

1ª REUNION NACIONAL SOBRE INVESTIGACION EN CANNABINOIDES



**Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
19 de Octubre de 2000**

**1ª REUNION NACIONAL SOBRE INVESTIGACION
EN CANNABINOIDES
Madrid, 19 de Octubre de 2000**

Comité organizador:

José Antonio Ramos Atance
Maribel Cebeira Mateos
Rosario de Miguel Fernández
Mariluz Hernández Gálvez
Javier Fernández Ruiz

Dirección de contacto:

1ª Reunión Nacional sobre Investigación en Cannabinoides
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
28040-Madrid
teléfonos: 91-3941454 / 91-3941450
fax: 91-3941691
e-mail: rnic@eucmos.sim.ucm.es,
<http://www.ucm.es/info/bioqcan/reun-cannab.htm>

Instituciones que colaboran:

Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas
Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid
Universidad Complutense de Madrid

1ª REUNION NACIONAL SOBRE INVESTIGACION EN CANNABINOIDES Madrid, 19 de Octubre de 2000

PROGRAMA CIENTIFICO

9:00 Acto de Presentación:

Gonzalo Robles Orozco (delegado del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas)
José Cabrera Forneiro (gerente de la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid)

9:30-11:30 1ª sesión: Cannabinoides: consumo e interacción con otras drogas (moderador: J.A. Ramos)

- 9:30 Cannabis: patología dual en jóvenes varones
M. Quiroga, S. Anglada
Servicio de Psiquiatría, Hospital Militar de Melilla
- 9:45 Alteraciones de los receptores de cannabinoides (CB₁) en el cerebro de ratas tratadas de forma prolongada con alcohol o cocaína
S. González, V. Sparpaglione, M. Cebeira, D. Parolaro, J.J. Fernández-Ruiz, J.A. Ramos
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Universidad Complutense de Madrid
- 10:00 Papel del sistema cannabinoide endógeno en la adicción a etanol
A. Bilbao, F. Rodríguez de Fonseca, R. Gómez, M. Navarro
Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense de Madrid
- 10:15 Alteración de los efectos reforzantes y de la sensibilización comportamental a la morfina en ratones knockout deficientes en receptores cannabinoides CB₁
R. Maldonado, M. Martín, C. Ledent, M. Parmentier, O. Valverde
Laboratorio de Neurofarmacología, Universidad Pompeu Fabra de Barcelona
- 10:30 Bloqueo del sistema cannabinoide endógeno como estrategia para el tratamiento de la adicción a opiáceos
M. Navarro, I. Del Arco, A. Bilbao, R. Gómez, L. Escudero, M.A. Villanúa, F. Rodríguez de Fonseca
Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense de Madrid
- 10:45 Efectos analgésicos y comportamentales del CP 55,940 en ratas de 40 días de edad. Implicaciones funcionales de los receptores cannabinoide y opioide
E.M. Romero, B. Fernández, O. Sagredo, N. Gómez, L. Urigüen, J.A. Ramos, M.P. Viveros
Departamento de Biología Animal II, Universidad Complutense de Madrid
- 11:00 Discusión General

11:15-11:45 Descanso (café en la antesala del aula de reuniones)

11:45-14:00 2ª sesión: Cannabinoides: potencial terapéutico y relación con patologías
(moderador: J.J. Fernández-Ruiz)

- 11:45 Cannabinoides y enfermedad de Huntington: relevancia en el tratamiento de los síntomas hiperquinéticos
I. Lastres-Becker, H.H. Hansen, F. Berrendero, R. De Miguel, A. Pérez-Rosado, J. Manzanares, J. A. Ramos, J.J. Fernández-Ruiz
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Universidad Complutense de Madrid
- 12:00 Perfil neurofarmacológico del bloqueante de la recaptación de anandamida AM404
F. Rodríguez de Fonseca, M.A. Gorriti, A. Bilbao, L. Escudero, R. Camacho, R. Muñoz, M. Navarro
Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense de Madrid
- 12:15 Alteraciones de los receptores de cannabinoides (CB₁) en los ganglios basales en la encefalomiелitis alérgica experimental, modelo de esclerosis múltiple en ratas
F. Berrendero, A. Sánchez, A. Cabranes, C. Puerta, M.L. Hernández, J.A. Ramos, A. García-Merino, J.J. Fernández-Ruiz
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Universidad Complutense de Madrid
- 12:30 Receptores centrales para cannabinoides en cerebro humano postmortem: estudio radiométrico en la depresión mayor
S. Mato, R. Rodríguez-Puertas, J. González-Maeso, J. Meana, J. Sallés, A. Pazos
Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Cantabria
- 12:45 Efectos anti-inflamatorios y neuroprotectores de los cannabinoides en cerebro
F. Molina-Holgado, E. Molina-Holgado, C. Guaza, N.J. Rothwell,
Universidad de Manchester
- 13:00 Efecto antitumoral de cannabinoides: papel del receptor CB₂
C. Sánchez, M.L. de Ceballos, T. Gómez del Pulgar, S. Ramón y Cajal, M. Guzmán
Instituto Cajal de Madrid
- 13:15 Cambios en los receptores de cannabinoides en modelos de neurodegeneración por necrosis o apoptosis en ratas
H.H. Hansen, I. Lastres-Becker, J. Manzanares, J. A. Ramos, H.S. Hansen, J.J. Fernández-Ruiz
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Universidad Complutense de Madrid
- 13:30 Expresión del receptor central de cannabinoides, CB₁, en próstata humana. Efecto de los cannabinoides sobre células tumorales de próstata
L. Ruiz, M.L. Velasco, M.G. Sánchez, I. Díaz-Laviada
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá de Henares
- 13:45 Discusión General

14:00-15:30 Comida (planta alta de la cafetería de la Facultad de Medicina)

15:30-17:45 3ª sesión: Cannabinoides: ligandos endógenos y receptores:
(moderador: M. Guzmán)

- 15:30 Diseño y síntesis de nuevos derivados de ácido araquidónico como inhibidores del sistema de recaptación de anandamida
M.L. López-Rodríguez, A. Viso, S. Ortega-Gutiérrez, I. Lastres-Becker, S. González, J.J. Fernández-Ruiz, J. A. Ramos
Departamento de Química Orgánica I, Universidad Complutense de Madrid

- 15:45 Acople de receptores CB1 a proteínas G en cerebro humano postmortem. Estudio autorradiográfico y agonismo
R. Rodríguez-Puertas, L. Hernández-García, J. González-Maeso, S. Mato, A. Pazos, J.J. Meana
Departamento de Farmacología, Universidad del País Vasco
- 16:00 Mecanismos de generación de ceramida e inducción de apoptosis por cannabinoides
I. Galve-Roperh, C. Sánchez, T. Gómez del Pulgar, D. Rueda, G. Velasco, M. Guzmán
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid
- 16:15 Papel del sistema endocannabinoide en la regulación de la ingesta de comida
R. Gómez, L. Escudero, J.M. Trigo, M. Moreno, F. Rodríguez de Fonseca, M. Navarro
Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense de Madrid
- 16:30 El receptor CB1 está acoplado a la activación de la vía PI3K/PKB. Posible papel en neuroprotección
T. Gómez del Pulgar, G. Velasco, M. Guzmán
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid
- 16:45 Potenciación de los efectos del quinpirole tras una única inyección de THC
B. Ferer, M. Gorriti, L. Escudero, M. Navarro, F. Rodríguez de Fonseca
Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense de Madrid
- 17:00 El receptor CB1 está acoplado a la estimulación de proteínas quinasas activadas por estrés
D. Rueda, I. Galve-Roperh, M. Guzmán
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid
- 17:15 Acciones de los cannabinoides en células gliales: receptores de cannabinoides en oligodendrocitos y papel biológico
E. Molina-Holgado, A. Arévalo-Martín, J.M. Vela, F. Molina-Holgado, G. Almazán, J. Borrell, C. Guaza.
Departamento de Plasticidad Neural, Instituto Cajal, CSIC, Madrid
- 17:30 Discusión General
- 17:45-18:15 Descanso (café en la antesala del aula de reuniones)**
- 18:15-19:00 Reunión para estudiar una posible constitución de una sociedad de investigación en cannabinoides**
- 19:00 Clausura**

CANNABIS: PATOLOGÍA DUAL EN JÓVENES VARONES.

M. Quiroga, S. Anglada

Servicio de Psiquiatría, Hospital Militar “Capitán Médico Pagés”, 52071 Melilla (España)

INTRODUCCION: El cannabis (THC) es una de las drogas ilegales más ampliamente utilizada por lo jóvenes. En el presente estudio buscamos si su consumo se asocia a alguna psicopatología, pues aún está por dirimir si el THC causa alteraciones psicopatológicas, es una mera coincidencia o, realmente constituye una dualidad psicopatológica.

MATERIAL Y METODO: Se revisan las historias clínicas de los varones atendidos en nuestro Servicio entre el 1 de enero de 1992 y el 31 de diciembre de 1999. En el estudio se incluyen aquellos que manifestaban consumir THC en la última semana y daban positivo sólo a THC (FRONTLINE®) en la orina y todos lo que no usaban drogas. Consideramos como variables, la edad en el momento de llegar a nuestro Servicio, el año, el grupo diagnóstico CIE-10, la hospitalización y la autoagresividad. El estudio estadístico busca mediante pruebas de asociación individuales si el THC positivo en orina está significativamente asociado a alguna de las variables consideradas. Posteriormente, mediante la regresión logística, cómo influyen conjuntamente en el consumo de THC la edad, el grupo diagnóstico y la hospitalización.

RESULTADOS: Se obtienen un total de 1968 historias clínicas que cumplen los criterios indicados. La edad media es de 19.25 años (E. típ. 0,003). Las orinas positivas a THC fueron 226 (11.48 %; IC-95% 10.08-12.88) y se asociaban significativamente con los más jóvenes (19.01 años; $F_{1 \text{ g.l.}} = 6.13$; $p < 0.05$). La tasa de THC positivo en orina incrementó a partir de 1997 ($\text{Chi}^2_{7 \text{ g.l.}} = 59.1$; $p < 0.001$). Los diagnósticos de trastorno psicótico inducido por cannabis (F12.5), esquizofrenia (F20-F29) y trastornos de la personalidad (F60-F69) fueron lo que predominaron ($\text{Chi}^2_{6 \text{ g.l.}} = 166.5$; $p < 0.001$) en los consumidores de cannabis. También fueron más casos los hospitalizados ($\text{Chi}^2_{1 \text{ g.l.}} = 56.49$; $p < 0.001$) que los no consumidores, en tanto que la autoagresividad se mostró independiente del consumo de THC. En el análisis multivariante encontramos que el consumo presentó una fuerte asociación con F12.5 (odds ratio (or) 21.14 <IC-95% 7.02-63.59>), F20-F29 (or 3.52 <1.25-9.92>), F60-F69 (or 3.36 <1.44-7.83>), con la hospitalización (or 2.45 <1.59-3.76>) y con la edad (or 0.82 <0.72-0.93>).

La ecuación que resume la probabilidad de que el consumo de cannabis se presente asociado es estos factores es:

$$\text{Ln} (P/1-P) = 0.56 - 0.18[\text{edad}] + 3.05[\text{F12.5}] + 1.26[\text{F20-29}] + 1.21[\text{F60F-69}] + 0.89[\text{hospitalización}].$$

DISCUSION: Nuestro estudio coincide con otros en la frecuente asociación del cannabis con la esquizofrenia (F20-F29) y con los trastornos de la personalidad (F60-F69), lo que apoyaría las hipótesis más recientes de que pudiera existir una determinación genética responsable de estas dualidades. El trastorno psicótico inducido por cannabis (F12.5) en criterios CIE-10 lo hace fenomenológicamente indistinguible de un primer brote esquizofrénico paranoide (F20.0) o de una psicosis aguda transitoria (F23), salvo por constatar la positividad inmediata del THC, sin que podamos determinar cuál fue su evolución una vez abandonado nuestro dispositivo asistencial. La significativa coincidencia de menor edad, trastornos psicóticos (F12.5 y F20-F29) y de la personalidad (F60-F69) en los consumidores nos hace pensar en que el cannabis es una droga de alto riesgo para los varones jóvenes, o viceversa.

CONCLUSIONES: En varones jóvenes, el consumo de cannabis, con orina positiva a THC, se asocia significativamente a trastornos psicóticos inducidos por la droga, a la esquizofrenia y a trastornos de la personalidad. Además, los consumidores son más jóvenes que los no consumidores. Las tasas de consumo incrementaron significativamente desde 1997 a 1999.

ALTERACIONES DE LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES (CB₁) EN EL CEREBRO DE RATAS TRATADAS DE FORMA PROLONGADA CON ALCOHOL O COCAINA

S. González, V. Sparpaglione*, M. Cebeira, D. Parolaro*, J.J. Fernández-Ruiz, J.A. Ramos

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid

*Departamento de Farmacología, Universidad de Milano, Italia

Se ha propuesto que el sistema cannabinoide endógeno podría estar implicado, como sistema neurotransmisor o neuromodulador, en los procesos de recompensa cerebral sobre los que actúan las diferentes drogas de abuso. Según esta hipótesis, el consumo de marihuana, pero también de cocaína, alcohol u otras drogas de abuso, podrían alterar el funcionamiento del sistema endocannabinoide, a nivel de los receptores CB₁ y/o de sus ligandos endógenos, en las regiones cerebrales directa o indirectamente implicadas en los mecanismos de refuerzo. El presente estudio ha pretendido establecer los cambios que se producen en los receptores CB₁, analizados mediante autorradiografía e hibridación *in situ*, en el cerebro de ratas expuestas de forma crónica a cocaína (dos inyecciones i.p. diarias a una dosis de 15 mg/kg durante 10 días) o alcohol (dieta líquida con 7.2% (v/v) de etanol *ad libitum* durante 14 días). Los resultados demostraron que los animales tratados crónicamente con cocaína presentaban un descenso significativo de los niveles de ARNm para el receptor CB₁ en el núcleo ventromedial hipotalámico, núcleos de la amígdala, capas profunda y superficial de la corteza cerebral y áreas del tallo cerebral, regiones que han sido implicadas directa o indirectamente en los fenómenos de refuerzo. No se observaron cambios en el resto de las regiones estudiadas (hipocampo, ganglios basales y cerebelo). Por el contrario, las ratas expuestas de forma crónica a etanol no evidenciaron ningún cambio en los niveles de ARNm para el receptor CB₁ en ninguna de las regiones analizadas. En la actualidad, se realizan estudios para ver los cambios a nivel de la concentración de endocannabinoides. Como conclusión, puede decirse que el consumo crónico de cocaína o alcohol no produce cambios similares a nivel de la expresión de receptores CB₁ en las regiones cerebrales directamente o indirectamente implicadas en los mecanismos de refuerzo, lo que apuntaría a la existencia de mecanismos independientes entre ambos tipos de drogas en cuanto a su capacidad de alterar el sistema endocannabinoide.

(estudios financiados por el Plan Nacional sobre Drogas)

PAPEL DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDOGENO EN LA ADICCION A ETANOL

A. Bilbao, F. Rodríguez de Fonseca, R. Gomez, M.Navarro

Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid

Marihuana y alcohol es una de las combinaciones más frecuentemente consumidas por los humanos polidrogodependientes. En este estudio mostraremos cómo la estimulación del receptor para cannabinoides CB1 estimula la ingesta de alcohol, mientras que el tratamiento con el bloqueante CB1 SR141716A induce una reducción del consumo operante de alcohol, pero sólo en animales con una historia de dependencia alcohólica previa. Estudios adicionales en membranas de cerebelo de ratas tratadas aguda o crónicamente con etanol muestran que el alcohol etílico es capaz de desensibilizar el sistema cannabinoide tras la exposición aguda a etanol, mientras que una sensibilización de este receptor puede detectarse durante el transcurso de la abstinencia. Estos datos apoyan la posible utilidad de fármacos activos en el receptor CB1 para el tratamiento de la adicción o la abstinencia alcohólica.

Estudios financiados gracias al Plan Nacional Sobre Drogas, CICYT, DGICYT y Comunidad de Madrid

ALTERACION DE LOS EFECTOS REFORZANTES Y DE LA SENSIBILIZACION COMPORTAMENTAL A LA MORFINA EN RATONES KNOCKOUT DEFICIENTES EN RECEPTORES CANNABINOIDES CB-1

R. Maldonado, M. Martín, C. Ledent, M. Parmentier, O. Valverde

Laboratori de Neurofarmacologia, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain.

Se ha conseguido recientemente mediante técnicas de recombinación homóloga la generación de ratones knock-out deficientes en receptores cannabinoides CB-1 (Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 1999). La expresión de los signos somáticos de la abstinencia morfinica así como el comportamiento de auto-administración de morfina resultaron fuertemente reducidos en animales deficientes en receptores CB-1 (Ledent et al., 1999). En el presente estudio, se ha evaluado la participación de los receptores cannabinoides CB-1 en diversas respuestas motivacionales inducidas por la morfina y la cocaína mediante el empleo de ratones knock-out deficientes en dichos receptores. En primer lugar, se ha estudiado la sensibilización a las respuestas hiperlocomotoras inducidas en estos animales tras la administración crónica de cocaína y morfina. La administración aguda de morfina (15 mg/kg, s.c.) produjo el mismo incremento de la actividad locomotora en animales controles y mutantes. Sin embargo, la administración crónica de morfina indujo una clara sensibilización de los efectos locomotores en los animales controles, pero esta sensibilización resultó abolida en los animales deficientes en receptores CB-1. La administración aguda de cocaína (10 mg/kg, i.p.) indujo un incremento similar de la actividad locomotora en ambos grupos de animales. La sensibilización producida por la administración repetida de cocaína fue asimismo similar en animales controles y mutantes. En segundo lugar, hemos estudiado en estos animales las propiedades reforzantes de la morfina y la cocaína mediante la utilización del test de condicionamiento espacial. La administración de morfina indujo una preferencia de plaza condicionada en animales controles, pero este efecto no fue observado en los animales deficientes en receptores CB-1. La preferencia de plaza condicionada inducida tras la administración de cocaína resultó similar en los animales controles y mutantes. Estos resultados demuestran que los receptores cannabinoides CB-1 desempeñan un papel crucial para la manifestación de los efectos reforzantes de la morfina así como en las respuestas adaptativas inducidas por la administración crónica de esta sustancia. Sin embargo, los receptores CB-1 no participan en estas respuestas motivacionales inducidas por la cocaína. Ciertos mecanismos neurobiológicos participan de una manera común en las propiedades reforzantes de los opioides y los psicoestimulantes (DiChiara y North, 1992). Sin embargo, este estudio demuestra una implicación diferente de los receptores CB-1 en las respuestas motivacionales inducidas por estos dos tipos de drogas de abuso.

Di Chiara, G., North, R.A. (1992) Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 185-193.

Ledent, C. Valverde, O., Cossu, G., Petite, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Bohme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., Vassart, G., Fratta, W., Parmentier, M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoid and reduced addictive effects of opiates in CB-1 receptor knockout mice. *Science* 283: 401-404.

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

BLOQUEO DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO COMO ESTRATEGIA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN A OPIÁCEOS

M. Navarro, I. Del Arco, A. Bilbao, R. Gómez, L. Escuredo, M. Villanúa, F. Rodríguez de Fonseca.

Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid

El sistema cannabinoide y el sistema opioide se encuentran estrechamente vinculados, especialmente en áreas del cerebro relacionadas con el control motivacional-emocional. En este trabajo hemos explorado la capacidad del antagonista del receptor para cannabinoide SR 141716 A para reducir la autoadministración de heroína, utilizando dos modelos de autoadministración. El SR 141716 A redujo la autoadministración de heroína en animales sometidos a regímenes de autoadministración capaces de inducir dependencia a este opiáceo. Sin embargo no fue efectivo en un modelo de autoadministración limitada que no indujo dependencia. Dado que la exposición reiterada a opiáceos es capaz de alterar los puntos de ajuste homeostáticos, lo que conduce al establecimiento de un fenotipo dependiente, es posible que el sistema cannabinoide endógeno sea uno de los que se vean afectados durante esta transición, esencial para el establecimiento de la conducta adictiva. Mediante hibridación in situ cuantitativa hemos podido comprobar que el receptor CB1 se modifica de manera opuesta durante la administración aguda y crónica de morfina en áreas cerebrales relevantes para la adicción. Estos datos apoyan el uso de antagonistas CB1 para el tratamiento de la adicción a heroína.

Estudios financiados gracias al Plan Nacional Sobre Drogas, CICYT, DGICYT y Comunidad de Madrid

EFFECTOS ANALGÉSICOS Y COMPORTAMENTALES DEL CP 55,940 EN RATAS DE 40 DÍAS DE EDAD. IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDE Y OPIOIDE

E. M. Romero^a, B. Fernández^a, O. Sagredo^b, N. Gomez^a, L. Urigüen^a, J. A. Ramos^b, M. P. Viveros^a.

(a) Dept. Biología Animal II, Fac. Biología, (b) Dept. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Medicina. Univ Complutense, 28040-Madrid.

Numerosos estudios realizados en roedores adultos indican que los agonistas cannabinoides producen analgesia e hipoactividad y que existen interacciones funcionales entre el sistema opioide y el sistema cannabinoide. Sin embargo, es muy escasa la información respecto a efectos agudos de agonistas cannabinoides y posibles interacciones entre receptores opioides y cannabinoides en animales jóvenes. Los datos disponibles sugieren que el período prepuberal podría ser crítico para la maduración funcional del receptor CB1 cannabinoide en cuanto a la mediación de los efectos analgésicos y motores. En el presente trabajo, presentamos los primeros resultados sobre efectos analgésicos y comportamentales de la administración aguda del agonista cannabinoide CP 55,940 en ratas de ambos sexos de 40 días de edad. Se utilizaron la prueba nociceptiva de inmersión de la cola en agua a 50° C (IC) (respuesta mediada a nivel espinal) y el tablero con agujeros (TCA), una prueba validada para el estudio de la actividad motora general y la exploración dirigida a estímulos. Se realizaron, en primer lugar, curvas dosis-respuesta utilizando las dosis 0,1, 0,2, 0,4 y 0,6 mg/kg de CP 55,940 (s.c.). A continuación se estudió el antagonismo de los efectos del CP 55,940 (0,6 mg/kg) tanto por el antagonista cannabinoide SR 141716 A (3 mg/kg, i.p.), como por el antagonista opioide Naloxona (NAL, 1 mg/kg, i.p.). Finalmente se evaluaron los efectos de un tratamiento combinado con CP 55,940 (0,1 mg/kg) y morfina (MF, 1 mg/kg, s.c.). Todas las dosis de CP 55,940 utilizadas produjeron un efecto analgésico significativo ($P < 0.05$) y no se encontraron diferencias significativas entre las distintas dosis. En todos los grupos de hembras se observó un % MEP (máximo efecto posible) significativamente superior al de los machos ($P < 0.05$). El efecto analgésico del CP 55,940 fue antagonizado por SR 141716 A, pero no por NAL y la MF (dosis subefectiva) no modificó el efecto del agonista cannabinoide. En el TCA, tanto la deambulacion externa (DE) como la postura erguida (parámetros relacionados con la actividad motora general) fueron deprimidos significativamente ($P < 0,05$) y de forma dosis dependiente por el CP 55,940. En el caso de la postura erguida el efecto del fármaco fue más marcado en hembras que en machos. Estos efectos sobre la actividad general fueron antagonizados por el antagonista cannabinoide pero no por NAL. El tratamiento combinado con dosis subefectivas de MF y CP 55,940 resultó en una disminución significativa de la DE ($P < 0,05$). El agonista cannabinoide también indujo una disminución significativa en la frecuencia y tiempo de exploración de agujeros ($P < 0,05$) (exploración dirigida a estímulos), pero estos efectos no fueron antagonizados ni por el antagonista cannabinoide ni por el antagonista opioide. El tratamiento combinado con dosis subefectivas de MF y CP 55,940 produjo una disminución significativa de la actividad exploratoria. Las principales conclusiones de este trabajo son: 1) El agonista cannabinoide produjo analgesia y redujo la actividad general y la exploración dirigida a estímulos en animales de 40 días de edad; 2) Los resultados indican una mediación del receptor CB1 en los efectos del CP 55,940 sobre nocicepción y actividad general, pero no en el efecto depresor de la exploración dirigida a estímulos; además, los datos también indican un diferente comportamiento del receptor CB 1 en la mediación de analgesia (ausencia de diferencias entre dosis) y actividad general (relación dosis-respuesta); 3) Los datos no indican la presencia de interacciones entre los receptores cannabinoide y opioide en la modulación de las respuestas nociceptivas mediadas a nivel espinal en ratas prepuberales. Sin embargo, algunos resultados sugieren interacciones entre los sistemas cannabinoide y opioide en la modulación de respuestas comportamentales.

CANNABINOIDES Y ENFERMEDAD DE HUNTINGTON: RELEVANCIA EN EL TRATAMIENTO DE LOS SÍNTOMAS HIPERQUINÉTICOS

I. Lastres-Becker, H.H. Hansen, F. Berrendero, R. de Miguel, A. Pérez-Rosado, J. Manzanares, J.A. Ramos, J.J. Fernández-Ruiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por trastornos del movimiento, alteraciones emocionales y demencia. En estudios recientes, se ha observado una pérdida significativa de los receptores CB₁ en los núcleos que reciben la inervación estriatal en el cerebro postmortem de pacientes afectados por esta enfermedad, y se ha sugerido que sustancias que sean capaces de incrementar la actividad endocannabinoide, como agonistas de los receptores o inhibidores del proceso de terminación de la acción biológica de los endocannabinoides, podrían ser útiles en el tratamiento de los síntomas hiperquinéticos de esta enfermedad. En el presente estudio se ha profundizado en esta posibilidad utilizando un modelo animal de la enfermedad de Huntington, generado mediante lesiones intrastriatales con ácido 3-nitropropiónico (3NP). En primer lugar se ha procedido a la caracterización comportamental y morfológica de este modelo. Se ha observado un patrón bifásico en las alteraciones motoras producidas por la lesión con 3NP. En una fase temprana (1-2 semanas después de la lesión) los animales presentaban hiperactividad, seguida de una fase más tardía (3-4 semanas) de depresión motora. En la fase de hiperactividad, se procedió al análisis de neurotransmisores en los ganglios basales. Los resultados demostraron un descenso notable en la concentración de GABA y dopamina y en la actividad de sus enzimas biosintéticas, glutamato descarboxilasa y tirosina hidroxilasa. Además, los niveles de ARN mensajero para el receptor CB₁, proencefalina y sustancia P disminuyeron significativamente en el estriado de ratas inyectadas con ácido 3NP y esto fue acompañado de reducciones paralelas en la densidad de los receptores CB₁ en el globo pálido y, en menor medida, en la sustancia nigra. En estudios farmacológicos utilizando los animales lesionados con 3NP, se observó que la administración de AM404, un inhibidor de la recaptación de endocannabinoides, redujo notablemente las alteraciones motoras observadas en la fase temprana de hiperactividad, y que los niveles de neurotransmisores tendían a normalizarse. Este resultado podría ser relevante para el tratamiento de los síntomas hiperquinéticos en los pacientes afectados por la enfermedad de Huntington, una enfermedad neurodegenerativa que todavía no posee un tratamiento farmacológico bien desarrollado.

(estudios financiados por el Plan Regional de Investigación-CAM (08.5/0029/1998))

PERFIL NEUROFARMACOLÓGICO DEL BLOQUEANTE DE LA RECAPTACION DE ANANDAMIDA AM 404

F. Rodríguez de Fonseca, M. A. Gorriti, A. Bilbao, L. Escuredo. R. Camacho, R. Muñoz, M. Navarro.

Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid

La degradación de los endocannabinoides anandamida y 2-araquidonilglicerol requiere como paso obligado su recaptación e incorporación al medio intracelular. Este Proceso se realiza mediante un sistema de recaptación específico. Fármacos que actúen bloqueando el sistema de recaptación de anandamida, como el AM 404, podrían tener un gran interés terapéutico al actuar solamente en aquellas sinapsis en las que hubiese una liberación activa de anandamida. El presente estudio se ha dirigido a la caracterización del perfil neuropsicofarmacológico del AM 404. La administración central de este compuesto indujo un síndrome comportamental que no es totalmente superponible al de la anandamida, ya que no produjo catalepsia o hipotermia. Sin embargo, el pretratamiento central o periférico con AM 404 atenuó las respuestas a agonistas dopaminérgicos (apomorfina, SKF 38393 o quinpirole) y anfetamina, reduciendo la hiperactividad espontánea que presentan las ratas hipertensivas espontáneas, consideradas como modelo del trastorno infantil de hiperactividad y déficit atencional. Estas propiedades del AM 404 permiten proponerle como fármaco neuroléptico atípico. El desarrollo de análogos no tóxicos permitiría su utilización en trastornos neuropsiquiátricos con participación dopaminérgica.

Estudios financiados gracias al Plan Nacional Sobre Drogas, CICYT, DGICYT y Comunidad de Madrid

ALTERACIONES DE LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES (CB₁) EN LOS GANGLIOS BASALES EN LA ENCEFALOMIELITIS ALERGICA EXPERIMENTAL, MODELO DE ESCLEROSIS MULTIPLE EN RATAS

F. Berrendero, A. Sánchez*, A. Cabranes, C. Puerta*, M.L. Hernández, J.A. Ramos, A. García-Merino*, J.J. Fernández-Ruiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid

*Servicio de Neurología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, 28035-Madrid

Datos, inicialmente anecdóticos y, más recientemente, apoyados por una más sólida evidencia experimental, sugieren que los cannabinoides podrían ser útiles en el tratamiento de alguno(s) de los síntomas de la esclerosis múltiple. A pesar de esta evidencia, no se han obtenido todavía datos acerca de los cambios que se producen en los receptores para cannabinoides CB₁, las dianas farmacológicas para la acción de los cannabinoides, en el cerebro postmortem de enfermos con esclerosis múltiple o en modelos animales de esta enfermedad. En el presente estudio, se ha utilizado el modelo de encefalomiелitis alérgica experimental en rata Lewis inducida mediante proteína básica de mielina bovina en coadyuvante completo de Freund. Tras la inoculación, los animales se pesaron y se exploraron a diario para detectar la aparición de afectación neurológica. Los primeros síntomas aparecieron hacia el día 10 después de la inoculación, alcanzando su máxima intensidad el día 13, momento en el que se sacrificaron los animales. El cerebro se extrajo tras perfusión del animal por vía intracardiaca con PBS y se utilizó para la determinación de la densidad de los receptores CB₁, mediante autorradiografía, y de los niveles de ARNm para este receptor, mediante hibridación *in situ*. Los resultados obtenidos demostraron que los receptores CB₁ no presentaban cambios significativos, ni en densidad ni en niveles de ARNm, en la mayor parte de las regiones cerebrales (corteza, hipocampo, estructuras límbicas y cerebelo) de los animales inoculados. Sin embargo, se observó un descenso muy marcado en ambos parámetros a nivel del cuerpo estriado. Estos datos sugieren que la generación de este modelo de esclerosis múltiple en ratas estaría asociada a un descenso de los receptores CB₁ en los ganglios basales, de forma que esto podría explicar algunos de los síntomas motores característicos de esta enfermedad y, sobre todo, apoyar la hipótesis de que agonistas directos o indirectos de estos receptores pudieran ser útiles en el tratamiento de alguno de los síntomas de la esclerosis múltiple.

(estudios financiados por la CAM-Plan Regional de Investigación (08.5/0029/1998))

RECEPTORES CENTRALES PARA CANNABINOIDES EN CEREBRO HUMANO POSTMORTEM: ESTUDIO RADIOMÉTRICO EN LA DEPRESION MAYOR.

S. Mato¹, R. Rodríguez-Puertas², J. González-Maeso², J. Meana², J. Sallés³ y A. Pazos¹.
Dpto. Farmacología, Universidad del País Vasco, ²Leioa y ³Gasteiz. ¹Dpto. Fisiología y Farmacología, Universidad de Cantabria, 39011-Santander.

Los compuestos cannabinoides ejercen la mayor parte de sus acciones a través de unos receptores específicos, que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Los receptores centrales para cannabinoides (CB₁) se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro de mamíferos y se acoplan negativamente a la enzima adenilato ciclasa a través de proteínas del subtipo Gi/o. El objetivo de este estudio consistió en evaluar, mediante técnicas de fijación de radioligandos, las posibles modificaciones en las propiedades, distribución y respuesta funcional de los receptores CB₁ en muestras de cerebro humano postmortem procedentes de individuos con diagnóstico establecido de depresión mayor (n=18) frente a muestras procedentes de individuos control (n=27).

La proteína receptora se marcó utilizando el agonista [³H]CP55,940 en presencia de WIN55,212-2 como sustancia desplazadora, en membranas (corteza frontal) y secciones (corteza frontal, hipocampo, ganglios basales y cerebelo) de cerebro humano postmortem. Para estudiar el acoplamiento de los receptores CB₁ a su proteína G se realizaron experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por WIN55,212-2 en membranas y en secciones de las mismas regiones cerebrales.

Los experimentos de fijación de [³H]CP55,940 realizados en corteza frontal no mostraron cambios en cuanto a la densidad ni la afinidad de los receptores CB₁ [$pK_D = 9.64 \pm 0.30$ (control) vs $pK_D = 9.51 \pm 0.36$ (depresión mayor)]. En los experimentos autorradiográficos se observó una ligera tendencia al incremento en la densidad de receptores CB₁ para los casos con depresión mayor en algunas áreas del hipocampo [42.3 ± 28.4 (control) vs 64.8 ± 40.8 (depresión mayor) fmol/mg tejido en el estrato granular del giro dentado]. En los estudios de fijación de [³⁵S]GTPγS a membranas de corteza frontal se encontró un incremento significativo de la capacidad de estimulación máxima del WIN55,212-2 (%E_{max}) para los casos con depresión mayor [$229.96 \pm 55.38\%$ (control) vs $282.39 \pm 54.79\%$ (depresión mayor)].

Estos resultados sugieren una posible implicación de los receptores CB₁ en la enfermedad depresiva mayor, probablemente a nivel postreceptorial.

(S.M. es una beneficiaria de una beca predoctoral del Gobierno Vasco).

EFFECTOS ANTI-INFLAMMATORIOS Y NEUROPROTECTORES DE LOS CANNABINOIDES EN CEREBRO

F. Molina-Holgado¹, E. Molina-Holgado², C. Guaza², N.J. Rothwell¹.

¹School of Biological Sciences, University of Manchester, Oxford Road, Manchester M139PT, Reino Unido. ²Instituto Cajal, CSIC, Avda. Dr. Arce nº 38, 28002 Madrid, España.

La investigación entre cannabinoides (CBs), inmunidad y procesos inflamatorios ha adquirido en los últimos años un especial interés, en particular en relación con enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) que cursan con alteraciones inmunoinflamatorias y que incluyen desde la esclerosis múltiple hasta enfermedades neurodegenerativas. La presencia de receptores cannabinoides del tipo CB₁, CB₂ o vainilloides (VR₁) en células neuronales o gliales (principales células implicadas en la respuesta inmune intracerebral) ha abierto nuevas expectativas en el estudio de las posibles acciones de los cannabinoides (endógenos o sintéticos) como reguladores de esta respuesta. La estimulación de los cultivos celulares primarios (neuronas y/o células gliales) con endotoxina bacteriana (LPS) es un buen modelo *in vitro* para el estudio de los mecanismos implicados en la respuesta inflamatoria por células intrínsecas del cerebro. Como resultado de la incubación de cultivos primarios de células gliales con LPS, se produce la liberación de diversos mediadores proinflamatorios, entre los que destacan por su capacidad neurodegenerativa, el óxido nítrico (NO) y las interleucinas (IL) proinflamatorias (IL-1β y TNF-α). Los cannabinoides (anandamida, metanandamida, CP-55940, HU-210 o 11-OH-CBN) regulan diferencialmente la liberación o producción de mediadores "dañinos" y "beneficiosos" para las células a través de diferentes mecanismos de acción o vías de señalización. A nivel nuclear destacan los efectos que

los cannabinoides ejercen sobre los sistemas PKB/Akt, MAPKs y los factores de transcripción STAT-3 y NFκB. Consecuencia de estas acciones moduladoras que los cannabinoides desarrollan sobre la respuesta inmunoinflamatoria en el SNC, es la regulación de la transcripción de proteínas inflamatorias (iNOS, IL-1β y TNF-α) y antiinflamatorias (IL-1ra, IL-4, IL-6 y IL-10), produciéndose una disminución del proceso inflamatorio (Fig.1). Estos efectos antiinflamatorios son dependientes del receptor CB₁, como se demuestra con el empleo del antagonista SR-141716A. Es importante destacar que este compuesto, además de su efecto antagonista, imita a los agonistas cannabinoides (especialmente relevante es su efecto en la producción de IL-1ra y IL-10) cuando es administrado en solitario a los cultivos celulares, lo cual le confiere propiedades de *agonista inverso*. Nuestros resultados indican que la activación de los receptores CB₁ puede inducir respuestas anti-inflamatorias en el SNC, sugiriendo por tanto, la posible capacidad terapéutica de los cannabinoides endógenos o sintéticos.

Financiado por: The Wellcome Trust (Reino Unido), MRC (Reino Unido), CICYT (MEC, España) y BIOMED-2 (UE).

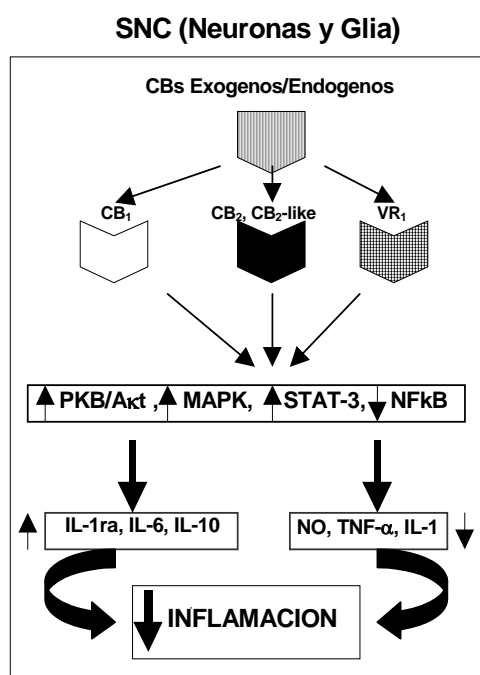


Fig.1. Inhibición de la respuesta inflamatoria/daño celular

EFFECTO ANTITUMORAL DE CANNABINOIDES: PAPEL DEL RECEPTOR CB₂

C. Sánchez^{1*}, M.L.de Ceballos^{2*}, T. Gómez del Pulgar¹, S. Ramón y Cajal³, M. Guzmán¹

¹Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I, Fac.de Biología, UCM; ²Instituto Cajal, CSIC; ³Servicio de Anatomía Patológica, CPH, Madrid

*Contribuyeron por igual a este trabajo

Uno de los efectos más intrigantes y menos explorados de los cannabinoides es su acción antiproliferativa sobre células transformadas. Así, la anandamida y otros agonistas cannabinoides inhiben la proliferación de células de cáncer de mama y próstata en cultivo. Además, nuestro grupo ha demostrado que los cannabinoides inducen apoptosis de células de glioma en cultivo y regresión de gliomas *in vivo*. Algunas observaciones *in vitro* indican que las células de glioma C6 expresan tanto el receptor CB₁ como el CB₂, y que los cannabinoides podrían ejercer sus efectos apoptóticos independientemente a través de cualquiera de dichos receptores. En este trabajo hemos estudiado la hipótesis de que este efecto antitumoral de los cannabinoides pudiera estar mediado por el receptor CB₂, lo que de confirmarse supondría una ventaja en su posible utilización terapéutica, ya que se evitarían los efectos psicoactivos mediados por el receptor CB₁ que ejercen los cannabinoides no selectivos hasta ahora ensayados.

Se estudió el efecto antitumoral del JWH-133, un agonista selectivo del receptor CB₂ ($K_i = 680$ y 3 nM para CB₁ y CB₂, respectivamente), y se comparó con el del WIN-55,212-2, un agonista cannabinoide no selectivo ($K_i = 2$ y 1 nM para CB₁ y CB₂, respectivamente). Se utilizaron ratones Rag2^{-/-}, carentes de células T y B maduras, a los que se les había inoculado células de glioma C6. La administración repetida de JWH-133 o WIN-55,212-2 durante 8 días (50 µg/kg x día) dió lugar a una reducción significativa del tamaño del tumor. Mientras que el efecto del WIN-55,212-2 fue antagonizado parcialmente tanto por el antagonista CB₁ SR141716 como por el antagonista CB₂ SR144528, el efecto antitumoral del JWH-133 sólo fue bloqueado por SR144528. Mediante estudios inmunocitoquímicos hemos comprobado que los tumores de glioma C6 expresan ambos receptores. Es más, de acuerdo con estos estudios, el tratamiento con JWH-133 disminuye selectivamente la expresión del receptor CB₂, mientras que el SR144528 aumenta su expresión y antagoniza el efecto del JWH-133. Estudios realizados en tumores humanos (astrocitomas y glioblastomas de diversa malignidad) han detectado la presencia de receptores CB₁ y/o CB₂. Por último, estudios preliminares en células C6 en cultivo indican que la activación selectiva del receptor CB₂ induce apoptosis via acumulación de ceramida y activación de la cascada de proteína quinasas regulada por señales extracelulares ERK.

Los glioblastomas, tumores cerebrales bastante frecuentes, de altísima malignidad y rápida evolución, son extremadamente resistentes a las terapias convencionales. El estudio del efecto antitumoral de agonistas selectivos del receptor CB₂ podría proporcionar la base para una vía terapéutica alternativa.

CAMBIOS EN LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN MODELOS DE NEURODEGENERACION POR NECROSIS O APOPTOSIS EN RATAS

H.H. Hansen, I. Lastres-Becker, J. Manzanares, J.A. Ramos, H.S. Hansen*, J.J. Fernández-Ruiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid

*Department of Pharmacology, The Royal Danish School of Pharmacy, Copenhagen (Denmark)

No se conoce bien como los receptores de cannabinoides CB₁ responden al daño necrótico o apoptótico *in vivo*, un hecho que tiene un cierto interés considerando que la activación de estos receptores tiene un efecto modulador sobre la actividad neuronal e, incluso, que agonistas sintéticos o endógenos de estos receptores han presentado ciertas acciones neuroprotectoras. En concreto, se ha propuesto que los receptores CB₁ podrían regular la actividad de los receptores NMDA para glutamato que se sabe que están implicados en la excitotoxicidad cerebral. En el presente estudio, se han evaluado los cambios en la densidad y niveles de ARNm para el receptor CB₁ en ratas de 6 días de vida que fueron sometidas a microinyecciones unilaterales de NMDA en el cuerpo estriado izquierdo. Se sabe que este procedimiento produce muerte neuronal por necrosis en el cerebro neonatal (Ikonomidou y cols., *J. Neurosci.* 9:2809-18, 1989). Estos cambios fueron comparados con los producidos tras el bloqueo del receptor NMDA mediante inyecciones sistémicas de (+)MK-801 a ratas de 7 días de vida. Se sabe que este procedimiento produce neurodegeneración apoptótica en el cerebro neonatal (Ikonomidou y cols., *Science* 283:70-74, 1999). Los cerebros de estos animales fueron utilizados a las 4 o 24 horas después de la inyección para la determinación de los niveles de ARNm para el receptor CB₁, mediante hibridación *in situ*, y para el análisis de la densidad de estos receptores, mediante autorradiografía.

El estriado ipsilateral mostró una pérdida significativa en la densidad y niveles de ARNm para el receptor CB₁ a las 4 horas de la inyección de NMDA, pérdida que fue muy marcada a las 24 horas. Esta reacción excitotóxica se diseminó de forma rápida y no apareció confinada a las regiones estriatales adyacentes al sitio de inyección, como demostró el hecho de que los receptores CB₁ se vieran afectados en mayor o menor medida a lo largo de diversas regiones del prosencéfalo. También se observaron cambios en los receptores CB₁ en diversas regiones cerebrales tras el bloqueo de los receptores NMDA con (+)MK-801, aunque los efectos fueron menos pronunciados. Esto podría significar que la hiperactividad NMDA en el cerebro neonatal afecta en mayor grado a los receptores CB₁ que la hipoactividad NMDA. En relación a esto, hemos demostrado recientemente que la formación de precursores de los endocannabinoides se incrementó en el cerebro durante la exposición neonatal a NMDA, mientras que no se observaron cambios durante el bloqueo del receptor NMDA (*J. Neurochem.*, en prensa). Por el momento, se desconoce si esto responde a una respuesta endógena para compensar la pérdida de receptores CB₁. En la actualidad, se realizan experimentos para demostrar: (i) los cambios que se producen en las concentraciones de los dos principales endocannabinoides, anandamida y 2-araquidonilglicerol, en estos modelos de neurodegeneración neonatal; y (ii) si la activación de los receptores CB₁ puede prevenir la pérdida neuronal durante la hiperactividad de los receptores NMDA en el cerebro neonatal.

(estudios financiados por la DGICYT (PM96-0049))

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CENTRAL DE CANNABINOIDES, CB₁, EN PRÓSTATA HUMANA. EFECTO DE LOS CANNABINOIDES SOBRE CÉLULAS TUMORALES DE PRÓSTATA.

L. Ruíz, M. L. Velasco, M.G. Sánchez, I. Díaz-Laviada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Madrid.

Los cannabinoides ejercen la mayoría de sus efectos a través de la unión a receptores de membrana acoplados a proteínas G. Hasta la actualidad, se han clonado dos tipos de receptores para cannabinoides en humanos: el receptor central, CB₁, y el receptor periférico, CB₂. Aunque el CB₁ se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso central, ha sido también localizado en útero, ovario, glándula mamaria y testículos. El objetivo de este trabajo es averiguar si la próstata humana expresa algún receptor para cannabinoides y qué efecto o efectos pueden producir estos compuestos en la esta glándula.

Estudios de *western blotting* realizados con membranas de próstata obtenidas a partir de biopsias humanas demuestran que el receptor central de cannabinoides CB₁ se expresa en estas membranas. El peso molecular del receptor expresado en la próstata es de 58 kDa mientras que el que se obtiene en membranas de cerebelo es de 72 kDa. Estas diferencias pueden deberse a distintos estados de glicosilación puesto que el peso molecular deducido a partir de la secuencia del receptor es de 53 kDa [1]. Mediante estudios de actividad de adenilil ciclasa (AC) se ha comprobado que tanto ⁹-Tetrahydrocannabinol (THC) como el agonista sintético HU-210 inhiben la producción de cAMP estimulada por forskolina lo que indica que el receptor de cannabinoides expresado en la próstata es funcionalmente activo.

Para estudiar el efecto de los cannabinoides en las células de próstata se ha utilizado la línea de células epiteliales PC-3 derivada de cáncer de próstata. El tratamiento de estas células con 0,1 :M THC o con 0,05 :M HU-210 estimula la producción de factor de crecimiento nervioso (NGF) por las células PC-3. Esta estimulación parece estar mediada por el receptor de cannabinoides. Sin embargo el tratamiento con dosis elevadas (5 :M THC) produce inhibición de la secreción de NGF lo que sugiere un comportamiento bifásico de estos compuestos en las células de próstata.

1. Shire D., Carrillón C. Kaghad M., Calandra B., Rinaldi-Carmona M., Le Fur G., Caput D. and Ferrara P. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 3726-3731

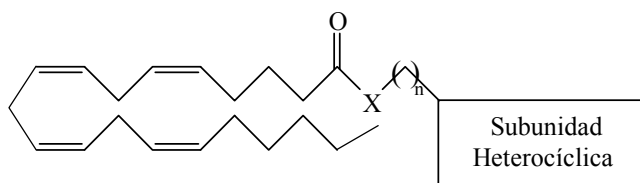
DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO COMO INHIBIDORES DEL SISTEMA DE RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA

María L. López-Rodríguez,^a Alma Viso,^a Silvia Ortega-Gutiérrez,^a Isabel Lastres-Becker,^b Sara González,^b J. J. Fernández-Ruiz,^b J. Antonio Ramos^b

^aDepartamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid. ^bDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid

Como parte de un amplio proyecto de investigación centrado en el estudio de la relación estructura-afinidad en el transportador de anandamida y dirigido a profundizar en la determinación de los principales requerimientos estéricos y electrónicos que rigen el reconocimiento de sustratos en dicho transportador, se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación bioquímica paralelas de los compuestos de estructura general **I**. Estos nuevos análogos de anandamida permiten evaluar el efecto de la sustitución del fragmento de etanolamina de la anandamida por distintos heterociclos así como la influencia de las funcionalidades éster o amida en la afinidad por el transportador.

La mayoría de los compuestos sintetizados exhiben una elevada afinidad por el transportador de anandamida ($CI_{50} = 24 - 3 \mu M$), comparable e incluso superior en alguno de los casos a la del propio AM404 ($CI_{50} = 4 \pm 2 \mu M$), único inhibidor potente y selectivo descrito hasta la fecha. Además, resultan inactivos en los receptores CB_1 y CB_2 ($K_i > 5 \mu M$), característica fundamental para poder activar farmacológicamente de forma selectiva estas dianas terapéuticas. La implicación del sistema cannabinoide endógeno en numerosos procesos fisiológicos de importancia tales como la antinocicepción, el control del movimiento, los procesos de aprendizaje, la memoria y el desarrollo cerebral, sugiere la posible utilidad terapéutica de estos derivados en el tratamiento de patologías asociadas a una hipofuncionalidad del sistema cannabinoide endógeno.



X = NH, O

n = 1

ACOPLE DE RECEPTORES CB₁ A PROTEÍNAS G EN CEREBRO HUMANO POSTMORTEM. ESTUDIO AUTORADIOGRÁFICO Y AGONISMO INVERSO

Rafael Rodríguez-Puertas¹, Lorena Hernández-García¹, Javier González-Maeso¹, Susana Mato², Angel Pazos², J. Javier Meana¹

¹Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina y Odontología, Univ. País Vasco, Leioa, Bizkaia.

²Departamento de Fisiología y Farmacología, Fac. de Medicina, Univ. Cantabria, Santander.

La estimulación mediante agonistas específicos de diferentes subtipos de receptores acoplados a proteínas G ha sido cuantificada en cerebro humano *postmortem* mediante la técnica de marcaje con [³⁵S]GTPγS. Se establecieron las condiciones experimentales idóneas para medir el marcaje de [³⁵S]GTPγS en secciones cerebrales de cortex prefrontal, hipocampo, ganglios basales, tronco cerebral y cerebelo. Se necesitó un exceso de GDP para disminuir la actividad basal y obtener estimulaciones apreciables mediante agonistas específicos. El agonista cannabinoide WIN55212-2 alcanzó los mayores porcentajes de estimulación 1458%, seguido de DAMGO 440% (receptor opioide μ), UK14304 339% (adrenoceptores α₂), sumatriptan 219 % (5-HT_{1B}), 8-OH-DPAT 188% (5-HT_{1A}) y carbacol 61% (receptores muscarínicos). Se demostró que el efecto estaba mediado por el receptor mediante antagonistas específicos.

Por otro lado se analizó en preparaciones de membranas de cortex prefrontal la capacidad del antagonista del receptor cannabinoide CB₁, SR141716A, para inhibir de manera concentración dependiente la fijación basal de [³⁵S]GTPγS y comportarse, por tanto, como un agonista inverso.

De todos los sistemas analizados la estimulación del receptor cannabinoide CB₁ mostró los mayores niveles de marcaje, probablemente debido a la abundancia de este receptor en cerebro humano. Esta abundancia facilitaría la posibilidad de cuantificar la actividad de potenciales agonistas inversos del receptor cannabinoide CB₁.

MECANISMOS DE GENERACIÓN DE CERAMIDA E INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR CANNABINOIDES

I. Galve-Roperh*, C. Sánchez*, T. Gómez del Pulgar, D. Rueda, G. Velasco, M. Guzmán

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid

*Contribuyeron por igual a este trabajo

Los cannabinoides ejercen la mayoría de sus efectos en el sistema nervioso central a través del receptor CB₁. Este receptor se encuentra acoplado a proteínas G heterotriméricas y está funcionalmente conectado a la generación de diferentes señales intracelulares que incluyen inhibición de adenilil ciclasa, modulación de canales iónicos y activación de proteína quinasa activada por señales extracelulares (ERK). Este estudio pretende determinar si el receptor CB₁ está acoplado a la generación de ceramida, lo que podría ser relevante en el control del destino celular. (a) La incubación a corto plazo con cannabinoides indujo hidrólisis de esfingomielina y acumulación de ceramida en astrocitos y en células de glioma C6, pero no en neuronas. La hidrólisis de esfingomielina fue dependiente de la activación del receptor CB₁ pero independiente de proteínas G_i/G_o. Así, diferentes experimentos sugieren que este efecto podría depender de la participación de la proteína adaptadora FAN. (b) La incubación a largo plazo de las células con cannabinoides indujo acumulación de ceramida y activación de ERK sostenidas. Estos efectos fueron prevenidos por L-cicloserina, un inhibidor de la serina palmitoiltransferasa (SPT), enzima que cataliza la etapa limitante de la síntesis de novo de ceramida, pero no por inhibidores de esfingomielinasas. Estos resultados indican que los cannabinoides generan dos picos de ceramida, pero es únicamente el que ocurre a largo plazo el que parece implicado en los efectos proapoptóticos observados en células de glioma.

PAPEL DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA REGULACION DE LA INGESTA DE COMIDA.

R. Gómez, L. Escuredo, J. M. Trigo, M. Moreno, F. Rodríguez de Fonseca, M. Navarro
Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid

Los cannabinoides psicoactivos pueden producir hiperfagia, mientras que la anandamida ha sido propuesta como un factor orexígeno natural. En el presente trabajo hemos estudiado los efectos de la anandamida sobre la ingesta en animales deprivados o sometidos a una reducción programada del acceso a la comida y al ejercicio (modelo de anorexia). La anandamida produjo hiperfagia sólo cuando se administró a ratas privadas de comida durante 24 hr, y presaciadas parcialmente antes de la administración. Sin embargo no alteró el patrón de ingesta si el animal fue privado de comida durante 24 horas antes de recibir el endocannabinoide. Ni la anandamida ni el AM 404 fueron capaces de incrementar la ingesta de comida ni de revertir la pérdida de peso en animales sometidos a reducción programada del tiempo de ingesta. El antagonista del receptor CB1 SR141716A redujo la ingesta de comida en animales privados, un efecto que desapareció tras tratamientos crónicos. Estos datos apuntan al sistema cannabinoide como factor regulador de la saciedad a corto plazo.

Estudios financiados gracias al Plan Nacional Sobre Drogas, CICYT, DGICYT y Comunidad de Madrid

EL RECEPTOR CB₁ ESTÁ ACOPLADO A LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/PKB. POSIBLE PAPEL EN NEUROPROTECCIÓN

T. Gómez del Pulgar, G. Velasco, M. Guzmán

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040-Madrid

Los cannabinoides ejercen la mayoría de sus efectos en el sistema nervioso central a través del receptor CB₁. Este receptor se encuentra acoplado a proteínas G heterotriméricas y está funcionalmente conectado a la generación de diferentes señales intracelulares que incluyen inhibición de adenilil ciclasa, modulación de canales iónicos y activación de la cascada de proteína quinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Utilizando células CHO transfectadas establemente con el cDNA del receptor CB₁ se observó que tanto el Δ^9 -tetrahidrocannabinol como diversos cannabinoides sintéticos y endógenos inducen la activación de la proteína quinasa B (PKB), siendo este efecto bloqueado por SR141716, un antagonista selectivo del receptor CB₁. La preincubación de dichas células con toxina pertussis, que bloquea la disociación de proteínas G_i/G_o, o con wortmanina, un inhibidor de la fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K), bloqueó la activación de PKB mediada por cannabinoides, lo que apunta a una implicación de las proteínas G_i/G_o y de la PI3K.

Dada la importancia del sistema PI3K/PKB en procesos de supervivencia y proliferación celular, nos propusimos estudiar el posible papel protector de los cannabinoides en células del sistema nervioso a través de dicha vía. Así, en un modelo de muerte celular inducida por ceramida en astrocitos en cultivo primario, los cannabinoides rescataron a estas células de la muerte. Este proceso de rescate se caracterizó en una línea celular derivada de astrocitos y resultó ser dependiente de la dosis y del tiempo. El efecto de los cannabinoides se vio bloqueado por SR141716, wortmanina, y PD098059, un inhibidor de la cascada ERK, apuntando a que el receptor CB₁ mediaría el rescate de la muerte inducida por ceramida en astrocitos a través de PI3K y ERK. En la actualidad se está llevando a cabo el estudio de las posibles dianas de PI3K implicadas en el proceso de rescate.

POTENCIACION DE LOS EFECTOS DEL QUINPIROLE TRAS UNA UNICA INYECCION DE THC

B.Ferer, M. Gorriti, L. Escuredo, M. Navarro, F.Rodríguez de Fonseca

Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid

EL sistema cannabinoide endógeno ha sido propuesto como un sistema de neuromodulación que en el cuerpo estriado regularía la actividad dopaminérgica. Por ejemplo, fármacos que bloquean el receptor CB1 potencian las acciones psicomotoras de los agonistas dopaminérgicos D2, hiperactividad que puede reducirse con el pretratamiento con bloqueantes de la recaptación de anandamida.. En el presente estudio hemos analizado si una breve exposición a THC (5 mg/kg), el principal componente psicoactivo de la marihuana, es capaz de inducir cambios en la respuesta motora al agonista D2 quinpirole. Los resultados muestran que el pretratamiento con THC 24 horas antes de quinpirole (0.025, 0.25, 1 mg/kg s.c.) potenció la hiperactividad inducida por una dosis intermedia de este agonista dopaminérgico (0.25 mg/kg). Estudios posteriores nos han permitido identificar una reducción en el número de receptores CB1 disponibles en el estriado 24 hr tras la administración de THC. Estos datos indican que exposiciones breves a cannabinoides podrían favorecer las acciones activadoras de la dopamina, lo que tiene importancia para comprender los casos documentados de psicosis precipitadas en consumidores de cannabis.

Estudios financiados gracias al Plan Nacional Sobre Drogas, CICYT, DGICYT y Comunidad de Madrid

EL RECEPTOR CB₁ ESTÁ ACOPLADO A LA ESTIMULACIÓN DE PROTEÍNA QUINASAS ACTIVADAS POR ESTRÉS

D. Rueda, I. Galve-Roperh, M. Guzmán

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid

El receptor CB₁ está funcionalmente acoplado a través de proteínas G heterotriméricas a la inhibición de la adenilil ciclasa, modulación de canales iónicos y activación de la cascada de proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Usando células CHO transfectadas de modo estable con el cDNA del receptor CB₁, hemos demostrado que distintos cannabinoides (naturales, endógenos y de síntesis) inducen la activación de proteína quinasas activadas por estrés (SAPK/JNK y p38 MAPK). Anticuerpos específicos para la forma activa de JNK-1 y JNK-2 mostraron que ambas son estimuladas en un proceso dependiente de CB₁, ya que el efecto se inhibió por el antagonista selectivo de CB₁ SR141716 y por toxina pertussis. La wortmanina y un inhibidor de la farnesiltransferasa de Ras bloquearon la activación de JNK por el receptor CB₁, sugiriendo una implicación de la fosfoinosítido 3'-quinasa y Ras. Se demostró que la activación de JNK es independiente de la generación de ceramida. Por último, la tirfostina AG1296, un inhibidor específico del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, bloqueó la activación de JNK por el THC. De modo similar, experimentos con la tirfostina AG1478 indican que la activación de ERK por cannabinoides en células de astrocitoma U373 MG depende del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Por tanto, vía CB₁ y por un proceso de transactivación de receptores con actividad tirosina quinasa, los cannabinoides activan cascadas de proteína quinasas (JNK, ERK) responsables de diversas respuestas celulares.

ACCIONES DE CANNABINOIDES EN CELULAS GLIALES: RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN OLIGODENDROCITOS Y PAPEL BIOLÓGICO.

E. Molina-Holgado, A. Arévalo-Martín, J.M. Vela¹, F. Molina-Holgado²; G. Almazán³, J. Borrell, C. Guaza

Departamento de Plasticidad Neural, Instituto Cajal; CSIC; Avda. Dr. Arce 37; 28002 Madrid.¹Unidad de Histología; Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona ²School of Biological Sciences, University of Manchester, Oxford Road, Manchester M139PT, UK.³ Department of Pharmacology; McGill University; Montreal, Canadá

La proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos es un proceso complejo que implica una gran variedad de moléculas que interaccionan según un programa específico de desarrollo. Los oligodendrocitos, no sólo son las células encargadas de mielinizar axones en el SNC, sino que también participan activamente en diversos procesos, incluidas las respuestas inmunológicas intracerebrales mediadas en parte, a través de receptores de citoquinas presentes en la superficie de estas células. Las denominadas citoquinas pro-inflamatorias parecen actuar como mediadores en enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple (EM), contribuyendo a la pérdida de oligodendrocitos que tiene lugar en esta enfermedad. En la actualidad, un tema de debate^{1,2} es la posible utilización de derivados cannabinoides con fines terapéuticos para aliviar la sintomatología en los pacientes con EM. Los efectos beneficiosos de los cannabinoides en modelos experimentales de EM como la encefalitis alérgica experimental crónica (CREAE) se han atribuido recientemente a la capacidad del sistema endógeno cannabinoide de incidir en el control del temblor y espasticidad observada en este modelo¹. Sin embargo, tenemos evidencias que apoyan otros mecanismos relacionados con la regulación de la respuesta inflamatoria por los cannabinoides, y su capacidad de reducir el microambiente celular inflamatorio que conduce a la desmielinización.

Nuestro grupo viene trabajando en la hipótesis de que los cannabinoides puedan actuar a nivel no solo de astrocitos y microglía, principales células implicadas en la respuesta inmune intracerebral, sino también a nivel de células del linaje oligodendroglial. La expresión de receptores CB1 en progenitores y en oligodendrocitos diferenciados, caracterizados por RT-PCR, por técnicas de inmunocitoquímica con doble marcaje y de Western Blot, apoyan dicha hipótesis. La exposición de los cultivos de oligodendrocitos a la acción de citoquinas pro-inflamatorias, en particular IFN- γ y TNF- α , afecta la supervivencia de los oligodendrocitos, induciendo muerte celular de manera más acusada en los progenitores que son más sensibles a los efectos dañinos de los estímulos inflamatorios. Es interesante resaltar que el tratamiento de los cultivos con los cannabinoides HU-210 y 11-OH cannabinol, rescató a los oligodendrocitos de la muerte celular, sugiriendo la posibilidad de que compuestos cannabinoides ejerzan acciones beneficiosas en este tipo celular directamente implicado en los procesos de desmielinización/remielinización.

Financiado por CAM (08.5/0039/98) y CYCIT (PM 98/014).

1.- Baker D, Gareth P., Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffmann JW & Layward L. (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*, **404**, 84-87.

2.- Di Marzo V, Bifulco M & Petrocellis L (2000). Endocannabinoids and multiple sclerosis: a blessing from the inner bliss?. *TIPS* **21**, 195-197