

Contenido:

1. Saludo del Presidente
2. Premio de la 13ª Reunión anual de la SEIC, Madrid 2012: "Dose-dependent therapeutic effects of the MAGL inhibitor JZL 184 in a chronic model of multiple sclerosis" (Ana Bernal Chico)
3. Premio de la 13ª Reunión anual de la SEIC, Madrid 2012: "The hypocretin receptor-1: a new target to modulate the reinforcing properties of cannabinoids" (África Flores de los Heros)
4. Agenda
5. Últimas publicaciones sobre cannabinoides de investigadores españoles

1. Saludo del Presidente

Estimados socios:

Ya estamos a las puertas del verano y, por tanto, de tres eventos destacados en el mundillo de la investigación científica sobre cannabinoides: ICRS (Vancouver, junio), Gordon (New Hampshire, agosto) e IACM (Colonia, septiembre). Posteriormente llegará nuestra 14ª reunión anual, de la cual ya podéis apuntar en vuestras agendas fecha (del 28 al 30 de noviembre de 2013) y sede (el Aula 1 del Centro de Cultura Contemporánea de Barcelona: http://www.cccb.org/es/lloguer_espai-aula_1-9738). Os enviaremos una primera circular tan pronto como cerremos algunos detalles logísticos aún pendientes.

Por otro lado, y desafortunadamente, proseguimos con el proceso de actualización del pago de las cuotas de socio, a pesar de las reiteradas llamadas de atención que se han hecho desde nuestra Secretaría. A todos los que ya habéis contribuido quería agradeceros de corazón vuestra colaboración, y a los que aún no lo habéis hecho me gustaría rogaros encarecidamente celeridad en el pago para poder cerrar de una vez este importante asunto. Como bien sabéis, disponer de un pequeño pero muy valioso "fondo de cohesión" nos permite implementar actuaciones de apoyo a los investigadores jóvenes tales como el mantenimiento de tarifas de inscripción reducidas a nuestra reunión anual o la convocatoria de ayudas de viaje a otros eventos científicos como el pasado 6th European Workshop on Cannabinoid Research de Dublín. Como podéis imaginar, esto es especialmente crítico en los tiempos de recortes económicos que actualmente estamos viviendo, en los que cada vez resulta más complicado mantener un elevado nivel de financiación de nuestra Sociedad por patrocinadores.

Por último, quería mencionaros que ya estamos abordando seriamente el cambio de portal electrónico de nuestra Sociedad, que esperamos poder activar hacia las vacaciones de verano, y recordaros que, desde hace unos meses, tenemos abiertas una página en Facebook (Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides-SEIC) y una cuenta en Twitter (@SEICannabinoide). Esperamos que todos estos recursos electrónicos sean de utilidad y os animamos encarecidamente a utilizarlos para conseguir una amplia difusión de nuestras actividades.

Saludos cordiales,

Manuel

2. Premio de la 13^a Reunión anual de la SEIC, Madrid 2012

DOSE-DEPENDENT THERAPEUTIC EFFECTS OF THE MAGL INHIBITOR JZL184 IN A CHRONIC MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

Ana Bernal Chico, Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea-UPV/EHU

La esclerosis múltiple (EM) es el trastorno neurológico más frecuente en adultos jóvenes. La etiología de la EM aún está sin determinar y se presume multifactorial en gran parte debido a la heterogeneidad de las lesiones desmielinizantes que aparecen en el sistema nervioso central (SNC). Histopatológicamente, la EM se caracteriza por la presencia de focos de inflamación con microglía y astrocitos reactivos, infiltración de células del sistema inmunitario, muerte oligodendroglial y degeneración axonal. Según la visión clásica sobre la etiología de la EM, el daño oligodendroglial y axonal se produce como consecuencia de una reacción autoinmune frente a antígenos de la mielina (1, 2).

Uno de los modelos animales más ampliamente utilizados para estudiar la EM es la encefalitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es un modelo in vivo de neuroinflamación autoinmune que se caracteriza por presentar desmielinización y disfunción neurológica junto con otros síntomas clínicos similares a los de la EM (3, 4, 5). Se han desarrollado distintos modelos de EAE aguda y crónica, que reflejan los diferentes cursos clínicos de la EM (6). La mayoría de los estudios se realizan en ratones C57BL/6 en los que la enfermedad se induce mediante la inmunización con componentes de la mielina, por ejemplo con péptidos de MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), MBP (myelin basic protein) o PLP (proteolipid protein), emulsionados en adyuvante de Freund suplementado con extracto de *Mycobacterium tuberculosis* (7, 8). La patogénesis de la EAE surge de una respuesta autoinmune llevada a cabo por linfocitos T reactivos a antígenos de mielina (7, 9). Durante la fase de inducción, células T proinflamatorias activadas y CD4⁺ proliferan en la periferia y se infiltran en el SNC mediante la interacción con células endoteliales, atravesando la barrera hemato-encefálica (10).

Entonces se inicia la fase efectora que se acompaña de otras células mononucleares infiltrantes y de microglía y astrocitos reactivos que segregan mediadores inflamatorios (11). En este modelo la médula espinal se encuentra altamente afectada mientras que las lesiones en el cerebro resultan menos evidentes.

El sistema endocannabinoide (eCB) juega un papel importante en la patogénesis tanto de la EAE como de la EM (12, 13), y se propone que su modulación farmacológica podría ser útil para el tratamiento de esta enfermedad desmielinizante. Se han descrito alteraciones en los niveles de los dos ligandos endocannabinoides (eCBs) principales, la N-araquidonoiletanolamina (anandamida, AEA) (14) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (15) tanto en la EM como en la EAE (12, 16). Además se han descrito cambios en la expresión génica de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, así como de las enzimas de síntesis (N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D, NAPE-PLD, y diacylglycerol lipase, DAGL) y degradación (fatty-acid amide hydrolase, FAAH y monoacylglycerol lipase, MAGL) de los eCBs (16, 17). Finalmente, los ratones knock-out para los receptores cannabinoides CB1 y CB2 exhiben una sintomatología exacerbada durante la progresión de la EAE (18).

Es un hallazgo consistente que la administración de agonistas exógenos de los receptores cannabinoides CB1 y/o CB2 como el Δ^9 -THC mejoran los déficits neurológicos en diferentes modelos animales de EM (19, 20, 21). Sin embargo, la administración de estos compuestos cannabinoides produce efectos psicoactivos y déficits cognitivos no deseados y asociados a la activación de receptores CB1 cerebrales (22, 23). Por ello se ha postulado que los inhibidores de la degradación enzimática de los eCBs, que aumentan el tono endógeno de los mismos y ejercen efectos antiinflamatorios exhibiendo menor potencial psicoactivo que los agonistas directos de los receptores CB1, serían una mejor aproximación terapéutica para el tratamiento de procesos neuroinflamatorios.

El JZL184 es un inhibidor específico de la MAGL, la enzima responsable de la degradación de 2-AG. En condiciones neu-

roinflamatorias la actividad de la MAGL contribuye a la producción de ácido araquidónico que funciona como sustrato para la producción de prostaglandinas. Cuando es administrado a dosis bajas (8 mg/kg), el JZL184 induce efectos antinociceptivos y ansiolíticos sin afectar a la consolidación de la memoria (24). Se ha descrito también que dosis altas de este inhibidor (40 mg/kg) resultan protectoras en modelos de neuroinflamación a través de mecanismos independientes de la activación de receptores cannabinoides, y que implican el desacoplamiento de la hidrólisis de 2-AG de la síntesis de prostaglandinas (25).

En el presente trabajo analizamos el potencial terapéutico del inhibidor JZL184 en el modelo de EAE en ratón. La EAE fue inducida en ratones machos C57BL/6 mediante la inmunización con MOG. Para testar el posible efecto protector del inhibidor se realizaron diariamente inyecciones intraperitoneales con dos dosis diferentes de JZL184 (8 mg/kg y 32 mg/kg) y el vehículo desde el comienzo de la fase aguda de la EAE (día 14 post-inducción), hasta el final del experimento (día 36 post-inducción).

El tratamiento con el inhibidor de la MAGL no afectó al peso de los animales. Sin embargo, observamos que con la dosis alta del mismo había una disminución de las lesiones cutáneas asociadas a la inmunización al finalizar el experimento. Los síntomas motores fueron evaluados diario utilizando una escala con valores entre 0 (ausencia de sintomatología) y 8 (muerte). Al comparar las curvas de progresión de los síntomas se observó que ambas dosis de JZL184 mejoraron la sintomatología motora durante el curso de la EAE. Sin embargo, el último día de experimento el efecto beneficioso del inhibidor sólo fue detectable en el grupo de animales tratados con la dosis de 8 mg/kg. La EAE provoca un descenso en la velocidad de conducción del tracto corticoespinal asociado a la desmielinización producida en la médula espinal. El incremento en la latencia de conducción axonal detectado en los ratones sometidos a EAE y tratados con vehículo se vio significativamente disminuido en los ratones tratados con la dosis de 8 mg/kg de JZL184, mientras que no se observaron diferencias en los animales tratados con la dosis de 32 mg/kg del inhibidor. Para comprobar el efecto del JZL184 sobre la desmielinización de la médula espinal se realizó una tinción específica de mielina (luxol fast blue) y

se cuantificó utilizando una escala de 0 (completamente mielinizado) a 4 (completamente desmielinizado). Los animales tratados con la dosis baja de JZL184 presentaron un menor grado de desmielinización que los animales tratados con la dosis alta, que presentaban el mismo grado de desmielinización que los animales tratados con el vehículo. Además, se analizaron los focos inflamatorios en secciones de médula espinal tras realizar una tinción de Nissl (tinción específica de núcleos celulares). La dosis baja del inhibidor redujo significativamente tanto el número de lesiones como el área lesionada en la sustancia blanca de la médula espinal, mientras que la dosis de 32 mg/kg produjo una reducción no significativa del número de lesiones.

La administración crónica de JZL184 (40 mg/kg) induce tolerancia a los efectos analgésicos del inhibidor, efecto que se asocia a una desensibilización de los receptores CB1 cerebrales (25). Para comprobar el efecto de nuestro tratamiento crónico (22 días) en la capacidad de acoplamiento de los receptores cannabinoides a las proteínas G, se realizó un experimento de autorradiografía de GTP γ S en secciones cerebrales, utilizando el agonista cannabinoide WIN55,212-2. La dosis alta JZL184 produjo una desensibilización de los receptores CB1 en todas las áreas del cerebro analizadas (hipocampo, corteza, estriado y cerebelo) mientras que la dosis baja redujo el nivel de acoplamiento de los receptores cannabinoides a proteínas G en menor medida, y únicamente en determinadas regiones anatómicas (como el cerebelo).

Teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir que la administración crónica de dosis bajas del inhibidor JZL184 mejora los déficits motores y de conducción del tracto corticoespinal en ratones sometidos a EAE. Los efectos terapéuticos de la inhibición de MAGL en este modelo de EM se relacionan con una menor presencia de focos inflamatorios en la sustancia blanca de la médula espinal. Además, la administración crónica del inhibidor induce una desensibilización dosis-dependiente de los receptores CB1 en el SNC, lo que podría explicar la menor eficacia terapéutica del inhibidor cuando es administrado a dosis altas. Estos datos sugieren que la enzima MAGL podría ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.

Referencias

- (1) Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7:115-21.
- (2) Matute C, Pérez-Cerdá F (2005) Multiple sclerosis: novel perspectives on newly forming lesions. *Trends Neurosci* 28:173-175.
- (3) Lavi E, Constantinescu C.S. (2005) *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. Springer, New York.
- (4) Baxter A.G. (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 904-912.
- (5) Cassan C, Liblau R.S. (2007) Immune tolerance and control of CNS autoimmunity: from animal models to MS patients. *J. Neurochem.* 100: 883-892.
- (6) Steinman L, Zamvil S.S. (2006) How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 60: 12-21.
- (7) Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L. (1985) T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317: 355-358.
- (8) Bischof F, Bins A, Durr M, Zevering Y, Melms A, Kruisbeek A.M. (2004) A structurally available encephalitogenic epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein specifically induces a diversified pathogenic autoimmune response. *J. Immunol.* 173: 600-606.
- (9) Zamvil SS, Steinman L (1990) The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 579-621.
- (10) Cassan C, Liblau RS (2007) Immune tolerance and control of CNS autoimmunity: from animal models to MS patients. *J. Neurochem.* 100: 883-892.
- (11) Kuchroo VK, Martin CA, Greer JM, Ju ST, Sobel RA, Dorf ME (1993) Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 151: 4371-4382.
- (12) Centonze D, Bari M, Rossi S, Prosperetti C, Furlan R, Fezza F, De Chiara V, Battistini L, Bernardi G, Bernardini S, Martino G, MacCarrone M (2007) The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 133: 2543-2553.
- (13) Shohami E, Mechoulam R. (2006) Multiple sclerosis may disrupt endocannabinoid brain protection mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 6087-6088.
- (14) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R, (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949.
- (15) Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al, (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50: 83-90.
- (16) Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, Sánchez A, Mestre L, Valenti M, García-Merino A, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J. (2005) Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 20(2): 207-217
- (17) Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. (2005) Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem*, 95(2): 437-445
- (18) Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, Ledent C, Cheng X, Carrier EJ, Mann MK, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Buckley NE, Hillard CJ, Lutz B, Baker D, Dittel BN. (2007) Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med* 13:492-497.
- (19) Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L. (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 404:84-87.
- (20) Arévalo-Martín A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C. (2003) Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 23: 2511-2516.
- (21) Loria F, Petrosino S, Hernangómez M, Mestre L, Spagnolo A, Correa F, Di Marzo V, Dacagne F, Guaza C (2010) An endocannabinoid tone limits excitotoxicity in vitro and in a model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 37:166-176.
- (22) Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3:771-84.
- (23) Ligresti A, Petrosino S, Di Marzo V. (2009) From endocannabinoid profiling to 'endocannabinoid therapeutics'. *Curr Opin Chem Biol* 13:321-31.
- (24) Busquets-García A, Puighermanal E, Pastor A, de la Torre R, Maldonado R, Ozaita A. (2011) Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry* 70(5): 479-486.
- (25) Nomura DK, Morrison BE, Blankman JL, Long JZ, Kinsey SG, Marcondes MC, Ward AM, Hahn YK, Lichtman AH, Conti B, Cra-

3. Premio de la 13ª Reunión anual de la SEIC, Madrid 2012

THE HYPOCRETIN RECEPTOR-1: A NEW TARGET TO MODULATE THE REINFORCING PROPERTIES OF CANNABINOIDS

África Flores – Universidad Pompeu Fabra, Laboratorio de Neurofarmacología (Barcelona)

Los preparados obtenidos a partir de la planta *Cannabis sativa*, tales como la marihuana y el hachís, constituyen el grupo de drogas ilegales de mayor consumo a nivel mundial (1). Dichos preparados contienen más de 60 compuestos cannabinoides, siendo el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) el principal responsable de sus efectos psicoactivos (2). El THC activa los circuitos de recompensa, instigando así a su consumo repetido. Se ha descrito que sobre el 10% de los consumidores de cannabis corren el riesgo de desarrollar un trastorno de dependencia (3), la cual puede conllevar varios problemas derivados del abuso de cannabis tales como síndrome amotivacional, disfunción cognitiva, ansiedad e incluso episodios psicóticos (4, 5). A pesar de que el número de admisiones hospitalarias derivadas del consumo de esta droga se ha triplicado en los últimos años (3), todavía no se dispone de ningún fármaco que haya demostrado su eficacia en el tratamiento de la dependencia a cannabis y sus consecuencias. Actualmente una de las posibles nuevas dianas terapéuticas es el sistema hipocretinérgico, relacionado recientemente con las conductas adictivas.

Las hipocretinas -1 y -2, también conocidas como orexinas A y B, son dos neuropéptidos generados a partir de la fragmentación proteolítica de un mismo precursor, la prepro-hipocretina (o prepro-orexina) (6, 7). Sus efectos fisiológicos se producen como consecuencia de la unión específica a dos receptores acoplados a proteína G: el receptor-1 de hipocretina y el receptor-2 de hipocretina. La hipocretina-1 se une a ambos receptores con similar afinidad mientras que la hipocretina-2 se une al receptor-2 con mayor afinidad (7). Las hipocretinas son expresadas por una población de neuronas localizada exclusivamente en las áreas lateral, perifornical y dorsome-

dial del hipotálamo, y envían sus proyecciones extensamente a través del cerebro hacia estructuras tales como el córtex, el hipotálamo, el hipocampo, varios núcleos del sistema límbico, el tronco del encéfalo y la médula espinal (8). La gran cantidad de proyecciones de las neuronas hipocretinérgicas da una idea de la variedad de funciones fisiológicas en las que está involucrada, entre las cuales destacan la regulación de la alerta y el ciclo circadiano (9), el estrés (10, 11), la homeostasis energética (12), y como se ha demostrado durante los últimos años, en los sistemas de recompensa y adicción (13, 14). De hecho se ha propuesto la existencia de dos subpoblaciones de neuronas hipocretinérgicas: una se localizaría en el hipotálamo lateral y procesaría estímulos relacionados con la recompensa, proyectando sobre el área tegmental ventral y el núcleo accumbens, mientras la otra, situada en las áreas dorsomedial y perifornical, se relacionaría principalmente con los procesos de alerta y estrés (14).

El objetivo del presente estudio es evaluar la implicación de las hipocretinas en las propiedades adictivas de los cannabinoides. Para ello se empleó el paradigma de auto-administración intravenosa de droga en ratones C57BL6/J. En este caso se optó por utilizar el compuesto WIN55,212-2, un cannabinoide sintético cuya farmacocinética es más rápida que la del THC, favoreciendo así el aprendizaje del comportamiento operante (15). Como estrategia farmacológica se utilizaron el antagonista del receptor -1 de hipocretina, SB334867, y el antagonista del receptor-2, TCSOX229. Para la posterior confirmación de los resultados obtenidos, se emplearon también ratones knock-out para el receptor-1 de hipocretina.

Los animales fueron sometidos a cateterización intrayugular bajo anestesia. Tras el período de recuperación, fueron conectados a una bomba de infusión a través del catéter y emplazados en cajas de condicionamiento operante. Dichas cajas cuentan con dos agujeros con el siguiente funcionamiento: cuando el ratón mete el hocico en el agujero activo recibe una infusión de droga a la vez que se enciende una pequeña luz situada encima de dicho agujero-

ro; cuando lo hace en el agujero inactivo no tiene lugar ninguna consecuencia. El período de adquisición dura 12 días y consiste en una sesión diaria de 2h bajo un programa a razón fija 1 (FR1; por cada respuesta activa el ratón recibe una única infusión). Para considerar que un ratón ha adquirido el comportamiento operante, debe alcanzar tres criterios durante tres días consecutivos: 75% de respuestas en el agujero activo, 80% de estabilidad en dicho número de respuestas y un mínimo de 8 infusiones obtenidas. Después del periodo de adquisición, los ratones se someten durante 3h a un programa de razón progresiva (PR), durante el cual deben incrementar progresivamente el número de respuestas en el agujero activo para obtener una infusión, parámetro que se correlaciona con la motivación por la droga y se conoce como breaking point.

En primer lugar se evaluó el rol de los receptores -1 y -2 de hipocretina en la adquisición de la auto-administración de WIN55,212-2. El antagonista del receptor-1 SB334867 (10 mg/kg, ip) o su vehículo se inyectaron 30 minutos antes de cada sesión. Durante el transcurso del período de adquisición, el número de respuestas activas realizadas por los ratones pretratados con SB334867 se vio atenuado, siendo casi significativa dicha diferencia al analizar el área bajo la curva. Además el porcentaje de animales que alcanzó los criterios de adquisición se vio dramáticamente reducido tras el tratamiento con el antagonista del receptor-1 (29%) en comparación al grupo vehículo (75%). Por el contrario, el tratamiento crónico con el antagonista del receptor-2 TCSOX229 (10 mg/kg, ip) no ejerció ningún efecto sobre la adquisición de la auto-administración de WIN55,212-2, ya que tanto el número de respuestas activas a lo largo del experimento como el porcentaje de adquisición fueron similares para el grupo tratado (90%) y el grupo control (77%).

En un segundo experimento se analizó si los receptores de hipocretina modulan el mantenimiento y expresión de la auto-administración de WIN55,212-2 una vez ya se ha adquirido dicho comportamiento operante. Para ello, todos los ratones se sometieron a un período de adquisición de 8 días durante el cual recibieron una inyec-

ción de vehículo 30 minutos antes de cada sesión. Los ratones que no alcanzaron los criterios de adquisición en ese intervalo de tiempo fueron descartados. Previamente a la 9ª sesión, la administración de vehículo fue sustituida por uno de los dos antagonistas (SB334867 ó TCSOX229, ambos a 10 mg/kg, ip), y durante los días 10, 11 y 12 se restauró de nuevo el tratamiento con vehículo. La administración aguda de SB334867 bloqueó la auto-administración de WIN55,212-2 (21±1 respuestas activas basales vs. 6±1 respuestas activas tras el tratamiento), reduciéndose el número de infusiones obtenidas, pero manteniendo el mismo nivel de respuestas en el agujero inactivo. Durante los tres días siguientes, el nivel de respuestas activas se restableció. Contrariamente, la administración aguda de TCSOX229 no tuvo ningún efecto en el desempeño de dicho comportamiento operante. El 13º día se evaluó la motivación por la droga en una sesión de PR, previa inyección de SB334867 ó TCSOX229. En línea con los datos anteriores, el antagonista del receptor-1 redujo el breaking point alcanzado en comparación a su vehículo (8±2 vs. 27±5), mientras que el antagonista del receptor-2 no afectó dicha respuesta (22±4 en grupo tratado vs. 28±3 en grupo vehículo).

Con el objetivo de confirmar el aparente papel del receptor-1 de hipocretina en las propiedades reforzantes de los cannabinoides, se evaluó la adquisición de la auto-administración de WIN55,212-2 en animales knock-out para el receptor-1 de hipocretina y en sus correspondientes wild-type. La delección de dicho receptor resultó en un menor número de respuestas activas, así como una menor discriminación entre los agujeros activo e inactivo y un porcentaje de adquisición reducido (75% en animales wild-type, 33% en knock-out). Asimismo, la sesión de PR puso de manifiesto que la motivación por la droga también se encuentra reducida en estos ratones (13±3 en knock-out vs. 25±4 en wild-type), confirmando los resultados farmacológicos.

En base a los datos comportamentales, se decidió evaluar si las neuronas hipocretinérgicas se activan en respuesta a la adquisición de la auto-administración de WIN55,212-2. Por consiguiente, se realizaron estudios de inmunofluorescencia para los cuales se usó un anticuerpo anti-

hipocretina-1 y un anticuerpo anti-FosB/ Δ fosB, un marcador de activación celular de difícil degradación apropiado para evaluar tratamientos crónicos debido a su acumulación progresiva (16). El tejido se obtuvo tras un protocolo de administración de WIN55,212-2 contingente/no-contingente, constituido por tres grupos de ratones: WIN-contingentes, emplazados en cajas de condicionamiento operante cuyo funcionamiento es igual al explicado anteriormente, donde deben adquirir la auto-administración de droga; WIN-no-contingentes, cuyas cajas están conectadas a las de los WIN-contingentes, recibiendo una infusión de droga por cada infusión que éstos reciben, mientras sus propias respuestas tanto en el agujero activo como en el inactivo no tienen ninguna consecuencia; y SAL-no-contingentes, cuyas cajas funcionan igual que las de los WIN-no-contingentes pero a diferencia de éstos, reciben salino. Dicho protocolo permite distinguir entre los efectos farmacológicos de la exposición crónica al WIN55,212-2 y los causados por sus propiedades reforzantes. Los estudios de inmunofluorescencia revelaron una activación de las neuronas hipocretinérgicas en el hipotálamo lateral de los ratones WIN-contingentes ($15.9 \pm 2\%$) en comparación a los WIN-no-contingentes ($5.9 \pm 2\%$) y a los SAL-no-contingentes ($6.9 \pm 2\%$). En las neuronas de las áreas dorsomedial/perifornical no se encontraron diferencias significativas entre los grupos WIN-contingente ($30.6 \pm 3\%$) y SAL-no-contingente ($22.6 \pm 2\%$), pero sí se observó cierta reducción en la activación neuronal en el grupo WIN-no-contingente ($13.7 \pm 2\%$).

La sensación de placer se correlaciona con la activación de los circuitos de recompensa y la consecuente liberación de dopamina en el núcleo accumbens (17, 18). En base a este dato se quiso estudiar la posibilidad de que el receptor-1 de hipocretina ejerciera su modulación sobre el refuerzo inducido por cannabinoides mediante la regulación de la transmisión dopaminérgica. Para ello se midieron los niveles de dopamina liberados al espacio extracelular en el núcleo accumbens después de una inyección aguda de THC (0.3 mg/kg, (19)) empleando microdiálisis in vivo, tanto en animales wildtype como knock-out para el receptor-1 de hipocretina. El tratamiento

agudo con THC produjo efectivamente un aumento de los niveles de dopamina (hasta el 24% respecto a la línea de base) en animales wildtype en comparación al grupo vehículo. Sin embargo, este incremento se vio totalmente bloqueado en los animales knock-out para el receptor-1.

A partir de los resultados descritos, se puede concluir que el receptor-1 de hipocretina modula las propiedades reforzantes de los cannabinoides, como se demuestra por su papel en la adquisición de la auto-administración de WIN55,212-2, el mantenimiento de dicho comportamiento y la motivación por la droga. En cambio, el receptor-2 no parece modular dichos efectos. Además, las neuronas hipocretinérgicas localizadas en el hipotálamo lateral no se activan tras la exposición crónica al cannabinoide de forma no contingente; sin embargo, éstas sí se activan a raíz de la adquisición de la auto-administración de WIN55,212-2 y por lo tanto en respuesta a sus propiedades reforzantes. Un posible mecanismo mediante el cual el receptor-1 de hipocretina modula las propiedades reforzantes de los cannabinoides es la regulación de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens. En conjunto, estos datos sugieren que el receptor-1 de hipocretina podría suponer una nueva diana para el tratamiento de la dependencia al cannabis.

Referencias

- (1) Murray RM, Morrison PD, Henquet C, Di Forti M. (2007) Cannabis, the mind and society: the hash realities. *Nat Rev Neurosci.* 8(11):885-95.
- (2) Cooper ZD, Haney M. (2008) Cannabis reinforcement and dependence: role of the cannabinoid CB1 receptor. *Addict Biol.* 13(2):188-95.
- (3) Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Plan Nacional sobre Drogas: Memoria 2009.
- (4) Johns A. (2001) Psychiatric effects of cannabis. *Br J Psychiatry.* 178:116-22.
- (5) Leweke FM, Koethe D. (2008) Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addict Biol.* 13(2):264-75.
- (6) de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6;95(1):322-7.

- (7) Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 20;92(4):573-85.
- (8) Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*. 1;18(23):9996-10015.
- (9) Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA, Leonard CS, Richardson JA, Hammer RE, Yanagisawa M. (2003) Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*. 5;38(5):715-30.
- (10) Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de Lecea L. (2004) Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci*. 15;24(50):11439-48.
- (11) Winsky-Sommerer R, Boutrel B, de Lecea L. (2005) Stress and arousal: the corticotropin-releasing factor/hypocretin circuitry. *Mol Neurobiol*. 32(3):285-94.
- (12) Sakurai T. (2006) Roles of orexins and orexin receptors in central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 5(3):313-25.
- (13) Plaza-Zabala A, Maldonado R, Berrendero F. (2012) The hypocretin/orexin system: implications for drug reward and relapse. *Mol Neurobiol*. 45(3):424-39.
- (14) Aston-Jones G, Smith RJ, Sartor GC, Moorman DE, Massi L, Tahsili-Fahadan P, Richardson KA. (2010) Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res*. 16;1314:74-90.
- (15) Mendizábal V, Zimmer A, Maldonado R. (2006) Involvement of kappa/dynorphin system in WIN 55,212-2 self-administration in mice. *Neuropsychopharmacology*. 31(9):1957-66.
- (16) Nestler EJ, Barrot M, Self DW. (2001) DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25;98(20):11042-6.
- (17) Bardo MT. (1998) Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol*. 12(1-2):37-67.
- (18) Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. (2011) Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13;108(37):15037-42.
- (19) Robledo P, Trigo JM, Panayi F, de la Torre R, Maldonado R. (2007) Behavioural and neurochemical effects of combined MDMA and THC administration in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 195(2):255-64.

4. Agenda

Gordon Conference on Cannabinoid Function in the CNS
4-9 de agosto de 2013

Waterville Valley, New Hampshire, EEUU

Más información: <http://www.grc.org/programs.aspx?year=2013&program=cannab>

15th EBPS (European Behavioural Pharmacology Society) Biennial Meeting
6-9 de septiembre de 2013

La Rochelle, Francia

Más información: <http://www.ebps.org/meetings/biennial.lasso>

15th Congreso Nacional Sociedad Española de Neurociencia
25-27 de septiembre de 2013

Oviedo, España

Más información: <http://www.senc2013.com/oviedo.html>

7th Conference on Cannabinoids (IACM Conference 2013)
27-28 de septiembre de 2013

Colonia, Alemania

Más información: <http://www.iacm2013.org/>

26th European College of Neuropsychopharmacology
5-9 de octubre de 2013
Barcelona, España
Más información: <http://www.ecnp-congress.eu/>

Society for Neuroscience Annual Meeting
9-13 Noviembre de 2013
San Diego, California, EEUU
Más información: <http://www.sfn.org/annual-meeting/neuroscience-2013>

5. Últimas publicaciones sobre cannabinoides de investigadores españoles

Preparation and characterization of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol-loaded biodegradable polymeric microparticles and their antitumoral efficacy on cancer cell lines. Hernán Pérez de la Ossa D, Gil-Alegre ME, Ligresti A, Aberturas MD, Molpeceres J, Torres AI, Di Marzo V. *J Drug Target*. 2013 Jun 18. [Epub ahead of print]

Neuropsychological assessment of memory in child and adolescent first episode psychosis: Cannabis and «the paradox effect». : Moreno-Granados JM, Ferrín M, Salcedo-Marín DM, Ruiz-Veguilla M *Rev Psiquiatr Salud Ment*. 2013 Jul 2. doi:pii: S1888-9891(13)00060-8. 10.1016/j.rpsm.2013.04.001. [Epub ahead of print]

Peripheral endocannabinoid system dysregulation in first-episode psychosis. Bioque M, García-Bueno B, Mac-Dowell KS, Meseguer A, Saiz PA, Parellada M, Gonzalez-Pinto A, Rodriguez-Jimenez R, Lobo A, Leza JC, Bernardo M. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jul 4. doi: 10.1038/npp.2013.165. [Epub ahead of print]

Lack of cannabis consumption registry. López-Pelayo H, Balcells-Oliveró MM, Gual-Solé A. *Actas Esp Psiquiatr*. 2013 May;41(3):208. Epub 2013 May 1.

Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. García-Gutiérrez MS, Ortega-Álvaro A, Busquets A, Pérez-Ortiz JM, Caltana L, Ricatti MJ, Brusco A, Maldonado R, Manzanares J. *Neuropharmacology*. 2013 Jun 21. doi:pii: S0028-3908(13)00248-7. 10.1016/j.neuropharm.2013.05.034. [Epub ahead of print]

Dysregulation of cannabinoid CB1 receptor and associated signaling networks in brains of cocaine addicts and cocaine-treated rodents. Alvaro-Bartolomé M, García-Sevilla JA. *Neuroscience* 2013 May 29. doi:pii: S0306-4522(13)00463-6. 10.1016/j.neuroscience.2013.05.035. [Epub ahead of print]

Quadrupole-time-of-flight mass spectrometry screening for synthetic cannabinoids in herbal blends. Ibáñez M, Bijlsma L, van Nuijs AL, Sancho JV, Haro G, Covaci A, Hernández F. *J Mass Spectrom*. 2013 Jun; 48(6):685-94. doi: 10.1002/jms.3217.

Stress and antibiotics alter luminal and wall-adhered microbiota and enhance the local expression of visceral sensory-related systems in mice. Aguilera M, Vergara P, Martínez V. *Neurogastroenterol Motil*. 2013 May 27. doi: 10.1111/nmo.12154. [Epub ahead of print]

Quantification of selected synthetic cannabinoids and $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. de Castro A, Piñeiro B, Lendoiro E, Cruz A, López-Rivadulla M. *J Chromatogr A*. 2013 Jun 21;1295:99-106. doi: 10.1016/j.chroma.2013.04.035. Epub 2013 Apr 22.

Environment-Related Adaptive Changes of Gut Commensal Microbiota Do not Alter Colonic Toll-Like Receptors but Modulate the Local Expression of Sensory-Related Systems in Rats. Aguilera M, Vergara P, Martínez V. *Microb Ecol.* 2013 Jul;66(1):232-43. doi: 10.1007/s00248-013-0241-0. Epub 2013 May 12.

Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. Vara D, Morell C, Rodríguez-Henche N, Diaz-Laviada I. *Cell Death Dis.* 2013 May 2;4:e618. doi: 10.1038/cddis.2013.141.

Control of experimental spasticity by targeting the degradation of endocannabinoids using selective fatty acid amide hydrolase inhibitors. Pryce G, Cabranes A, Fernández-Ruiz J, Bisogno T, Di Marzo V, Long J, Cravatt B, Giovannoni G, Baker D. *Mult Scler.* 2013 Apr 26. [Epub ahead of print]

Cannabinoid receptors and cholecystokinin in feeding inhibition. Alén F, Ramírez-López MT, Gómez de Heras R, Rodríguez de Fonseca F, Orio L. *Vitam Horm.* 2013;92:165-96. doi: 10.1016/B978-0-12-410473-0.00007-6.

Cannabinoid Receptors Couple to NMDA Receptors to Reduce the Production of NO and the Mobilization of Zinc Induced by Glutamate. Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Vicente-Sánchez A, Garzón J. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jun 1. [Epub ahead of print]

Cannabinoids may worsen gastric dysmotility induced by chronic cisplatin in the rat. Abalo R, Cabezas PA, Vera G, López-Pérez AE, Martín MI. *Neurogastroenterol Motil.* 2013 May;25(5):373-82, e292. doi: 10.1111/nmo.12073. Epub 2013 Feb 6.

Abuse or dependence on cannabis and other psychiatric disorders. Madrid study on dual pathology prevalence. Arias F, Szerman N, Vega P, Mesias B, Basurte I, Morant C, Ochoa E, Poyo F, Babin F. *Actas Esp Psiquiatr.* 2013 Mar-Apr;41(2):122-9. Epub 2013 Mar 1.

Modulation Of 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine Effects By Endocannabinoid System. Valverde O, Rodríguez-Árias M. *Curr Pharm Des.* 2013 Apr 5. [Epub ahead of print]

Lipid Transmitter Signaling As A New Target For Treatment Of Cocaine Addiction: New Roles For Acylethanolamides And Lysophosphatidic Acid. Orio L, Pavón FJ, Blanco E, Serrano A, Araos P, Pedraz M, Rivera P, Calado M, Suárez J, de Fonseca FR. *Curr Pharm Des.* 2013 Apr 5. [Epub ahead of print]

The pseudokinase tribbles homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. Salazar M, Lorente M, García-Taboada E, Hernández-Tiedra S, Davila D, Francis SE, Guzmán M, Kiss-Toth E, Velasco G. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Apr 6. doi:pii: S1388-1981(13)00085-1. 10.1016/j.bbali.2013.03.014. [Epub ahead of print]

Ghrelin-induced orexigenic effect in rats depends on the metabolic status and is counteracted by peripheral CB1 receptor antagonism. Alén F, Crespo I, Ramírez-López MT, Jagerovic N, Goya P, de Fonseca FR, de Heras RG, Orio L. *PLoS One.* 2013;8(4):e60918. doi: 10.1371/journal.pone.0060918. Epub 2013 Apr 2.

Additive effect of rimonabant and citalopram on extracellular serotonin levels monitored with in vivo microdialysis in rat brain. Ortega JE, Gonzalez-Lira V, Horrillo I, Herrera-Marschitz M, Callado LF, Meana JJ. *Eur J Pharmacol.* 2013 Jun 5;709(1-3):13-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.03.043. Epub 2013 Apr 3.

Composición de la Junta Directiva de la SEIC

<u>Presidente:</u>	Manuel Guzmán (Universidad Complutense de Madrid)
<u>Vicepresidente:</u>	Julián Romero (Fundación Hospital Alcorcón, Madrid)
<u>Tesorera:</u>	Onintza sagredo (Universidad Complutense de Madrid)
<u>Vocales:</u>	Javier Fernández Ruiz (Universidad Complutense de Madrid) Koldo Callado (Universidad del País Vasco) Emilio Fernández Espejo (Universidad de Sevilla) Eduardo Muñoz (Universidad de Córdoba) Ester Aso (Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona) Luis Núñez (Centro Médico de Pamplona)
<u>Secretaria:</u>	Cristina Sánchez (Universidad Complutense de Madrid)

Dirección de contacto de la SEIC

Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC)
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III
Facultad de Medicina, Universidad Complutense
Ciudad Universitaria, s/n, 28040 Madrid
Teléfonos: 913941450/913941454; fax: 913941691; e-mail: seic@med.ucm.es
Dirección Web: <http://www.ucm.es/info/seic-web>
Facebook: Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides-SEIC
Twitter: @SEICannabinoide