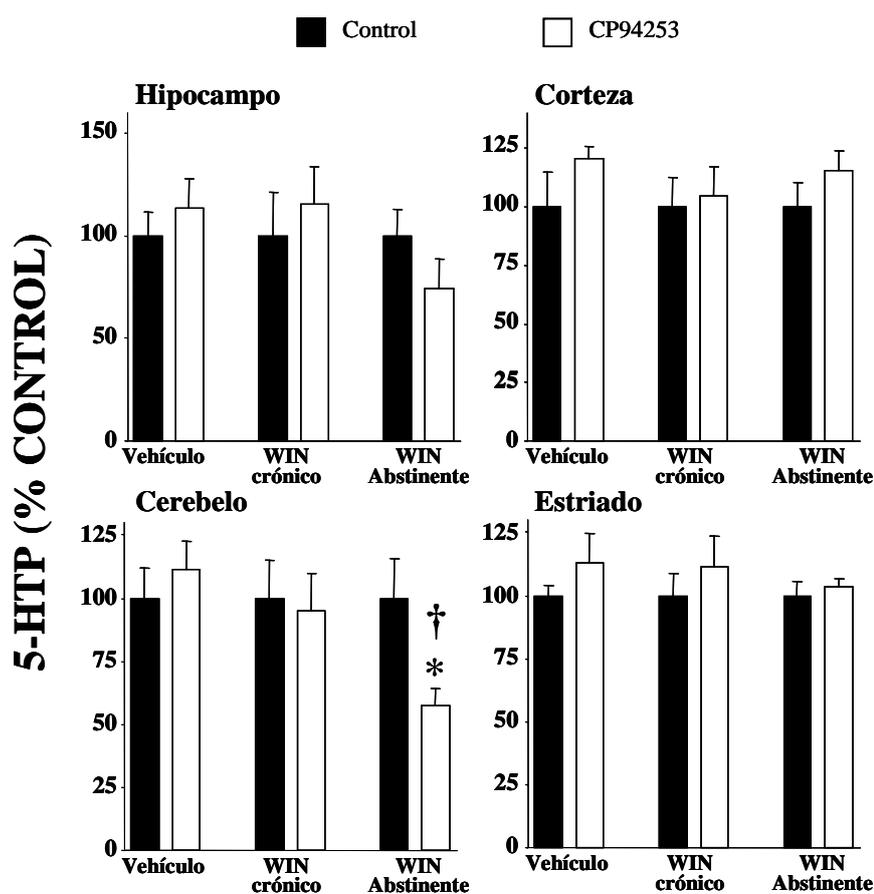
**Fig. 4.21** Efecto agudo del 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., 1h) sobre la síntesis de DOPA en el hipocampo, corteza parieto-occipital, cerebelo y estriado de ratas tratadas con vehículo (1 ml/kg, i.p., 2h), de forma crónica con WIN 55,212-2 (WIN; 2-8 mg/kg, i.p., 5 días y efecto a las 2h) y en ratas abstinentes por la administración de SR141716A (10 mg/kg, i.p., 2h) 4 horas después del tratamiento crónico con WIN. Las ratas recibieron salino (barras negras) o 8-OH-DPAT (barras blancas) 30 min antes de la administración del NSD 1015 y fueron sacrificadas después de otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 3-9 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra negra). Ver valores control en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min en pie de la figura 4.18. \* $P < 0,05$  comparado con su respectivo control salino (test t de Student a dos vías). † $P < 0,05$  comparando el efecto agudo del 8-OH-DPAT en los distintos tratamientos con el efecto del 8-OH-DPAT en el grupo de ratas control tratadas con vehículo (ANOVA seguido de un test de Bonferroni)

#### ***4.2.3.3 Modulación de la funcionalidad de los receptores presinápticos serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub>***

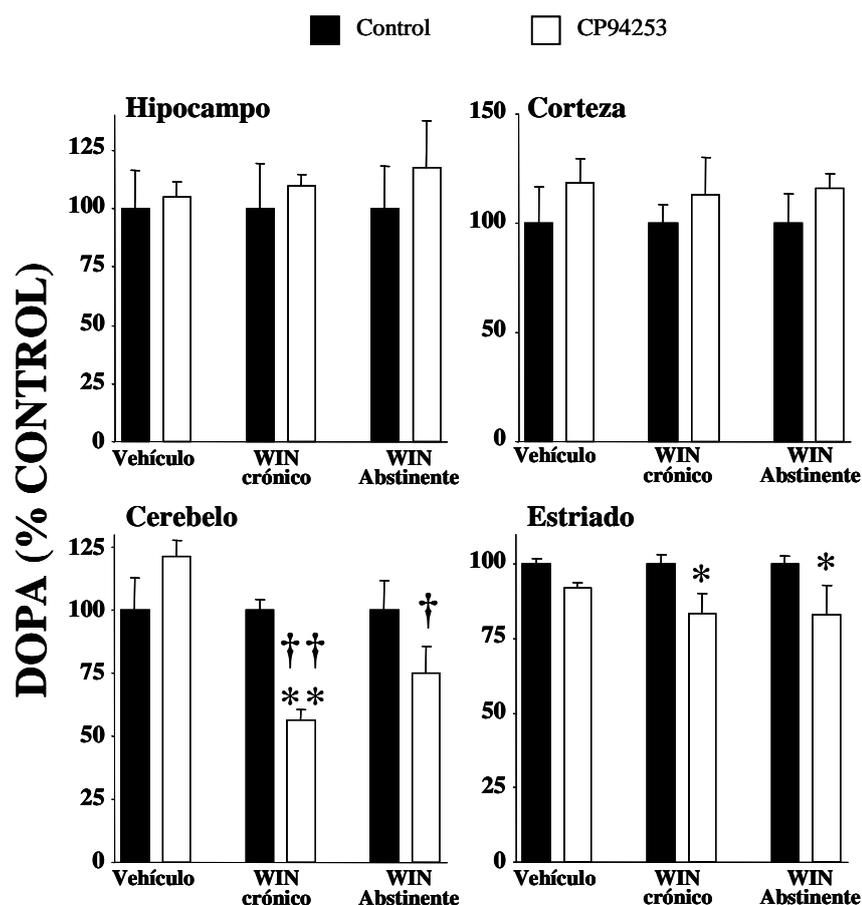
La funcionalidad de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub> fueron analizados mediante la administración del agonista selectivo de estos receptores, el CP94253 (1,5 mg/kg, i.p., 1h) y el análisis del efecto que producía sobre la síntesis de las distintas monoaminas.

La administración aguda de este agonista no produjo cambios significativos sobre la síntesis de 5-HTP/5-HT en ninguna región estudiada y al contrario de lo que ocurría con otros receptores presinápticos, el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 no alteró esta respuesta (Fig. 4.22). En cambio, en ratas abstinentes esta misma dosis de agonista redujo sensiblemente la síntesis de serotonina en el cerebelo (43%), sin cambios aparentes en el resto de regiones cerebrales estudiadas (Fig. 4.22). Este resultado sugiere un aumento de la funcionalidad/sensibilidad del autorreceptor 5-HT<sub>1B</sub> que modula la síntesis de serotonina en el cerebelo durante la abstinencia a WIN 55,212-2.

Por lo que respecta a la síntesis de noradrenalina, también se observó un aumento del efecto del agonista 5-HT<sub>1B</sub>, CP94253, tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 en el cerebelo, sin efectos significativos a través de este receptor sobre la síntesis de noradrenalina en el hipocampo y la corteza parieto-occipital de ratas control tratadas con vehículo, ratas tratadas de forma crónica con WIN 55,212-2 o animales abstinentes (Fig. 4.23). En el caso de la síntesis de dopamina, aunque tras el tratamiento crónico y en ratas abstinentes esta dosis del agonista CP94253 redujo de forma significativa la síntesis, este efecto no fue estadísticamente diferente del que producía en animales tratados con vehículo (Fig. 4.23).



**Fig. 4.22** Efecto agudo del CP94253 (1,5 mg/kg, i.p., 1h) sobre la síntesis de 5-HTP en el hipocampo, corteza parieto-occipital, cerebelo y estriado de ratas tratadas con vehículo (1 ml/kg, i.p., 2h), de forma crónica con WIN 55,212-2 (WIN; 2-8 mg/kg, i.p., 5 días y efecto a las 2h) y en ratas abstinentes por la administración de SR141716A (10 mg/kg, i.p., 2h) 4 horas después del tratamiento crónico con WIN. Las ratas recibieron salino (barras negras) o CP94253 (barras blancas) 30 min antes de la administración del NSD 1015 y fueron sacrificadas después de otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 3-9 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra negra). Ver valores control en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min en pie de la figura 4.19. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  comparado con su respectivo control salino (test t de Student a dos vías). † $P < 0,05$ , †† $P < 0,01$  comparando el efecto agudo del CP94253 en los distintos tratamientos con el efecto del CP94253 en el grupo de ratas control tratadas con vehículo (ANOVA seguido de un test de Bonferroni)



**Fig. 4.23** Efecto agudo del CP94253 (1,5 mg/kg, i.p., 1h) sobre la síntesis de DOPA en el hipocampo, corteza parieto-occipital, cerebelo y estriado de ratas tratadas con vehículo (1 ml/kg, i.p., 2h), de forma crónica con WIN 55,212-2 (WIN; 2-8 mg/kg, i.p., 5 días y efecto a las 2h) y en ratas abstinente por la administración de SR141716A (10 mg/kg, i.p., 2h) 4 horas después del tratamiento crónico con WIN. Las ratas recibieron salino (barras negras) o CP94253 (barras blancas) 30 min antes de la administración del NSD 1015 y fueron sacrificadas después de otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 3-9 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra negra). Ver valores control en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min en pie de la figura 4.18. \* $P < 0,05$  comparado con su respectivo control salino (test t de Student a dos vías). † $P < 0,05$  comparando el efecto agudo del CP94253 en los distintos tratamientos con el efecto del CP94253 en el grupo de ratas control tratadas con vehículo (ANOVA seguido de un test de Bonferroni)

### 4.3 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON ETANOL SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS

#### 4.3.1 Efectos de los tratamientos con alcohol sobre la síntesis de monoaminas

Se analizó simultáneamente la síntesis de noradrenalina, dopamina y serotonina en el locus ceruleus (principal centro noradrenérgico cerebral), en regiones cerebrales ricas en terminales nerviosos noradrenérgicos y serotoninérgicos (hipocampo y corteza parieto-occipital) y en una región rica en terminales dopaminérgicos y serotoninérgicos (estriado).

**Tabla 4.6** Efecto de los tratamientos con etanol y de la abstinencia espontánea sobre la síntesis de DOPA y 5-HTP en diferentes regiones cerebrales de rata

Acumulación de DOPA	Locus ceruleus	Hipocampo	Corteza parieto-occipital	Estriado
Salino	93 ± 9	40 ± 4	49 ± 7	1643 ± 81
Etanol agudo	240 ± 29**	32 ± 6	54 ± 8	1520 ± 163
Etanol crónico	111 ± 13	39 ± 2	38 ± 3	1535 ± 218
Abstinencia a etanol	127 ± 8	33 ± 4	64 ± 7	2074 ± 176
Acumulación de 5-HTP				
Salino	494 ± 14	196 ± 17	135 ± 4	253 ± 16
Etanol agudo	636 ± 106	165 ± 8	132 ± 10	201 ± 20
Etanol crónico	576 ± 112	264 ± 22*	164 ± 10**	210 ± 10
Abstinencia a etanol	794 ± 38*	256 ± 17*	178 ± 13**	205 ± 18

Las ratas fueron tratadas con salino (1 ml/kg, i.p.), etanol agudo (2 mg/kg, i.p.) o etanol crónico (2 mg/kg, i.p, 7 días), y la abstinencia fue analizada 24h después del tratamiento crónico. Los valores están expresados en valores absolutos (ng/g acumulados en 30 min) y representan la media ± error estándar de 4-8 experimentos por grupo. Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) a una vía seguido de un test de Scheffé para el análisis estadístico. \*\*P<0,01

Ninguno de los tratamientos realizados con etanol (agudo, crónico o la abstinencia espontánea) modificó significativamente la síntesis de DOPA/NA en el hipocampo o la corteza parieto-occipital. En cambio, el tratamiento agudo con etanol aumentó la síntesis de NA en el locus ceruleus (158%) y este efecto se vio reducido por el tratamiento crónico y durante la abstinencia (Tabla 4.6).

Por otra parte, la síntesis de DOPA/DA en el estriado tampoco fue modificada de forma significativa por ningún tratamiento con etanol (Tabla 4.6).

En cuanto a la síntesis de serotonina, el tratamiento agudo con etanol no modificó de forma significativa la síntesis de 5-HTP/5-HT en ninguna de las regiones

estudiadas (Tabla 4.6). En cambio, la administración crónica de etanol aumentó la síntesis de 5-HTP en el hipocampo (35%) y la corteza parieto-occipital (21%), sin cambios significativos en el resto de regiones. Por su parte, en ratas abstinentes a etanol se observó un marcado aumento de la síntesis de 5-HTP tanto en el locus ceruleus (61%), en el hipocampo (31%), como en la corteza (32%) (Tabla 4.6).

No se observaron cambios significativos en los niveles de las distintas monoaminas (noradrenalina, dopamina o serotonina) tras los distintos tratamientos con etanol (datos no mostrados).

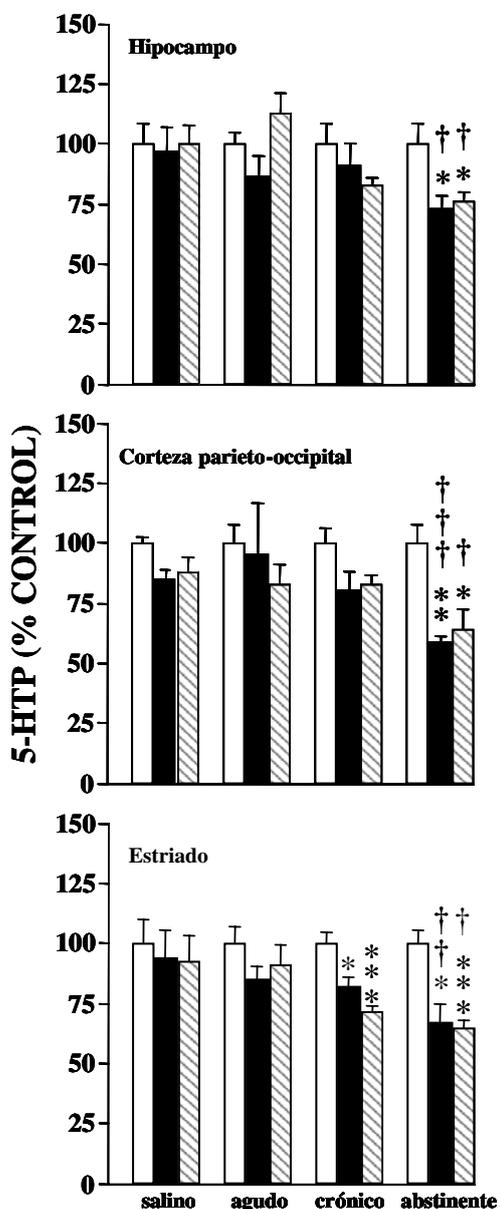
#### **4.3.2 Modulación de la funcionalidad de los receptores serotonina 5-HT<sub>1A</sub> tras la exposición crónica a alcohol**

Ya que la administración crónica de etanol modificó la síntesis de serotonina en la mayoría de regiones estudiadas se analizó la funcionalidad de receptores presinápticos serotoninérgicos para comprobar si se producen cambios adaptativos en este sistema tras este tratamiento crónico.

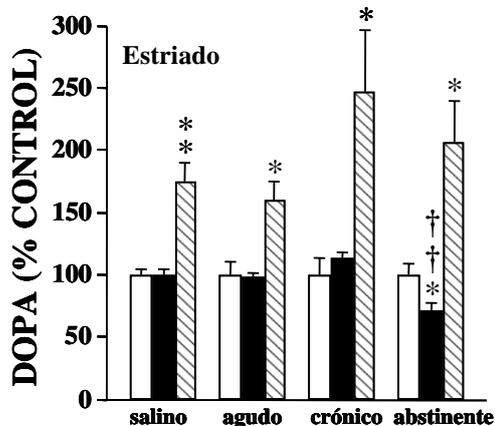
De esta forma, en ratas control tratadas con salino, una dosis baja del agonista 5-HT<sub>1A</sub> 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., 1h) no alteró de forma significativa la síntesis de 5-HTP ni en el hipocampo, la corteza parieto-occipital, ni en el estriado (Fig. 4.24). De forma similar, en ratas tratadas de forma aguda o crónica con etanol, el 8-OH-DPAT tampoco alteró la síntesis de 5-HTP en el cerebro, excepto en el estriado donde disminuyó de forma moderada (20%) después del tratamiento crónico con etanol (Fig. 4.24). Por el contrario, en ratas abstinentes a etanol (abstinencia espontánea a las 24h), el 8-OH-DPAT disminuyó de forma marcada la síntesis de serotonina en el hipocampo (29%), en la corteza parieto-occipital (41%) y en el estriado (33%) (Fig. 4.24). Un efecto similar fue inducido por el fármaco mixto buspirona (agonista 5-HT<sub>1A</sub> y antagonista D<sub>2</sub>; 1 mg/kg, i.p., 1h) que también disminuyó claramente la síntesis de 5-HTP en el hipocampo (24%), en la corteza parieto-occipital (36%) y en el estriado (35%) en ratas abstinentes a etanol (Fig. 4.24).

Además, el agonista 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., 1h) tampoco modificó la síntesis de DOPA/DA en el estriado de ratas tratadas con salino, de forma aguda o crónica con etanol (Fig. 4.25). Sin embargo disminuyó de forma significativa la síntesis de DOPA/DA en el estriado de ratas abstinentes a etanol (28%, Fig. 4.25). Por otra

parte, el marcado efecto estimulador de la bupiriona sobre la síntesis de DOPA/DA en el estriado (75%), como resultado de sus propiedades como antagonista  $D_2$ , no fue alterado de forma significativa por ningún tratamiento con etanol (Fig. 4.25).



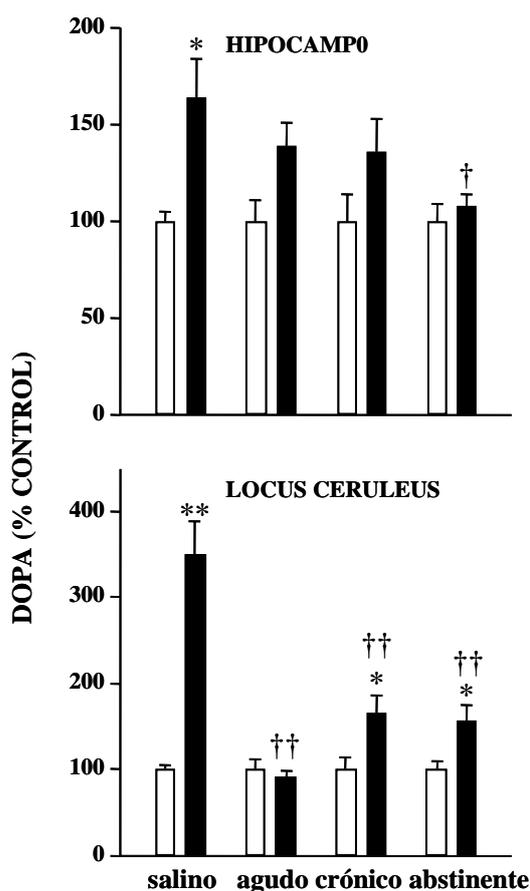
**Fig. 4.24** Efectos agudos del 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., 1h) y de la bupiriona (1 mg/kg, i.p., 1h) sobre la síntesis de 5-HTP en diferentes regiones cerebrales de ratas tratadas con salino, etano agudo (2 g/kg, i.p., 2h), etanol crónico (2 g/kg, i.p., 7 días) y ratas abstinente (24h después del tratamiento crónico). Las ratas recibieron salino (barras blancas), 8-OH-DPAT (barras negras) o bupiriona (barras ralladas) 30 min antes de la administración del NSD 1015 y fueron sacrificadas después de otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 3-9 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra blanca). Los valores control en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min se muestran en la Tabla 4.6. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  comparado con su respectivo control salino (test t de Student a dos vías). † $P < 0,05$ , †† $P < 0,01$ , ††† $P < 0,001$  comparando el efecto agudo del 8-OH-DPAT o la bupiriona en los distintos grupos con el del grupo salino (ANOVA seguido de un test de Scheffé)



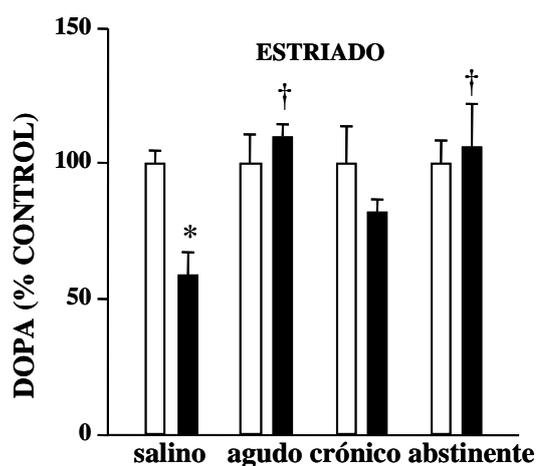
**Fig. 4.25** Efectos agudos del 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., 1h) y de la bupiriona (1 mg/kg, i.p., 1h) sobre la síntesis de DOPA en el estriado de ratas tratadas con salino, etano agudo (2 g/kg, i.p., 2h), etanol crónico (2 g/kg, i.p., 7 días) y ratas abstinentes (24h después del tratamiento crónico). Las ratas recibieron salino (barras blancas), 8-OH-DPAT (barras negras) o bupiriona (barras ralladas) 30 min antes de la administración del NSD 1015 y fueron sacrificadas después de otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 3-9 experimentos como porcentaje de su respectivo control (barra blanca). Los valores control en valores absolutos expresados en ng/g acumulado en 30 min se muestran en la Tabla 4.6. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  comparado con su respectivo control salino (test t de Student a dos vías).  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  comparando el efecto agudo del 8-OH-DPAT o la bupiriona en los distintos grupos con el del grupo salino (ANOVA seguido de un test de Scheffé)

#### 4.4 DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB<sub>1</sub> TRAS TRATAMIENTOS CON ETANOL

Se analizó el efecto agudo del agonista del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, WIN 55,212-2 sobre la síntesis de las distintas monoaminas tras los distintos tratamientos con etanol en el hipocampo, el locus ceruleus y en el estriado. La administración aguda de WIN 55,212-2 (4 mg/kg) a ratas tratadas con salino incrementó la síntesis de DOPA/noradrenalina en el hipocampo (64%) y el locus ceruleus (250%) (Fig. 4.26), y redujo la síntesis de DOPA/dopamina en el estriado (41%) y de 5-HTP/serotonina en las tres regiones (34%, 43% y 36%, respectivamente) (Fig. 4.27 y Fig. 4.28). En todas estas regiones cerebrales estudiadas, el efecto agudo del WIN 55,212-2 ya fue modificado significativamente por el tratamiento agudo con etanol (Fig. 4.26, Fig. 4.27 y Fig. 4.28).

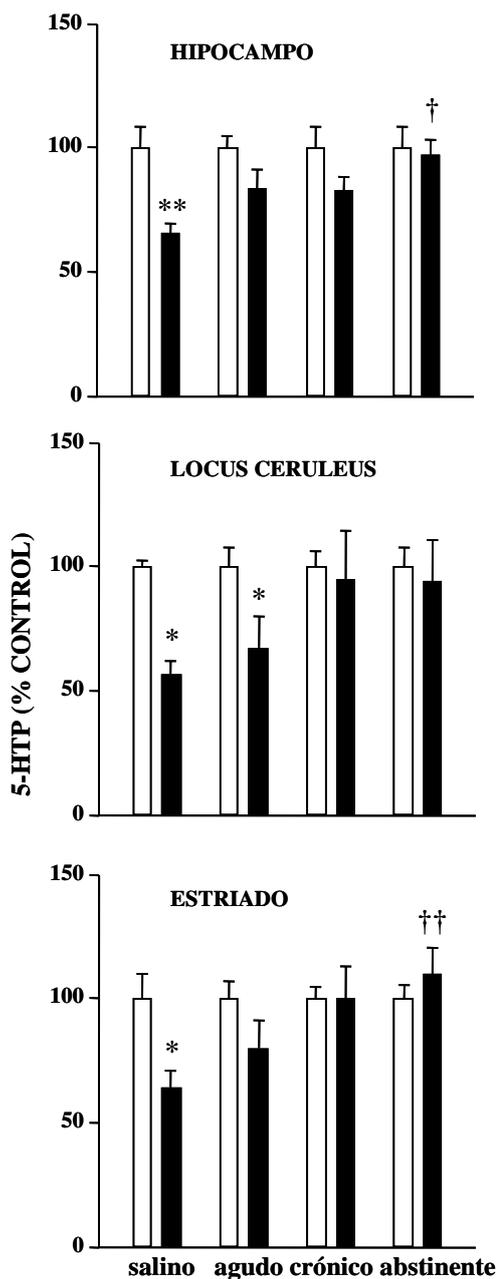


**Fig. 4.26** Efectos agudos del WIN 55,212-2 (WIN, 4 mg/kg, i.p., 1h) sobre la acumulación de DOPA en el hipocampo y el locus ceruleus (pequeña rodaja de tronco encefálico que lo contenía) de ratas tratadas con salino, etanol agudo (2 g/kg, i.p., 2h), etanol crónico (2 g/kg, i.p., 7 días y efecto a las 2 h) y ratas abstinente a etanol (24h después del tratamiento crónico con etanol). Las ratas recibieron una administración de vehículo (mezcla de Cremophor:etanol:agua; 1:1:18; barras blancas) o de WIN (barras oscuras) 30 min antes del NSD 1015 y fueron sacrificadas transcurridos otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 4-8 experimentos y expresados como porcentaje de su respectivo control (barras blancas). \* $P > 0,01$ ; \*\* $P > 0,001$  comparando con su correspondiente control (test t de Student a dos vías); † $P < 0,05$ ; †† $P < 0,001$  comparando con el correspondiente efecto agudo del WIN en el grupo salino (ANOVA seguido del test de Scheffé)



**Fig. 4.27** Efectos agudos del WIN 55,212-2 (WIN, 4 mg/kg, i.p., 1h) sobre la acumulación de DOPA en el estriado de ratas tratadas con salino, etanol agudo (2 g/kg, i.p., 2h), etanol crónico (2 g/kg, i.p., 7 días y efecto a las 2 h) y ratas abstinentes a etanol (24h después del tratamiento crónico con etanol). Las ratas recibieron una administración aguda de vehículo (mezcla de Cremophor:etanol:agua; 1:1:18; barras blancas) o de WIN (barras oscuras) 30 min antes del NSD 1015 y fueron sacrificadas transcurridos otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 4-8 experimentos y expresados como porcentaje de su respectivo control (barras blancas). \* $P > 0,001$  comparando con su correspondiente control (test t de Student a dos vías); † $P < 0,01$  comparando con el correspondiente efecto agudo del WIN en el grupo salino (ANOVA seguido del test de Scheffé)

Pero en el caso de ratas tratadas de forma crónica con etanol y más significativamente en ratas abstinentes, estos efectos del WIN 55,212-2 sobre la síntesis de las distintas monoaminas fue claramente reducido o incluso abolido (Fig. 4.26, Fig. 4.27 y Fig. 4.28).



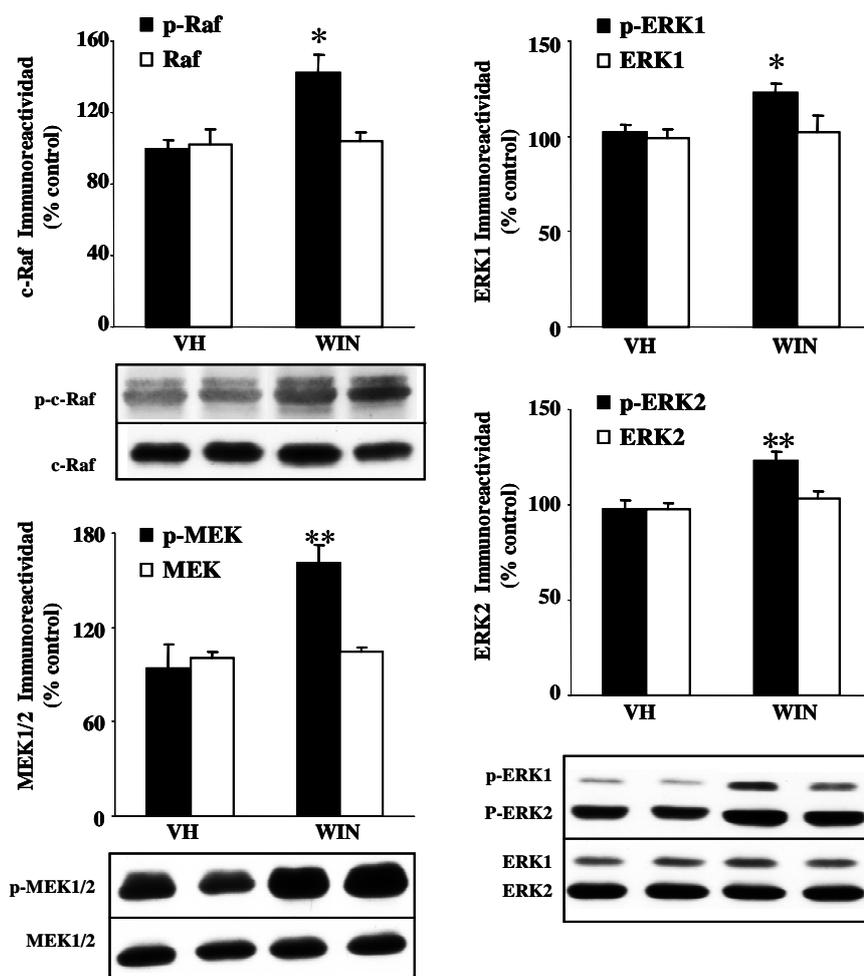
**Fig. 4.28** Efectos agudos del WIN 55,212-2 (WIN, 4 mg/kg, i.p., 1h) sobre la acumulación de 5-HTP en el hipocampo, el locus ceruleus (pequeña rodaja de tronco encefálico que lo contenía) y en el estriado de ratas tratadas con salino, etanol agudo (2 g/kg, i.p., 2h), etanol crónico (2 g/kg, i.p., 7 días y efecto a las 2 h) y ratas abstinente a etanol (24h después del tratamiento crónico con etanol). Las ratas recibieron una administración aguda de vehículo (mezcla de Cremophor:etanol:agua; 1:1:18; barras blancas) o de WIN (barras oscuras) 30 min antes del NSD 1015 y fueron sacrificadas transcurridos otros 30 min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 4-8 experimentos y expresados como porcentaje de su respectivo control (barras blancas). \*\* $P > 0,001$  comparando con su correspondiente control (test t de Student a dos vías); † $P < 0,01$ ; †† $P < 0,001$  comparando con el correspondiente efecto agudo del WIN en el grupo salino (ANOVA seguido del test de Scheffé)

#### **4.5 EFECTOS DE TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES Y ETANOL SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE QUINASAS MITOGÉNICAS (MAPK) DE LA SUBFAMILIA ERK**

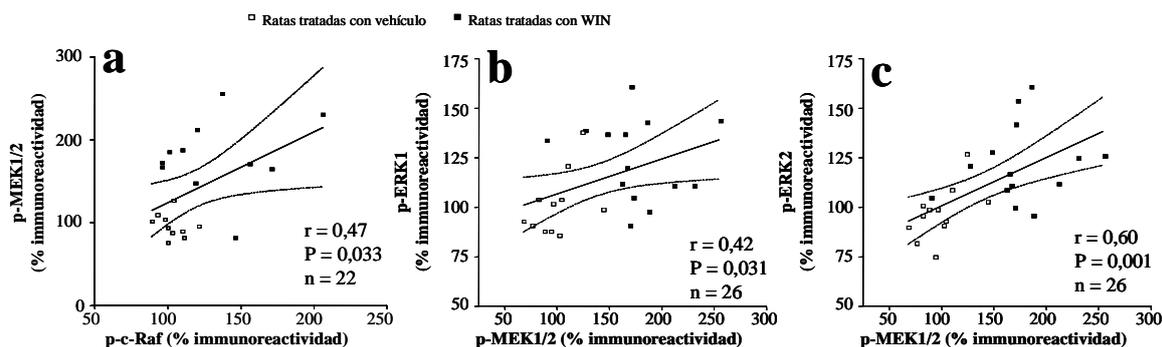
##### **4.5.1 Efecto de tratamientos con WIN 55,212-2 sobre la vía de señalización intracelular de ERK**

###### ***4.5.1.1 Efecto agudo del WIN 55,212-2 sobre los niveles de fosforilación de los distintos componentes de la cascada ERK (c-Raf, MEK1/2 y ERK1/2) a través del receptor CB<sub>1</sub>***

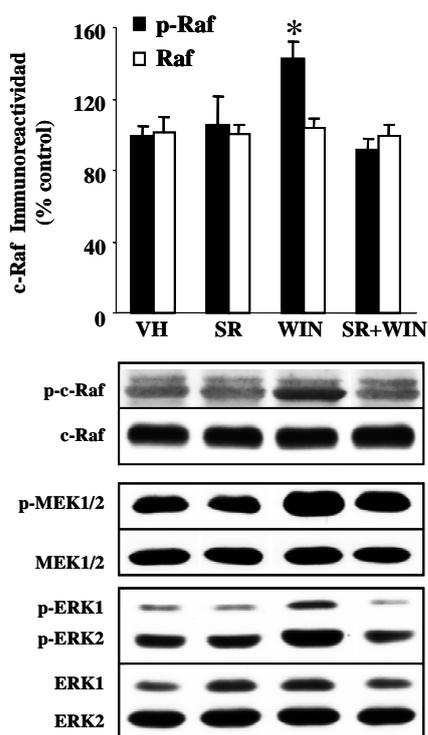
El tratamiento agudo con el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (8 mg/kg, i.p., 1h) produjo una activación significativa de los diferentes componentes de la cascada ERK. Incrementó la fosforilación de c-Raf (43%), MEK1/2 (67%), ERK1 (22%) y ERK2 (25%), sin ningún cambio significativo en la inmunoreactividad total de estas proteínas (Fig. 4.29). Además, se observaron correlaciones significativas entre los niveles de fosforilación de estas proteínas (Fig. 4.30). La administración del SR141716A solo, no produjo ningún efecto significativo sobre la activación de ninguna de las proteínas analizadas (Fig. 4.31). Sin embargo, la administración previa del antagonista del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> SR141716A (10 mg/kg, i.p., 1h 10 min) bloqueó la activación de los componentes de esta cascada de señalización ya en su primer componente, c-Raf 1 (Fig. 4.31).



**Fig. 4.29** Efecto del tratamiento agudo con WIN 55,212-2 (WIN; 8 mg/kg, i.p., 1h, n=14) sobre la inmunodensidad de los niveles totales (barras blancas) y fosforilados (barras negras) de las proteínas c-Raf, MEK1/2, ERK1 y ERK2, en la corteza frontal de rata. Los animales controles fueron tratados con el vehículo (1 ml/kg, i.p., 1h, n=12). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar y se expresan como porcentaje respecto a las ratas control tratadas con vehículo. Para el análisis estadístico se utilizó el test t de Student a dos vías (\* $P < 0,05$ , \*\* $P > 0,01$ ). En la parte inferior de cada gráfica se encuentra un inmunoblot representativo para el efecto del tratamiento con WIN (dos animales por grupo, 50  $\mu$ g de proteína cargada) sobre la inmunodensidad de cada proteína total (panel inferior) y fosforilada (panel superior) en la corteza frontal de rata (todas las muestras analizadas en un mismo gel)



**Fig. 4.30** Correlaciones entre los porcentajes de inmunoreactividad de los niveles fosforilados de c-Raf con MEK1/2 y MEK1/2 con ERK1 y ERK2 en la corteza frontal de ratas tratadas con vehículo o WIN 55,212-2. Las ecuaciones que describieron mejor estos datos fueron: (a)  $y = 39,39 + 0,85x$  ( $r=0,47$ ,  $n=22$ ,  $P=0,033$ ) (b)  $y = 89,33 + 0,177x$  ( $r=0,42$ ,  $n=26$ ,  $P=0,031$ ); (c)  $y = 76,66 + 0,243x$  ( $r=0,6$ ,  $n=26$ ,  $P=0,001$ )



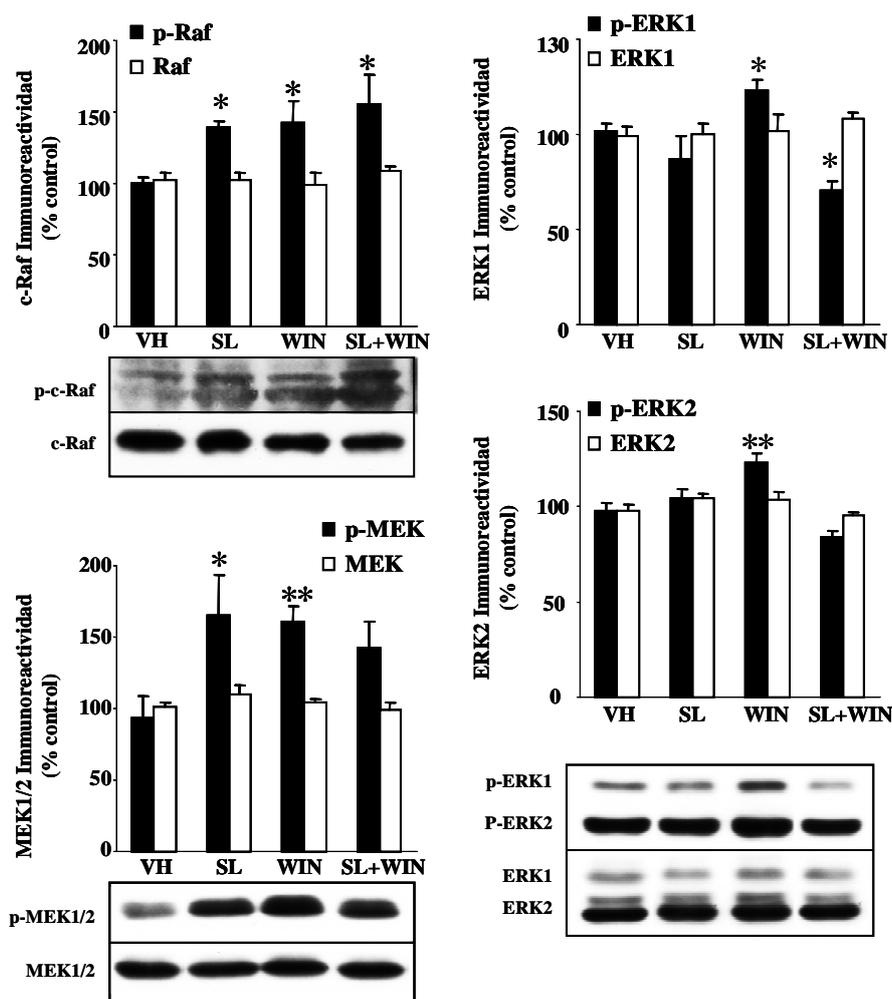
**Fig. 4.31** Efecto del antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, SR141716A (SR; 10 mg/kg, i.p., 1h 10 min), sobre los cambios inducidos por el WIN 55,212-2 (WIN; 8 mg/kg, i.p., 1h) en la inmunodensidad de los niveles totales (barras blancas) y fosforilados (barras negras) de las proteínas c-Raf, MEK1/2, ERK1 y ERK2, en la corteza frontal de rata. Las drogas fueron administradas solas o en combinación (el SR administrado 10 min antes que el WIN). Las ratas control recibieron (i.p.) 1 ml/kg de vehículo (VH). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 5-12 experimentos y se expresan como porcentaje respecto a las ratas controles tratadas con vehículo (VH). Se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por un test de Scheffé para el análisis estadístico. \* $P < 0,05$  comparando con las ratas tratadas con vehículo. En la parte inferior de cada gráfica se encuentra un inmunoblot representativo del efecto de los diferentes tratamientos (50  $\mu$ g de proteína cargada) sobre la inmunodensidad de cada proteína total (panel inferior) y fosforilada (panel superior) en la corteza frontal de rata (todas las muestras analizadas en un mismo gel)

#### ***4.5.1.2 Efecto agudo del pretratamiento con un inhibidor selectivo de MEK1/2 sobre el efecto agudo del WIN 55,212-2***

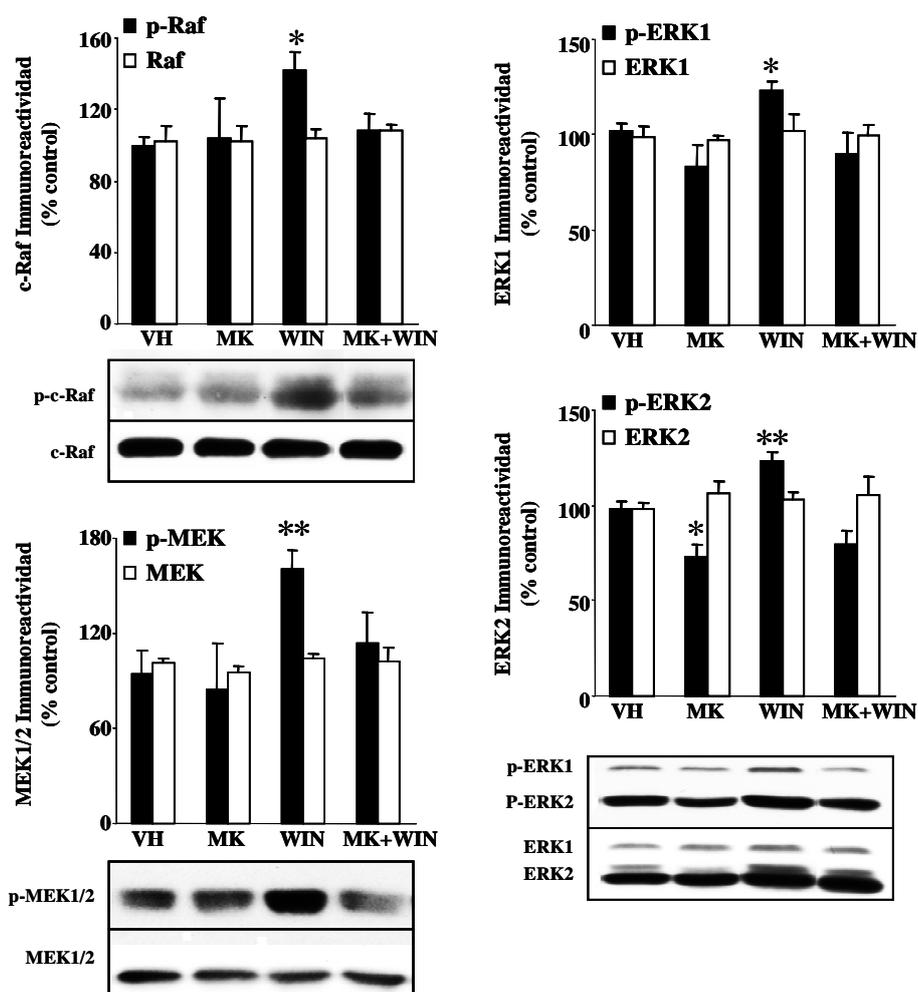
La activación de ERK1/2 provocada por el tratamiento agudo con WIN 55,212-2 (8 g/kg, i.p., 1h) fue mediada directamente por la activación de MEK1/2 (que también se observa tras el tratamiento agudo con WIN 55,212-2) ya que la administración previa del inhibidor selectivo de MEK1/2, SL327 (20 mg/kg, i.p., 1h 30 min), previno esta activación de ERK1/2 (Fig. 4.32). La administración de SL327 por si solo produjo una ligera disminución (aunque no significativa) de ERK1 fosforilado e incrementó los niveles fosforilados de c-Raf (40%) y MEK1/2 (48%) (Fig. 4.32).

#### ***4.5.1.3 Efecto agudo del pretratamiento con un antagonista selectivo de receptores para NMDA sobre el efecto agudo del WIN 55,212-2***

El pretratamiento con el antagonista selectivo del receptor NMDA, el MK801 (1 mg/kg, i.p., 1h 10 min) también antagonizó la activación de los distintos componentes de la cascada de la ERK producida por el tratamiento con WIN 55,212-2 en la corteza frontal de rata (Fig. 4.33), sugiriendo la mediación de la transmisión glutamatérgica en este efecto. El MK801 por si solo disminuyó ligeramente los niveles de ERK2 fosforilados sin alterar significativamente el resto de proteínas (Fig. 4.33).



**Fig. 4.32** Efecto del inhibidor selectivo de la MEK1/2, SL327 (SL; 20 mg/kg, i.p., 1h 30 min), sobre los cambios inducidos por el WIN 55,212-2 (WIN; 8 mg/kg, i.p., 1h) en la inmunodensidad de los niveles totales (barras blancas) y fosforilados (barras negras) de las proteínas c-Raf, MEK1/2, ERK1 y ERK2, en la corteza frontal de rata. Las drogas fueron administradas solas o en combinación (el SL administrado 30 min antes que el WIN). Las ratas control recibieron (i.p.) 1 ml/kg de vehículo (VH). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 5-12 experimentos y se expresan como porcentaje respecto a las ratas controles tratadas con vehículo (VH). Se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por un test de Scheffé para el análisis estadístico. \* $P < 0,05$  comparando con las ratas tratadas con vehículo. En la parte inferior de cada gráfica se encuentra un inmunoblot representativo del efecto de los diferentes tratamientos (50  $\mu$ g de proteína cargada) sobre la inmunodensidad de cada proteína total (panel inferior) y fosforilada (panel superior) en la corteza frontal de rata (todas las muestras analizadas en un mismo gel)

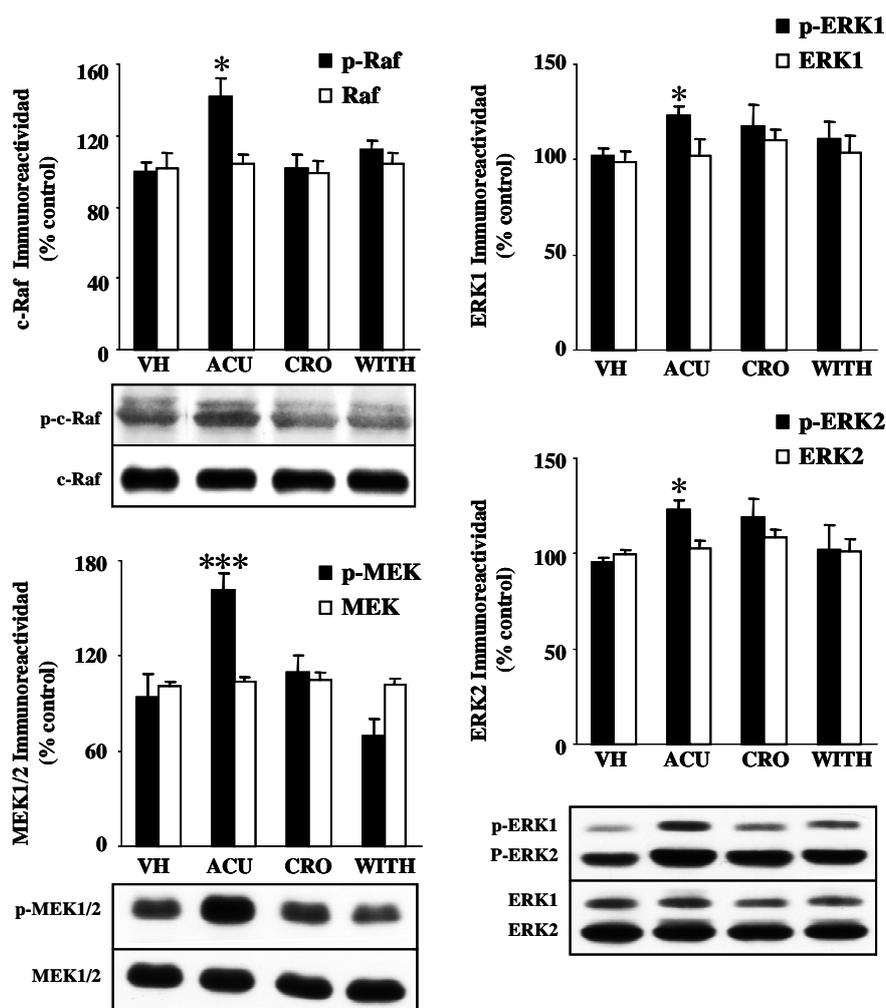


**Fig. 4.33** Efecto del antagonista selectivo del receptor NMDA, MK801 (MK; 1 mg/kg, i.p., 1h 10 min), sobre los cambios inducidos por el WIN 55,212-2 (WIN; 8 mg/kg, i.p., 1h) en la inmunodensidad de los niveles totales (barras blancas) y fosforilados (barras negras) de las proteínas c-Raf, MEK1/2, ERK1 y ERK2, en la corteza frontal de rata. Las drogas fueron administradas solas o en combinación (el MK administrado 10 min antes que el WIN). Las ratas control recibieron (i.p.) 1 ml/kg de vehículo (VH). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 5-12 experimentos y se expresan como porcentaje respecto a las ratas controles tratadas con vehículo (VH). Se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por un test de Scheffé para el análisis estadístico. \* $P < 0,05$  comparando con las ratas tratadas con vehículo. En la parte inferior de cada gráfica se encuentra un inmunoblot representativo del efecto de los diferentes tratamientos (50  $\mu$ g de proteína cargada) sobre la inmunodensidad de cada proteína total (panel inferior) y fosforilada (panel superior) en la corteza frontal de rata (todas las muestras analizadas en un mismo gel)

#### ***4.5.1.4 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la vía de señalización de ERK***

Como ya hemos visto anteriormente el tratamiento agudo con WIN 55,212-2 (8 mg/kg, i.p., 1 h) produjo una activación de los distintos componentes de la cascada de señalización de la ERK (c-Raf, MEK1/2 y ERK1/2) en la corteza frontal de rata. Después del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 (2-8 mg/kg, i.p., dos veces al día durante 5 días) se observó tolerancia a este efecto agudo del WIN 55,212-2 (Fig. 4.34).

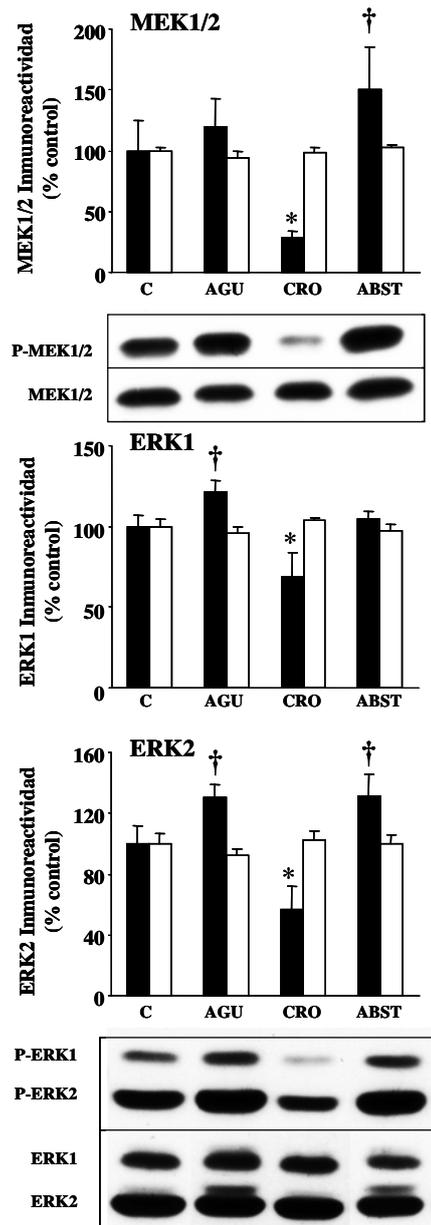
Por su parte, a pesar de que la administración del antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, el SR141716A (10 mg/kg, i.p., 1h) tras este tratamiento crónico con WIN 55,212-2 precipitó un prominente síndrome de abstinencia (Fig. 4.34), estas ratas abstinentes presentaron niveles basales de fosforilación de los distintos componentes de esta vía de señalización (Fig. 4.34).



**Fig. 4.34** Efecto de los tratamientos agudo y crónico con WIN55,212-2 y de la abstinencia precipitada por la administración del antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, el SR141716A, 4h después de la última dosis de WIN55,212-2 del tratamiento crónico, sobre la inmunodensidad de los niveles totales (barras blancas) y fosforilados (barras negras) de las proteínas c-Raf, MEK1/2, ERK1 y ERK2, en la corteza frontal de rata. Los animales control recibieron (i.p.) 1 ml/kg de vehículo (VH). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 5-12 experimentos y se expresan como porcentaje respecto a las ratas controles tratadas con vehículo (VH). Se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por un test de Scheffé para el análisis estadístico. \* $P < 0,05$  comparando con las ratas tratadas con vehículo. En la parte inferior de cada gráfica se encuentra un inmunoblot representativo del efecto de los diferentes tratamientos (50  $\mu$ g de proteína cargada) sobre la inmunodensidad de cada proteína total (panel inferior) y fosforilada (panel superior) en la corteza frontal de rata (todas las muestras analizadas en un mismo gel).

#### **4.5.2 Modulación de la vía de señalización intracelular de ERK por tratamientos agudos y crónicos con etanol**

Se analizó el efecto de los distintos tratamientos con etanol sobre el nivel de fosforilación de los componentes de la vía de señalización intracelular de ERK: MEK1/2 y ERK1/2. El tratamiento agudo con etanol (2 mg/kg, i.p., 1h) produjo una activación moderada (aunque en este caso no significativa) de alrededor de un 20% en estas proteínas analizadas (Fig. 4.35). Por el contrario, el tratamiento crónico con etanol redujo de forma marcada la activación de ambas proteínas, sobretodo MEK1/2 (70%) pero también ERK1 (31%) y ERK2 (43%) (Fig. 4.35). Por lo que respecta a la abstinencia, 24h después del tratamiento crónico con etanol provocó que los niveles fosforilados de las distintas proteínas analizadas volvieran a los valores controles aunque en el caso de MEK1/2 y ERK2 fosforilados presentaron valores ligeramente incrementados (aunque en este caso no significativos) respecto a los valores control (Fig. 4.35).



**Fig. 4.35** Efecto de los tratamientos agudo (2 mg/kg, i.p., 1h) y crónico con etanol (2 mg/kg, i.p., 2 veces al día durante 7 días, 1h) y de la abstinencia espontánea (24 h tras el tratamiento crónico con etanol), sobre la inmunodensidad de los niveles totales (barras blancas) y fosforilados (barras negras) de las proteínas MEK1/2, ERK1 y ERK2, en la corteza frontal de rata. Las ratas control recibieron (i.p.) 1 ml/kg de suero salino. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de 4-5 experimentos y se expresan como porcentaje respecto a las ratas controles. Se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por un test de Scheffé para el análisis estadístico. \* $P < 0,05$  comparando con las ratas control. † $P < 0,05$  comparado con el efecto del tratamiento crónico. En la parte inferior de cada gráfica se encuentra un inmunoblot representativo del efecto de los diferentes tratamientos (50  $\mu$ g de proteína cargada) sobre la inmunodensidad de cada proteína total (panel inferior) y fosforilada (panel superior) en la corteza frontal de rata (todas las muestras analizadas en un mismo gel).



# **DISCUSIÓN**



## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 EFECTOS CONDUCTUALES DE LOS TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES

#### 5.1.1 Efecto de los tratamientos agudos sobre la sensibilidad al dolor y la temperatura rectal

Como está ampliamente descrito, los resultados indican un efecto hipotérmico y analgésico tras la administración de agonistas cannabinoides (Pertwee, 1997; Ameri, 1999; Bobes y Calafat, 2000). Los resultados referentes a los efectos de los agonistas cannabinoides sobre la temperatura rectal ponen de manifiesto las diferencias en las propiedades farmacocinéticas de los dos compuestos agonistas, el THC y el WIN 55,212-2. A las 2 h de la administración del WIN 55,212-2 (4 mg/kg) ya no se observó ninguna diferencia significativa con el grupo de animales tratados con vehículo; su efecto máximo se observó a los 30 min y a partir de este momento el efecto fue disminuyendo. En cambio, en el caso del THC (5 mg/kg) los efectos fueron cada vez mayores y a las 2 h de su administración se obtuvo el efecto máximo observado. Los datos referentes al efecto analgésico también ponen de manifiesto algo similar ya que, a las 2 h el efecto sobre el tiempo de latencia de la dosis de THC 5 mg/kg fue superior (aunque de forma no significativa) al efecto del WIN 55,212-2 (4 mg/kg), a pesar de que a los 30 min la proporción de efectos fue al revés. Estas diferencias farmacocinéticas se ponen más de manifiesto al administrar una dosis baja (1 mg/kg) del antagonista selectivo para el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, el AM 281, 10 min antes que los agonistas. Tanto administrando el antagonista 10 min antes como 1 hora antes del WIN 55,212-2, no se antagonizó el efecto analgésico del agonista a los 30 min. En cambio se antagonizó casi completamente este efecto analgésico del WIN 55,212-2 a las 2 horas de su administración. Algo parecido se observó sobre el efecto hipotérmico del WIN 55,212-2. En cambio, esta dosis de AM 281 no consiguió antagonizar los efectos analgésicos e hipotérmicos del THC a ningún tiempo estudiado. Estos datos podrían estar indicando una menor vida media del WIN 55,212-2 respecto al THC.

Por otra parte, la dosis de AM 281 de 5 mg/kg sí que consiguió antagonizar completamente el efecto analgésico del THC (5 mg/kg) y parcialmente su efecto hipotérmico. Sin embargo, el SR141716A (5mg/kg) fue más efectivo antagonizando

ambos efectos. Además, la administración del antagonista selectivo AM 281 (5 mg/kg) 10 min antes del agonista WIN 55,212-2 (4 mg/kg) también antagonizó, aunque solo de forma parcial a los 30 min, sus efectos analgésico e hipotérmico. Estas diferencias entre los dos agonistas indican que realmente existen diferencias farmacológicas entre ellos pero además podrían apuntar a la existencia de otros subtipos de receptores para cannabinoides en el cerebro (además del CB<sub>1</sub>) responsables de parte de los efectos farmacológicos del WIN 55,212-2, como ya ha sido sugerido (Berrendero y cols., 1998a; Hajos y cols., 2001; Wiley y Martin, 2002), y que el antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> no es capaz de bloquear estos efectos realizados a través de otros tipos de receptor cannabinoide.

### **5.1.2 Efecto de los tratamientos agudos sobre la actividad locomotora espontánea**

La reducción de la actividad motora es un componente de la tétada de comportamientos usados en la evaluación inicial y para el establecimiento de un perfil cannabimimético general en roedores (Martin y cols., 1991). Aunque el principal efecto de los cannabinoides sobre la locomoción en roedores son hipoactividad y catalepsia (Compton y cols., 1992a; Compton y cols., 1992b; Compton y cols., 1993; Howlett, 1995; Compton y cols., 1996; Romero y cols., 1996; Pertwee, 1997; Rodriguez de Fonseca y cols., 1998; Ferrari y cols., 1999; Gifford y cols., 1999; Howlett y cols., 2002), se ha demostrado que estos compuestos tienen efectos bifásicos sobre la actividad motora que son dependientes del tiempo y la dosis (Sulcova y cols., 1998; Sanudo-Pena y cols., 1999; Sanudo-Pena y cols., 2000; Darmani, 2001). En el caso del THC se ha descrito un efecto trifásico, en el que disminuye la locomoción a dosis bajas (0,2 mg/kg) y aumenta a dosis más elevadas hasta que aparece la catalepsia (alrededor de 4-5 mg/kg), generalmente asociada a una reducción de la actividad locomotora (Prescott y cols., 1992; Sanudo-Pena y cols., 2000). También se ha descrito un efecto bifásico para la anandamida, con una estimulación de la actividad a dosis bajas e inhibición del movimiento a dosis más altas e incluso catalepsia (Sulcova y cols., 1998; Watanabe y cols., 1999). Hay que tener en cuenta que al parecer, la catalepsia que producen los cannabinoides parece ir acompañada de una hipersensibilidad a estímulos externos lo que puede enmascarar esta conducta cataléptica (Kawasaki y cols., 1980). Además, todos estos estudios comentados observan el efecto sobre la actividad locomotora durante un periodo de tiempo limitado tras la administración aguda del

cannabinoide (en general 1h como máximo) y no se han estudiado los efectos de compuestos cannabinoides sobre el ciclo circadiano.

Como podemos observar en el presente trabajo, la administración diurna de THC inicialmente produjo una reducción de la actividad locomotora espontánea si se compara con el resto de tratamientos. Lo que podría estar reflejando el efecto cataleptogénico de una dosis de THC de 5 mg/kg comentado anteriormente. Realmente lo que ocurre es que se reduce el aumento de actividad debido a la manipulación del animal, conocido como *handling* (sacar el animal de la jaula, pesarlo e inyectarle el fármaco), el cual es menor en el grupo de animales tratados con THC que en el resto de grupos experimentales. Este aumento de la actividad debido a la manipulación del animal es más importante cuando el tratamiento se realiza de día (durante el periodo de menor actividad de los animales) que cuando el tratamiento se hace de noche (periodo durante el que las ratas presentan mayor actividad). En cambio, sorprendentemente la mayor parte del tiempo de iluminación (día), el grupo de animales tratados con THC presentó una actividad locomotora aumentada respecto a los otros grupos, lo que puede estar indicando que estos animales descansaron menos o que durmieron peor, como podemos observar en los datos de eficiencia de sueño. De hecho, a los cannabinoides también se les ha asociado un efecto modulador sobre el sueño (Moreton y Davis, 1973; Freemon, 1982; Santucci y cols., 1996). En cambio, la noche siguiente al tratamiento diurno con THC, los animales presentaron una actividad locomotora reducida respecto al resto de grupos, sobretodo durante las primeras etapas de la noche.

Se han relacionado los efectos que producen los cannabinoides sobre la locomoción con la gran abundancia de receptores CB<sub>1</sub> en la zona de los ganglios basales y el cerebelo (Herkenham y cols., 1990; Matsuda y cols., 1990; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y cols., 1998). De esta forma, distintos estudios sugieren que los ganglios basales están involucrados en los efectos motores de los cannabinoides (Romero y cols., 1995a; Sanudo-Pena y cols., 1996; Miller y Walker, 1998; Sanudo-Pena y Walker, 1998; Sanudo-Pena y cols., 1999), al parecer a través del CB<sub>1</sub> (Rinaldi-Carmona y cols., 1994; Compton y cols., 1996), donde los cannabinoides modulan tanto la neurotransmisión inhibitoria (GABA) (Szabo y cols., 1998; Wallmichrath y Szabo, 2002a; Wallmichrath y Szabo, 2002b) y excitatoria (glutamato) (Gerdeman y Lovinger, 2001; Huang y cols., 2001). Lo que puede ser la base de la regulación dual del

movimiento (Sanudo-Pena y cols., 1996; Sanudo-Pena y Walker, 1998; van der Stelt y Di Marzo, 2003).

En general, parece como si el tratamiento agudo con THC provocase una alteración del ciclo circadiano, ya que estos animales presentaron más actividad en el periodo de menor actividad y menos actividad en su periodo de mayor actividad, lo que se refleja en la disminución de la amplitud de su ciclo circadiano. De esta forma, la onda que describe su ciclo no es tan marcada. Por otra parte, el mesor se redujo levemente indicando que, en proporción, disminuyó más la actividad en el periodo de mayor actividad respecto al aumento en el de menor actividad. Pero la frecuencia o el periodo del ciclo no fueron alterados significativamente aunque hay cierta tendencia a retrasarse ya que la acrofase, que en este caso es nuestro marcador de fase, aumentó ligeramente.

Por otra parte, el aumento de actividad locomotora comparado con el grupo control en las horas siguientes al tratamiento con el antagonista SR141716A (10 mg/kg) podría estar relacionado con el bloqueo de un tono cannabinoide endógeno o, en cambio, poner de manifiesto su actividad intrínseca como agonista inverso que ha sido bien caracterizado en muchos trabajos (Bouaboula y cols., 1997; Mato y cols., 2002). Este aumento se observa durante el tratamiento diurno y existe una tendencia durante el tratamiento nocturno. De hecho se ha descrito que el SR141716A provoca por si solo efectos sobre la actividad locomotora (Rinaldi-Carmona y cols., 1994; Compton y cols., 1996; Santucci y cols., 1996; Gallate y McGregor, 1999; Masserano y cols., 1999; Poncelet y cols., 1999; Darmani, 2001). En cambio, al cabo de algunas horas este grupo presentó una actividad locomotora parecida a la del grupo tratado con vehículo, incluso el día o la noche siguiente. Además, administrado 10 min antes de la inyección diurna de THC antagonizó sus efectos, tanto durante el día como durante la noche siguiente al tratamiento diurno; lo que indica que estos efectos del THC están mediados por el receptor CB<sub>1</sub>.

Por su parte, la administración nocturna de THC no tuvo efectos sobre el aumento de actividad provocado por la manipulación del animal (hay que tener en cuenta que durante la administración nocturna este efecto es proporcionalmente menor). Lo que sí se observó fue una reducción muy significativa de la actividad locomotora durante la noche sin efectos significativos durante el día siguiente a esta administración nocturna. En este caso, la dosis de 10 mg/kg de SR141716A administrado 10 min antes

que el agonista, no fue capaz de antagonizar esta reducción de la actividad locomotora provocada por el THC, por lo menos durante las primeras horas. En cambio con el transcurso del tiempo si que fue capaz de antagonizarla.

Podemos observar lo mismo si analizamos el efecto de los cannabinoides sobre distintos parámetros que describen el sueño de estos animales. Sobretudo un empeoramiento del sueño durante el día y un aumento de tiempo que estuvieron durmiendo y en inmovilidad durante la noche. De hecho, ya ha sido descrito una reducción del sueño de onda lenta en humanos (Freemon, 1982) o del REM en ratas (Moreton y Davis, 1973) por el tratamiento agudo con THC. En cambio, Nicholson y cols. (2004) no vieron ningún efecto significativo sobre el sueño nocturno en humanos por parte del THC administrado justo antes de entrar en esta fase, aunque al día siguiente sí que empeoró la memoria, produjo somnolencia y redujo el tiempo de latencia de sueño. Por el contrario, para la anandamida se ha descrito en ratas un aumento del sueño de onda lenta y del REM y una reducción de la vigilia, efectos mediados por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> (Murillo-Rodriguez y cols., 1998; Murillo-Rodriguez y cols., 2001a; Murillo-Rodriguez y cols., 2001b; Murillo-Rodriguez y cols., 2003). Además, en este trabajo el SR141716A solo antagonizó algunos de estos efectos. En este sentido se han descrito algunos efectos del SR141716A sobre el sueño pero se ha postulado que son debidos a la interferencia del sistema cannabinoide endógeno o a su actividad como agonista inverso. Se ha descrito un aumento de la vigilia por parte del SR141716A sin alterar la actividad motora (Santucci y cols., 1996) y la reversión de lo que se conoce como “rebote de sueño” después de la privación del sueño (Navarro y cols., 2003).

Estos resultados distintos obtenidos, en función de si la administración se realiza de día o de noche, podrían indicar la implicación de algún componente de los mecanismos reguladores de los ciclos circadianos y del sueño en los efectos producidos por el THC sobre la actividad locomotora. De hecho, se ha observado que el sueño altera los niveles del receptor CB<sub>1</sub>, observándose cambios cíclicos con máximo durante el día (sobre las 13:00) y mínimo durante la noche (sobre la 1:00) (Martinez-Vargas y cols., 2003). Por otra parte, la oleamida es un potente agente inductor de sueño y se ha postulado que ejerce estos efectos principalmente por un mecanismo cannabimimético a través del receptor CB<sub>1</sub> (Cheer y cols., 1999; Lambert y Di Marzo, 1999; Mendelson y Basile, 1999; Fedorova y cols., 2001; Mendelson y Basile, 2001). De hecho, la oleamida

también produce otros efectos cannabimiméticos como el empeoramiento de la memoria (Murillo-Rodríguez y cols., 2001b). Ciertos autores han apuntado a que estos efectos quizás son debidos al aumento de los niveles endógenos de anandamida que produce la oleamida por una inhibición del enzima encargado de su degradación, la FAAH (Mechoulam y cols., 1997; Bisogno y cols., 1998).

Por otra parte, los resultados también podría indicar la participación de mecanismos distintos para sus efectos sobre la actividad diurna o sobre la actividad nocturna, o mecanismos distintos para los efectos a corto plazo y a largo plazo. Además, algunos de estos mecanismos podrían ser independientes del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, ya que el SR141716A no es capaz de antagonizar todos los efectos.

### **5.1.3 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 sobre la actividad locomotora espontánea**

Durante el tratamiento crónico se realizaron 2 inyecciones diarias (i.p.) de WIN 55,212-2, una a las 8:00 y otra a las 20:00. La dosis de WIN 55,212-2 administrada fue aumentando progresivamente durante los 5 días que duró el tratamiento, realizándose finalmente tres administraciones de 2 mg/kg, tres de 4 mg/kg y tres de 8 mg/kg; registrándose la actividad locomotora espontánea las 24 h del día durante los cuatro primeros días de este tratamiento crónico.

Al contrario de lo observado durante el tratamiento agudo con THC, la administración de WIN 55,212-2 por la mañana no provocó una reducción del aumento de la actividad locomotora provocada por la manipulación del animal. Posiblemente debido a que la dosis inicial de WIN 55,212-2 utilizada fue demasiado baja para observar efectos significativos. De forma similar, Darmani (2001) no encontró efectos inhibitorios a dosis menores de 5 mg/kg de este agonista cannabinoide sobre la actividad locomotora espontánea en hurones (especie en la que el WIN 55,212-2 tiene una afinidad parecida por el CB<sub>1</sub> que en otras especies de roedores) y tampoco observó un efecto cataleptogénico del WIN 55,212-2 mientras sí que lo observó para el THC.

El resto del día el tratamiento con WIN 55,212-2 provocó un aumento de la actividad locomotora como ocurrió en el caso del THC. Y además, se observó un fenómeno de tolerancia a este efecto a medida que transcurría el tratamiento crónico. Este efecto de tolerancia provocado por el tratamiento crónico también se observa en la

disminución de la actividad locomotora durante las horas de oscuridad provocada por el tratamiento con WIN 55,212-2. Está ampliamente descrito tolerancia a los efectos de los cannabinoides sobre la actividad locomotora, aunque generalmente se trata de una tolerancia al efecto hipolocomotor de los cannabinoides registrado como máximo durante la hora siguiente a su administración (Oviedo y cols., 1993; Rodríguez de Fonseca y cols., 1994; Fan y cols., 1996; Rubino y cols., 1997; Hutcheson y cols., 1998; Castane y cols., 2003; Rubino y cols., 2004).

El tratamiento con WIN 55,212-2 también alteró el ciclo circadiano de los animales y en el mismo sentido que lo hizo el THC. Por una parte, redujo la amplitud de la onda que describe el ciclo circadiano de actividad-inactividad de estos animales. Es decir, redujo las diferencias entre el período de actividad y el de inactividad. Y el efecto fue ligeramente mayor en la reducción del movimiento durante el periodo de actividad (noche) ya que se redujo ligeramente el mesor. La mayor proporción de efecto se observó el segundo día y se produjo tolerancia a este efecto durante los días sucesivos del tratamiento crónico con WIN 55,212-2. Es decir, parece que se recupera el ciclo circadiano inicial de estos animales. Por otro lado, también se observa un ligero retraso de fase, ya que se retrasó ligeramente la aparición del momento de máxima actividad (acrofase). Efecto para el que no parece desarrollarse tolerancia.

Los datos analizados con el programa *Actiwatch Sleep Analysis* pusieron también de manifiesto que el tratamiento con WIN 55,212-2 alteró la calidad del sueño de estos animales, al igual que ocurría con el tratamiento agudo con THC. Durante la fase de sueño, disminuyó la eficiencia de este sueño, el tiempo que los animales permanecieron durmiendo y aumentó el número de despertares que sufrieron durante esta fase. Se empezó a observar un efecto significativo al segundo día de tratamiento y no se observó tolerancia a medida que transcurría el tratamiento crónico. En cambio, durante la noche del primer día de tratamiento aumentó la eficacia del sueño y el tiempo que pasaron los animales durmiendo y se observó una marcada tolerancia a medida que transcurría el tratamiento crónico. Estos datos también parecen indicar que existen distintos mecanismos por los que el WIN 55,212-2 ejerce sus efectos sobre el estado sueño-vigilia de estos animales, lo que podría explicar que se observe tolerancia a algunos efectos y a otros no.

#### 5.1.4 Síndrome de abstinencia precipitado por SR141716A tras tratamiento crónico con WIN 55,212-2

Los signos conductuales observados durante los 15 min anteriores a los distintos tratamientos agudos y crónicos (últimas administraciones o inyección del antagonista) no presentaron diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, podemos afirmar que después de 4 horas de la última administración de WIN 55,212-2 del tratamiento crónico, los animales no presentaron un síndrome de abstinencia espontáneo.

Además, los datos conductuales muestran que el esquema de tratamiento crónico utilizado en estos experimentos provoca el desarrollo de un fenómeno de tolerancia, al menos para el efecto hipotérmico e hipolocomotor (o de reducción del aumento de actividad provocado por el manejo del animal) del WIN 55,212-2, ya que tras la última administración de WIN 55,212-2 del tratamiento crónico los animales presentaron una actividad locomotora ligeramente aumentada.

Por otra parte, parece bastante claro que la administración del antagonista SR141716A 4 horas después de la última administración de WIN 55,212-2 del tratamiento crónico provocó la aparición de un síndrome de abstinencia característico, como se puede observar en la puntuación global que es significativamente superior comparando con el resto de grupos incluso durante los 15 primeros minutos de abstinencia (después de administrar el SR141716A). En cuanto a los signos que se observaron significativamente aumentados en el grupo abstinentes, fueron los eventos de *wet dog shakes*, de temblor de pata o *paw tremor*, de masticación, la aparición de ptosis y el temblor generalizado. Se observó que las ratas no padecieron ataxia, que es un signo presente de forma muy aparente en el síndrome de abstinencia a cannabinoides en ratones (Hutcheson y cols., 1998; Castane y cols., 2004).

Hay que tener en cuenta que la administración de SR141716A por si solo ya provoca la aparición de ciertos signos como ya ha sido descrito anteriormente (Sim-Selley y cols., 2001; Freedland y cols., 2003). En nuestro caso, el SR141716A provocó que los animales se rascasen de una forma un poco compulsiva y provocó un cierto temblor generalizado, un aumento de la masticación y del número de acicalamientos, que aunque fue significativamente diferente comparado con el grupo tratado únicamente

con vehículo, no fue tan importante como en el grupo abstinentes. Lo mismo ocurre con los signos que aparecen al administrar el SR141716A 4 horas después de una dosis aguda de WIN 55,212-2, pero en este caso la aparición de ciertos síntomas es más importante, lo que podría estar sugiriendo que tras este tratamiento agudo con WIN 55,212-2 ya se han empezado a poner en marcha ciertos mecanismos de adaptación.

## **5.2 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS**

### **5.2.1 Efecto de los tratamientos agudos con compuestos cannabinoides sobre la síntesis de monoaminas**

En este estudio se analizó simultáneamente los efectos directos o indirectos de los compuestos cannabinoides sobre la síntesis de dopa/noradrenalina, dopa/dopamina y 5-HTP/serotonina en distintas regiones del cerebro de rata ricas en noradrenalina y/o serotonina, como por ejemplo la corteza cerebral, el hipocampo y el hipotálamo, o ricas en dopamina como el cuerpo estriado. Los resultados indican que la administración aguda de agonistas del receptor cannabinoide, en este caso el THC y el WIN 55,212-2, inducen efectos diferenciales sobre la síntesis de estos tres neurotransmisores: un efecto estimulador sobre la síntesis de noradrenalina y efectos inhibitorios sobre la síntesis de dopamina y serotonina.

Además, existen evidencias que implican al receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> como mediador de estos efectos sobre la síntesis de monoaminas. Por una parte, este receptor es el único subtipo del receptor cannabinoide clonado hasta el momento presente en el Sistema Nervioso Central (Herkenham y cols., 1991b; Tsou y cols., 1998). Además, a pesar de que el THC ejerce algunos de sus efectos independientemente de los receptores para cannabinoides (Pertwee, 1997) y que se ha propuesto la existencia de otros subtipos de receptores para cannabinoides para explicar algunos efectos que produce el WIN 55,212-2 (Berrendero y cols., 1998a; Hajos y cols., 2001; Wiley y Martin, 2002), la administración previa de los antagonistas selectivos de este receptor CB<sub>1</sub>, el SR141716A o el AM 281, antagonizaron los efectos producidos por los agonistas sobre la síntesis de las distintas monoaminas, tanto los efectos estimuladores como los inhibitorios.

Los resultados muestran un claro efecto estimulador, mediado por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, por parte de los agonistas del receptor cannabinoide (THC y WIN 55,212-2) sobre la síntesis de dopa/noradrenalina *in vivo*. Asimismo, también indican que ambos agonistas reducen el contenido de noradrenalina en distintas regiones cerebrales. Además, en el hipotálamo (región donde se encuentra el mayor contenido en este neurotransmisor) se observa una correlación inversa y significativa entre la acumulación de dopa y el contenido en noradrenalina, que sugiere un aumento de la liberación de noradrenalina inducida por los agonistas cannabinoideos (Pi y Garcia-Sevilla, 1992). Sin embargo, es bien conocido que la activación del receptor CB<sub>1</sub> induce principalmente efectos inhibitorios sobre las neuronas donde se localiza (Schlicker y Kathmann, 2001). En este contexto, se ha descrito la existencia de marcadas diferencias regionales y entre especies en los efectos producidos por cannabinoideos. Así, la activación del receptor CB<sub>1</sub> por WIN 55,212-2 inhibió *in vitro* la liberación de noradrenalina en hipocampo humano y de cobaya (Schlicker y cols., 1997; Kathmann y cols., 1999). Mientras que otros estudios *in vitro* observaron que la liberación de noradrenalina en cortes hipocampales y corticales de rata y ratón no sufría alteraciones significativas por parte del WIN 55,212-2 o el CP-55,940 (otro agonista potente del receptor cannabinoide) (Gifford y cols., 1997; Schlicker y cols., 1997; Trendelenburg y cols., 2000). Al mismo tiempo, de acuerdo con los datos de nuestro estudio, se han observado aumentos *in vivo* en el recambio (*turnover*) de noradrenalina en hipotálamo y corteza cerebral de rata por tratamientos con agonistas cannabinoideos (Jentsch y cols., 1997). A pesar de que se han encontrado receptores CB<sub>1</sub> que inhiben la liberación de noradrenalina en axones noradrenérgicos que inervan el *vas deferens*, estos no se han encontrado en axones noradrenérgicos que inervan el atrio o el bazo, ni en axones noradrenérgicos que inervan la corteza parieto-occipital (Trendelenburg y cols., 2000). De forma similar, los resultados obtenidos en nuestro estudio no proporcionan ninguna evidencia funcional sobre la existencia de heterorreceptores CB<sub>1</sub> inhibitorios sobre las neuronas noradrenérgicas que modulen la síntesis de dopa/noradrenalina en el cerebro de rata.

A pesar de que existe cierta controversia concerniente al tipo de neuronas que expresan el receptor CB<sub>1</sub> en el cerebro de rata, la principal población neuronal donde se localiza este receptor son neuronas GABAérgicas. Se ha observado la localización de receptores CB<sub>1</sub> en neuronas GABAérgicas en el estriado (Hohmann y Herkenham,

2000), hipocampo (Katona y cols., 1999; Tsou y cols., 1999) y en corteza cerebral (Marsicano y Lutz, 1999). Además se ha demostrado una inhibición de la liberación de GABA mediada por receptores CB<sub>1</sub> mediante experimentos de perfusión (Katona y cols., 1999) y estudios electrofisiológicos (Szabo y cols., 1998; Hajos y cols., 2000). Por eso, y aunque no se puede descartar un efecto de facilitación por parte de los agonistas cannabinoides de los mecanismos excitatorios que ejercen sobre el locus ceruleus, como una facilitación de la excitación provocada a través de receptores para NMDA (Mendiguren y Pineda, 2004), y teniendo en cuenta que el locus ceruleus, principal núcleo noradrenérgico cerebral, está tónicamente inhibido por GABA (Kawahara y cols., 1999), se puede sugerir que el efecto estimulador observado por agonistas cannabinoides sobre la síntesis de noradrenalina resulta de un efecto indirecto mediado por GABA. De esta forma, la activación de receptores inhibitorios CB<sub>1</sub> localizados sobre neuronas GABAérgicas reduciría el efecto inhibitorio mediado por GABA sobre las neuronas noradrenérgicas del locus ceruleus. Al mismo tiempo, este efecto facilitador de los cannabinoides sobre el locus ceruleus también puede ser el responsable del aumento en la síntesis de noradrenalina observado en las áreas de proyección. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que interneuronas GABAérgicas en estas áreas de proyección (por ejemplo en corteza e hipocampo) también estén involucradas en los efectos inducidos por los fármacos cannabinoides sobre la síntesis de noradrenalina, ya que estas neuronas también expresan el receptor CB<sub>1</sub> (Katona y cols., 1999; Marsicano y Lutz, 1999; Tsou y cols., 1999).

En este estudio también se observa que la administración de THC y de WIN 55,212-2 induce efectos inhibitorios sobre la síntesis de dopa/dopamina en el estriado de rata. Este resultado está en concordancia con estudios previos en los que se describe una inhibición de la liberación de dopamina mediada por el receptor CB<sub>1</sub> en cortes estriatales de rata *in vitro* (Cadogan y cols., 1997; Kathmann y cols., 1999). Sin embargo, en otros estudios no se observan cambios en la liberación de dopamina, provocados por la administración de agonistas cannabinoides, en el estriado de rata *in vivo* (Castaneda y cols., 1991) ni en cortes estriatales o en el núcleo acumbens de rata *in vitro* (Szabo y cols., 1999). Por el contrario, otros estudios muestran efectos estimuladores sobre la liberación de dopamina provocados por la administración de agonistas cannabinoides *in vivo* tanto en el núcleo acumbens (Chen y cols., 1990; Tanda y cols., 1997) como en el estriado (Malone y Taylor, 1999). También se ha descrito que

los cannabinoides aumentan la actividad dopaminérgica en el área ventrotectal (Cheer y cols., 2003) y en la sustancia negra (Melis y cols., 2000) de ratas. Aunque el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> es abundante en el estriado de rata (Herkenham y cols., 1991b; Hohmann y Herkenham, 2000), múltiples evidencias indican que no se expresa en neuronas dopaminérgicas (Herkenham y cols., 1991a; Szabo y cols., 1999; Cheer y cols., 2000). Por tanto, los cannabinoides modulan la actividad dopaminérgica probablemente a través de aferencias excitatoria o inhibitorias. Distintos estudios han sugerido que los cannabinoides deprimen la inhibición GABAérgica que existe sobre las neuronas dopaminérgicas, lo que podría ser la base para los aumentos en la actividad dopaminérgica descritos por distintos autores (Manzoni y Bockaert, 2001; Szabo y cols., 2002). Sin embargo, otros autores han descrito que la activación de receptores CB<sub>1</sub> inhiben la transmisión excitatoria glutamatérgica y la liberación de glutamato en el estriado de rata (Gerdeman y Lovinger, 2001). Una inhibición de la liberación de glutamato provocada por cannabinoides también ha sido descrita en el cerebelo (Levenes y cols., 1998), hipocampo (Shen y cols., 1996; Misner y Sullivan, 1999; Sullivan, 1999) y en la sustancia gris periacueductal (Vaughan y cols., 2000) de ratas. A pesar de estos resultados parece que este receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> no se localiza sobre neuronas glutamatérgicas (Katona y cols., 1999; Marsicano y Lutz, 1999; Hajos y cols., 2000; Wiley y Martin, 2002; Bodor y cols., 2005) y estos efectos de los cannabinoides podrían estar mediados a través de un nuevo receptor cannabinoide que estaría localizado sobre estas neuronas glutamatérgicas (Hajos y cols., 2001; Hajos y Freund, 2002a; Hajos y Freund, 2002b; Ohno-Shosaku y cols., 2002a; Kofalvi y cols., 2003). Estos resultados podrían explicar los efectos inhibitorios observados en este estudio tras la administración de THC y WIN 55,212-2 sobre la síntesis de dopa/dopamina en el estriado de rata.

Finalmente, los resultados muestran además un efecto inhibitorio *in vivo* del THC y del WIN 55,212-2, mediado por el receptor CB<sub>1</sub>, sobre la síntesis de 5-HT en varias regiones del cerebro de rata. De acuerdo con nuestros datos, se ha descrito una inhibición de la liberación de serotonina inducida por agonistas cannabinoides en el área ventral del hipocampo de rata *in vivo* (Egashira y cols., 2002) y en cortes de corteza de ratón *in vitro* (Nakazi y cols., 2000). Además, el antagonista selectivo CB<sub>1</sub>, SR141716A, aumentó de forma moderada la liberación de serotonina en el área prefrontal de la corteza y en el núcleo acumbens (Tzavara y cols., 2003), aunque no lo

hizo en el hipocampo (Tzavara y cols., 2001), ni tampoco fue observado algo parecido en este estudio en las distintas regiones estudiadas. De esta forma, el efecto inhibitorio sobre la síntesis de serotonina en el cerebro de rata *in vivo* observado tras la administración aguda de compuestos cannabinoides parece ser debido a la activación de heterorreceptores CB<sub>1</sub> presinápticos localizados sobre terminales serotoninérgicos, como ha sido descrito en cerebro de ratón (Nakazi y cols., 2000).

### **5.2.2 Efecto de los tratamientos crónicos con compuestos cannabinoides sobre la síntesis de monoaminas en el cerebro de rata**

La administración del antagonista selectivo CB<sub>1</sub>, el SR141716A (10 mg/kg), no provocó cambios significativos sobre la síntesis de las distintas monoaminas en ninguna de las regiones estudiadas, de esta forma no se pusieron de manifiesto ni sus propiedades como agonista inverso caracterizadas en distintos trabajos (Bouaboula y cols., 1997; Mato y cols., 2002), ni la existencia de un tono cannabinoide endógeno basal. Por su parte, el hecho de que la administración de este antagonista 4 horas después de una dosis aguda de WIN 55,212-2 (8 mg/kg) antagonizara, en mayor o menor medida, los efectos producidos por el agonista sobre la síntesis de estas monoaminas cerebrales en las distintas regiones, pone de manifiesto que 4 horas después de la administración de esta dosis de WIN 55,212-2 aun existen niveles importantes de este agonista en el organismo y que está ejerciendo efectos a través de este receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>.

Se observó un efecto de tolerancia al efecto estimulador del WIN 55,212-2 sobre la síntesis de dopa/noradrenalina en el locus ceruleus, en la corteza cerebral y parcialmente en el hipocampo de ratas tras el tratamiento crónico. En cambio, no se observa tolerancia al efecto del WIN 55,212-2 sobre la síntesis de noradrenalina en el cerebelo o en el hipotálamo. Este efecto de tolerancia tras el tratamiento crónico también se observó para la inhibición de la síntesis de dopa/dopamina en el estriado, aunque en este caso la reducción de efecto no fue tan importante. Igualmente se observó una reducción sobre la síntesis de serotonina por WIN 55,212-2 tras su exposición crónica en todas las regiones estudiadas, en mayor o menor medida.

Estos resultados, en general, están en concordancia con trabajos publicados anteriormente donde se observa que el fenómeno de desensibilización del receptor

cannabinoide CB<sub>1</sub> tras tratamiento crónico con agonistas cannabinoides es dependiente de la región cerebral observada. En estos trabajos, la primera estructura cerebral donde aparece esta desensibilización y con la mayor proporción de efecto es el hipocampo; también aparece en estructuras como la corteza cerebral o el cerebelo; en cambio, al igual que en nuestro trabajo, el hipotálamo es una de las estructuras cerebrales más resistente a dicha desensibilización (Oviedo y cols., 1993; Rodriguez de Fonseca y cols., 1994; Romero y cols., 1995b; Fan y cols., 1996; Sim y cols., 1996; Romero y cols., 1997; Romero y cols., 1998; Rubino y cols., 1998; Rubino y cols., 2000c). En el hipocampo, cerebelo, corteza cerebral y estriado también se ha descrito una reducción de la activación por cannabinoides de proteínas G, así como aumentos en los niveles de AMPc y en la activación de la adenilato ciclasa, tras tratamiento crónico con agonistas cannabinoides (Sim y cols., 1996; Zhuang y cols., 1998; Rubino y cols., 2000c; Rubino y cols., 2000b; Rubino y cols., 2000d).

Los datos obtenidos indican además, que los fenómenos implicados en la tolerancia a los efectos farmacológicos de los cannabinoides son principalmente de tipo farmacodinámico ya que existen diferencias entre las distintas monoaminas, además de diferencias entre las distintas regiones cerebrales.

Por otra parte, aunque la administración de SR141716A tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 puso de manifiesto la existencia de un síndrome de abstinencia cannabinoide ostensible (ver discusión sobre los datos conductuales durante el síndrome de abstinencia), no se observan cambios importantes sobre la síntesis de monoaminas en ninguna región cerebral, lo que no pone de manifiesto cambios adaptativos importantes en los distintos sistemas monoaminérgicos. Los datos obtenidos en animales abstinentes pueden interpretarse como un efecto antagónico sobre el WIN 55,212-2 existente aun en el organismo proveniente de la última administración del tratamiento crónico. Estos resultados también podrían explicar la falta de signos vegetativos y autonómicos durante el síndrome de abstinencia a cannabinoides (Aceto y cols., 1996; Cook y cols., 1998; Hutcheson y cols., 1998; Tzavara y cols., 2000).

### **5.2.3 Modulación de la funcionalidad de los receptores presinápticos adrenérgico $\alpha_2$ y serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> tras tratamientos crónicos con el agonista cannabinoide WIN 55,212-2**

Como hemos observado la administración de compuestos cannabinoides modifican la síntesis monoaminérgica, además distintos trabajos ha descrito una modulación de la transmisión monoaminérgica por estos compuestos (Cadogan y cols., 1997; Schlicker y cols., 1997; Tanda y cols., 1997; Kathmann y cols., 1999; Malone y Taylor, 1999; Nakazi y cols., 2000; Trendelenburg y cols., 2000; Schlicker y Kathmann, 2001; Tzavara y cols., 2001; Egashira y cols., 2002; Cheer y cols., 2003; Tzavara y cols., 2003). En este trabajo, se ha descrito que los compuestos cannabinoides modulan de forma diferente la síntesis cerebral de los distintos neurotransmisores monoaminérgicos; lo que sugiere una diferente localización neuroanatómica del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> responsables de estos efectos. En este sentido, receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> sobre terminales GABAérgicos podrían ser los responsables del control positivo sobre la actividad tirosina hidroxilasa responsable de la síntesis de noradrenalina. Por otra parte, receptores CB<sub>1</sub> (u otro tipo de receptor para cannabinoides aun no identificado) localizados sobre neuronas serotoninérgicas y/o glutamatérgicas podrían ser responsables del control negativo sobre la síntesis de dopamina y serotonina. En este contexto, es posible que durante la administración crónica de agonistas cannabinoides se produzcan cambios en la sensibilidad de los receptores presinápticos involucrados en la modulación de la neurotransmisión, síntesis y liberación de monoaminas, lo que a su vez podría estar relacionado con el desarrollo de los fenómenos de tolerancia, dependencia y abstinencia a cannabinoides. Por ello, se analizó la funcionalidad de los auto/heterorreceptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> que modulan negativamente la síntesis de monoaminas durante el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y durante el síndrome de abstinencia precipitado por SR141716A en hipocampo, corteza parieto-occipital, cerebelo y estriado de rata; regiones cerebrales en las que el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> es abundante (Herkenham y cols., 1990; Matsuda y cols., 1990; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Pettit y cols., 1998; Tsou y cols., 1998) y donde además se encontraron cambios importantes en la síntesis de monoaminas en el presente trabajo.

Los resultados de este trabajo muestran, durante el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de forma más importante durante la abstinencia precipitada por SR141716A tras este tratamiento crónico, una desensibilización de los receptores (tanto auto- como heterorreceptores) adrenérgicos  $\alpha_2$  en todas las regiones cerebrales estudiadas y una supersensibilidad de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> en cerebelo y estriado, junto con una supersensibilidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en cerebelo, mostrando una modulación de estos sistemas durante este tratamiento crónico; lo que podría estar relacionado con el fenómeno de tolerancia y dependencia a cannabinoides. En cambio, los resultados no ofrecen ninguna evidencia de la participación de estos sistemas en la expresión del síndrome de abstinencia.

Las neuronas monoaminérgicas poseen adrenoceptores  $\alpha_2$  presinápticos que están involucrados en el control de la liberación y de la síntesis de sus neurotransmisores a través del control inhibitorio de la actividad de los enzimas tirosina y triptófano hidroxilasa (Anden y cols., 1976; Starke y cols., 1989; Pi y Garcia-Sevilla, 1992; Trendelenburg y cols., 1994a; Trendelenburg y cols., 1994b; Esteban y cols., 1996). Estudios funcionales indican que en el cerebro de varias especies de mamíferos, adrenoceptores  $\alpha_2$  modulan la liberación de noradrenalina y serotonina (Starke, 1987; Maura y cols., 1992; Tao y Hjorth, 1992; Trendelenburg y cols., 1994b; Kiss y cols., 1995) así como la de dopamina (Trendelenburg y cols., 1994a) y además modulan *in vivo* la síntesis de noradrenalina (Pi y Garcia-Sevilla, 1992), dopamina (Sastre Coll y cols., 1999) y serotonina (Esteban y cols., 1996). De hecho, existen evidencias sobre la existencia de adrenoceptores  $\alpha_2$  sobre terminales serotoninérgicos en el cerebro de mamíferos (Starke y cols., 1989; Raiteri y cols., 1990) y su activación por agonistas exógenos puede producir el mismo grado de inhibición de la liberación de serotonina que la ejercida por la activación de autorreceptores serotoninérgicos en cortes de cerebro (Blier y cols., 1990). Estos receptores son activados por la noradrenalina endógena que además ejerce un efecto tónico sobre la liberación y la síntesis de serotonina en algunas regiones cerebrales de rata (Raiteri y cols., 1990; Tao y Hjorth, 1992; Yoshioka y cols., 1992a; Yoshioka y cols., 1992b; Mongeau y cols., 1993).

Los resultados revelan una reducción en la capacidad de la clonidina para disminuir la síntesis de noradrenalina en hipocampo, corteza parieto-occipital y cerebelo, de dopamina en estriado y de serotonina en todas estas regiones cerebrales

estudiadas; lo que indica una desensibilización de los autorreceptores adrenérgicos  $\alpha_2$  que modulan la actividad tirosina hidroxilasa noradrenérgica y de heterorreceptores  $\alpha_2$  que modulan la actividad tirosina hidroxilasa dopaminérgica, además de los heterorreceptores  $\alpha_2$  que modulan la actividad triptófano hidroxilasa. Esta desensibilización observada de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  presinápticos durante el tratamiento crónico probablemente es debida al aumento en la disponibilidad de noradrenalina en la hendidura sináptica provocada por el tratamiento con WIN 55,212-2, a pesar de que se ha comprobado que se produce una marcada tolerancia a los efectos del WIN 55,212-2 sobre la síntesis de monoaminas, ya que el tratamiento administrado a los animales es a base de dosis crecientes con objeto de superar dicha tolerancia.

Por otra parte, la liberación de serotonina en los terminales nerviosos de rata está regulada principalmente por receptores presinápticos 5-HT<sub>1A</sub> somatodendríticos y 5-HT<sub>1B</sub> localizados en terminales. Distintas regiones que forman parte del sistema límbico se encuentran entre las que presentan niveles importantes de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, entre las que se incluyen el hipocampo, la corteza, núcleos del rafe, amígdala e hipotálamo (Hoyer y cols., 1986; Pazos y cols., 1987; Pompeiano y cols., 1992). Muchos de estos receptores son de localización somatodendrítica modulando la actividad de neuronas serotoninérgicas, como por ejemplo en los núcleos del rafe (Pazos y Palacios, 1985; Sotelo y cols., 1990; Artigas y cols., 1994; Jolas y cols., 1994; Le Poul y cols., 1995) que inervan una gran cantidad de regiones serotoninérgicas del sistema nervioso central (Azmitia y Segal, 1978; Imai y cols., 1986b; Imai y cols., 1986a; Jacobs y Azmitia, 1992). De esta forma la serotonina liberada en el soma neuronal (Adell y Artigas, 1991; Adell y cols., 1993; Casanovas y Artigas, 1996; Matos y cols., 1996) puede activar los autorreceptores somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub>; y se ha descrito que la activación de estos receptores provoca una reducción de la actividad eléctrica de neuronas serotoninérgicas y de la síntesis y liberación de serotonina en zonas terminales (Sprouse y Aghajanian, 1986; VanderMaelen y cols., 1986; Sprouse y Aghajanian, 1987; Hjorth y Magnusson, 1988; Sinton y Fallon, 1988; Auerbach y cols., 1989; Hutson y cols., 1989; Sharp y cols., 1989; Adell y Artigas, 1991; Invernizzi y cols., 1991; de Montigny y Blier, 1992; Adell y cols., 1993; Bosker y cols., 1994; Kreiss y Lucki, 1994; Casanovas y cols., 1997; Esteban y cols., 1999). Pero además, en estas regiones de proyección existen sitios de fijación tanto 5-HT<sub>1A</sub> como 5-HT<sub>1B</sub> (Verge y cols., 1986). De esta forma receptores 5-HT<sub>1A</sub> postsinápticos localizados en regiones terminales también modulan

la actividad de neuronas serotoninérgicas (Raap y cols., 1999; Martin-Ruiz y Ugedo, 2001; Gur y cols., 2002) y se ha postulado que además influyen en la liberación de serotonina a través de largos circuitos que pasan a través de los núcleos del rafe y en los que la corteza frontal interviene de alguna forma (Ceci y cols., 1994; Casanovas y cols., 1999; Hajos y cols., 1999). También se ha descrito que agonistas 5-HT<sub>1A</sub> modulan probablemente por un mecanismo postsináptico la liberación de dopamina en diferentes regiones cerebrales de rata (Millan, 2000; Bantick y cols., 2001; Ago y cols., 2003) y una inhibición de la síntesis de dopamina en el estriado (Johnson y cols., 1993). También se ha descrito que el sistema serotoninérgico modula la actividad de neuronas noradrenérgicas probablemente a través de receptores 5-HT<sub>1A</sub>. De hecho, la lesión en el sistema serotoninérgico producen un aumento de la actividad de neuronas noradrenérgicas (Hadjjeri y cols., 1997). Aunque al parecer, los agonistas 5-HT<sub>1A</sub> ejercen un efecto estimulador sobre la liberación de noradrenalina (Done y Sharp, 1994; Suzuki y cols., 1995; Hajos-Korcsok y Sharp, 1996) por un efecto directo sobre estas neuronas independientes de la transmisión serotoninérgica (Chen y Reith, 1995; Suzuki y cols., 1995; Hajos-Korcsok y cols., 1999).

Los resultados del presente trabajo muestran un aumento en la capacidad del 8-OH-DPAT para disminuir la síntesis de serotonina en cerebelo y estriado, de dopamina en estriado y de noradrenalina en cerebelo sin cambios en el hipocampo y la corteza parieto-occipital tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2; poniendo de manifiesto un aumento de la funcionalidad de los auto- y heterorreceptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> que modulan la actividad triptófano hidroxilasa y tirosina hidroxilasa en cerebelo y estriado. En este cambio de respuesta al 8-OH-DPAT podrían intervenir receptores presinápticos 5-HT<sub>1A</sub> somatodendríticos, de hecho estos receptores parece estar involucrados en determinados efectos de los cannabinoides como por ejemplo en la hipotermia inducida por el THC en ratas (Malone y Taylor, 2001), pero también podrían participar receptores postsinápticos en las regiones proyectantes lo que podría explicar las diferencias regionales observadas, incluso en el cerebelo donde aunque se ha descrito una baja presencia de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Hall y cols., 1997) la administración local de agonistas selectivos de estos receptores es capaz de reducir la liberación de serotonina (Mendlin y cols., 1996) aunque otros autores observaron la presencia de heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> pero no de autorreceptores (Raiteri y cols., 1986).

Además, como hemos comentado, en el cerebro de rata una gran cantidad de lugares de fijación 5-HT<sub>1</sub> son del tipo 5-HT<sub>1B</sub> con una alta densidad en zonas de los ganglios basales aunque también se encuentran de forma moderada en el hipocampo, corteza, estriado y cerebelo (Pazos y Palacios, 1985; Segu y cols., 1991; Boulenguez y cols., 1992; Palacios y cols., 1992; Sari, 2004). Se ha descrito que la activación de autorreceptores 5-HT<sub>1B</sub> localizados en los terminales de neuronas serotoninérgicas inhibe la liberación de esta serotonina (Sharp y cols., 1989; Middlemiss y Hutson, 1990; Auerbach y cols., 1991; Hjorth y Tao, 1991; Roberts y cols., 1997; Gaster y cols., 1998; Hertel y cols., 1999; Knobelmann y cols., 2000; Roberts y cols., 2000b) y también hay evidencias de su presencia en el rafe dorsal cuya activación disminuye la liberación local de serotonina (Starkey y Skingle, 1994; Davidson y Stamford, 1995; Pineyro y cols., 1995; Moret y Briley, 1997). Estos receptores 5-HT<sub>1B</sub> también ejercen como heterorreceptores inhibitorios localizados en terminales de otros tipos de neuronas (Boschert y cols., 1994; Saito y cols., 1996; Sari y cols., 1997; Barnes y Sharp, 1999; Riad y cols., 2000), tanto sobre neuronas noradrenérgicas (Gothert y cols., 1986; Hoyer y cols., 1994; Barnes y Sharp, 1999) como sobre neuronas dopaminérgicas (Hamon y cols., 1973; Boulenguez y cols., 1996; Sarhan y cols., 1999; Sarhan y Fillion, 1999; Sarhan y cols., 2000).

En nuestro trabajo, tras este tratamiento crónico, se observa un aumento en la capacidad del CP94253 para disminuir la síntesis de serotonina y noradrenalina en el cerebelo sin cambios significativos en el resto de regiones cerebrales estudiadas; mostrando un aumento de la sensibilidad de los auto- y probablemente heterorreceptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub> en el cerebelo. Como hemos comentado, este aumento en la sensibilidad de receptores serotoninérgicos se produce probablemente por la reducción del contenido de serotonina en el espacio sináptico provocada por el tratamiento con WIN 55,212-2.

El hecho de que en el sistema serotoninérgico cerebral no se produzca cambios de forma tan generalizada como en el caso del sistema adrenérgico puede ser debido a que los efectos observados en este estudio por parte del WIN 55,212-2 sobre el sistema serotoninérgico son más moderados. Estos resultados ponen de manifiesto además que el cerebelo es probablemente la estructura cerebral que sufre cambios más importantes durante la exposición crónica a cannabinoides y una de las principales estructuras implicadas en la expresión somática del síndrome de abstinencia a cannabinoides, como

han sugerido diversos autores (Hutcheson y cols., 1998; Rubino y cols., 2000d; Tzavara y cols., 2000; Castane y cols., 2004).

### **5.3 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON ETANOL SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS**

#### **5.3.1 Efectos de los tratamientos con etanol sobre la síntesis de monoaminas**

El tratamiento agudo con etanol provocó un aumento significativo en la síntesis de noradrenalina en el locus ceruleus, sin cambios significativos en el hipocampo y en la corteza parieto-occipital. En cambio distintos estudios han descrito una inhibición de la liberación (que podría ir acompañado de una inhibición de la síntesis) de noradrenalina estimulada principalmente por NMDA en la corteza de rata (Gothert y Fink, 1989; Fink y cols., 1992; Fink y Gothert, 1992). En cambio, Rossetti y cols. (1992) describieron un efecto bifásico del etanol sobre la liberación de noradrenalina en la corteza frontal, donde dosis bajas la estimulaban mientras que dosis más altas de etanol la inhibían. Además, también ha sido descrito un aumento del metabolismo de noradrenalina en distintas regiones cerebrales por el etanol (Shirao y cols., 1988) y aumento de la liberación de noradrenalina en sinaptosomas por parte del etanol (Ohlin y cols., 1987). De cualquier forma, la noradrenalina parece intervenir en algunos efectos agudos del etanol y principalmente en el inicio de la conducta de autoadministración de etanol, aunque al parecer no interviene en el mantenimiento de estas conductas (Mason y cols., 1979; Kiianmaa, 1980; Daoust y cols., 1987). En cambio parece bastante claro que tanto la exposición prolongada a etanol y como su abstinencia provoca un aumento en la liberación y el *turnover* de noradrenalina (Lynch y Littleton, 1985; Eisenhofer y cols., 1990).

Por su parte, la síntesis de dopamina (DOPA en el estriado) no fue modificada significativamente por ninguno de los tratamientos con etanol aunque igualmente se puede intuir una ligera tendencia a reducirla durante la abstinencia. La mayoría de trabajos han descrito un aumento del metabolismo de dopamina provocado por el tratamiento agudo con etanol descrito (Barbaccia y cols., 1982; Dar y Wooles, 1984; Fadda y cols., 1989), aunque otros no han descrito efectos sobre este metabolismo por el etanol (Budygin y cols., 2001). También se ha observado que la administración aguda de alcohol provoca la liberación de dopamina en el núcleo acumbens relacionándolo con

su poder adictivo (Brodie y cols., 1990; Rassnick y cols., 1992; Yoshimoto y cols., 1992a; Yoshimoto y cols., 1992b; Brodie y cols., 1999; Piepponen y cols., 2002) y en el estriado (Budygin y cols., 2001; Tang y cols., 2003). El consumo de alcohol también se ve reducido por fármacos que interfieren con el sistema dopaminérgico (Rassnick y cols., 1993b), postulándose la vía dopaminérgica mesolímbica como un importante sustrato en el desarrollo y mantenimiento del refuerzo a etanol (Gonzales y cols., 2004). También se ha descrito una disminución del metabolismo y la liberación de dopamina durante la abstinencia a etanol (Schmidt y cols., 1984; Eisenhofer y cols., 1990; Gil y cols., 1992), incluso en el área ventrotegmental (Shen, 2003), como ocurre con otras drogas de abuso.

En cuanto a la síntesis de serotonina, los resultados no muestran efectos consistentes tras el tratamiento agudo con etanol aunque se intuye una ligera tendencia a reducirla en el hipocampo y el estriado. Al parecer esta modulación de la transmisión serotoninérgica juega también un papel en la estimulación de la actividad dopaminérgica en el núcleo acumbens producida por el etanol (Campbell y McBride, 1995), y también podrían participar en la tolerancia, abstinencia y en la intoxicación por alcohol (Valenzuela, 1997). Así, se ha descrito que el etanol de forma dosis dependiente aumenta también la liberación de serotonina en el núcleo acumbens (Yoshimoto y cols., 1992a; Yoshimoto y cols., 1992b; Yan, 1999) y la ingesta de alcohol se ve reducida por drogas que interfieren con el sistema serotoninérgico central (Naranjo y cols., 1987; McBride y cols., 1991; Higgins y cols., 1992). Por el contrario, los datos mostrados en este trabajo muestran que el tratamiento crónico con etanol produce un marcado aumento de la síntesis de serotonina en el hipocampo y la corteza cerebral de ratas. Efecto consistente y duradero ya que se mantiene aún 24 h después del cese de este tratamiento. En el estriado aunque no se observan efectos significativos también se intuye una ligera tendencia a aumentar la síntesis de serotonina en las ratas abstinentes. De acuerdo con estos resultados ha sido descrito, en ratas abstinentes a etanol, una reducción del metabolismo de la serotonina en el hipocampo, corteza cerebral y en el estriado, probablemente como consecuencia de la reducción de la liberación y el metabolismo de serotonina durante la abstinencia a etanol (Weiss y cols., 1996; Woods y Druse, 1996).

### **5.3.2 Modulación de la funcionalidad de los receptores serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> tras la exposición crónica a etanol**

La funcionalidad o sensibilidad de los auto y heteroreceptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> se estudió mediante la administración aguda de una dosis baja del agonista de estos receptores, el 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg). Esta dosis no produjo ningún efecto significativo sobre la síntesis de serotonina en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas de ratas control tratadas con salino. De forma similar, la administración de este agonista tras el tratamiento agudo y crónico con etanol no alteró la acumulación de 5-HTP en la mayoría de regiones estudiadas, excepto en el estriado donde produjo una ligera disminución de la síntesis de serotonina. En cambio en ratas abstinentes, esta dosis de 8-OH-DPAT disminuyó de forma importante la síntesis de serotonina en el hipocampo, en la corteza parieto-occipital y en el estriado. Por su parte, la buspirona (1 mg/kg) produjo efectos idénticos a los observados para el 8-OH-DPAT sobre la síntesis de serotonina en los distintos grupos experimentales. Estos datos indican que el tratamiento crónico con etanol y más claramente la abstinencia espontánea a esta droga indujo una mayor sensibilidad del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> que modula la síntesis de serotonina en el cerebro de rata.

En cuanto a la síntesis de DOPA/dopamina en el estriado, no fue alterada por la administración de 8-OH-DPAT, a esta dosis mínima, administrado a ratas control, tratadas de forma aguda o crónica con etanol. Sin embargo, disminuyó de forma moderada la síntesis de dopamina en ratas abstinentes, lo que sugiere que durante la abstinencia a etanol también se produce un aumento de la funcionalidad del heterorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> que modula la síntesis de dopamina en el estriado de rata. De acuerdo con estos resultados, la abstinencia espontánea (en este caso 18h) tras el tratamiento crónico con etanol potenció distintos efectos conductuales inducidos por el 8-OH-DPAT en ratas (Kleven y cols., 1995). Un posible mecanismo molecular involucrado en el proceso de sensibilización de este receptor 5-HT<sub>1A</sub> durante la abstinencia a etanol podría ser un aumento del número de receptores. De esta forma, se ha descrito un aumento en la densidad de estos receptores en los núcleos dorsales del rafe tras tratamientos crónicos con etanol (Nevo y cols., 1995). Este aumento observado en la sensibilidad de los auto/heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> puede ser el resultado de la disminución de la disponibilidad de la serotonina endógena, como consecuencia de una marcada disminución de su liberación durante la abstinencia a etanol, lo que es

consistente con la descrita disminución de los niveles de 5-HIAA en el cerebro de rata (Weiss y cols., 1996). Los resultados sugieren un papel de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, tanto auto como heterorreceptores, en los mecanismos celulares involucrados en la dependencia y la abstinencia a alcohol que puede contribuir al mantenimiento de la conducta de ingesta de alcohol.

En cambio, debido a sus propiedades como antagonista D<sub>2</sub>, la buspirona produjo una marcada estimulación sobre la síntesis de DOPA/dopamina en el estriado. Efecto que no fue modificado de forma consistente por ninguno de los tratamientos con alcohol, sugiriendo que la funcionalidad de este autorreceptor dopaminérgico D<sub>2</sub> no se ve modificado por la dependencia a etanol y que los mecanismos de retroalimentación (modulación *feed-back*) se mantiene intactos en el estriado de rata.

#### **5.4 DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB<sub>1</sub> TRAS TRATAMIENTOS CON ETANOL**

Para analizar la modulación de la sensibilidad de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> en el cerebro de rata, se analizó el efecto agudo de una dosis de WIN 55,212-2 (4 mg/kg) sobre la síntesis de las distintas monoaminas en diferentes regiones cerebrales ricas en estas monoaminas, tras los distintos tratamientos con etanol comentados en otros apartados anteriores. Como hemos visto, el efecto agudo del WIN 55,212-2 sobre la síntesis de las distintas monoaminas fue estimuladorio para la síntesis de noradrenalina e inhibitorio sobre la de dopamina y serotonina. Además, estos efectos fueron mediados por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. En esta línea, analizamos la posible modificación de este efecto del WIN 55,212-2 por tratamientos con etanol en el hipocampo, región muy rica en terminales noradrenérgicos y sertonérgicos y donde el receptor CB<sub>1</sub> es además muy abundante (Herkenham y cols., 1990; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y cols., 1998), el locus ceruleus que aunque no se trata de una de las regiones más abundantes en CB<sub>1</sub>, fue la región en la que se observó un efecto estimuladorio sobre la síntesis de noradrenalina más importante, y en el estriado, región muy rica en terminales dopaminérgicos y en receptores CB<sub>1</sub> (Herkenham y cols., 1990; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y cols., 1998).

Como puede verse, en la mayoría de casos, el efecto agudo del WIN 55,212-2 para las distintas monoaminas ya fue modificado en mayor o menor medida por el

tratamiento agudo con etanol en las distintas regiones estudiadas. Esto podría ser debido a una alteración de la respuesta a través del receptor cannabinoides CB<sub>1</sub> por una acción directa del etanol o de forma más probable a una interacción entre los mecanismos desencadenados por ambas drogas y que finalmente se traducen en los efectos observados. Así, por ejemplo, el sistema cerebral que se ha postulado como principal responsable de muchos de los efectos agudos de los cannabinoides es el sistema GABAérgico (Tsou y cols., 1998; Katona y cols., 1999; Tsou y cols., 1999) y en concreto debido a una reducción en la transmisión GABA (Katona y cols., 1999; Hajos y cols., 2000). Por su parte, una de las distintas dianas para los efectos centrales del etanol es el receptor GABA<sub>A</sub> a través de una interacción directa del etanol con este receptor provocando una facilitación de su respuesta tanto por GABA como por otros agonistas como barbitúricos o benzodiazepinas (Grobin y cols., 1998; Aguayo y cols., 2002), lo que podría estar contrarrestando los efectos del WIN 55,212-2.

Por su parte, este efecto agudo del WIN 55,212-2 fue claramente reducido o incluso abolido en algunos casos por el tratamiento crónico con etanol. Pero fue completamente abolido durante la abstinencia espontánea a alcohol en todas las regiones cerebrales estudiada. Estos resultados indican que el tratamiento crónico con etanol seguido de un periodo de abstinencia, induce una disminución de la respuesta a agonistas cannabinoides mediada por el receptor CB<sub>1</sub> lo que sugiere una disminución de la sensibilidad de estos receptores que modulan la síntesis de noradrenalina, dopamina y serotonina en el cerebro de rata. En este caso los niveles de etanol en el organismo deben ser prácticamente inexistentes por lo que no se trata de una modulación directa de la respuesta del WIN 55,212-2, sino que debe ser causado por una disminución de la respuesta al WIN 55,212-2 seguramente por una desensibilización del CB<sub>1</sub>. Un posible mecanismo involucrado en este proceso de desensibilización podría estar relacionado con una disminución del número de receptores CB<sub>1</sub> como ha sido descrito, así como una disminución en la activación de vías de señalización activadas por cannabinoides, tras la exposición crónica a alcohol (Basavarajappa y cols., 1998; Basavarajappa y Hungund, 1999a; Wang y cols., 2003). También ha sido descrito la disminución de la expresión del gen que codifica este receptor CB<sub>1</sub> en diferentes regiones cerebrales de rata provocado por la ingesta de etanol (Ortiz y cols., 2004; Cippitelli y cols., 2005). Esta disminución de receptores CB<sub>1</sub> puede ser el resultado de cambios en la disponibilidad de los endocannabinoides provocada por el etanol. De esta forma, se ha descrito que el

etanol aumenta los niveles de los dos principales ligandos endógenos de los receptores cannabinoides, la anandamida y el 2-araquidonil glicerol (Basavarajappa y Hungund, 1999b; Gonzalez y cols., 2004b) lo que parece ser consecuencia de una inhibición del transportador de endocannabinoides (Basavarajappa y cols., 2003). Los resultados apoyan la idea de un papel importante del receptor CB<sub>1</sub> en los mecanismos involucrados en la dependencia y abstinencia a etanol. Además, apoyan la idea de que algunos efectos del etanol pueden estar mediados por el sistema cannabinoide endógeno (Hungund y cols., 2003).

## **5.5 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS CANNABINOIDES Y ETANOL SOBRE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN DE ERK**

### **5.5.1 Efecto del tratamiento agudo con WIN 55,212-2 sobre la vía de señalización de quinasas mitogénicas (MAPK) de la subfamilia de ERK**

En general, los resultados obtenidos para la modulación de los distintos componentes de la cascada de ERK en la corteza frontal de rata por el agonista selectivo de los receptores cannabinoides WIN 55,212-2, están de acuerdo con los distintos trabajos que describen la activación de la proteína ERK por cannabinoides en cultivos celulares no neuronales (Bouaboula y cols., 1995b; Bouaboula y cols., 1999; Roche y cols., 1999; Galve-Roperh y cols., 2000; Sanchez y cols., 2001; Galve-Roperh y cols., 2002; Sanchez y cols., 2003), en cultivos de neuroblastoma (Davis 2003) y en los estudios *in vivo* que utilizan el THC (Valjent y cols., 2001; Barbara y cols., 2003; Derkinderen y cols., 2003; Rubino y cols., 2004; Valjent y cols., 2004). Sin embargo, en nuestro estudio hemos comprobado la activación de todos los componentes de esta cascada de ERK (c-Raf, MEK1/2 y ERK1/2) a través del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en la corteza frontal de rata *in vivo*. La corteza frontal es una región que participa en las acciones que se producen por el abuso de drogas (Koob y cols., 1998) donde los cannabinoides además producen diferentes efectos (Auclair y cols., 2000; Ferraro y cols., 2001; Barbara y cols., 2003; Tzavara y cols., 2003; Verrico y cols., 2003). Se ha involucrado esta vía de señalización de la familia de las quinasas mitogénicas (MAPK) en la plasticidad sináptica y en los cambios adaptativos que son la base de los cambios a largo plazo debidos al abuso de drogas (English y Sweatt, 1997; Davis y cols., 2000; Valjent y cols., 2004).

El tratamiento agudo con WIN 55,212-2 aumentó la fosforilación de c-Raf, MEK1/2 y ERK1/2 en los residuos responsables de su activación (Payne y cols., 1991; Alessi y cols., 1994; Mason y cols., 1999), con una mayor proporción de efecto en la activación de MEK1/2. Además, se observaron correlaciones positivas y significativas entre los niveles fosforilados de las distintas proteínas, mostrando una activación secuencial de esta cascada de señalización.

La activación de ERK por THC a través del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> ya ha sido descrito anteriormente en distintas regiones cerebrales (Derkinderen y cols., 2001; Valjent y cols., 2001; Rubino y cols., 2004; Valjent y cols., 2004), incluso en la corteza prefrontal (Barbara y cols., 2003). En nuestro trabajo, la activación de la cascada de señalización de la ERK por el WIN 55,212-2 fue mediada por el receptor CB<sub>1</sub> ya en el primer paso de la vía, ya que la administración previa del antagonista selectivo del receptor CB<sub>1</sub>, el SR141716A, bloqueó la activación de c-Raf producida por WIN 55,212-2.

Además, la activación observada de ERK1/2 provocada por el tratamiento con WIN 55,212-2 fue debida a la activación de MEK1/2 ya que la administración previa del inhibidor selectivo de la MEK1/2, el SL327, previno esta activación de ERK1/2. Por su parte, la administración del SL327 solo causó una activación significativa de c-Raf y MEK1/2, lo que puede relacionarse con una retroregulación (o regulación *feed-back*) sobre la actividad quinasa de las proteínas c-Raf y MEK1/2. De acuerdo con estos resultados, se ha descrito que ERK regula de forma negativa la actividad de c-Raf por fosforilación en residuos específicos que inhiben su interacción con Ras (proteína G de bajo peso molecular que puede activar c-Raf) (Dougherty y cols., 2005).

Asimismo, la activación de esta cascada por WIN 55,212-2 también fue bloqueada por la administración previa del antagonista selectivo del receptor NMDA, el MK801, apuntando a la mediación de la transmisión glutamatérgica en esta activación de la cascada de ERK por el WIN 55,212-2. De la misma forma, los trabajos previos también sugirieron que la activación provocada por el THC sobre la proteína ERK *in vivo*, fue totalmente o parcialmente mediada por la transmisión glutamatérgica en el estriado (Valjent y cols., 2001), el hipocampo (Derkinderen y cols., 2003) y la corteza frontal (Barbara y cols., 2003). De esta forma, la activación de la vía de señalización de ERK observada después de los tratamientos con cannabinoides podría ser debida a un

aumento en la liberación de glutamato y la consiguiente activación de los receptores NMDA. De esta forma, se ha asociado la activación de estos receptores NMDA con el aumento de la actividad de ERK en neuronas a través de la proteína Ras y la consiguiente activación de c-Raf (Chandler y cols., 2001; Thiels y cols., 2002; Krapivinsky y cols., 2003; Crossthwaite y cols., 2004). Sin embargo, aunque se ha descrito una modulación de la liberación de glutamato por cannabinoides en distintas regiones cerebrales (Shen y cols., 1996; Levenes y cols., 1998; Misner y Sullivan, 1999; Sullivan, 1999; Vaughan y cols., 2000; Gerdeman y Lovinger, 2001), las neuronas glutamatérgicas no parecen expresar el receptor CB<sub>1</sub> (Katona y cols., 1999; Marsicano y Lutz, 1999; Hajos y cols., 2000; Bodor y cols., 2005) con lo que el efecto de los cannabinoides sobre este tipo celular podría ser indirecto. Aunque últimamente están surgiendo evidencias a favor de la existencia de un nuevo receptor cannabinoide aun no clonado para explicar algunos efectos contradictorios de ciertos agonistas cannabinoides, sobre todo la anandamida y el WIN 55,212-2 (Wiley y Martin, 2002), y que podría estar localizado sobre neuronas glutamatérgicas (Hajos y cols., 2001; Hajos y Freund, 2002a; Hajos y Freund, 2002b; Kofalvi y cols., 2003).

Los resultados del presente trabajo también sugieren una cierta activación basal de ERK por parte de esta transmisión glutamatérgica pues la administración del MK801 por si solo, disminuyó ligeramente sus niveles de fosforilación. Este efecto ya se había observado anteriormente en otros trabajos donde, por ejemplo, la administración de MK801 también disminuyó la fosforilación de ERK en la corteza cerebral de ratón (Kalluri y Ticku, 2002a).

### **5.5.2 Efecto del tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de la abstinencia provocada por SR141716A sobre la vía de señalización de quinasas mitogénicas (MAPK) de la subfamilia de ERK**

Como hemos visto, el tratamiento agudo con WIN 55,212-2 (8 mg/kg) activó los distintos componentes de la cascada de señalización de la ERK (c-Raf, MEK1/2 y ERK1/2) a través del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> y de forma dependiente de la transmisión glutamatérgica. Tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2, así como en la abstinencia provocada por la administración del antagonista selectivo del receptor CB<sub>1</sub>, el SR141716A, tras esta administración crónica, se observó tolerancia a este efecto agudo del WIN 55,212-2 sobre los distintos componentes de la cascada. El único

estudio *in vivo* que hasta el momento también ha estudiado la modulación de ERK por el tratamiento crónico con cannabinoides observó tolerancia al efecto estimulador del THC sobre la fosforilación de la proteína ERK en el estriado y en el cerebelo (Rubino y cols., 2004). También describió la activación de ERK en el hipocampo y la inducción de genes de expresión temprana (*immediate early genes*), que son promovidos por la activación de ERK, en la corteza frontal tras la administración crónica de THC (Rubino y cols., 2004). Como hemos visto, está ampliamente descrito el desarrollo de tolerancia a los diferentes efectos farmacológicos de los cannabinoides, así como una disminución del número de receptores CB<sub>1</sub> (Oviedo y cols., 1993; Rodríguez de Fonseca y cols., 1994; Romero y cols., 1995b; Fan y cols., 1996; Sim y cols., 1996; Romero y cols., 1997; Romero y cols., 1998; Rubino y cols., 1998; Rubino y cols., 2000c) y de su funcionalidad (Sim y cols., 1996; Zhuang y cols., 1998; Rubino y cols., 2000c; Rubino y cols., 2000b; Rubino y cols., 2000d), tras la exposición crónica a cannabinoides.

Aunque el análisis conductual mostró que la administración de antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, el SR141716A, después del tratamiento crónico precipitara un ostensible síndrome de abstinencia, no se observaron efectos significativos sobre la cascada de la ERK en la corteza frontal de estos animales. Estos resultados no proporcionan ninguna evidencia que sugieran la implicación de esta vía de señalización en la corteza frontal de rata en la expresión del síndrome de abstinencia a cannabinoides. De acuerdo con esto, se ha descrito que las principales estructuras cerebrales implicadas en la expresión somática del síndrome de abstinencia a cannabinoides son principalmente el cerebelo y la amígdala (Hutcheson y cols., 1998; Rubino y cols., 2000c; Ghozland y cols., 2002; Castane y cols., 2004).

### **5.5.3 Modulación de la vía de señalización de las MAPK por tratamientos agudo y crónico con etanol**

Como hemos comentado anteriormente la vía de señalización de ERK está involucrada en procesos de plasticidad sináptica (English y Sweatt, 1997; Davis y cols., 2000; Valjent y cols., 2004) y se relaciona con fenómenos adaptativos que ocurren durante el abuso de drogas (Koob y cols., 1998). El tratamiento agudo con etanol (2 mg/kg) produjo un ligero aumento (aunque no significativo) en los niveles de fosforilación de MEK1/2 y ERK1/2 en la corteza frontal de rata *in vivo*. En cambio, en la corteza de ratón el etanol (i.p.) produjo, a los 10 min de su administración y de forma

dependiente de dosis (1,5-3,5 mg/kg), una marcada disminución en la fosforilación de ERK (Kalluri y Ticku, 2002a), alcanzando la máxima proporción de efecto a la hora y volviendo a valores control a los 90 min (Kalluri y Ticku, 2002a). En cambio, en estudios *in vitro* con distintos tipos de cultivos celulares se ha descrito tanto inhibición (Hendrickson y cols., 1998; Davis y cols., 1999; Kalluri y Ticku, 2002a; Kalluri y Ticku, 2002b) como activación (Chen y cols., 1998; Weng y Shukla, 2000) de ERK por la exposición a etanol.

En cuanto al tratamiento crónico con etanol los datos presentados en este trabajo muestran una marcada reducción de la fosforilación de ERK1/2 y MEK1/2. Por su parte, 24 horas después de interrumpir este tratamiento crónico (abstinencia espontánea) los niveles de proteína fosforilada para MEK1/2 y ERK1/2 volvieron a valores cercanos al control o incluso presentaron una ligera activación respecto a los que presentaron estos animales control tratados con salino. De acuerdo con esto, distintos trabajos *in vivo* previos, muestran una marcada disminución de los niveles de la proteína ERK fosforilada en distintas regiones cerebrales de rata, entre ellas la corteza frontal, tras la exposición crónica a etanol durante 12 días (administrado por vía inhalatoria mediante una cámara de vapor) y aumentó sus niveles en la mayoría de estas regiones durante la abstinencia a etanol aunque a las 24 h los animales presentaron valores basales en la mayoría de regiones cerebrales (Sanna y cols., 2002). El tratamiento crónico intermitente también inhibió ERK en el hipocampo de rata aunque en este caso fue un efecto más duradero y permaneció reducido algunos días después de interrumpir el tratamiento (Roberto y cols., 2003), relacionándolo con la alteración de la plasticidad sináptica que produce el etanol en esta región (Roberto y cols., 2002).

Este efecto del etanol sobre la vía de señalización de las ERK-MAPK podría estar mediado por los efectos que ejerce el etanol sobre distintos tipos de receptores. Los receptores principales diana para los efectos centrales del etanol son receptores GABA<sub>A</sub>, receptores para glutamato tipo NMDA o canales de calcio dependientes de voltaje. Se postula estos dos últimos sistemas como los más probables para explicar los efectos del etanol sobre esta vía de señalización. De hecho, la entrada de Ca<sup>2+</sup> ya sea a través de canales de calcio dependientes de voltaje (Rosen y cols., 1994) o receptores para glutamato (Sala y cols., 2000) conlleva a la activación de la cascada de señalización de ERK-MAPK; de hecho, la activación de MAPK por Ca<sup>2+</sup> a través de

estos receptores está ampliamente descrito en la literatura (Rosen y cols., 1994; Xia y cols., 1996; Orban y cols., 1999).

#### **5.5.4 Modulación de la vía de señalización de las MAPK y síntesis de monoaminas**

Por último, cabe destacar que los efectos provocados tanto por los cannabinoides como por el alcohol sobre la síntesis de las distintas monoaminas, podrían estar mediados, al menos en parte, por los efectos que producen sobre la vía de señalización de MAPK. Se ha observado que esta vía de señalización puede modular la actividad del enzima tirosina hidroxilasa por fosforilación en determinados residuos de aminoácidos (Griffiths y Marley, 2001; Takekoshi y cols., 2001; Lindgren y cols., 2002; Ma y cols., 2004). Además, esta vía de señalización podría estar involucrada en modulaciones de esta actividad enzimática a más largo plazo ya que se ha observado que también modula la expresión del gen de la tirosina hidroxilasa (Guo y cols., 1998) y del gen de la triptófano hidroxilasa (Wood y Russo, 2001). Además, la modulación de esta vía de señalización podría estar involucrada con procesos plásticos neuronales que ocurren durante la exposición a cannabinoides o alcohol.

# **CONCLUSIONES**



## 6 CONCLUSIONES

1 El tratamiento agudo con fármacos cannabinoides alteró de forma diferente las características del ciclo sueño-vigilia de la rata en función del periodo (sueño-vigilia) y mayoritariamente a través del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>; empeorando la calidad del sueño y reduciendo la actividad en el periodo de vigilia. Efectos a los que se observó tolerancia tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2, excepto a la disminución de la calidad y cantidad de sueño durante el periodo de inactividad (día). Estos resultados sugieren la participación de distintos mecanismos en estos efectos de los cannabinoides, así como la intervención de algún componente de los sistemas que controla estos procesos circadianos.

2 Los tratamientos agudos con fármacos cannabinoides produjeron un efecto diferencial, y mediado por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, sobre la síntesis de las distintas monoaminas cerebrales: un efecto estimulador sobre la síntesis de noradrenalina y efectos inhibitorios sobre la síntesis de dopamina y serotonina en la mayoría de regiones estudiadas. Estos resultados sugieren una diferente localización neuroanatómica de este receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> sobre las distintas poblaciones de neuronas monoaminérgicas y/o sobre las aferencias que reciben, tanto inhibitorias como estimuladoras.

3 El tratamiento crónico con WIN 55,212-2 provocó la aparición de tolerancia a la mayoría de sus efectos agudos sobre la síntesis de las distintas monoaminas en el cerebro de rata con ciertas diferencias regionales; corroborándose el rápido desarrollo de tolerancia a los efectos farmacológicos de los compuestos cannabinoides descrito en la literatura.

4 La administración aguda del antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, SR141716A, tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 precipitó la aparición de un síndrome de abstinencia conductual característico aunque durante este síndrome de abstinencia no se pusieron de manifiesto cambios adaptativos importantes relacionados con la síntesis de las distintas monoaminas en ninguna región estudiada.

5 Tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2 y de forma más importante durante la abstinencia cannabinoide, se observó una desensibilización de los receptores

presinápticos adrenérgicos  $\alpha_2$  en las distintas regiones estudiadas, así como un aumento de la funcionalidad de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> en el cerebelo y estriado y 5-HT<sub>1B</sub> únicamente en el cerebelo. Estos resultados refuerzan la hipótesis del aumento de la transmisión noradrenérgica y la disminución de la transmisión serotoninérgica provocada por los compuestos cannabinoides.

6 Durante la abstinencia espontánea a alcohol se observó un aumento de la síntesis de serotonina en el cerebro de rata, sin cambios significativos sobre la síntesis de noradrenalina y dopamina; además, de un aumento en la funcionalidad del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> modulando la síntesis de monoaminas. Estos resultados sugieren un papel importante del sistema serotoninérgico en los fenómenos que ocurren durante la abstinencia a alcohol.

7 Se observó una interacción entre el alcohol y los compuestos cannabinoides. La exposición a alcohol tanto aguda como crónica, así como la abstinencia a alcohol, redujo la respuesta del WIN 55,212-2 a través del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> modulando la síntesis de las distintas monoaminas en el cerebro de rata; lo que sugiere una desensibilización de este receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> tras la exposición crónica a alcohol.

8 La administración aguda de WIN 55,212-2 activó los distintos componentes de la vía de señalización de quinasas mitogénicas de la subfamilia de ERK en la corteza frontal de rata *in vivo*; efecto mediado por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> y dependiente de la transmisión glutamatérgica; y se observó tolerancia a este efecto tras el tratamiento crónico con WIN 55,212-2.

9 El tratamiento agudo con etanol activó la proteína ERK mientras que el tratamiento crónico produjo una marcada reducción en la activación de la vía de señalización de ERK. Durante la abstinencia espontánea a etanol se observó una activación de estos componentes.

10 La modulación de la vía de señalización de ERK que producen tanto los compuestos cannabinoides como el alcohol podría estar involucrada, en ciertas regiones cerebrales, en las alteraciones en la síntesis de monoaminas provocadas por ambos compuestos.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## 7 BIBLIOGRAFÍA

ABOOD, M. E. y MARTIN, B. R., 1992, Neurobiology of marijuana abuse, *Trends Pharmacol Sci* 13, 201-206.

ABOOD, M. E., SAUSS, C., FAN, F., TILTON, C. L. y MARTIN, B. R., 1993, Development of behavioral tolerance to THC without alteration of cannabinoid receptor binding or mRNA levels in whole brain, *Pharmacol Biochem Behav* 46, 575-579.

ACETO, M. D., SCATES, S. M., LOWE, J. A. y MARTIN, B. R., 1995, Cannabinoid precipitated withdrawal by the selective cannabinoid receptor antagonist, SR 141716A, *Eur J Pharmacol* 282, R1-2.

ACETO, M. D., SCATES, S. M., LOWE, J. A. y MARTIN, B. R., 1996, Dependence on THC: studies on precipitated and abrupt withdrawal, *J Pharmacol Exp Ther* 278, 1290-1295.

ACETO, M.D., SCATES, S.M. y MARTIN, B.B., 2001, Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55212-2, *Eur J Pharmacol* 416, 75-81.

ADAMS, J. P. y SWEATT, J. D., 2002, Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 135-163.

ADELL, A. y ARTIGAS, F., 1991, Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo brain microdialysis study, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343, 237-244.

ADELL, A., CARCELLER, A. y ARTIGAS, F., 1993, In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, *J Neurochem* 60, 1673-1681.

AGHAJANIAN, G. K. y BUNNEY, B. S., 1977, Dopamine "autoreceptors": pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 297, 1-7.

AGO, Y., KOYAMA, Y., BABA, A. y MATSUDA, T., 2003, Regulation by 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the in vivo release of 5-HT and DA in mouse frontal cortex, *Neuropharmacology* 45, 1050-1056.

AGUAYO, L. G., PEOPLES, R. W., YEH, H. H. y YEVENES, G. E., 2002, GABA(A) receptors as molecular sites of ethanol action. Direct or indirect actions?, *Curr Top Med Chem* 2, 869-885.

AHERN, K. B., LUSTIG, H. S. y GREENBERG, D. A., 1994, Enhancement of NMDA toxicity and calcium responses by chronic exposure of cultured cortical neurons to ethanol, *Neurosci Lett* 165, 211-214.

ALESSI, D. R., SAITO, Y., CAMPBELL, D. G., COHEN, P., SITHANANDAM, G., RAPP, U., ASHWORTH, A., MARSHALL, C. J. y COWLEY, S., 1994, Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1, *Embo J* 13, 1610-1619.

ALTMAN, J., EVERITT, B. J., GLAUTIER, S., MARKOU, A., NUTT, D., ORETTI, R., PHILLIPS, G. D. y ROBBINS, T. W., 1996, The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate, *Psychopharmacology (Berl)* 125, 285-345.

AMERI, A., 1999, The effects of cannabinoids on the brain., *Prog Neurobiol* 58, 315-348.

ANDEN, N. E., GRABOWSKA, M. y STROMBOM, U., 1976, Different alpha-adrenoreceptors in the central nervous system mediating biochemical and functional effects of clonidine and receptor blocking agents, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 292, 43-52.

ARAGON, C. M., ABITBOL, M. y AMIT, Z., 1986, Acetaldehyde may mediate reinforcement and aversion produced by ethanol. An examination using a conditioned taste-aversion paradigm, *Neuropharmacology* 25, 79-83.

ARNONE, M., MARUANI, J., CHAPERON, F., THIEBOT, M. H., PONCELET, M., SOUBRIE, P. y LE FUR, G., 1997, Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors, *Psychopharmacology (Berl)* 132, 104-106.

ARTIGAS, F., PEREZ, V. y ALVAREZ, E., 1994, Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors, *Arch Gen Psychiatry* 51, 248-251.

AUCLAIR, N., OTANI, S., SOUBRIE, P. y CREPEL, F., 2000, Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons, *J Neurophysiol* 83, 3287-3293.

AUERBACH, S. B., MINZENBERG, M. J. y WILKINSON, L. O., 1989, Extracellular serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in hypothalamus of the unanesthetized rat measured by in vivo dialysis coupled to high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: dialysate serotonin reflects neuronal release, *Brain Res* 499, 281-290.

AUERBACH, S. B., RUTTER, J. J. y JULIANO, P. J., 1991, Substituted piperazine and indole compounds increase extracellular serotonin in rat diencephalon as determined by in vivo microdialysis, *Neuropharmacology* 30, 307-311.

AZMITIA, E. C. y SEGAL, M., 1978, An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat, *J Comp Neurol* 179, 641-667.

BAAS, W.B. y VANDER BROECK, M.J., 1952, A note of an improved method of analgesic evaluation, *J Am Pharm Assoc (Wash)* 41, 569-570.

BALL, D. M. y MURRAY, R. M., 1994, Genetics of alcohol misuse, *Br Med Bull* 50, 18-35.

BANTICK, R. A., DEAKIN, J. F. y GRASBY, P. M., 2001, The 5-HT<sub>1A</sub> receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics?, *J Psychopharmacol* 15, 37-46.

BARBACCIA, M. L., BOSIO, A., SPANO, P. F. y TRABUCCHI, M., 1982, Ethanol metabolism and striatal dopamine turnover, *J Neural Transm* 53, 169-177.

BARBARA, J. G., AUCLAIR, N., ROISIN, M. P., OTANI, S., VALJENT, E., CABOCHE, J., SOUBRIE, P. y CREPEL, F., 2003, Direct and indirect interactions between cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor and group II metabotropic glutamate receptor signalling in layer V pyramidal neurons from the rat prefrontal cortex, *Eur J Neurosci* 17, 981-990.

BARNES, N. M. y SHARP, T., 1999, A review of central 5-HT receptors and their function, *Neuropharmacology* 38, 1083-1152.

BASAVARAJAPPA, B. S., COOPER, T. B. y HUNGUND, B. L., 1998, Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane, *Brain Res* 793, 212-218.

BASAVARAJAPPA, B. S. y HUNGUND, B. L., 1999a, Down-regulation of cannabinoid receptor agonist-stimulated [35S]GTP gamma S binding in synaptic plasma membrane from chronic ethanol exposed mouse, *Brain Res* 815, 89-97.

BASAVARAJAPPA, B. S. y HUNGUND, B. L., 1999b, Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells, *J Neurochem* 72, 522-528.

BASAVARAJAPPA, B. S., SAITO, M., COOPER, T. B. y HUNGUND, B. L., 2003, Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons, *Eur J Pharmacol* 466, 73-83.

BASS, C.E. y MARTIN, B.R., 2000, Time course for the induction and maintenance of tolerance to THC in mice, *Drug Alcohol Depend* 60, 113-119.

BECKER, H. C., 1998, Kindling in alcohol withdrawal, *Alcohol Health Res World* 22, 25-33.

BELL, M.R., D'AMBRA, T.E., KUMAR, V., EISSENSTAT, M.A. y HERMAN, J.L., 1991, Antinociceptive [amino-alkyl]-indoles, *J Med Chem* 34, 1099-1110.

BELTRAMO, M., STELLA, N., CALIGNANO, A., LIN, S. Y., MAKRIYANNIS, A. y PIOMELLI, D., 1997, Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition, *Science* 277, 1094-1097.

BENJAMIN, D., GRANT, E. R. y POHORECKY, L. A., 1993, Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats, *Brain Res* 621, 137-140.

BERRENDERO, F., GARCIA-GIL, L., HERNANDEZ, M. L., ROMERO, J., CEBEIRA, M., DE MIGUEL, R., RAMOS, J. A. y FERNANDEZ-RUIZ, J. J., 1998a, Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development, *Development* 125, 3179-3188.

BERRENDERO, F., ROMERO, J., GARCIA-GIL, L., SUAREZ, I., DE LA CRUZ, P., RAMOS, J. A. y FERNANDEZ-RUIZ, J. J., 1998b, Changes in cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several brain regions of aged rats, *Biochim Biophys Acta* 1407, 205-214.

BISOGNO, T., MELCK, D., DE PETROCELLIS, L., BOBROV, MYU, GRETSKAYA, N. M., BEZUGLOV, V. V., SITACHITTA, N., GERWICK, W. H. y DI MARZO, V., 1998, Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase, *Biochem Biophys Res Commun* 248, 515-522.

BISOGNO, T., BERRENDERO, F., AMBROSINO, G., CEBEIRA, M., RAMOS, J. A., FERNANDEZ-RUIZ, J. J. y DI MARZO, V., 1999, Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function, *Biochem Biophys Res Commun* 256, 377-380.

BLIER, P., GALZIN, A. M. y LANGER, S. Z., 1990, Interaction between serotonin uptake inhibitors and alpha-2 adrenergic heteroreceptors in the rat hypothalamus, *J Pharmacol Exp Ther* 254, 236-244.

BOBES, J. y CALAFAT, A., 2000, Monografía cannabis, *Adicciones* 12.

BODOR, A. L., KATONA, I., NYIRI, G., MACKIE, K., LEDENT, C., HAJOS, N. y FREUND, T. F., 2005, Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types, *J Neurosci* 25, 6845-6856.

BONHAUS, D. W., CHANG, L. K., KWAN, J. y MARTIN, G. R., 1998, Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses, *J Pharmacol Exp Ther* 287, 884-888.

BORNHEIM, L. M., EVERHART, E. T., LI, J. y CORREIA, M. A., 1994, Induction and genetic regulation of mouse hepatic cytochrome P450 by cannabidiol, *Biochem Pharmacol* 48, 161-171.

BOSCHERT, U., AMARA, D. A., SEGU, L. y HEN, R., 1994, The mouse 5-HT<sub>1B</sub> receptor is localized predominantly on axon terminals, *Neuroscience* 58, 167-182.

BOSKER, F. J., DONKER, M. G., KLOMPMAKERS, A. A., KURATA, K. y WESTENBERG, H. G., 1994, 5-Hydroxytryptamine release in dorsal hippocampus of freely moving rats: modulation by pindolol, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 18, 765-778.

BOUABOULA, M., BOURRIE, B., RINALDI-CARMONA, M., SHIRE, D., LE FUR, G. y CASELLAS, P., 1995a, Stimulation of cannabinoid receptor CB<sub>1</sub> induces krox-24 expression in human astrocytoma cells, *J Biol Chem* 270, 13973-13980.

BOUABOULA, M., POINOT-CHAZEL, C., BOURRIE, B., CANAT, X., CALANDRA, B., RINALDI-CARMONA, M., LE-FUR, G. y CASELLAS, P., 1995b, Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB<sub>1</sub>, *Biochem J* 312, 637-641.

BOUABOULA, M., POINOT-CHAZEL, C., MARCHAND, J., CANAT, X., BOURRIE, B., RINALDI-CARMONA, M., CALANDRA, B., LE FUR, G. y CASELLAS, P., 1996, Signaling pathway associated with stimulation of CB<sub>2</sub> peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression, *Eur J Biochem* 237, 704-711.

BOUABOULA, M., PERRACHON, S., MILLIGAN, L., CANAT, X., RINALDI-CARMONA, M., PORTIER, M., BARTH, F., CALANDRA, B., PECCEU, F., LUPKER, J., MAFFRAND, J. P., LE FUR, G. y CASELLAS, P., 1997, A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions, *J Biol Chem* 272, 22330-22339.

BOUABOULA, M., BIANCHINI, L., MCKENZIE, F. R., POUYSSEGUR, J. y CASELLAS, P., 1999, Cannabinoid receptor CB<sub>1</sub> activates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 isoform via Gi-mediated mitogen activated protein kinase signaling transduction pathways, *FEBS Lett* 449, 61-65.

BOULENGUEZ, P., SEGU, L., CHAUVEAU, J., MOREL, A., LANOIR, J. y DELAAGE, M., 1992, Biochemical and pharmacological characterization of serotonin-O-carboxymethylglycyl[125I]iodotyrosinamide, a new radioiodinated probe for 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> binding sites, *J Neurochem* 58, 951-959.

BOULENGUEZ, P., RAWLINS, J. N., CHAUVEAU, J., JOSEPH, M. H., MITCHELL, S. N. y GRAY, J. A., 1996, Modulation of dopamine release in the nucleus accumbens by 5-HT<sub>1B</sub> agonists: involvement of the hippocampo-accumbens pathway, *Neuropharmacology* 35, 1521-1529.

BRAIDA, D., POZZI, M., PAROLARO, D. y SALA, M., 2001, Intracerebral self-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the rat: interaction with the opioid system., *Eur J Pharmacol* 413, 227-234.

BREIVOGEL, C. S., GRIFFIN, G., DI MARZO, V. y MARTIN, B. R., 2001, Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain, *Mol Pharmacol* 60, 155-163.

BRODIE, M. S., SHEFNER, S. A. y DUNWIDDIE, T. V., 1990, Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro, *Brain Res* 508, 65-69.

BRODIE, M. S., PESOLD, C. y APPEL, S. B., 1999, Ethanol directly excites dopaminergic ventral tegmental area reward neurons, *Alcohol Clin Exp Res* 23, 1848-1852.

BUDYGIN, E. A., PHILLIPS, P. E., ROBINSON, D. L., KENNEDY, A. P., GAINETDINOV, R. R. y WIGHTMAN, R. M., 2001, Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats, *J Pharmacol Exp Ther* 297, 27-34.

BURSTEIN, S., BUDROW, J., DEBATIS, M., HUNTER, S. A. y SUBRAMANIAN, A., 1994, Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid, *Biochem Pharmacol* 48, 1253-1264.

CADOGAN, A.K., ALEXANDER, S.P., BOYD, E.A. y KENDALL, D.A., 1997, Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum., *J Neurochem* 69, 1131-1137.

CAMPBELL, A. D. y MCBRIDE, W. J., 1995, Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens, *Pharmacol Biochem Behav* 51, 835-842.

CARLSSON, A., DAVIS, J. N., KEHR, W., LINDQVIST, M. y ATACK, C. V., 1972, Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 275, 153-168.

CASANOVAS, J. M. y ARTIGAS, F., 1996, Differential effects of ipsapirone on 5-hydroxytryptamine release in the dorsal and median raphe neuronal pathways, *J Neurochem* 67, 1945-1952.

CASANOVAS, J. M., LESOURD, M. y ARTIGAS, F., 1997, The effect of the selective 5-HT<sub>1A</sub> agonists alnespirone (S-20499) and 8-OH-DPAT on extracellular 5-hydroxytryptamine in different regions of rat brain, *Br J Pharmacol* 122, 733-741.

CASANOVAS, J. M., HERVAS, I. y ARTIGAS, F., 1999, Postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors control 5-HT release in the rat medial prefrontal cortex, *Neuroreport* 10, 1441-1445.

CASTANE, A., ROBLEDO, P., MATIFAS, A., KIEFFER, B. L. y MALDONADO, R., 2003, Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in double mu and delta opioid receptor knockout mice, *Eur J Neurosci* 17, 155-159.

CASTANE, A., MALDONADO, R. y VALVERDE, O., 2004, Role of different brain structures in the behavioural expression of WIN 55,212-2 withdrawal in mice, *Br J Pharmacol* 142, 1309-1317.

CASTANEDA, E., MOSS, D.E., ODDIE, S.D. y WHISHAW, I.Q., 1991, THC does not affect striatal dopamine release: microdialysis in freely moving rats., *Pharmacol Biochem Behav* 40, 587-591.

CATLIN, M. C., GUIZZETTI, M. y COSTA, L. G., 1999, Effects of ethanol on calcium homeostasis in the nervous system: implications for astrocytes, *Mol Neurobiol* 19, 1-24.

CECI, A., BASCHIROTTO, A. y BORSINI, F., 1994, The inhibitory effect of 8-OH-DPAT on the firing activity of dorsal raphe serotonergic neurons in rats is attenuated by lesion of the frontal cortex, *Neuropharmacology* 33, 709-713.

CEDARBAUM, J. M. y AGHAJANIAN, G. K., 1977, Catecholamine receptors on locus coeruleus neurons: pharmacological characterization, *Eur J Pharmacol* 44, 375-385.

CHANDLER, L. J., NEWSOM, H., SUMNERS, C. y CREWS, F., 1993, Chronic ethanol exposure potentiates NMDA excitotoxicity in cerebral cortical neurons, *J Neurochem* 60, 1578-1581.

CHANDLER, L. J., SUTTON, G., DORAIRAJ, N. R. y NORWOOD, D., 2001, N-methyl D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures, *J Biol Chem* 276, 2627-2636.

CHAO, Y. C., YOUNG, T. H., CHANG, W. K., TANG, H. S. y HSU, C. T., 1995, An investigation of whether polymorphisms of cytochrome P4502E1 are genetic markers of susceptibility to alcoholic end-stage organ damage in a Chinese population, *Hepatology* 22, 1409-1414.

CHAPERON, F., SOUBRIE, P., PUECH, A. J. y THIEBOT, M. H., 1998, Involvement of central cannabinoid (CB<sub>1</sub>) receptors in the establishment of place conditioning in rats, *Psychopharmacology (Berl)* 135, 324-332.

CHEER, J. F., CADOGAN, A. K., MARSDEN, C. A., FONE, K. C. y KENDALL, D. A., 1999, Modification of 5-HT<sub>2</sub> receptor mediated behaviour in the rat by oleamide and the role of cannabinoid receptors, *Neuropharmacology* 38, 533-541.

CHEER, J.F., MARSDEN, C.A., KENDALL, D.A. y MASON, R., 2000, Lack of response suppression follows repeated ventral tegmental cannabinoid administration: an in vitro electrophysiological study, *Neuroscience* 99, 661-667.

CHEER, J.F., KENDALL, D.A., MASON, R. y MARSDEN, C.A., 2003, Differential cannabinoid-induced electrophysiological effects in rat ventral tegmentum, *Neuropharmacology* 44, 633-641.

CHEN, F. y LAWRENCE, A. J., 2000, 5-HT transporter sites and 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in Fawn-Hooded rats: a quantitative autoradiography study, *Alcohol Clin Exp Res* 24, 1093-1102.

CHEN, J., ISHAC, E. J., DENT, P., KUNOS, G. y GAO, B., 1998, Effects of ethanol on mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase cascades in normal and regenerating liver, *Biochem J* 334 ( Pt 3), 669-676.

CHEN, J.P., PAREDES, W., LI, J., SMITH, D., LOWINSON, J. y GARDNER, E.L., 1990, THC produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis, *Psychopharmacology (Berl)* 102, 156-162.

CHEN, N. H. y REITH, M. E., 1995, Monoamine interactions measured by microdialysis in the ventral tegmental area of rats treated systemically with 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, *J Neurochem* 64, 1585-1597.

CHILDERS, S. R., PACHECO, M. A., BENNETT, B. A., EDWARDS, T. A., HAMPSON, R. E., MU, J. y DEADWYLER, S. A., 1993, Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms, *Biochem Soc Symp* 59, 27-50.

CHILDERS, S.R. y DEADWYLER, S.A., 1996, Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors, *Biochem Pharmacol* 52, 819-827.

CHIN, J. H. y GOLDSTEIN, D. B., 1977, Electron paramagnetic resonance studies of ethanol on membrane fluidity, *Adv Exp Med Biol* 85A, 111-122.

CHRISTIANSEN, J. y SQUIRES, R. F., 1974a, Antagonistic effects of neuroleptics and apomorphine on synaptosomal tyrosine hydroxylase in vitro, *J Pharm Pharmacol* 26, 742-743.

CHRISTIANSEN, J. y SQUIRES, R. F., 1974b, Antagonistic effects of apomorphine and haloperidol on rat striatal synaptosomal tyrosine hydroxylase, *J Pharm Pharmacol* 26, 367-369.

CIPPITELLI, A., BILBAO, A., HANSSON, A. C., DEL ARCO, I., SOMMER, W., HEILIG, M., MASSI, M., BERMUDEZ-SILVA, F. J., NAVARRO, M., CICCOCIOPPO, R. y DE FONSECA, F. R., 2005, Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonism reduces conditioned reinstatement of ethanol-seeking behavior in rats, *Eur J Neurosci* 21, 2243-2251.

COLOMBO, G., AGABIO, R., FA, M., GUANO, L., LOBINA, C., LOCHE, A., REALI, R. y GESSA, G. L., 1998, Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716, *Alcohol Alcohol* 33, 126-130.

COMPTON, D. R., DEWEY, W. L. y MARTIN, B. R., 1990, Cannabis dependence and tolerance production, *Adv Alcohol Subst Abuse* 9, 129-147.

COMPTON, D. R., GOLD, L. H., WARD, S. J., BALSTER, R. L. y MARTIN, B. R., 1992a, Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from THC, *J Pharmacol Exp Ther* 263, 1118-1126.

COMPTON, D. R., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S. y MARTIN, B. R., 1992b, Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents, *J Pharmacol Exp Ther* 260, 201-209.

COMPTON, D. R., RICE, K. C., DE COSTA, B. R., RAZDAN, R. K., MELVIN, L. S., JOHNSON, M. R. y MARTIN, B. R., 1993, Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities, *J Pharmacol Exp Ther* 265, 218-226.

COMPTON, D. R., ACETO, M. D., LOWE, J. y MARTIN, B. R., 1996, In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of THCl-induced responses and apparent agonist activity, *J Pharmacol Exp Ther* 277, 586-594.

COOK, S.A., LOWE, J.A. y MARTIN, B.R., 1998, CB1 receptor antagonist precipitates withdrawal in mice exposed to THC, *J Pharmacol Exp Ther* 285, 1150-1156.

COSENZA, M., GIFFORD, A.N., GATLEY, S.J., PYATT, B., LIU, Q., MAKRIYANNIS, A. y VOLKOW, N.D., 2000, Locomotor activity and occupancy of brain cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors by the antagonist/inverse agonist AM281, *Synapse* 38, 477-482.

COSTA, B., PAROLARO, D. y COLLEONI, M., 1996, Chronic cannabinoid, CP-55,940, administration alters biotransformation in the rat, *Eur J Pharmacol* 313, 17-24.

COSTA, B., GIAGNONI, G. y COLLEONI, M., 2000, Precipitated and spontaneous withdrawal in rats tolerant to anandamide, *Psychopharmacology (Berl)* 149, 121-128.

CRISWELL, H. E., SIMSON, P. E., DUNCAN, G. E., MCCOWN, T. J., HERBERT, J. S., MORROW, A. L. y BREESE, G. R., 1993, Molecular basis for regionally specific action of ethanol on GABA<sub>A</sub> receptors: generalization to other ligand-gated ion channels, *J Pharmacol Exp Ther* 267, 522-537.

CROSTHWAITE, A. J., VALLI, H. y WILLIAMS, R. J., 2004, Inhibiting Src family tyrosine kinase activity blocks glutamate signalling to ERK1/2 and Akt/PKB but not JNK in cultured striatal neurones, *J Neurochem* 88, 1127-1139.

D'AMOUR, F.E. y SMITH, D.L., 1941, A method for determining loss of pain sensation, *J Pharmacol Exp Ther* 72, 74-79.

DAOUST, M., LHUINTRE, J. P., SALIGAUT, C., MOORE, N., FLIPO, J. L. y BOISMARE, F., 1987, Noradrenaline and GABA brain receptors are co-involved in the voluntary intake of ethanol by rats, *Alcohol Alcohol Suppl* 1, 319-322.

DAR, M. S. y WOOLLES, W. R., 1984, Striatal and hypothalamic neurotransmitter changes during ethanol withdrawal in mice, *Alcohol* 1, 453-458.

DARMANI, N. A., 2001, The cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR 141716A reverses the antiemetic and motor depressant actions of WIN 55, 212-2, *Eur J Pharmacol* 430, 49-58.

DAVIDSON, C. y STAMFORD, J. A., 1995, Evidence that 5-hydroxytryptamine release in rat dorsal raphe nucleus is controlled by 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> autoreceptors, *Br J Pharmacol* 114, 1107-1109.

DAVIS, M. I., SZAROWSKI, D., TURNER, J. N., MORRISETT, R. A. y SHAIN, W., 1999, In vivo activation and in situ BDNF-stimulated nuclear translocation of mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase is inhibited by ethanol in the developing rat hippocampus, *Neurosci Lett* 272, 95-98.

DAVIS, M. I., RONESI, J. y LOVINGER, D. M., 2003, A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells, *J Biol Chem* 278, 48973-48980.

DAVIS, S., VANHOUTTE, P., PAGES, C., CABOCHE, J. y LAROCHE, S., 2000, The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo, *J Neurosci* 20, 4563-4572.

DE MONTIGNY, C. y BLIER, P., 1992, Potentiation of 5-HT neurotransmission by short-term lithium: in vivo electrophysiological studies, *Clin Neuropharmacol* 15 Suppl 1 Pt A, 610A-611A.

DEADWYLER, S. A., HAMPSON, R. E., MU, J., WHYTE, A. y CHILDERS, S., 1995, Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process, *J Pharmacol Exp Ther* 273, 734-743.

DERKINDEREN, P., ENSLEN, H. y GIRAULT, J. A., 1999, The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system, *Neuroreport* 10, R24-34.

DERKINDEREN, P., LEDENT, C., PARMENTIER, M. y GIRAULT, J. A., 2001, Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB<sub>1</sub> receptors in hippocampus, *J Neurochem* 77, 957-960.

DERKINDEREN, P., VALJENT, E., TOUTANT, M., CORVOL, J.C., ENSLEN, H., LEDENT, C., TRZASKOS, J., CABOCHE, J. y GIRAULT, J.A., 2003, Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus., *J Neurosci* 23, 2371-2382.

DEVANE, W. A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R. G., STEVENSON, L. A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A. y MECHOULAM, R., 1992, Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science* 258, 1946-1949.

DI CHIARA, G., ACQUAS, E. y TANDA, G., 1996, Ethanol as a neurochemical surrogate of conventional reinforcers: the dopamine-opioid link, *Alcohol* 13, 13-17.

DI MARZO, V., FONTANA, A., CADAS, H., SCHINELLI, S., CIMINO, G., SCHWARTZ, J. C. y PIOMELLI, D., 1994, Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons, *Nature* 372, 686-691.

DI MARZO, V. y DEUTSCH, D. G., 1998, Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors, *Neurobiol Dis* 5, 386-404.

DIAMOND, I. y GORDON, A. S., 1997, Cellular and molecular neuroscience of alcoholism, *Physiol Rev* 77, 1-20.

DIANA, M., PISTIS, M., MUNTONI, A. y GESSA, G., 1996, Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: evidence of protracted abstinence, *Neuroscience* 71, 411-415.

DIANA, M., MELIS, M., MUNTONI, A. L. y GESSA, G. L., 1998, Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10269-10273.

DIANA, M. A., LEVENES, C., MACKIE, K. y MARTY, A., 2002, Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids, *J Neurosci* 22, 200-208.

DONE, C. J. y SHARP, T., 1994, Biochemical evidence for the regulation of central noradrenergic activity by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors: microdialysis studies in the awake and anaesthetized rat, *Neuropharmacology* 33, 411-421.

DOUGHERTY, M. K., MULLER, J., RITT, D. A., ZHOU, M., ZHOU, X. Z., COPELAND, T. D., CONRADS, T. P., VEENSTRA, T. D., LU, K. P. y MORRISON, D. K., 2005, Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation, *Mol Cell* 17, 215-224.

DUBOCOVICH, M. L. y LANGER, S. Z., 1974, Negative feed-back regulation of noradrenaline release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency of phenoxybenzamine in blocking the pre- and post-synaptic adrenergic receptors, *J Physiol* 237, 505-519.

ECCLESTON, D., RITCHIE, I. M. y ROBERTS, M. H., 1970, Long term effects of midbrain stimulation on 5-hydroxyindole synthesis in rat brain, *Nature* 226, 84-85.

ECKARDT, M. J., FILE, S. E., GESSA, G. L., GRANT, K. A., GUERRI, C., HOFFMAN, P. L., KALANT, H., KOOB, G. F., LI, T. K. y TABAKOFF, B., 1998, Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system, *Alcohol Clin Exp Res* 22, 998-1040.

EGASHIRA, N., MISHIMA, K., KATSURABAYASHI, S., YOSHITAKE, T., MATSUMOTO, Y., ISHIDA, J., YAMAGUCHI, M., IWASAKI, K. y FUJIWARA, M., 2002, Involvement of 5-hydroxytryptamine neuronal system in THC-induced impairment of spatial memory, *Eur J Pharmacol* 445, 221-229.

EISENHOFER, G., SZABO, G. y HOFFMAN, P. L., 1990, Opposite changes in turnover of noradrenaline and dopamine in the CNS of ethanol-dependent mice, *Neuropharmacology* 29, 37-45.

ELLERT-MIKLASZEWSKA, A., KAMINSKA, B. y KONARSKA, L., 2005, Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein, *Cell Signal* 17, 25-37.

ELPHICK, M. R. y EGERTOVA, M., 2001, The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 381-408.

ENGLISH, J. D. y SWEATT, J. D., 1997, A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation, *J Biol Chem* 272, 19103-19106.

ESPOSITO, G., IZZO, A. A., DI ROSA, M. y IUVONE, T., 2001, Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells, *J Neurochem* 78, 835-841.

ESTEBAN, S., LLADO, J. y GARCIA-SEVILLA, J. A., 1996, Alpha 2-autoreceptors and alpha 2-heteroreceptors modulating tyrosine and tryptophan hydroxylase activity in the rat brain in vivo: an investigation into the alpha 2-adrenoceptor subtypes, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353, 391-399.

ESTEBAN, S., LLADO, J., SASTRE-COLL, A. y GARCIA-SEVILLA, J. A., 1999, Activation and desensitization by cyclic antidepressant drugs of alpha2-autoreceptors, alpha2-heteroreceptors and 5-HT<sub>1A</sub>-autoreceptors regulating monamine synthesis in the rat brain in vivo, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360, 135-143.

FADDA, F., MOSCA, E., COLOMBO, G. y GESSA, G. L., 1989, Effect of spontaneous ingestion of ethanol on brain dopamine metabolism, *Life Sci* 44, 281-287.

FAINGOLD, C. L., N'GOUEMO, P. y RIAZ, A., 1998, Ethanol and neurotransmitter interactions--from molecular to integrative effects, *Prog Neurobiol* 55, 509-535.

FAN, F., TAO, Q., ABOOD, M. y MARTIN, B. R., 1996, Cannabinoid receptor down-regulation without alteration of the inhibitory effect of CP 55,940 on adenylyl cyclase in the cerebellum of CP 55,940-tolerant mice, *Brain Res* 706, 13-20.

FATTORE, L., MARTELLOTTA, M. C., COSSU, G., MASCIA, M. S. y FRATTA, W., 1999, CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats, *Behav Brain Res* 104, 141-146.

FATTORE, L., COSSU, G., MARTELLOTTA, C.M. y FRATTA, W., 2001, Intravenous self-administration of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonist WIN 55,212-2 in rats., *Psychopharmacology (Berl)* 156, 410-416.

FAUBERT KAPLAN, B. L. y KAMINSKI, N. E., 2003, Cannabinoids inhibit the activation of ERK MAPK in PMA/Io-stimulated mouse splenocytes, *Int Immunopharmacol* 3, 1503-1510.

FEDOROVA, I., HASHIMOTO, A., FECIK, R. A., HEDRICK, M. P., HANUS, L. O., BOGER, D. L., RICE, K. C. y BASILE, A. S., 2001, Behavioral evidence for the interaction of oleamide with multiple neurotransmitter systems, *J Pharmacol Exp Ther* 299, 332-342.

FELDER, C. C., JOYCE, K.E., BRILEY, E.M., MANSOURI, J., MACKIE, K., BLOND, O., LAI, Y., MA, A.L. y MITCHELL, R.L., 1995, Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors, *Mol Pharmacol* 48, 443-450.

FERNANDEZ-RUIZ, J., BERRENDERO, F., HERNANDEZ, M. L. y RAMOS, J. A., 2000, The endogenous cannabinoid system and brain development, *Trends Neurosci* 23, 14-20.

FERRARI, F., OTTANI, A. y GIULIANI, D., 1999, Cannabimimetic activity in rats and pigeons of HU 210, a potent antiemetic drug, *Pharmacol Biochem Behav* 62, 75-80.

FERRARO, L., TOMASINI, M.C., GESSA, G.L., BEBE, B.W., TANGANELLI, S. y ANTONELLI, T., 2001, The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 regulates glutamate transmission in rat cerebral cortex: an in vivo and in vitro study, *Cereb Cortex* 11, 728-733.

FIMIANI, C., MATTOCKS, D., CAVANI, F., SALZET, M., DEUTSCH, D. G., PRYOR, S., BILFINGER, T. V. y STEFANO, G. B., 1999, Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release, *Cell Signal* 11, 189-193.

FINK, K. y GOTHERT, M., 1992, Presynaptic site of action underlying the ethanol-induced inhibition of norepinephrine release evoked by stimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in rat cerebral cortex, *Brain Res* 572, 27-32.

FINK, K., SCHULTHEISS, R. y GOTHERT, M., 1992, Inhibition of N-methyl-D-aspartate- and kainate-evoked noradrenaline release in human cerebral cortex slices by ethanol, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345, 700-703.

FITTON, A. G. y PERTWEE, R. G., 1982, Changes in body temperature and oxygen consumption rate of conscious mice produced by intrahypothalamic and intracerebroventricular injections of THC, *Br J Pharmacol* 75, 409-414.

FREEDLAND, C.S., WHITLOW, C.T., SMITH, H.R. y PORRINO, L.J., 2003, Functional consequences of the acute administration of the cannabinoid receptor antagonist, SR 141716A, in cannabinoid-naive and -tolerant animals: a quantitative 2-[14C]deoxyglucose study, *Brain Res* 962, 169-179.

FREEMON, F. R., 1982, The effect of chronically administered THC upon the polygraphically monitored sleep of normal volunteers, *Drug Alcohol Depend* 10, 345-353.

FRENCH, E.D., 1997, THC excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors, *Neurosci Lett* 226, 159-162.

GALIEGUE, S., MARY, S., MARCHAND, J., DUSSOSSOY, D., CARRIERE, D., CARAYON, P., BOUABOULA, M., SHIRE, D., LE-FUR, G. y CASELLAS, P., 1995, Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations, *Eur J Biochem* 232, 54-61.

GALLATE, J. E. y MCGREGOR, I. S., 1999, The motivation for beer in rats: effects of ritanserin, naloxone and SR 141716, *Psychopharmacology (Berl)* 142, 302-308.

GALVE-ROPERH, I., SANCHEZ, C., CORTES, M.L., DEL-PULGAR, T.G., IZQUIERDO, M. y GUZMAN, M., 2000, Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation, *Nat Med* 6, 313-319.

GALVE-ROPERH, I., RUEDA, D., GOMEZ DEL PULGAR, T., VELASCO, G. y GUZMAN, M., 2002, Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor, *Mol Pharmacol* 62, 1385-1392.

GARCIA, D.E., BROWN, S., HILLE, B. y MACKIE, K., 1998, Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor, *J Neurosci* 18, 2834-2841.

GARDNER, E. L., 2002, Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology, *Chem Phys Lipids* 121, 267-290.

GARDNER, E.L. y VOREL, S.R., 1998, Cannabinoid transmission and reward-related events, *Neurobiol Dis* 5, 502-533.

GASTER, L. M., HAM, P., JOINER, G. F., KING, F. D., MULHOLLAND, K. R., WYMAN, P. A., HAGAN, J. J., PRICE, G. W., ROBERTS, C., ROUTLEDGE, C., SELKIRK, J., SLADE, P. D. y MIDDLEMISS, D. N., 1998, The selective 5-HT<sub>1B</sub> receptor inverse agonist SB-224289, potently blocks terminal 5-HT autoreceptor function both in vitro and in vivo, *Ann N Y Acad Sci* 861, 270-271.

GATLEY, S.J., LAN, R., VOLKOW, N.D., PAPPAS, N., KING, P., WONG, C.T., GIFFORD, A.N., PYATT, B., DEWEY, S.L. y MAKRIYANNIS, A., 1998, Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in vivo, *J Neurochem* 70, 417-423.

GERARD, C. M., MOLLEREAU, C., VASSART, G. y PARMENTIER, M., 1991, Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis, *Biochem J* 279 (Pt 1), 129-134.

GERDEMAN, G. y LOVINGER, D.M., 2001, CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum, *J Neurophysiol* 85, 468-471.

GESSA, G. L., SERRA, S., VACCA, G., CARAI, M. A. y COLOMBO, G., 2005, Suppressing effect of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist, SR147778, on alcohol intake and motivational properties of alcohol in alcohol-preferring sP rats, *Alcohol Alcohol* 40, 46-53.

GHOZLAND, S., MATTHES, H. W., SIMONIN, F., FILLIOL, D., KIEFFER, B. L. y MALDONADO, R., 2002, Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors, *J Neurosci* 22, 1146-1154.

GIFFORD, A. N., BRUNEUS, M., GATLEY, S. J., LAN, R., MAKRIYANNIS, A. y VOLKOW, N. D., 1999, Large receptor reserve for cannabinoid actions in the central nervous system, *J Pharmacol Exp Ther* 288, 478-483.

GIFFORD, A.N., SAMIAN, L., GATLEY, S.J. y ASHBY, C.R., 1997, Examination of the effect of the cannabinoid receptor agonist, CP 55,940, on electrically evoked transmitter release from rat brain slices., *Eur J Pharmacol* 324, 187-192.

GIL, E., COLADO, I., LOPEZ, F., FERNANDEZ-BRIERA, A., FERNANDEZ-LOPEZ, A. y CALVO, P., 1992, Effects of chronic treatment with ethanol and withdrawal of ethanol on levels of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid in the striatum of the rat. Influence of benzodiazepines, barbiturate and somatostatin, *Neuropharmacology* 31, 1151-1156.

GIVENS, B., 1995, Low doses of ethanol impair spatial working memory and reduce hippocampal theta activity, *Alcohol Clin Exp Res* 19, 763-767.

GIVENS, B. y MCMAHON, K., 1995, Ethanol suppresses the induction of long-term potentiation in vivo, *Brain Res* 688, 27-33.

GOLDSTEIN, D. B. y CHIN, J. H., 1981, Interaction of ethanol with biological membranes, *Fed Proc* 40, 2073-2076.

GOLDSTEIN, D. B., CHIN, J. H. y LYON, R. C., 1982, Ethanol disordering of spin-labeled mouse brain membranes: correlation with genetically determined ethanol sensitivity of mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4231-4233.

GOMEZ DEL PULGAR, T., VELASCO, G. y GUZMAN, M., 2000, The CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt, *Biochem J* 347, 369-373.

GONGWER, M. A., MURPHY, J. M., MCBRIDE, W. J., LUMENG, L. y LI, T. K., 1989, Regional brain contents of serotonin, dopamine and their metabolites in the selectively bred high- and low-alcohol drinking lines of rats, *Alcohol* 6, 317-320.

GONZALES, R. A., JOB, M. O. y DOYON, W. M., 2004, The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement, *Pharmacol Ther* 103, 121-146.

GONZALEZ, S., FERNANDEZ-RUIZ, J., MARZO, V. D., HERNANDEZ, M., AREVALO, C., NICANOR, C., CASCIO, M. G., AMBROSIO, E. y RAMOS, J. A., 2004a, Behavioral and molecular changes elicited by acute administration of SR141716 to THC-tolerant rats: an experimental model of cannabinoid abstinence, *Drug Alcohol Depend* 74, 159-170.

GONZALEZ, S., VALENTI, M., DE MIGUEL, R., FEZZA, F., FERNANDEZ-RUIZ, J., DI MARZO, V. y RAMOS, J. A., 2004b, Changes in endocannabinoid contents in reward-related brain regions of alcohol-exposed rats, and their possible relevance to alcohol relapse, *Br J Pharmacol* 143, 455-464.

GOTHERT, M., SCHLICKER, E. y KOLLECKER, P., 1986, Receptor-mediated effects of serotonin and 5-methoxytryptamine on noradrenaline release in the rat vena cava and in the heart of the pithed rat, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 332, 124-130.

GOTHERT, M. y FINK, K., 1989, Inhibition of N-methyl-D-aspartate (NMDA)- and L-glutamate-induced noradrenaline and acetylcholine release in the rat brain by ethanol, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340, 516-521.

GREWAL, S. S., YORK, R. D. y STORK, P. J., 1999, Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons, *Curr Opin Neurobiol* 9, 544-553.

GRIFFITHS, J. y MARLEY, P. D., 2001, Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of tyrosine hydroxylase involves MEK1, *Neuroreport* 12, 2679-2683.

GROBIN, A. C., MATTHEWS, D. B., DEVAUD, L. L. y MORROW, A. L., 1998, The role of GABA<sub>A</sub> receptors in the acute and chronic effects of ethanol, *Psychopharmacology (Berl)* 139, 2-19.

GROBIN, A. C., PAPADEAS, S. T. y MORROW, A. L., 2000, Regional variations in the effects of chronic ethanol administration on GABA<sub>A</sub> receptor expression: potential mechanisms, *Neurochem Int* 37, 453-461.

GSCHWIND, A., ZWICK, E., PRENZEL, N., LESERER, M. y ULLRICH, A., 2001, Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission, *Oncogene* 20, 1594-1600.

GUAL, A., 2002, Monografía alcohol, *Adicciones* 14, 452.

GUEUDET, C., SANTUCCI, V., RINALDI-CARMONA, M., SOUBRIE, P. y LE FUR, G., 1995, The CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor antagonist SR 141716A affects A9 dopamine neuronal activity in the rat, *Neuroreport* 6, 1421-1425.

GUIZZETTI, M. y COSTA, L. G., 2002, Effect of ethanol on protein kinase Czeta and p70S6 kinase activation by carbachol: a possible mechanism for ethanol-induced inhibition of glial cell proliferation, *J Neurochem* 82, 38-46.

GULYA, K., GRANT, K. A., VALVERIUS, P., HOFFMAN, P. L. y TABAKOFF, B., 1991, Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal, *Brain Res* 547, 129-134.

GUO, Z., DU, X. y IACOVITTI, L., 1998, Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression during transdifferentiation of striatal neurons: changes in transcription factors binding the AP-1 site, *J Neurosci* 18, 8163-8174.

GUPPY, L. J., CRABBE, J. C. y LITTLETON, J. M., 1995, Time course and genetic variation in the regulation of calcium channel antagonist binding sites in rodent tissues during the induction of ethanol physical dependence and withdrawal, *Alcohol Alcohol* 30, 607-615.

GUR, E., LIFSCHYTZ, T., LERER, B. y NEWMAN, M. E., 2002, Effects of triiodothyronine and imipramine on basal 5-HT levels and 5-HT<sub>1</sub> autoreceptor activity in rat cortex, *Eur J Pharmacol* 457, 37-43.

GUSTAFSON, R. A., KIM, I., STOUT, P. R., KLETTE, K. L., GEORGE, M. P., MOOLCHAN, E. T., LEVINE, B. y HUESTIS, M. A., 2004, Urinary pharmacokinetics of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol after controlled oral THC administration, *J Anal Toxicol* 28, 160-167.

GUZMAN, M., SANCHEZ, C. y GALVE-ROPERH, I., 2001, Control of the cell survival/death decision by cannabinoids, *J Mol Med* 78, 613-625.

HADDJERI, N., DE MONTIGNY, C. y BLIER, P., 1997, Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system, *Br J Pharmacol* 120, 865-875.

HAGEMANN, C. y BLANK, J. L., 2001, The ups and downs of MEK kinase interactions, *Cell Signal* 13, 863-875.

HAJOS, M., HAJOS-KORCSOK, E. y SHARP, T., 1999, Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT<sub>1A</sub> receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat, *Br J Pharmacol* 126, 1741-1750.

HAJOS, N., KATONA, I., NAIEM, S.S., MACKIE, K., LEDENT, C., MODY, I. y FREUND, T.F., 2000, Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations., *Eur J Neurosci* 12, 3239-3249.

HAJOS, N., LEDENT, C. y FREUND, T.F., 2001, Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus., *Neuroscience* 106, 1-4.

HAJOS, N. y FREUND, T.F., 2002a, Distinct cannabinoid sensitive receptors regulate hippocampal excitation and inhibition, *Chem Phys Lipids* 121, 73-82.

HAJOS, N. y FREUND, T.F., 2002b, Pharmacological separation of cannabinoid sensitive receptors on hippocampal excitatory and inhibitory fibers, *Neuropharmacology* 43, 503-510.

HAJOS-KORCSOK, E. y SHARP, T., 1996, 8-OH-DPAT-induced release of hippocampal noradrenaline in vivo: evidence for a role of both 5-HT<sub>1A</sub> and dopamine D1 receptors, *Eur J Pharmacol* 314, 285-291.

HAJOS-KORCSOK, E., MCQUADE, R. y SHARP, T., 1999, Influence of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on central noradrenergic activity: microdialysis studies using (+/-)-MDL 73005EF and its enantiomers, *Neuropharmacology* 38, 299-306.

HALL, H., LUNDKVIST, C., HALLDIN, C., FARDE, L., PIKE, V. W., MCCARRON, J. A., FLETCHER, A., CLIFFE, I. A., BARF, T., WIKSTROM, H. y SEDVALL, G., 1997, Autoradiographic localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the post-mortem human brain using [3H]WAY-100635 and [11C]way-100635, *Brain Res* 745, 96-108.

HALLIDAY, G., BAKER, K. y HARPER, C., 1995, Serotonin and alcohol-related brain damage, *Metab Brain Dis* 10, 25-30.

HAMON, M., BOURGOIN, S. y GLOWINSKI, J., 1973, Feedback regulation of 5-HT synthesis in rat striatal slices, *J Neurochem* 20, 1727-1745.

HAMON, M. y GLOWINSKI, J., 1974, Regulation of serotonin synthesis, *Life Sci* 15, 1533-1548.

HANEY, M., COMER, S. D., WARD, A. S., FOLTIN, R. W. y FISCHMAN, M. W., 1997, Factors influencing marijuana self-administration by humans, *Behav Pharmacol* 8, 101-112.

HANEY, M., WARD, A.S., COMER, S.D., FOLTIN, R.W. y FISCHMAN, M.W., 1999a, Abstinence symptoms following smoked marijuana in humans, *Psychopharmacology (Berl)* 141, 395-404.

HANEY, M., WARD, A.S., COMER, S.D., FOLTIN, R.W. y FISCHMAN, M.W., 1999b, Abstinence symptoms following oral THC administration to humans, *Psychopharmacology (Berl)* 141, 385-394.

HANEY, M., HART, C. L., VOSBURG, S. K., NASSER, J., BENNETT, A., ZUBARAN, C. y FOLTIN, R. W., 2004, Marijuana withdrawal in humans: effects of oral THC or divalproex, *Neuropsychopharmacology* 29, 158-170.

HANUS, L., ABU-LAFI, S., FRIDE, E., BREUER, A., VOGEL, Z., SHALEV, D. E., KUSTANOVICH, I. y MECHOULAM, R., 2001, 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3662-3665.

HARRIS, R. A. y HITZEMANN, R. J., 1981, Membrane fluidity and alcohol actions, *Curr Alcohol* 8, 379-404.

HARRIS, R. A., MCQUILKIN, S. J., PAYLOR, R., ABELIOVICH, A., TONEGAWA, S. y WEHNER, J. M., 1995a, Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3658-3662.

HARRIS, R. A., PROCTOR, W. R., MCQUILKIN, S. J., KLEIN, R. L., MASCIA, M. P., WHATLEY, V., WHITING, P. J. y DUNWIDDIE, T. V., 1995b, Ethanol increases GABA<sub>A</sub> responses in cells stably transfected with receptor subunits, *Alcohol Clin Exp Res* 19, 226-232.

HARRIS, R. A., 1999, Ethanol actions on multiple ion channels: which are important?, *Alcohol Clin Exp Res* 23, 1563-1570.

HENDRICKSON, R. J., CAHILL, P. A., MCKILLOP, I. H., SITZMANN, J. V. y REDMOND, E. M., 1998, Ethanol inhibits mitogen activated protein kinase activity and growth of vascular smooth muscle cells in vitro, *Eur J Pharmacol* 362, 251-259.

HERKENHAM, M., LYNN, A. B., LITTLE, M. D., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S., DE COSTA, B. R. y RICE, K. C., 1990, Cannabinoid receptor localization in brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1932-1936.

HERKENHAM, M., LYNN, A.B., DE-COSTA, B.R. y RICHFIELD, E.K., 1991a, Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat, *Brain Research* 547, 267-274.

HERKENHAM, M., LYNN, A.B., JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S., DE-COSTA, B.R. y RICE, K.C., 1991b, Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study, *J Neurosci* 11, 563-583.

HERMANN, H., MARSICANO, G. y LUTZ, B., 2002, Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain, *Neuroscience* 109, 451-460.

HERRING, A. C., FAUBERT KAPLAN, B. L. y KAMINSKI, N. E., 2001, Modulation of CREB and NF-kappaB signal transduction by cannabimol in activated thymocytes, *Cell Signal* 13, 241-250.

HERTEL, P., NOMIKOS, G. G. y SVENSSON, T. H., 1999, The antipsychotic drug risperidone interacts with auto- and hetero-receptors regulating serotonin output in the rat frontal cortex, *Neuropharmacology* 38, 1175-1184.

HIGGINS, G. A., TOMKINS, D. M., FLETCHER, P. J. y SELLERS, E. M., 1992, Effect of drugs influencing 5-HT function on ethanol drinking and feeding behaviour in rats: studies using a drinkometer system, *Neurosci Biobehav Rev* 16, 535-552.

HILLARD, C. J., EDGEMOND, W. S., JARRAHIAN, A. y CAMPBELL, W. B., 1997, Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion, *J Neurochem* 69, 631-638.

HJORTH, S. y MAGNUSSON, T., 1988, The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338, 463-471.

HJORTH, S. y TAO, R., 1991, The putative 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist CP-93,129 suppresses rat hippocampal 5-HT release in vivo: comparison with RU 24969, *Eur J Pharmacol* 209, 249-252.

HODGE, C. W., SAMSON, H. H. y CHAPPELLE, A. M., 1997, Alcohol self-administration: further examination of the role of dopamine receptors in the nucleus accumbens, *Alcohol Clin Exp Res* 21, 1083-1091.

HOFFMAN, A.F. y LUPICA, C.R., 2000, Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA<sub>A</sub> synaptic transmission in the hippocampus, *J Neurosci* 20, 2470-2479.

HOFFMAN, P. L. y TABAKOFF, B., 1994, The role of the NMDA receptor in ethanol withdrawal, *EXS* 71, 61-70.

HOFFMAN, P. L., 1995, Glutamate receptors in alcohol withdrawal-induced neurotoxicity, *Metab Brain Dis* 10, 73-79.

HOHMANN, A.G. y HERKENHAM, M., 2000, Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study., *Synapse* 37, 71-80.

HOWLETT, A. C., 1995, Pharmacology of cannabinoid receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 607-634.

HOWLETT, A.C., BARTH, F., BONNER, T.I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W.A., FELDER, C.C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B.R., MECHOULAM, R. y PERTWEE, R.G., 2002, International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors, *Pharmacol Rev* 54, 161-202.

HOYER, D., PAZOS, A., PROBST, A. y PALACIOS, J. M., 1986, Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT<sub>1A</sub> recognition sites. Apparent absence of 5-HT<sub>1B</sub> recognition sites, *Brain Res* 376, 85-96.

HOYER, D., CLARKE, D. E., FOZARD, J. R., HARTIG, P. R., MARTIN, G. R., MYLECHARANE, E. J., SAXENA, P. R. y HUMPHREY, P. P., 1994, International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin), *Pharmacol Rev* 46, 157-203.

HSIEH, C., BROWN, S., DERLETH, C. y MACKIE, K., 1999, Internalization and recycling of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor, *J Neurochem* 73, 493-501.

HUANG, C.C., LO, S.W. y HSU, K.S., 2001, Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons, *J Physiol* 532, 731-748.

HUESTIS, M. A., MITCHELL, J. M. y CONE, E. J., 1996, Urinary excretion profiles of 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol in humans after single smoked doses of marijuana, *J Anal Toxicol* 20, 441-452.

HUNGUND, B. L. y BASAVARAJAPPA, B. S., 2000, Are anandamide and cannabinoid receptors involved in ethanol tolerance? A review of the evidence, *Alcohol Alcohol* 35, 126-133.

HUNGUND, B. L., SZAKALL, I., ADAM, A., BASAVARAJAPPA, B. S. y VADASZ, C., 2003, Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens, *J Neurochem* 84, 698-704.

HUNT, W. A., 1983, The effect of ethanol on GABAergic transmission, *Neurosci Biobehav Rev* 7, 87-95.

HUNT, W. A., 1996, Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain, *Alcohol* 13, 147-151.

HUTCHESON, D.M., TZAVARA, E.T., SMADJA, C., VALJENT, E., ROQUES, B.P., HANOUNE, J. y MALDONADO, R., 1998, Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with THC, *Br J Pharmacol* 125, 1567-1577.

HUTSON, P. H., SARNA, G. S., O'CONNELL, M. T. y CURZON, G., 1989, Hippocampal 5-HT synthesis and release in vivo is decreased by infusion of 8-OHDPAT into the nucleus raphe dorsalis, *Neurosci Lett* 100, 276-280.

IKEDA, M., LEVITT, M. y UDEFRIEND, S., 1965, Hydroxylation of Phenylalanine by Purified Preparations of Adrenal and Brain Tyrosine Hydroxylase, *Biochem Biophys Res Commun* 18, 482-488.

IKEDA, M., FAHIEN, L. A. y UDEFRIEND, S., 1966, A kinetic study of bovine adrenal tyrosine hydroxylase, *J Biol Chem* 241, 4452-4456.

IKEDA, M., LEVITT, M. y UDEFRIEND, S., 1967, Phenylalanine as substrate and inhibitor of tyrosine hydroxylase, *Arch Biochem Biophys* 120, 420-427.

IMAI, H., PARK, M. R., STEINDLER, D. A. y KITAI, S. T., 1986a, The morphology and divergent axonal organization of midbrain raphe projection neurons in the rat, *Brain Dev* 8, 343-354.

IMAI, H., STEINDLER, D. A. y KITAI, S. T., 1986b, The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat, *J Comp Neurol* 243, 363-380.

INVERNIZZI, R., CARLI, M., DI CLEMENTE, A. y SAMANIN, R., 1991, Administration of 8-hydroxy-2-(Di-n-propylamino)tetralin in raphe nuclei dorsalis and medianus reduces serotonin synthesis in the rat brain: differences in potency and regional sensitivity, *J Neurochem* 56, 243-247.

IORIO, K. R., REINLIB, L., TABAKOFF, B. y HOFFMAN, P. L., 1992, Chronic exposure of cerebellar granule cells to ethanol results in increased N-methyl-D-aspartate receptor function, *Mol Pharmacol* 41, 1142-1148.

ISHAC, E.J., JIANG, L., LAKE, K.D., VARGA, K., ABOOD, M.E. y KUNOS, G., 1996, Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors on peripheral sympathetic nerves, *Br J Pharmacol* 118, 2023-2028.

IVERSEN, L. L., ROGAWSKI, M. A. y MILLER, R. J., 1976, Comparison of the effects of neuroleptic drugs on pre- and postsynaptic dopaminergic mechanisms in the rat striatum, *Mol Pharmacol* 12, 251-262.

JACOBS, B. L. y AZMITIA, E. C., 1992, Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol Rev* 72, 165-229.

JANKOWSKA, E. y KOSTOWSKI, W., 1995, The effect of tropisetron injected into the nucleus accumbens septi on ethanol consumption in rats, *Alcohol* 12, 195-198.

JENTSCH, J.D., ANDRUSIAK, E., TRAN, A., BOWERS, M.B. y ROTH, R.H., 1997, THC increases prefrontal cortical catecholaminergic utilization and impairs spatial working memory in the rat: blockade of dopaminergic effects with HA966., *Neuropsychopharmacology* 16, 426-432.

JIN, W., BROWN, S., ROCHE, J. P., HSIEH, C., CELVER, J. P., KOVOOR, A., CHAVKIN, C. y MACKIE, K., 1999, Distinct domains of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization, *J Neurosci* 19, 3773-3780.

JOHNSON, E. A., TSAI, C. E., SHAHAN, Y. H. y AZZARO, A. J., 1993, Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors mediate inhibition of tyrosine hydroxylation in rat striatum, *J Pharmacol Exp Ther* 266, 133-141.

JOLAS, T., HAJ-DAHMANE, S., KIDD, E. J., LANGLOIS, X., LANFUMEY, L., FATTACCINI, C. M., VANTALON, V., LAPORTE, A. M., ADRIEN, J. y GOZLAN, H., 1994, Central pre- and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rats treated chronically with a novel antidepressant, cericlamine, *J Pharmacol Exp Ther* 268, 1432-1443.

KALLURI, H. S. y TICKU, M. K., 2002a, Ethanol-mediated inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in mouse brain, *Eur J Pharmacol* 439, 53-58.

KALLURI, H. S. y TICKU, M. K., 2002b, Role of GABA<sub>A</sub> receptors in the ethanol-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase, *Eur J Pharmacol* 451, 51-54.

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

KATHMANN, M., BAUER, U., SCHLICKER, E. y GOTHERT, M., 1999, Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359, 466-470.

KATONA, I., SPERLAGH, B., SIK, A., KAFALVI, A., VIZI, E.S., MACKIE, K. y FREUND, T.F., 1999, Presynaptically located CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons, *J Neurosci* 19, 4544-4558.

KAUFMAN, R.S. y FISHER, D.B., 1974, Pterin-requiring aromatic acid hydroxylases., en: *Molecular mechanism of oxigen activation*, ed. HAYAISHI, O. (Academic press., New York) p. 809-816.

KAWAHARA, Y., KAWAHARA, H. y WESTERINK, B.H., 1999, Tonic regulation of the activity of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of the conscious rat studied by dual-probe microdialysis, *Brain Res* 823, 42-48.

KAWASAKI, H., WATANABE, S. y UEKI, S., 1980, Effects of chronic administration of THC on the cardiovascular system, and pressor and behavioral responses to brain stimulation in freely moving rats, *Eur J Pharmacol* 65, 63-69.

KEBABIAN, J. W. y CALNE, D. B., 1979, Multiple receptors for dopamine, *Nature* 277, 93-96.

KEHR, W., CARLSSON, A., LINDQVIST, M., MAGNUSSON, T. y ATACK, C., 1972, Evidence for a receptor-mediated feedback control of striatal tyrosine hydroxylase activity, *J Pharm Pharmacol* 24, 744-747.

KEHR, W., CARLSSON, A. y LINDQVIST, M., 1977a, Catecholamine synthesis in rat brain after axotomy: interaction between apomorphine and haloperidol, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 297, 111-117.

KEHR, W., SPECKENBACH, W. y ZIMMERMANN, R., 1977b, Interaction of haloperidol and gamma-butyrolactone with (+)-amphetamine-induced changes in monoamine synthesis and metabolism in rat brain, *J Neural Transm* 40, 129-147.

KIIANMAA, K., 1980, Alcohol intake and ethanol intoxication in the rat: effect of a 6-OHDA-induced lesion of the ascending noradrenaline pathways, *Eur J Pharmacol* 64, 9-19.

KISS, J. P., ZSILLA, G., MIKE, A., ZELLES, T., TOTH, E., LAJTHA, A. y VIZI, E. S., 1995, Subtype-specificity of the presynaptic alpha 2-adrenoceptors modulating hippocampal norepinephrine release in rat, *Brain Res* 674, 238-244.

KLEIN, T. W., NEWTON, C. y FRIEDMAN, H., 1998, Cannabinoid receptors and the cytokine network, *Adv Exp Med Biol* 437, 215-222.

KLEVEN, M., YBEMA, C., CARILLA, E., HAMON, M. y KOEK, W., 1995, Modification of behavioral effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin following chronic ethanol consumption in the rat: evidence for the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in ethanol dependence, *Eur J Pharmacol* 281, 219-228.

KNOBELMAN, D. A., KUNG, H. F. y LUCKI, I., 2000, Regulation of extracellular concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in mouse striatum by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors, *J Pharmacol Exp Ther* 292, 1111-1117.

KOFALVI, A., VIZI, E. S., LEDENT, C. y SPERLAGH, B., 2003, Cannabinoids inhibit the release of [3H]glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB<sub>1</sub> receptor-independent action, *Eur J Neurosci* 18, 1973-1978.

KOOB, G. F. y WEISS, F., 1992, Neuropharmacology of cocaine and ethanol dependence, *Recent Dev Alcohol* 10, 201-233.

KOOB, G. F., SANNA, P. P. y BLOOM, F. E., 1998, Neuroscience of addiction, *Neuron* 21, 467-476.

KOOB, G. F., 2000, Animal models of craving for ethanol, *Addiction* 95 Suppl 2, S73-81.

KOOB, G.F., 1992, Neural mechanisms of drug reinforcement., *Ann N Y Acad Sci* 654, 171-191.

KORPI, E. y SEPPALA, T., 1998, Alcohol: mechanism of action, interactions and treatment of alcohol abuse, *Duodecim* 114, 1029-1036.

KOSTOWSKI, W., DYR, W. y KRZASCIK, P., 1993, The abilities of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ICS 205-930 to inhibit alcohol preference and withdrawal seizures in rats, *Alcohol* 10, 369-373.

KOURI, E. M., POPE, H. G., JR. y LUKAS, S. E., 1999, Changes in aggressive behavior during withdrawal from long-term marijuana use, *Psychopharmacology (Berl)* 143, 302-308.

KRAPIVINSKY, G., KRAPIVINSKY, L., MANASIAN, Y., IVANOV, A., TYZIO, R., PELLEGRINO, C., BEN-ARI, Y., CLAPHAM, D. E. y MEDINA, I., 2003, The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR<sub>2B</sub> and RasGRF1, *Neuron* 40, 775-784.

KREISS, D. S. y LUCKI, I., 1994, Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei, *J Pharmacol Exp Ther* 269, 1268-1279.

KREITZER, A. C. y REGEHR, W. G., 2001a, Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids, *J Neurosci* 21, RC174.

KREITZER, A. C. y REGEHR, W. G., 2001b, Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells, *Neuron* 29, 717-727.

LADURON, P. M., 1985, Presynaptic heteroreceptors in regulation of neuronal transmission, *Biochem Pharmacol* 34, 467-470.

LAEMMLI, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.

LALLEMAND, F., SOUBRIE, P. y DE WITTE, P., 2004, Effects of CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor blockade on ethanol preference after chronic alcohol administration combined with repeated re-exposures and withdrawals, *Alcohol Alcohol* 39, 486-492.

LAMBERT, D.M. y DI MARZO, V., 1999, The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic?, *Curr Med Chem* 6, 757-773.

LANDS, W. E., 1998, A review of alcohol clearance in humans, *Alcohol* 15, 147-160.

LANGER, S. Z., 1974, Presynaptic regulation of catecholamine release, *Biochem Pharmacol* 23, 1793-1800.

LANGER, S. Z., 1997, 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives, *Trends Pharmacol Sci* 18, 95-99.

LASCHINSKI, G., KITTNER, B. y BRAUTIGAM, M., 1986, Direct inhibition of tyrosine hydroxylase from PC-12 cells by catechol derivatives, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 332, 346-350.

LAWFORD, B. R., YOUNG, R. M., ROWELL, J. A., QUALICHEFSKI, J., FLETCHER, B. H., SYNDULKO, K., RITCHIE, T. y NOBLE, E. P., 1995, Bromocriptine in the treatment of alcoholics with the D<sub>2</sub> dopamine receptor A1 allele, *Nat Med* 1, 337-341.

LE POUL, E., LAARIS, N., DOUCET, E., LAPORTE, A. M., HAMON, M. y LANFUMEY, L., 1995, Early desensitization of somato-dendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352, 141-148.

LEDENT, C., VALVERDE, O., COSSU, G., PETITET, F., AUBERT, J.F., BESLOT, F., BOHME, G.A., IMPERATO, A., PEDRAZZINI, T., ROQUES, B.P., VASSART, G., FRATTA, W. y PARMENTIER, M., 1999, Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB<sub>1</sub> receptor knockout mice, *Science* 283, 401-404.

LEHMANN, J. y LANGER, S. Z., 1982, Dopamine autoreceptors differ pharmacologically from postsynaptic dopamine receptors: effects of (-)-N-(2-chloroethyl)-norapomorphine, *Eur J Pharmacol* 77, 85-86.

LEPORE, M., VOREL, S. R., LOWINSON, J. y GARDNER, E. L., 1995, Conditioned place preference induced by THC: comparison with cocaine, morphine, and food reward, *Life Sci* 56, 2073-2080.

LEPORE, M., LIU, X., SAVAGE, V., MATALON, D. y GARDNER, E. L., 1996, Genetic differences in THC-induced facilitation of brain stimulation reward as measured by a rate-frequency curve-shift electrical brain stimulation paradigm in three different rat strains, *Life Sci* 58, PL365-372.

LEVENES, C., DANIEL, H., SOUBRIE, P. y CREPEL, F., 1998, Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells, *J Physiol* 510 (Pt 3), 867-879.

LI, C., PEOPLES, R. W. y WEIGHT, F. F., 1994, Alcohol action on a neuronal membrane receptor: evidence for a direct interaction with the receptor protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8200-8204.

LICHTMAN, A. H., WILEY, J. L., LAVECCHIA, K. L., NEVIASER, S. T., ARTHUR, D. B., WILSON, D. M. y MARTIN, B. R., 1998, Effects of SR 141716A after acute or chronic cannabinoid administration in dogs, *Eur J Pharmacol* 357, 139-148.

LIMA-LANDMAN, M. T. y ALBUQUERQUE, E. X., 1989, Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells, *FEBS Lett* 247, 61-67.

LINDGREN, N., GOINY, M., HERRERA-MARSCHITZ, M., HAYCOCK, J. W., HOKFELT, T. y FISONE, G., 2002, Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by depolarization stimulates tyrosine hydroxylase phosphorylation and dopamine synthesis in rat brain, *Eur J Neurosci* 15, 769-773.

LITTLE, H. J., DOLIN, S. J. y HALSEY, M. J., 1986, Calcium channel antagonists decrease the ethanol withdrawal syndrome, *Life Sci* 39, 2059-2065.

LITTLE, H. J., 1999, The contribution of electrophysiology to knowledge of the acute and chronic effects of ethanol, *Pharmacol Ther* 84, 333-353.

LITTLETON, J., 1998, Neurochemical mechanisms underlying alcohol withdrawal, *Alcohol Health Res World* 22, 13-24.

LOVENBERG, W., WEISSBACH, H. y UDENFRIEND, S., 1962, Aromatic L-amino acid decarboxylase, *J Biol Chem* 237, 89-93.

LOVINGER, D. M., WHITE, G. y WEIGHT, F. F., 1989, Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons, *Science* 243, 1721-1724.

LOVINGER, D. M., 1991, Ethanol potentiation of 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated ion current in NCB-20 neuroblastoma cells, *Neurosci Lett* 122, 57-60.

LOVINGER, D. M. y WHITE, G., 1991, Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons, *Mol Pharmacol* 40, 263-270.

LYNCH, M. A. y LITTLETON, J. M., 1985, Enhanced [3H]-noradrenaline release in synaptosomes from ethanol-tolerant animals: the role of nerve terminal calcium ion concentrations, *Alcohol Alcohol* 20, 5-11.

LYNCH, M. A., ARCHER, E. R. y LITTLETON, J. M., 1986, Increased sensitivity of transmitter release to calcium in ethanol tolerance, *Biochem Pharmacol* 35, 1207-1209.

MA, F. Y., GRATTAN, D. R., BOBROVSKAYA, L., DUNKLEY, P. R. y BUNN, S. J., 2004, Angiotensin II regulates tyrosine hydroxylase activity and mRNA expression in rat mediobasal hypothalamic cultures: the role of specific protein kinases, *J Neurochem* 90, 431-441.

MACEY, D. J., SCHULTEIS, G., HEINRICHS, S. C. y KOOB, G. F., 1996, Time-dependent quantifiable withdrawal from ethanol in the rat: effect of method of dependence induction, *Alcohol* 13, 163-170.

MACKIE, K. y HILLE, B., 1992, Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells., *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3825-3829.

MACKIE, K., LAI, Y., WESTENBROEK, R. y MITCHELL, R., 1995, Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor, *J Neurosci* 15, 6552-6561.

MACLENNAN, S. J., REYNEN, P. H., KWAN, J. y BONHAUS, D. W., 1998, Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors, *Br J Pharmacol* 124, 619-622.

MAEJIMA, T., OHNO-SHOSAKU, T. y KANO, M., 2001, Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals, *Neurosci Res* 40, 205-210.

MAILLEUX, P. y VANDERHAEGHEN, J.J., 1992, Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry, *Neuroscience* 48, 655-668.

MAILLEUX, P. y VANDERHAEGHEN, J. J., 1993, Dopaminergic regulation of cannabinoid receptor mRNA levels in the rat caudate-putamen: an in situ hybridization study, *J Neurochem* 61, 1705-1712.

MALDONADO, R., 2002, Study of cannabinoid dependence in animals, *Pharmacol Ther* 95, 153-164.

MALDONADO, R. y RODRIGUEZ DE FONSECA, F., 2002, Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates, *J Neurosci* 22, 3326-3331.

MALONE, D. T. y TAYLOR, D. A., 2001, Involvement of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in THC-induced hypothermia in the rat, *Pharmacol Biochem Behav* 69, 595-601.

MALONE, D.T. y TAYLOR, D.A., 1999, Modulation by fluoxetine of striatal dopamine release following THC: a microdialysis study in conscious rats, *Br J Pharmacol* 128, 21-26.

MANEUF, Y.P. y BROTCHE, J.M., 1997, Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices., *Br J Pharmacol* 120, 1397-1398.

MANSBACH, R. S., NICHOLSON, K. L., MARTIN, B. R. y BALSTER, R. L., 1994, Failure of THC and CP 55,940 to maintain intravenous self-administration under a fixed-interval schedule in rhesus monkeys, *Behav Pharmacol* 5, 219-225.

MANZANARES, J., CORCHERO, J., ROMERO, J., FERNANDEZ-RUIZ, J.J., RAMOS, J.A. y FUENTES, J.A., 1999, Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids, *Trends Pharmacol Sci* 20, 287-294.

MANZONI, O.J. y BOCKAERT, J., 2001, Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens., *Eur J Pharmacol* 412, R3-5.

MARINISSEN, M. J. y GUTKIND, J. S., 2001, G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms, *Trends Pharmacol Sci* 22, 368-376.

MARSICANO, G. y LUTZ, B., 1999, Expression of the cannabinoid receptor CB<sub>1</sub> in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain, *Eur J Neurosci* 11, 4213-4225.

MARTELLOTTA, M.C., COSSU, G., FATTORE, L., GESSA, G.L. y FRATTA, W., 1998, Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in drug-naive mice, *Neuroscience* 85, 327-330.

MARTIN, B. R., COMPTON, D. R., THOMAS, B. F., PRESCOTT, W. R., LITTLE, P. J., RAZDAN, R. K., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S., MECHOULAM, R. y WARD, S. J., 1991, Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs, *Pharmacol Biochem Behav* 40, 471-478.

MARTINEZ-VARGAS, M., MURILLO-RODRIGUEZ, E., GONZALEZ-RIVERA, R., LANDA, A., MENDEZ-DIAZ, M., PROSPRO-GARCIA, O. y NAVARRO, L., 2003, Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats, *Neuroscience* 117, 197-201.

MARTIN-RUIZ, R. y UGEDO, L., 2001, Electrophysiological evidence for postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor control of dorsal raphe 5-HT neurones, *Neuropharmacology* 41, 72-78.

MASCIA, M. P., MACHU, T. K. y HARRIS, R. A., 1996, Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anaesthetics, *Br J Pharmacol* 119, 1331-1336.

MASCIA, M. S., OBINU, M. C., LEDENT, C., PARMENTIER, M., BOHME, G. A., IMPERATO, A. y FRATTA, W., 1999, Lack of morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor knockout mice, *Eur J Pharmacol* 383, R1-2.

MASON, C. S., SPRINGER, C. J., COOPER, R. G., SUPERTI-FURGA, G., MARSHALL, C. J. y MARAIS, R., 1999, Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation, *Embo J* 18, 2137-2148.

MASON, S. T., CORCORAN, M. E. y FIBIGER, H. C., 1979, Noradrenaline and ethanol intake in the rat, *Neurosci Lett* 12, 137-142.

MASSERANO, J. M. y WEINER, N., 1981, The rapid activation of tyrosine hydroxylase by the subcutaneous injection of formaldehyde, *Life Sci* 29, 2025-2029.

MASSERANO, J. M., KAROUM, F. y WYATT, R. J., 1999, SR 141716A, a CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor antagonist, potentiates the locomotor stimulant effects of amphetamine and apomorphine, *Behav Pharmacol* 10, 429-432.

MATO, S., PAZOS, A. y VALDIZAN, E. M., 2002, Cannabinoid receptor antagonism and inverse agonism in response to SR141716A on cAMP production in human and rat brain, *Eur J Pharmacol* 443, 43-46.

MATOS, F. F., KORPINEN, C. y YOCCA, F. D., 1996, 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist effects of BMY-14802 on serotonin release in dorsal raphe and hippocampus, *Eur J Pharmacol* 317, 49-54.

MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTEIN, M.J., YOUNG, A.C. y BONNER, T.I., 1990, Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature* 346, 561-564.

MATSUNAGA, T., IWAWAKI, Y., WATANABE, K., YAMAMOTO, I., KAGEYAMA, T. y YOSHIMURA, H., 1995, Metabolism of THC by cytochrome P450 isozymes purified from hepatic microsomes of monkeys, *Life Sci* 56, 2089-2095.

MAURA, G., BONANNO, G. y RAITERI, M., 1992, Presynaptic alpha 2-adrenoceptors mediating inhibition of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine release in rat cerebral cortex: further characterization as different alpha 2-adrenoceptor subtypes, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345, 410-416.

MAZZUCHELLI, C., VANTAGGIATO, C., CIAMEI, A., FASANO, S., PAKHOTIN, P., KREZEL, W., WELZL, H., WOLFER, D. P., PAGES, G., VALVERDE, O., MAROWSKY, A., PORRAZZO, A., ORBAN, P. C., MALDONADO, R., EHRENGRUBER, M. U., CESTARI, V., LIPP, H. P., CHAPMAN, P. F., POUYSSEGUR, J. y BRAMBILLA, R., 2002, Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory, *Neuron* 34, 807-820.

MCBRIDE, W. J., MURPHY, J. M., GATTO, G. J., LEVY, A. D., LUMENG, L. y LI, T. K., 1991, Serotonin and dopamine systems regulating alcohol intake, *Alcohol Alcohol Suppl* 1, 411-416.

MCBRIDE, W. J., CHERNET, E., DYR, W., LUMENG, L. y LI, T. K., 1993a, Densities of dopamine D<sub>2</sub> receptors are reduced in CNS regions of alcohol-preferring P rats, *Alcohol* 10, 387-390.

MCBRIDE, W. J., CHERNET, E., RABOLD, J. A., LUMENG, L. y LI, T. K., 1993b, 5-HT<sub>2</sub> receptors in the CNS of alcohol-preferring and -nonpreferring rats, *Pharmacol Biochem Behav* 46, 631-636.

MCBRIDE, W. J., GUAN, X. M., CHERNET, E., LUMENG, L. y LI, T. K., 1994, Regional 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the CNS of alcohol-preferring and -nonpreferring rats, *Pharmacol Biochem Behav* 49, 7-12.

MCBRIDE, W. J., BODART, B., LUMENG, L. y LI, T. K., 1995, Association between low contents of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens and high alcohol preference, *Alcohol Clin Exp Res* 19, 1420-1422.

MCGREGOR, I.S., ISSAKIDIS, C.N. y PRIOR, G., 1996, Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats, *Pharmacol Biochem Behav* 53, 657-664.

MCKERNAN, R. M. y WHITING, P. J., 1996, Which GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes really occur in the brain?, *Trends Neurosci* 19, 139-143.

MCPARTLAND, J. M. y GLASS, M., 2003, Functional mapping of cannabinoid receptor homologs in mammals, other vertebrates, and invertebrates, *Gene* 312, 297-303.

MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N. E., SCHATZ, A. R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B. R. y COMPTON, D. R., 1995, Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors, *Biochem Pharmacol* 50, 83-90.

MECHOULAM, R., FRIDE, E., HANUS, L., SHESKIN, T., BISOGNO, T., DI MARZO, V., BAYEWITCH, M. y VOGEL, Z., 1997, Anandamide may mediate sleep induction, *Nature* 389, 25-26.

MEHTA, A. K. y TICKU, M. K., 1999a, An update on GABA<sub>A</sub> receptors, *Brain Res Brain Res Rev* 29, 196-217.

MEHTA, A. K. y TICKU, M. K., 1999b, Prevalence of the GABA<sub>A</sub> receptor assemblies containing alpha1-subunit in the rat cerebellum and cerebral cortex as determined by immunoprecipitation: lack of modulation by chronic ethanol administration, *Brain Res Mol Brain Res* 67, 194-199.

MELIS, M., GESSA, G.L. y DIANA, M., 2000, Different mechanisms for dopaminergic excitation induced by opiates and cannabinoids in the rat midbrain, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24, 993-1006.

MENDELSON, J. H., 1987, Marihuana, en: *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, ed. MELTZER, H.Y. (Raven Press, New York) p. 1565-1571.

MENDELSON, J. H., WOODS, B. T., CHIU, T. M., MELLO, N. K., LUKAS, S. E., TEOH, S. K., SINTAVANARONG, P., COCHIN, J., HOPKINS, M. A. y DOBROSIELSKI, M., 1990, In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of alcohol in human brain, *Alcohol* 7, 443-447.

MENDELSON, W. B. y BASILE, A. S., 1999, The hypnotic actions of oleamide are blocked by a cannabinoid receptor antagonist, *Neuroreport* 10, 3237-3239.

MENDELSON, W. B. y BASILE, A. S., 2001, The hypnotic actions of the fatty acid amide, oleamide, *Neuropsychopharmacology* 25, S36-39.

MENDIGUREN, A. y PINEDA, J., 2004, Cannabinoid enhance N-methyl-D-aspartate-induced excitation of locus coeruleus neurons by CB<sub>1</sub> receptors in rat brain slices, *Neurosci Lett* 363, 1-5.

MENDLIN, A., MARTIN, F. J., RUETER, L. E. y JACOBS, B. L., 1996, Neuronal release of serotonin in the cerebellum of behaving rats: an in vivo microdialysis study, *J Neurochem* 67, 617-622.

MESSING, R. O., SNEADE, A. B. y SAVIDGE, B., 1990, Protein kinase C participates in up-regulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels by ethanol, *J Neurochem* 55, 1383-1389.

MIDDLEMISS, D. N. y HUTSON, P. H., 1990, The 5-HT<sub>1B</sub> receptors, *Ann N Y Acad Sci* 600, 132-147.

MILLAN, M. J., 2000, Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors, *J Pharmacol Exp Ther* 295, 853-861.

MILLER, A. S. y WALKER, J. M., 1998, Local effects of cannabinoids on spontaneous activity and evoked inhibition in the globus pallidus, *Eur J Pharmacol* 352, 199-205.

MIRSHAHI, T. y WOODWARD, J. J., 1995, Ethanol sensitivity of heteromeric NMDA receptors: effects of subunit assembly, glycine and NMDA<sub>R1</sub> Mg(2+)-insensitive mutants, *Neuropharmacology* 34, 347-355.

MISNER, D.L. y SULLIVAN, J.M., 1999, Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons., *J Neurosci* 19, 6795-6805.

MOLDRICH, G. y WENGER, T., 2000, Localization of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study, *Peptides* 21, 1735-1742.

MONGEAU, R., BLIER, P. y DE MONTIGNY, C., 1993, In vivo electrophysiological evidence for tonic activation by endogenous noradrenaline of alpha 2-adrenoceptors on 5-hydroxytryptamine terminals in the rat hippocampus, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347, 266-272.

MONORY, K., TZAVARA, E. T., LEXIME, J., LEDENT, C., PARMENTIER, M., BORSODI, A. y HANOUNE, J., 2002, Novel, not adenylyl cyclase-coupled cannabinoid binding site in cerebellum of mice, *Biochem Biophys Res Commun* 292, 231-235.

MONTI, J. M. y ALTERWAIN, P., 1991, Ritanserin decreases alcohol intake in chronic alcoholics, *Lancet* 337, 60.

MORALES, M., CRIADO, J. R., SANNA, P. P., HENRIKSEN, S. J. y BLOOM, F. E., 1998, Acute ethanol induces c-fos immunoreactivity in GABAergic neurons of the central nucleus of the amygdala, *Brain Res* 798, 333-336.

MORET, C. y BRILEY, M., 1997, 5-HT autoreceptors in the regulation of 5-HT release from guinea pig raphe nucleus and hypothalamus, *Neuropharmacology* 36, 1713-1723.

MORETON, J. E. y DAVIS, W. M., 1973, Electroencephalographic study of the effects of tetrahydrocannabinols on sleep in the rat, *Neuropharmacology* 12, 897-907.

MUKHOPADHYAY, S., SHIM, J. Y., ASSI, A. A., NORFORD, D. y HOWLETT, A. C., 2002, CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling, *Chem Phys Lipids* 121, 91-109.

MUNRO, S., THOMAS, K.L. y ABU-SHAAR, M., 1993, Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature* 365, 61-65.

MURILLO-RODRIGUEZ, E., SANCHEZ-ALAVEZ, M., NAVARRO, L., MARTINEZ-GONZALEZ, D., DRUCKER-COLIN, R. y PROSPERO-GARCIA, O., 1998, Anandamide modulates sleep and memory in rats, *Brain Res* 812, 270-274.

MURILLO-RODRIGUEZ, E., CABEZA, R., MENDEZ-DIAZ, M., NAVARRO, L. y PROSPERO-GARCIA, O., 2001a, Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB<sub>1</sub> receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor, *Neuroreport* 12, 2131-2136.

MURILLO-RODRIGUEZ, E., GIORDANO, M., CABEZA, R., HENRIKSEN, S. J., MENDEZ DIAZ, M., NAVARRO, L. y PROSPERO-GARCIA, O., 2001b, Oleamide modulates memory in rats, *Neurosci Lett* 313, 61-64.

MURILLO-RODRIGUEZ, E., BLANCO-CENTURION, C., SANCHEZ, C., PIOMELLI, D. y SHIROMANI, P. J., 2003, Anandamide enhances extracellular levels of adenosine and induces sleep: an in vivo microdialysis study, *Sleep* 26, 943-947.

MURPHY, J. M., MCBRIDE, W. J., LUMENG, L. y LI, T. K., 1987, Contents of monoamines in forebrain regions of alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) lines of rats, *Pharmacol Biochem Behav* 26, 389-392.

NAGATSU, T., LEVITT, M. y UDENFRIEND, S., 1964, Conversion of L-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine by cell free preparations of brain and sympathetically innervated tissues, *Biochem Biophys Res Commun* 14, 543-549.

NAGY, J., HORVATH, C., FARKAS, S., KOLOK, S. y SZOMBATHELYI, Z., 2004, NR<sub>2B</sub> subunit selective NMDA antagonists inhibit neurotoxic effect of alcohol-withdrawal in primary cultures of rat cortical neurones, *Neurochem Int* 44, 17-23.

NAKAZI, M., BAUER, U., NICKEL, T., KATHMANN, M. y SCHLICKER, E., 2000, Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361, 19-24.

NARANJO, C. A., SELLERS, E. M. y LAWREN, M. O., 1986, Modulation of ethanol intake by serotonin uptake inhibitors, *J Clin Psychiatry* 47 Suppl, 16-22.

NARANJO, C. A., SELLERS, E. M., SULLIVAN, J. T., WOODLEY, D. V., KADLEC, K. y SYKORA, K., 1987, The serotonin uptake inhibitor citalopram attenuates ethanol intake, *Clin Pharmacol Ther* 41, 266-274.

NAVARRO, L., MARTINEZ-VARGAS, M., MURILLO-RODRIGUEZ, E., LANDA, A., MENDEZ-DIAZ, M. y PROSPERO-GARCIA, O., 2003, Potential role of the cannabinoid receptor CB<sub>1</sub> in rapid eye movement sleep rebound, *Neuroscience* 120, 855-859.

NAVARRO, M., FERNANDEZ-RUIZ, J. J., DE MIGUEL, R., HERNANDEZ, M. L., CEBEIRA, M. y RAMOS, J. A., 1993, An acute dose of THC affects behavioral and neurochemical indices of mesolimbic dopaminergic activity, *Behav Brain Res* 57, 37-46.

NEFF, N. H. y COSTA, E., 1966, The influence of monoamine oxidase inhibition on catecholamine synthesis, *Life Sci* 5, 951-959.

NEVO, I., LANGLOIS, X., LAPORTE, A. M., KLEVEN, M., KOEK, W., LIMA, L., MAUDHUIT, C., MARTRES, M. P. y HAMON, M., 1995, Chronic alcoholization alters the expression of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor subtypes in rat brain, *Eur J Pharmacol* 281, 229-239.

NICHOLSON, A. N., TURNER, C., STONE, B. M. y ROBSON, P. J., 2004, Effect of THC and cannabidiol on nocturnal sleep and early-morning behavior in young adults, *J Clin Psychopharmacol* 24, 305-313.

NISSBRANDT, H., ENGBERG, G., WIKSTROM, H., MAGNUSSON, T. y CARLSSON, A., 1988, NSD 1034: an amino acid decarboxylase inhibitor with a stimulatory action on dopamine synthesis not mediated by classical dopamine receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338, 148-161.

NOBLE, E. P., 1996, Alcoholism and the dopaminergic system: a review, *Addict Biol* 1, 333-348.

OHLIN, H., MATTIASSON, I., CHRISTENSSON, B., NYSTROM, I. y HOOD, B., 1987, [3H]noradrenaline efflux from platelets and synaptosomes of ethanol-treated rats, *Acta Physiol Scand* 129, 529-533.

OHNO-SHOSAKU, T., SHOSAKU, J., TSUBOKAWA, H. y KANO, M., 2002a, Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation, *Eur J Neurosci* 15, 953-961.

OHNO-SHOSAKU, T., TSUBOKAWA, H., MIZUSHIMA, I., YONEDA, N., ZIMMER, A. y KANO, M., 2002b, Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses, *J Neurosci* 22, 3864-3872.

OLSEN, R. W. y TOBIN, A. J., 1990, Molecular biology of GABA<sub>A</sub> receptors, *Faseb J* 4, 1469-1480.

ORBAN, P. C., CHAPMAN, P. F. y BRAMBILLA, R., 1999, Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation?, *Trends Neurosci* 22, 38-44.

ORTIZ, S., OLIVA, J. M., PEREZ-RIAL, S., PALOMO, T. y MANZANARES, J., 2004, Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor gene expression in selected regions of rat brain, *Alcohol Alcohol* 39, 88-92.

OVIEDO, A., GLOWA, J. y HERKENHAM, M., 1993, Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study, *Brain Res* 616, 293-302.

PALACIOS, J. M., WAEBER, C., BRUINVELS, A. T. y HOYER, D., 1992, Direct visualization of 5-HT<sub>1D</sub> receptors in the human brain using a new iodinated radioligand, *Brain Res Mol Brain Res* 13, 175-178.

PANDEY, P. C., UPADHYAY, S., UPADHYAY, B. C. y PATHAK, H. C., 1998, Ethanol biosensors and electrochemical oxidation of NADH, *Anal Biochem* 260, 195-203.

PANEK, D. U., AZZARO, A. J., STITZEL, R. E. y HEAD, R. J., 1987, Inhibition of tyrosine hydroxylase in rabbit mesenteric artery and vas deferens by catechol oestrogens, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 335, 243-249.

PARKER, L.A. y GILLIES, T., 1995, THC-induced place and taste aversions in Lewis and Sprague-Dawley rats, *Behav Neurosci* 109, 71-78.

PAYNE, D. M., ROSSOMANDO, A. J., MARTINO, P., ERICKSON, A. K., HER, J. H., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., WEBER, M. J. y STURGILL, T. W., 1991, Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase), *Embo J* 10, 885-892.

PAZOS, A. y PALACIOS, J. M., 1985, Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors, *Brain Res* 346, 205-230.

PAZOS, A., PROBST, A. y PALACIOS, J. M., 1987, Serotonin receptors in the human brain--III. Autoradiographic mapping of 5-HT<sub>1</sub> receptors, *Neuroscience* 21, 97-122.

PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B. E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. y COBB, M. H., 2001, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr Rev* 22, 153-183.

PEOPLES, R. W. y WEIGHT, F. F., 1995, Cutoff in potency implicates alcohol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in alcohol intoxication, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2825-2829.

PEREZ-REYES, M., WHITE, W. R., McDONALD, S. A., HICKS, R. E., JEFFCOAT, A. R. y COOK, C. E., 1991, The pharmacologic effects of daily marijuana smoking in humans, *Pharmacol Biochem Behav* 40, 691-694.

PEREZ-VELAZQUEZ, J. L., VALIANTE, T. A. y CARLEN, P. L., 1994, Changes in calcium currents during ethanol withdrawal in a genetic mouse model, *Brain Res* 649, 305-309.

PERKONIGG, A., LIEB, R., HOFER, M., SCHUSTER, P., SONNTAG, H. y WITTCHEN, H. U., 1999, Patterns of cannabis use, abuse and dependence over time: incidence, progression and stability in a sample of 1228 adolescents, *Addiction* 94, 1663-1678.

PERTWEE, R. G., 1999a, Pharmacology of cannabinoid receptor ligands, *Curr Med Chem* 6, 635-664.

PERTWEE, R.G., 1997, Pharmacology of cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors, *Pharmacol Ther* 74, 129-180.

PERTWEE, R.G., 1999b, Evidence for the presence of CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors, *Life Sciences* 65, 597-605.

PETROFF, O. A., NOVOTNY, E. J., OGINO, T., AVISON, M. y PRICHARD, J. W., 1990, In vivo measurements of ethanol concentration in rabbit brain by <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy, *J Neurochem* 54, 1188-1195.

PETTIT, D. A., HARRISON, M. P., OLSON, J. M., SPENCER, R. F. y CABRAL, G. A., 1998, Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain, *J Neurosci Res* 51, 391-402.

PI, F. y GARCIA-SEVILLA, J. A., 1992, Alpha 2-autoreceptor-mediated modulation of tyrosine hydroxylase activity in noradrenergic regions of the rat brain in vivo, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345, 653-660.

PIEPPONEN, T. P., KIIANMAA, K. y AHTEE, L., 2002, Effects of ethanol on the accumbal output of dopamine, GABA and glutamate in alcohol-tolerant and alcohol-nontolerant rats, *Pharmacol Biochem Behav* 74, 21-30.

PIERCE, K. L., TOHGO, A., AHN, S., FIELD, M. E., LUTTRELL, L. M. y LEFKOWITZ, R. J., 2001, Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding, *J Biol Chem* 276, 23155-23160.

PINEYRO, G., DE MONTIGNY, C. y BLIER, P., 1995, 5-HT<sub>1D</sub> receptors regulate 5-HT release in the rat raphe nuclei. In vivo voltammetry and in vitro superfusion studies, *Neuropsychopharmacology* 13, 249-260.

PIOMELLI, D., BELTRAMO, M., GLASNAPP, S., LIN, S. Y., GOUTOPOULOS, A., XIE, X. Q. y MAKRIYANNIS, A., 1999, Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5802-5807.

PITLER, T. A. y ALGER, B. E., 1994, Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism, *Neuron* 13, 1447-1455.

POMPEIANO, M., PALACIOS, J. M. y MENGOD, G., 1992, Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding, *J Neurosci* 12, 440-453.

PONCELET, M., BARNOUIN, M. C., BRELIERE, J. C., LE FUR, G. y SOUBRIE, P., 1999, Blockade of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors by SR 141716 selectively antagonizes drug-induced reinstatement of exploratory behaviour in gerbils, *Psychopharmacology (Berl)* 144, 144-150.

POUYSEGUER, J. y LENORMAND, P., 2003, Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling, *Eur J Biochem* 270, 3291-3299.

PRESCOTT, W. R., GOLD, L. H. y MARTIN, B. R., 1992, Evidence for separate neuronal mechanisms for the discriminative stimulus and catalepsy induced by THC in the rat, *Psychopharmacology (Berl)* 107, 117-124.

RAAP, D. K., GARCIA, F., MUMA, N. A., WOLF, W. A., BATTAGLIA, G. y VAN DE KAR, L. D., 1999, Sustained desensitization of hypothalamic 5-HT<sub>1A</sub> receptors after discontinuation of fluoxetine: inhibited neuroendocrine responses to 8-hydroxy-2-(Dipropylamino)Tetralin in the absence of changes in Gi/o/z proteins, *J Pharmacol Exp Ther* 288, 561-567.

RAITERI, M., MAURA, G., BONANNO, G. y PITTALUGA, A., 1986, Differential pharmacology and function of two 5-HT<sub>1</sub> receptors modulating transmitter release in rat cerebellum, *J Pharmacol Exp Ther* 237, 644-648.

RAITERI, M., MAURA, G., FOLGHERA, S., CAVAZZANI, P., ANDRIOLI, G. C., SCHLICKER, E., SCHALNUS, R. y GOTHERT, M., 1990, Modulation of 5-hydroxytryptamine release by presynaptic inhibitory alpha 2-adrenoceptors in the human cerebral cortex, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342, 508-512.

RAMER, R., BRUNE, K., PAHL, A. y HINZ, B., 2001, R(+)-methanandamide induces cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells via a non-cannabinoid receptor-mediated mechanism, *Biochem Biophys Res Commun* 286, 1144-1152.

RASSNICK, S., PULVIRENTI, L. y KOOB, G. F., 1992, Oral ethanol self-administration in rats is reduced by the administration of dopamine and glutamate receptor antagonists into the nucleus accumbens, *Psychopharmacology (Berl)* 109, 92-98.

RASSNICK, S., HEINRICH, S. C., BRITTON, K. T. y KOOB, G. F., 1993a, Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal, *Brain Res* 605, 25-32.

RASSNICK, S., PULVIRENTI, L. y KOOB, G. F., 1993b, SDZ-205,152, a novel dopamine receptor agonist, reduces oral ethanol self-administration in rats, *Alcohol* 10, 127-132.

RASSNICK, S., STINUS, L. y KOOB, G. F., 1993c, The effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in the rat, *Brain Res* 623, 16-24.

RHEE, M. H., BAYEWITCH, M., AVIDOR-REISS, T., LEVY, R. y VOGEL, Z., 1998, Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes, *J Neurochem* 71, 1525-1534.

RIAD, M., GARCIA, S., WATKINS, K. C., JODOIN, N., DOUCET, E., LANGLOIS, X., EL MESTIKAWY, S., HAMON, M. y DESCARRIES, L., 2000, Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain, *J Comp Neurol* 417, 181-194.

RINALDI-CARMONA, M., BARTH, F., HEAULME, M., SHIRE, D., CALANDRA, B., CONGY, C., MARTINEZ, S., MARUANI, J., NELIAT, G. y CAPUT, D., 1994, SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor, *FEBS Lett* 350, 240-244.

RINALDI-CARMONA, M., BARTH, F., MILLAN, J., DEROCQ, J. M., CASELLAS, P., CONGY, C., OUSTRIC, D., SARRAN, M., BOUABOULA, M., CALANDRA, B., PORTIER, M., SHIRE, D., BRELIERE, J. C. y LE FUR, G. L., 1998, SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor, *J Pharmacol Exp Ther* 284, 644-650.

ROBERTO, M., NELSON, T. E., UR, C. L. y GRUOL, D. L., 2002, Long-term potentiation in the rat hippocampus is reversibly depressed by chronic intermittent ethanol exposure, *J Neurophysiol* 87, 2385-2397.

ROBERTO, M., NELSON, T. E., UR, C. L., BRUNELLI, M., SANNA, P. P. y GRUOL, D. L., 2003, The transient depression of hippocampal CA1 LTP induced by chronic intermittent ethanol exposure is associated with an inhibition of the MAP kinase pathway, *Eur J Neurosci* 17, 1646-1654.

ROBERTS, A. J., McDONALD, J. S., HEYSER, C. J., KIEFFER, B. L., MATTHES, H. W., KOOB, G. F. y GOLD, L. H., 2000a,  $\mu$ -Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol, *J Pharmacol Exp Ther* 293, 1002-1008.

ROBERTS, C., PRICE, G. W. y JONES, B. J., 1997, The role of 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptors in the modulation of 5-hydroxytryptamine levels in the frontal cortex of the conscious guinea pig, *Eur J Pharmacol* 326, 23-30.

ROBERTS, C., HATCHER, P., HAGAN, J. J., AUSTIN, N. E., JEFFREY, P., WYMAN, P., GASTER, L. M., ROUTLEDGE, C. y MIDDLEMISS, D. N., 2000b, The effect of SB-236057-A, a selective 5-HT<sub>1B</sub> receptor inverse agonist, on in vivo extracellular 5-HT levels in the freely-moving guinea-pig, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 177-183.

ROCHE, J. P., BOUNDS, S., BROWN, S. y MACKIE, K., 1999, A mutation in the second transmembrane region of the CB<sub>1</sub> receptor selectively disrupts G protein signaling and prevents receptor internalization, *Mol Pharmacol* 56, 611-618.

RODRIGUEZ DE FONSECA, F., FERNANDEZ-RUIZ, J. J., MURPHY, L., ELDRIDGE, J. C., STEGER, R. W. y BARTKE, A., 1991, Effects of THC exposure on adrenal medullary function: evidence of an acute effect and development of tolerance in chronic treatments, *Pharmacol Biochem Behav* 40, 593-598.

RODRIGUEZ DE FONSECA, F., FERNANDEZ-RUIZ, J., MURPHY, L., CEBEIRA, M., STEGER, R. W., BARTKE, A. y RAMOS, J. A., 1992, Acute effects of THC on dopaminergic activity in several rat brain areas, *Pharmacol Biochem Behav* 42, 269-275.

RODRIGUEZ DE FONSECA, F., GORRITI, M.A., FERNANDEZ RUIZ, J.J., PALOMO, T. y RAMOS, J.A., 1994, Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic THC treatment., *Pharmacol Biochem Behav* 47, 33-40.

RODRIGUEZ DE FONSECA, F., CARRERA, M.R., NAVARRO, M., KOOB, G.F. y WEISS, F., 1997, Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal, *Science* 276, 2050-2054.

RODRIGUEZ DE FONSECA, F., DEL ARCO, I., MARTIN-CALDERON, J. L., GORRITI, M. A. y NAVARRO, M., 1998, Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity, *Neurobiol Dis* 5, 483-501.

ROIVAINEN, R., HUNDLE, B. y MESSING, R. O., 1995, Ethanol enhances growth factor activation of mitogen-activated protein kinases by a protein kinase C-dependent mechanism, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1891-1895.

ROMERO, J., GARCIA, L., CEBEIRA, M., ZADROZNY, D., FERNANDEZ-RUIZ, J.J. y RAMOS, J.A., 1995a, The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons, *Life Sciences* 56, 2033-2040.

ROMERO, J., GARCIA, L., FERNANDEZ-RUIZ, J. J., CEBEIRA, M. y RAMOS, J. A., 1995b, Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, or to THC, *Pharmacol Biochem Behav* 51, 731-737.

ROMERO, J., GARCIA-PALOMERO, E., LIN, S. Y., RAMOS, J. A., MAKRIYANNIS, A. y FERNANDEZ-RUIZ, J. J., 1996, Extrapyramidal effects of methanandamide, an analog of anandamide, the endogenous CB<sub>1</sub> receptor ligand, *Life Sci* 58, 1249-1257.

ROMERO, J., GARCIA-PALOMERO, E., CASTRO, J. G., GARCIA-GIL, L., RAMOS, J. A. y FERNANDEZ-RUIZ, J. J., 1997, Effects of chronic exposure to THC on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions, *Brain Res Mol Brain Res* 46, 100-108.

ROMERO, J., BERRENDERO, F., MANZANARES, J., PEREZ, A., CORCHERO, J., FUENTES, J. A., FERNANDEZ-RUIZ, J. J. y RAMOS, J. A., 1998, Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to THC, *Synapse* 30, 298-308.

RON, D., 2004, Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol, *Neuroscientist* 10, 325-336.

ROSEN, L. B., GINTY, D. D., WEBER, M. J. y GREENBERG, M. E., 1994, Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras, *Neuron* 12, 1207-1221.

ROSSETTI, Z. L., LONGU, G., MERCURO, G., HMAIDAN, Y. y GESSA, G. L., 1992, Biphasic effect of ethanol on noradrenaline release in the frontal cortex of awake rats, *Alcohol Alcohol* 27, 477-480.

ROTH, R. H., MORGENROTH, V. H., 3RD y SALZMAN, P. M., 1975, Tyrosine hydroxylase: allosteric activation induced by stimulation of central noradrenergic neurons, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 289, 327-343.

ROTTENBERG, H., 1986, Membrane solubility of ethanol in chronic alcoholism. The effect of ethanol feeding and its withdrawal on the protection by alcohol of rat red blood cells from hypotonic hemolysis, *Biochim Biophys Acta* 855, 211-222.

RUBINO, T., MASSI, P., PATRINI, G., VENIER, I., GIAGNONI, G. y PAROLARO, D., 1994, Chronic CP-55,940 alters cannabinoid receptor mRNA in the rat brain: an in situ hybridization study, *Neuroreport* 5, 2493-2496.

RUBINO, T., PATRINI, G., PARENTI, M., MASSI, P. y PAROLARO, D., 1997, Chronic treatment with a synthetic cannabinoid CP-55,940 alters G-protein expression in the rat central nervous system, *Brain Res Mol Brain Res* 44, 191-197.

RUBINO, T., PATRINI, G., MASSI, P., FUZIO, D., VIGANO, D., GIAGNONI, G. y PAROLARO, D., 1998, Cannabinoid-precipitated withdrawal: a time-course study of the behavioral aspect and its correlation with cannabinoid receptors and G protein expression., *J Pharmacol Exp Ther* 285, 813-819.

RUBINO, T., MASSI, P., VIGANO, D., FUZIO, D. y PAROLARO, D., 2000a, Long-term treatment with SR141716A, the CB<sub>1</sub> receptor antagonist, influences morphine withdrawal syndrome, *Life Sci* 66, 2213-2219.

RUBINO, T., VIGANO, D., COSTA, B., COLLEONI, M. y PAROLARO, D., 2000b, Loss of cannabinoid-stimulated guanosine 5'-O-(3-[(35)S]Thiotriphosphate) binding without receptor down-regulation in brain regions of anandamide-tolerant rats, *J Neurochem* 75, 2478-2484.

RUBINO, T., VIGANO, D., MASSI, P. y PAROLARO, D., 2000c, Changes in the cannabinoid receptor binding, G protein coupling, and cyclic AMP cascade in the CNS of rats tolerant to and dependent on the synthetic cannabinoid compound CP55,940, *J Neurochem* 75, 2080-2086.

RUBINO, T., VIGANO, D., MASSI, P., SPINELLO, M., ZAGATO, E., GIAGNONI, G. y PAROLARO, D., 2000d, Chronic THC treatment increases cAMP levels and cAMP-dependent protein kinase activity in some rat brain regions, *Neuropharmacology* 39, 1331-1336.

RUBINO, T., VIGANO, D., MASSI, P. y PAROLARO, D., 2001, The psychoactive ingredient of marijuana induces behavioural sensitization, *Eur J Neurosci* 14, 884-886.

RUBINO, T., FORLANI, G., VIGANO, D., ZIPPEL, R. y PAROLARO, D., 2004, Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic THC treatment, *Mol Cell Neurosci* 25, 355-362.

RUEDA, D., NAVARRO, B., MARTINEZ-SERRANO, A., GUZMAN, M. y GALVE-ROPERH, I., 2002, The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway, *J Biol Chem* 277, 46645-46650.

SAGAN, S., VENANCE, L., TORRENS, Y., CORDIER, J., GLOWINSKI, J. y GIAUME, C., 1999, Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors in cultured astrocytes, *Eur J Neurosci* 11, 691-699.

SAITO, H., MATSUMOTO, M., TOGASHI, H. y YOSHIOKA, M., 1996, Functional interaction between serotonin and other neuronal systems: focus on in vivo microdialysis studies, *Jpn J Pharmacol* 70, 203-205.

SALA, C., RUDOLPH-CORREIA, S. y SHENG, M., 2000, Developmentally regulated NMDA receptor-dependent dephosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB) in hippocampal neurons, *J Neurosci* 20, 3529-3536.

SALMELA, K. S., KAIHOVAARA, P., SALASPURO, M. y ROINE, R. P., 1996, Role of catalase in rat gastric mucosal ethanol metabolism in vitro, *Alcohol Clin Exp Res* 20, 1011-1015.

SANCHEZ, C., RUEDA, D., SEGUI, B., GALVE-ROPERH, I., LEVADE, T. y GUZMAN, M., 2001, The CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan, *Mol Pharmacol* 59, 955-959.

SANCHEZ, M. G., RUIZ-LLORENTE, L., SANCHEZ, A. M. y DIAZ-LAVIADA, I., 2003, Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction, *Cell Signal* 15, 851-859.

SANNA, E., SERRA, M., COSSU, A., COLOMBO, G., FOLLESA, P., CUCCHEDDU, T., CONCAS, A. y BIGGIO, G., 1993, Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA<sub>A</sub> and NMDA receptor function in the rat brain, *Alcohol Clin Exp Res* 17, 115-123.

SANNA, P. P., SIMPSON, C., LUTJENS, R. y KOOB, G., 2002, ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal, *Brain Res* 948, 186-191.

SANTUCCI, V., STORME, J. J., SOUBRIE, P. y LE FUR, G., 1996, Arousal-enhancing properties of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor antagonist SR 141716A in rats as assessed by electroencephalographic spectral and sleep-waking cycle analysis, *Life Sci* 58, PL103-110.

SANUDO-PENA, M. C., PATRICK, S. L., PATRICK, R. L. y WALKER, J. M., 1996, Effects of intranigral cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with the dopaminergic system, *Neurosci Lett* 206, 21-24.

SANUDO-PENA, M. C. y WALKER, J. M., 1998, Effects of intrapallidal cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with the dopaminergic system, *Synapse* 28, 27-32.

SANUDO-PENA, M. C., TSOU, K. y WALKER, J. M., 1999, Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei, *Life Sci* 65, 703-713.

SANUDO-PENA, M. C., ROMERO, J., SEALE, G. E., FERNANDEZ-RUIZ, J. J. y WALKER, J. M., 2000, Activational role of cannabinoids on movement, *Eur J Pharmacol* 391, 269-274.

SANUDO-PENA, M.C., TSOU, K., DELAY, E.R., HOHMAN, A.G., FORCE, M. y WALKER, J.M., 1997, Endogenous cannabinoids as an aversive or counter-rewarding system in the rat, *Neurosci Lett* 223, 125-128.

SARHAN, H., CLOEZ-TAYARANI, I., MASSOT, O., FILLION, M. P. y FILLION, G., 1999, 5-HT<sub>1B</sub> receptors modulate release of [3H]dopamine from rat striatal synaptosomes, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359, 40-47.

SARHAN, H. y FILLION, G., 1999, Differential sensitivity of 5-HT<sub>1B</sub> auto and heteroreceptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360, 382-390.

SARHAN, H., GRIMALDI, B., HEN, R. y FILLION, G., 2000, 5-HT<sub>1B</sub> receptors modulate release of [3H]dopamine from rat striatal synaptosomes: further evidence using 5-HT moduline, polyclonal 5-HT<sub>1B</sub> receptor antibodies and 5-HT<sub>1B</sub> receptor knock-out mice, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361, 12-18.

SARI, Y., LEFEVRE, K., BANCILA, M., QUIGNON, M., MIQUEL, M. C., LANGLOIS, X., HAMON, M. y VERGE, D., 1997, Light and electron microscopic immunocytochemical visualization of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the rat brain, *Brain Res* 760, 281-286.

SARI, Y., 2004, 5-HT<sub>1B</sub> receptors: from protein to physiological function and behavior, *Neurosci Biobehav Rev* 28, 565-582.

SASTRE COLL, A., ESTEBAN, S. y GARCIA SEVILLA, J.A., 1999, Effects of imidazoline receptor ligands on monoamine synthesis in the rat brain in vivo., *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360, 50-62.

SCHATZ, A. R., LEE, M., CONDIE, R. B., PULASKI, J. T. y KAMINSKI, N. E., 1997, Cannabinoid receptors CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system, *Toxicol Appl Pharmacol* 142, 278-287.

SCHLICKER, E., TIMM, J., ZENTNER, J. y GOTHERT, M., 1997, Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356, 583-589.

SCHLICKER, E. y KATHMANN, M., 2001, Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors, *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 565-572.

SCHMIDT, J., ANDREAS, K., DIENEL, A., FISCHER, H. D. y WUSTMANN, C., 1984, Ethanol preference behaviour and dopamine release in the rat, *Biomed Biochim Acta* 43, 1431-1434.

SCHWEITZER, P., 2000, Cannabinoids decrease the K<sup>+</sup> M-current in hippocampal CA1 neurons, *J Neurosci* 20, 51-58.

SEGU, L., CHAUVEAU, J., BOULENGUEZ, P., MOREL, A., LANOIR, J. y DELAAGE, M., 1991, Synthesis and pharmacological study of radioiodinated serotonin derivative specific of 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> binding sites of the central nervous system, *C R Acad Sci III* 312, 655-661.

SELLERS, E. M., HIGGINS, G. A. y SOBELL, M. B., 1992, 5-HT and alcohol abuse, *Trends Pharmacol Sci* 13, 69-75.

SHARP, T., BRAMWELL, S. R. y GRAHAME-SMITH, D. G., 1989, 5-HT<sub>1</sub> agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis, *Br J Pharmacol* 96, 283-290.

SHEN, M., PISER, T.M., SEYBOLD, V.S. y THAYER, S.A., 1996, Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures, *J Neurosci* 16, 4322-4334.

SHEN, R. Y., 2003, Ethanol withdrawal reduces the number of spontaneously active ventral tegmental area dopamine neurons in conscious animals, *J Pharmacol Exp Ther* 307, 566-572.

SHI, C., SZCZESNIAK, A., MAO, L., JOLLIMORE, C., COCA-PRADOS, M., HUNG, O. y KELLY, M. E., 2003, A3 adenosine and CB<sub>1</sub> receptors activate a PKC-sensitive Cl<sup>-</sup> current in human nonpigmented ciliary epithelial cells via a G beta gamma-coupled MAPK signaling pathway, *Br J Pharmacol* 139, 475-486.

SHIELDS, P. J. y ECCLESTON, D., 1972, Effects of electrical stimulation of rat midbrain on 5-hydroxytryptamine synthesis as determined by a sensitive radioisotope method, *J Neurochem* 19, 265-272.

SHIMAN, R., AKINO, M. y KAUFMAN, S., 1971, Solubilization and partial purification of tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla, *J Biol Chem* 246, 1330-1340.

SHIRAO, I., TSUDA, A., IDA, Y., TSUJIMARU, S., SATOH, H., OGUCHI, M., TANAKA, M. y INANAGA, K., 1988, Effect of acute ethanol administration on noradrenaline metabolism in brain regions of stressed and nonstressed rats, *Pharmacol Biochem Behav* 30, 769-773.

SHIRE, D., CARILLON, C., KAGHAD, M., CALANDRA, B., RINALDI-CARMONA, M., LE FUR, G., CAPUT, D. y FERRARA, P., 1995, An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing, *J Biol Chem* 270, 3726-3731.

SIGEL, E., BAUR, R. y MALHERBE, P., 1993, Recombinant GABA<sub>A</sub> receptor function and ethanol, *FEBS Lett* 324, 140-142.

SIM, L.J., HAMPSON, R.E., DEADWYLER, S.A. y CHILDERS, S.R., 1996, Effects of chronic treatment with THC on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain, *J Neurosci* 16, 8057-8066.

SIM-SELLEY, L.J., BRUNK, L.K. y SELLEY, D.E., 2001, Inhibitory effects of SR141716A on G-protein activation in rat brain, *Eur J Pharmacol* 414, 135-143.

SINTON, C. M. y FALLON, S. L., 1988, Electrophysiological evidence for a functional differentiation between subtypes of the 5-HT<sub>1</sub> receptor, *Eur J Pharmacol* 157, 173-181.

SKAPER, S. D., BURIANI, A., DAL TOSO, R., PETRELLI, L., ROMANELLO, S., FACCI, L. y LEON, A., 1996, The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3984-3989.

SMART, D. y JERMAN, J. C., 2000, Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor, *Trends Pharmacol Sci* 21, 134.

SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. y KLENK, D. C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* 150, 76-85.

SMITH, T. L. y NAVRATILOVA, E., 2003, The effect of ethanol exposure on mitogen-activated protein kinase activity and expression in cultured rat astrocytes, *Neurosci Lett* 341, 91-94.

SNELL, L. D., TABAKOFF, B. y HOFFMAN, P. L., 1993, Radioligand binding to the N-methyl-D-aspartate receptor/ionophore complex: alterations by ethanol in vitro and by chronic in vivo ethanol ingestion, *Brain Res* 602, 91-98.

SODERPALM, B., ERICSON, M., OLAUSSON, P., BLOMQUIST, O. y ENGEL, J. A., 2000, Nicotinic mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol, *Behav Brain Res* 113, 85-96.

SOTELO, C., CHOLLEY, B., EL MESTIKAWY, S., GOZLAN, H. y HAMON, M., 1990, Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT<sub>1A</sub> Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei, *Eur J Neurosci* 2, 1144-1154.

SPROUSE, J. S. y AGHAJANIAN, G. K., 1986, (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT<sub>1A</sub> selective agonists, *Eur J Pharmacol* 128, 295-298.

SPROUSE, J. S. y AGHAJANIAN, G. K., 1987, Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> agonists, *Synapse* 1, 3-9.

STARK, S., PACHECO, M. A. y CHILDERS, S. R., 1997, Binding of aminoalkylindoles to noncannabinoid binding sites in NG108-15 cells, *Cell Mol Neurobiol* 17, 483-493.

STARKE, K., TAUBE, H. D. y BROWSKI, E., 1977, Presynaptic receptor systems in catecholaminergic transmission, *Biochem Pharmacol* 26, 259-268.

STARKE, K., 1981, Presynaptic receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21, 7-30.

STARKE, K., 1987, Presynaptic alpha-autoreceptors, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 107, 73-146.

STARKE, K., GOTHERT, M. y KILBINGER, H., 1989, Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors, *Physiol Rev* 69, 864-989.

STARKEY, S. J. y SKINGLE, M., 1994, 5-HT<sub>1D</sub> as well as 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors modulate 5-HT release in the guinea-pig dorsal raphe nucleus, *Neuropharmacology* 33, 393-402.

STEFANO, G. B., LIU, Y. y GOLIGORSKY, M. S., 1996, Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes, *J Biol Chem* 271, 19238-19242.

STEFANO, G. B., 2000, Endocannabinoid immune and vascular signaling, *Acta Pharmacol Sin* 21, 1071-1081.

STELLA, N., SCHWEITZER, P. y PIOMELLI, D., 1997, A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation, *Nature* 388, 773-778.

STUBBS, C. D. y SLATER, S. J., 1999, Ethanol and protein kinase C, *Alcohol Clin Exp Res* 23, 1552-1560.

SUGIURA, T., KONDO, S., SUKAGAWA, A., NAKANE, S., SHINODA, A., ITOH, K., YAMASHITA, A. y WAKU, K., 1995, 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain, *Biochem Biophys Res Commun* 215, 89-97.

SULCOVA, E., MECHOULAM, R. y FRIDE, E., 1998, Biphasic effects of anandamide, *Pharmacol Biochem Behav* 59, 347-352.

SULLIVAN, J.M., 1999, Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons, *J Neurophysiol* 82, 1286-1294.

SUN, G. Y., HUANG, H. M., LEE, D. Z. y SUN, A. Y., 1984, Increased acidic phospholipids in rat brain membranes after chronic ethanol administration, *Life Sci* 35, 2127-2133.

SUZDAK, P. D., SCHWARTZ, R. D., SKOLNICK, P. y PAUL, S. M., 1986, Ethanol stimulates gamma-aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4071-4075.

SUZUKI, M., MATSUDA, T., ASANO, S., SOMBOONTHUM, P., TAKUMA, K. y BABA, A., 1995, Increase of noradrenaline release in the hypothalamus of freely moving rat by postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation, *Br J Pharmacol* 115, 703-711.

SWEATT, J. D., 2001, The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory, *J Neurochem* 76, 1-10.

SZABO, B., DORNER, L., PFREUNDTNER, C., NOREMBERG, W. y STARKE, K., 1998, Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum, *Neuroscience* 85, 395-403.

SZABO, B., MULLER, T. y KOCH, H., 1999, Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro., *J Neurochem* 73, 1084-1089.

SZABO, B., SIEMES, S. y WALLMICHATH, I., 2002, Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids, *Eur J Neurosci* 15, 2057-2061.

TABAKOFF, B. y HOFFMAN, P. L., 1996, Alcohol addiction: an enigma among us, *Neuron* 16, 909-912.

TAKEKOSHI, K., ISHII, K., NANMOKU, T., SHIBUYA, S., KAWAKAMI, Y., ISOBE, K. y NAKAI, T., 2001, Leptin stimulates catecholamine synthesis in a PKC-dependent manner in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells, *Endocrinology* 142, 4861-4871.

TANDA, G., PONTIERI, F.E. y DI-CHIARA, G., 1997, Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism, *Science* 276, 2048-2050.

TANDA, G., MUNZAR, P. y GOLDBERG, S. R., 2000, Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys, *Nat Neurosci* 3, 1073-1074.

TANDA, G. y GOLDBERG, S. R., 2003, Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms- a review of recent preclinical data, *Psychopharmacology (Berl)* 169, 115-134.

TANG, A., GEORGE, M. A., RANDALL, J. A. y GONZALES, R. A., 2003, Ethanol increases extracellular dopamine concentration in the ventral striatum in C57BL/6 mice, *Alcohol Clin Exp Res* 27, 1083-1089.

TAO, R. y HJORTH, S., 1992, Alpha 2-adrenoceptor modulation of rat ventral hippocampal 5-hydroxytryptamine release in vivo, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345, 137-143.

TARASCHI, T. F., ELLINGSON, J. S., WU, A., ZIMMERMAN, R. y RUBIN, E., 1986, Membrane tolerance to ethanol is rapidly lost after withdrawal: a model for studies of membrane adaptation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3669-3673.

THIELS, E., KANTEREWICZ, B. I., NORMAN, E. D., TRZASKOS, J. M. y KLANN, E., 2002, Long-term depression in the adult hippocampus in vivo involves activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphorylation of Elk-1, *J Neurosci* 22, 2054-2062.

TOMKINS, D. M., LE, A. D. y SELLERS, E. M., 1995, Effect of the 5-HT<sub>3</sub> antagonist ondansetron on voluntary ethanol intake in rats and mice maintained on a limited access procedure, *Psychopharmacology (Berl)* 117, 479-485.

TRENDELENBURG, A. U., STARKE, K. y LIMBERGER, N., 1994a, Presynaptic alpha 2A-adrenoceptors inhibit the release of endogenous dopamine in rabbit caudate nucleus slices, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350, 473-481.

TRENDELENBURG, A. U., TRENDELENBURG, M., STARKE, K. y LIMBERGER, N., 1994b, Release-inhibiting alpha 2-adrenoceptors at serotonergic axons in rat and rabbit brain cortex: evidence for pharmacological identity with alpha 2-autoreceptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349, 25-33.

TRENDELENBURG, A.U., COX, S.L., SCHEL, V., KLEBROFF, W., KHAIRALLAH, L. y STARKE, K., 2000, Modulation of (3)H-noradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and beta-adrenoceptors in mouse tissues, *Br J Pharmacol* 130, 321-330.

TREVISAN, L., FITZGERALD, L. W., BROSE, N., GASIC, G. P., HEINEMANN, S. F., DUMAN, R. S. y NESTLER, E. J., 1994, Chronic ingestion of ethanol up-regulates NMDA<sub>R1</sub> receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus, *J Neurochem* 62, 1635-1638.

TSOU, K., BROWN, S., SANUDO-PENA, M.C., MACKIE, K. y WALKER, J.M., 1998, Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in the rat central nervous system, *Neuroscience* 83, 393-411.

TSOU, K., MACKIE, K., SANUDO-PENA, M.C. y WALKER, J.M., 1999, Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation, *Neuroscience* 93, 969-975.

TUPALA, E. y TIIHONEN, J., 2004, Dopamine and alcoholism: neurobiological basis of ethanol abuse, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 1221-1247.

TWITCHELL, W., BROWN, S. y MACKIE, K., 1997, Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons, *J Neurophysiol* 78, 43-50.

TZAVARA, E. T., VALJENT, E., FIRMO, C., MAS, M., BESLOT, F., DEFER, N., ROQUES, B. P., HANOUNE, J. y MALDONADO, R., 2000, Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum, *Eur J Neurosci* 12, 1038-1046.

TZAVARA, E.T., PERRY, K.W., RODRIGUEZ, D.E., BYMASTER, F.P. y NOMIKOS, G.G., 2001, The cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR141716A increases norepinephrine outflow in the rat anterior hypothalamus, *Eur J Pharmacol* 426, R3-4.

TZAVARA, E.T., DAVIS, R.J., PERRY, K.W., LI, X., SALHOFF, C., BYMASTER, F.P., WITKIN, J.M. y NOMIKOS, G.G., 2003, The CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions, *Br J Pharmacol* 138, 544-553.

UDENFRIEND, S., ZALTZMAN-NIRENBERG, P. y NAGATSU, T., 1965, Inhibitors of purified beef adrenal tyrosine hydroxylase, *Biochem Pharmacol* 14, 837-845.

UDENFRIEND, S., 1966, Tyrosine hydroxylase, *Pharmacol Rev* 18, 43-51.

UEDA, N., PUFFENBARGER, R. A., YAMAMOTO, S. y DEUTSCH, D. G., 2000, The fatty acid amide hydrolase (FAAH), *Chem Phys Lipids* 108, 107-121.

ULM, R. R., VOLPICELLI, J. R. y VOLPICELLI, L. A., 1995, Opiates and alcohol self-administration in animals, *J Clin Psychiatry* 56 Suppl 7, 5-14.

UPADHYA, S. C., TIRUMALAI, P. S., BOYD, M. R., MORI, T. y RAVINDRANATH, V., 2000, Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization, *Arch Biochem Biophys* 373, 23-34.

VALENZUELA, C. F., 1997, Alcohol and neurotransmitter interactions, *Alcohol Health Res World* 21, 144-148.

VALJENT, E., PAGES, C., ROGARD, M., BESSON, M. J., MALDONADO, R. y CABOCHE, J., 2001, THC-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission, *Eur J Neurosci* 14, 342-352.

VALJENT, E., PAGES, C., HERVE, D., GIRAULT, J. A. y CABOCHE, J., 2004, Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain, *Eur J Neurosci* 19, 1826-1836.

VALVERDE, O., MALDONADO, R., VALJENT, E., ZIMMER, A.M. y ZIMMER, A., 2000, Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice, *J Neurosci* 20, 9284-9289.

VAN DER STELT, M. y DI MARZO, V., 2003, The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders, *Eur J Pharmacol* 480, 133-150.

VANDERMAELEN, C. P., MATHESON, G. K., WILDERMAN, R. C. y PATTERSON, L. A., 1986, Inhibition of serotonergic dorsal raphe neurons by systemic and iontophoretic administration of buspirone, a non-benzodiazepine anxiolytic drug, *Eur J Pharmacol* 129, 123-130.

VARMA, N., CARLSON, G. C., LEDENT, C. y ALGER, B. E., 2001, Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus, *J Neurosci* 21, RC188.

VAUGHAN, C.W., CONNOR, M., BAGLEY, E.E. y CHRISTIE, M.J., 2000, Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro, *Mol Pharmacol* 57, 288-295.

VELA, G., RUIZ-GAYO, M. y FUENTES, J.A., 1995, Anandamide decreases naloxone-precipitated withdrawal signs in mice chronically treated with morphine, *Neuropharmacology* 34, 665-668.

VERGE, D., DAVAL, G., MARCINKIEWICZ, M., PATEY, A., EL MESTIKAWY, S., GOZLAN, H. y HAMON, M., 1986, Quantitative autoradiography of multiple 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats, *J Neurosci* 6, 3474-3482.

VERRICO, C. D., JENTSCH, J. D., DAZZI, L. y ROTH, R. H., 2003, Systemic, but not local, administration of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonists modulate prefrontal cortical acetylcholine efflux in the rat, *Synapse* 48, 178-183.

WAFFORD, K. A., BURNETT, D. M., LEIDENHEIMER, N. J., BURT, D. R., WANG, J. B., KOFUJI, P., DUNWIDDIE, T. V., HARRIS, R. A. y SIKELA, J. M., 1991, Ethanol sensitivity of the GABA<sub>A</sub> receptor expressed in *Xenopus* oocytes requires 8 amino acids contained in the gamma 2L subunit, *Neuron* 7, 27-33.

WAGGONER, W. G., MCDERMED, J. y LEIGHTON, H. J., 1980, Presynaptic regulation of tyrosine hydroxylase activity in rat striatal synaptosomes by dopamine analogs, *Mol Pharmacol* 18, 91-99.

WALLMICHRATH, I. y SZABO, B., 2002a, Analysis of the effect of cannabinoids on GABAergic neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365, 326-334.

WALLMICHRATH, I. y SZABO, B., 2002b, Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse, *Neuroscience* 113, 671-682.

WANG, L., LIU, J., HARVEY-WHITE, J., ZIMMER, A. y KUNOS, G., 2003, Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1393-1398.

WATANABE, K., KAYANO, Y., MATSUNAGA, T., YAMAMOTO, I. y YOSHIMURA, H., 1996, Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids, *Biol Pharm Bull* 19, 1109-1111.

WATANABE, K., MATSUNAGA, T., NAKAMURA, S., KIMURA, T., HO, I. K., YOSHIMURA, H. y YAMAMOTO, I., 1999, Pharmacological effects in mice of anandamide and its related fatty acid ethanolamides, and enhancement of cataleptogenic effect of anandamide by phenylmethylsulfonyl fluoride, *Biol Pharm Bull* 22, 366-370.

WEINER, N., 1970, Regulation of norepinephrine biosynthesis, *Annu Rev Pharmacol* 10, 273-290.

WEISS, F., PARSONS, L. H., SCHULTEIS, G., HYYTIA, P., LORANG, M. T., BLOOM, F. E. y KOOB, G. F., 1996, Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats, *J Neurosci* 16, 3474-3485.

WENG, Y. y SHUKLA, S. D., 2000, Ethanol alters angiotensin II stimulated mitogen activated protein kinase in hepatocytes: agonist selectivity and ethanol metabolic independence, *Eur J Pharmacol* 398, 323-331.

WESTFALL, T. C., BESSON, M. J., GIORGUEFF, M. F. y GLOWINSKI, J., 1976, The role of presynaptic receptors in the release and synthesis of 3H-dopamine by slices of rat striatum, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 292, 279-287.

WESTFALL, T. C., 1977, Local regulation of adrenergic neurotransmission, *Physiol Rev* 57, 659-728.

WESTLAKE, T. M., HOWLETT, A. C., ALI, S. F., PAULE, M. G., SCALLET, A. C. y SLIKKER, W., JR., 1991, Chronic exposure to THC fails to irreversibly alter brain cannabinoid receptors, *Brain Res* 544, 145-149.

WIESBECK, G. A., SCHUCKIT, M. A., KALMIJN, J. A., TIPP, J. E., BUCHOLZ, K. K. y SMITH, T. L., 1996, An evaluation of the history of a marijuana withdrawal syndrome in a large population, *Addiction* 91, 1469-1478.

WILEY, J. L. y MARTIN, B. R., 2002, Cannabinoid pharmacology: implications for additional cannabinoid receptor subtypes, *Chem Phys Lipids* 121, 57-63.

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

WIRKNER, K., POELCHEN, W., KOLES, L., MUHLBERG, K., SCHEIBLER, P., ALLGAIER, C. y ILLES, P., 1999, Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels, *Neurochem Int* 35, 153-162.

WONG, D. T., REID, L. R., LI, T. K. y LUMENG, L., 1993, Greater abundance of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in some brain areas of alcohol-preferring (P) rats compared to nonpreferring (NP) rats, *Pharmacol Biochem Behav* 46, 173-177.

WOOD, J. L. y RUSSO, A. F., 2001, Autoregulation of cell-specific MAP kinase control of the tryptophan hydroxylase promoter, *J Biol Chem* 276, 21262-21271.

WOODS, J. M. y DRUSE, M. J., 1996, Effects of chronic ethanol consumption and aging on dopamine, serotonin, and metabolites, *J Neurochem* 66, 2168-2178.

XIA, Z., DUDEK, H., MIRANTI, C. K. y GREENBERG, M. E., 1996, Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism, *J Neurosci* 16, 5425-5436.

XIE, X. Q., CHEN, J. Z. y BILLINGS, E. M., 2003, 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor, *Proteins* 53, 307-319.

YAKSH, T. L., 1999, Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models, *Trends Pharmacol Sci* 20, 329-337.

YAN, Q. S., 1999, Extracellular dopamine and serotonin after ethanol monitored with 5-minute microdialysis, *Alcohol* 19, 1-7.

YANG, X., CRISWELL, H. E., SIMSON, P., MOY, S. y BREESE, G. R., 1996, Evidence for a selective effect of ethanol on N-methyl-d-aspartate responses: ethanol affects a subtype of the ifenprodil-sensitive N-methyl-d-aspartate receptors, *J Pharmacol Exp Ther* 278, 114-124.

YANG, Z. W., WANG, J., ZHENG, T., ALTURA, B. T. y ALTURA, B. M., 2002, Roles of tyrosine kinase-, 1-phosphatidylinositol 3-kinase-, and mitogen-activated protein kinase-signaling pathways in ethanol-induced contractions of rat aortic smooth muscle: possible relation to alcohol-induced hypertension, *Alcohol* 28, 17-28.

YOSHIMOTO, K., MCBRIDE, W. J., LUMENG, L. y LI, T. K., 1992a, Ethanol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats, *Alcohol Clin Exp Res* 16, 781-785.

YOSHIMOTO, K., MCBRIDE, W. J., LUMENG, L. y LI, T. K., 1992b, Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens, *Alcohol* 9, 17-22.

YOSHIOKA, M., MATSUMOTO, M., TOGASHI, H., SMITH, C. B. y SAITO, H., 1992a, Alpha 2-adrenoceptor modulation of 5-HT biosynthesis in the rat brain, *Neurosci Lett* 139, 53-56.

YOSHIOKA, M., MATSUMOTO, M., TOGASHI, H., SMITH, C. B. y SAITO, H., 1992b, Effect of clonidine on the release of serotonin from the rat hippocampus as measured by microdialysis, *Neurosci Lett* 139, 57-60.

YOUNG, S. N. y GAUTHIER, S., 1981, Tryptophan availability and the control of 5-hydroxytryptamine and tryptamine synthesis in human CNS, *Adv Exp Med Biol* 133, 221-230.

YU, D., ZHANG, L., EISELE, J. L., BERTRAND, D., CHANGEUX, J. P. y WEIGHT, F. F., 1996, Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine type alpha 7 receptors involves the amino-terminal domain of the receptor, *Mol Pharmacol* 50, 1010-1016.

ZHU, W., VOLKOW, N. D., MA, Y., FOWLER, J. S. y WANG, G. J., 2004, Relationship between ethanol-induced changes in brain regional metabolism and its motor, behavioural and cognitive effects, *Alcohol Alcohol* 39, 53-58.

ZHUANG, S., KITTLER, J., GRIGORENKO, E. V., KIRBY, M. T., SIM, L. J., HAMPSON, R. E., CHILDERS, S. R. y DEADWYLER, S. A., 1998, Effects of long-term exposure to THC on expression of cannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>) mRNA in different rat brain regions, *Brain Res Mol Brain Res* 62, 141-149.

ZIMATKIN, S. M., 1991, Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS, *J Neurochem* 56, 1-11.

ZYGMUNT, P. M., PETERSSON, J., ANDERSSON, D. A., CHUANG, H., SORGARD, M., DI MARZO, V., JULIUS, D. y HOGESTATT, E. D., 1999, Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide, *Nature* 400, 452-457.