


# 7<sup>a</sup> REUNIÓN ANUAL

SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE INVESTIGACIÓN SOBRE  
CANNABINOIDES

23-25 NOVIEMBRE

PALACIO DE BENACAZÓN



TOLEDO  
2006



**7ª Reunión Anual**  
**Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides**  
**Toledo, 23-25 de Noviembre de 2006**

**Programa científico de la reunión**

**Día 23 de Noviembre**

**12:00** Entrega de la documentación

**12:30** Inauguración:

- Roberto Sabrido, Consejero de Sanidad de la JCCM
- Eduardo Molina-Holgado (Comité Organizador)
- José Antonio Ramos Atance (Presidente de la SEIC)

**13:00** Conferencia Inaugural (presentada por Francisco Molina-Holgado)  
MULTIPLE FUNCTIONS FOR NOVEL DAG LIPASES IN ENDOCANNABINOID SIGNALLING THROUGHOUT THE LIFE OF A NEURON. Patrick Doherty (Wolfson Centre for Age-Related Diseases, King's College London, London, UK)

**14:00** Comida (ofrecida por GW Pharmaceuticals y Almirall)

**16:00-20:00** 1ª Sesión de comunicaciones: "CANNABINOIDES: ASPECTOS GENERALES" (moderadores: Angel Arévalo y Joseba Pineda)

16:00 O-1.1

DISCOVERY OF 1,1-DIOXO-1,2,6-THIADIAZINE-5-CARBOXAMIDE DERIVATIVES AS CANNABINOID-LIKE MOLECULES WITH AGONIST AND ANTAGONIST ACTIVITY. R. Girón, E. Sánchez, M.I. Martín, C. Cano, P. Goya, J.A. Páez.

16:15 O-1.2

CARACTERIZACION DE RECEPTORES CANNABINOIDES EN PEZ CEBRA. I. Rodríguez Martín, M.J. Herrero Turrión, E. Marrón Fdez de Velasco y R.E. Rodríguez

16:30 O-1.3

GENETIC AND PHARMACOLOGICAL APPROACHES TO EVALUATE THE INTERACTION BETWEEN THE CANNABINOID AND CHOLINERGIC SYSTEMS IN COGNITIVE PROCESSES. S. Andreea Bura, A. Castañé, C. Ledent, O. Valverde y R. Maldonado

16:45 O-1.4

ELECTROPHYSIOLOGICAL EVIDENCE FOR REGULATION OF DORSAL RAPHE NUCLEUS NEURONS BY THE ENDOGENOUS CANNABINOID SYSTEM: POSSIBLE INVOLVEMENT OF THE GABAERGIC SYSTEM. A. Mendiguren, J. Pineda.

17:00 O-1.5

COLOCALIZATION OF THE CB<sub>1</sub> RECEPTOR WITH L1 AND GAP43 IN FOREBRAIN WHITE MATTER REGIONS DURING FETAL RAT BRAIN DEVELOPMENT. M. Gómez, M.L. Hernández, R. Pazos, R.M. Tolón, M. Rubio, J. Romero y J. Fernández-Ruiz

17:15 O-1.6

PAPEL DE LOS CANNABINOIDES EN LA REGULACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DEL ENDOTELIO CEREBRAL. L. Mestre, F. Docagne, F. Correa, D. Clemente, F. Loría, M. Hernangómez, J. Borrell, C. Guaza

17:30 O-1.7

MODULACIÓN DE LA MIELINIZACIÓN Y LA REMIELINIZACIÓN POR EL SISTEMA CANNABINOIDE. A. Rubio-Araiz, O. Torres, A. Arévalo, D. García-Ovejero, F. Molina-Holgado, E. Molina-Holgado

**18:00 Pausa (café)**

18:30 O-1.8

EFFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS DEI SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DEL LIGANDO CD200. M. Hernangómez, F. Correa, F. Docagne, F. Loría, D. Clemente, L. Mestre, C. Guaza

18:45 O-1.9

BLOQUEO DE LOS EFECTOS DE CANNABINOIDES SOBRE PRÓSTATA DE RATA POR LOS ANTAGONISTAS SR141716A Y SR144528. M.V. Pello, I. Soria, A. Alsasua

19:00 O-1.10

HUMAN ENDOCRINE PANCREAS DISPLAYS A COMPLETE AND FUNCTIONAL ENDOGENOUS CANNABINOID SYSTEM. F.J. Bermudez-Silva, J. Suárez-Pérez, E. Baixeras, M.D. Bautista, N. Acosta, I. Sánchez-Vera, P. Juan-Picó, E. Fuentes, A. Nadal, F. Rodríguez de Fonseca

19:15 O-1.11

EFECTO DE SR141716A SOBRE LA RESPUESTA INDUCIDA POR WIN 55,212-2 EN PRESIÓN ARTERIAL DE RATA. I. Soria, M<sup>a</sup>.I. Martín, M.V. Pello, A. Alsasua

19:30 Discusión General

**21:00 Cena de Bienvenida (ofrecida por la Fundación del Hospital Nacional de Paraplégicos para la Investigación y la Integración)**

## Día 24 de Noviembre

**09:30-13:30**      **2ª Sesión de comunicaciones: “CANNABINOIDES Y CONTROL DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR”**  
(moderadores: Ana Rubio y Arkaitz Carracedo)

9:30 O-2.1

THE MOST COMMONLY USED ANANDAMIDE UPTAKE INHIBITORS AFFECT C6 GLIOMA CELL VIABILITY AT PHARMACOLOGICALLY RELEVANT CONCENTRATIONS. E. de Lago, S.B. Gustafsson, J. Fernández-Ruiz, J. Nilsson, S.O.P. Jacobsson y C.J. Fowler

9:45 O-2.2

AMPHIREGULIN MEDIATES RESISTANCE OF GLIOMA CELLS TO CANNABINOID-INDUCED APOPTOSIS. M. Lorente, A. Carracedo, F. Natali, A. Egia, C. Blázquez, S. Torres, M. Guzmán y G. Velasco

10:00 O-2.3

DISMINUCION DE LA EXPRESIÓN Y LA FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB<sub>1</sub> EN MEMBRANAS DE GLIOBLASTOMAS HUMANOS. L.F. Callado, M. López De Jesús, J. Garibi, J. Sallés, J.J. Meana

10:15 O-2.4

EARLY MATERNAL SEPARATION IN RATS AS A MODEL FOR STUDYING MODULATION OF GLIAL CELLS AND CORTICOSTERONE RESPONSES BY SELECTIVE INHIBITORS OF ENDOCANNABINOID INACTIVATION: PRELIMINARY RESULTS. R. Llorente, A. Llorente, E.M. Marco, C. Prada, V. Di Marzo, C. Guaza, M. López-Gallardo, M.P. Viveros

10:30 O-2.5

REGULATION OF PI3K/AKT/GSK-3 PATHWAY BY ACUTE AND CHRONIC DELTA(9)-TETRAHYDROCANNABINOL IN THE BRAIN. A. Ozaita, E. Puighermanal, C. Fernández-Avilés, R. Maldonado

10:45 O-2.6

EFFECTOS NEUROPROTECTORES DE LOS CANNABINOIDES CONTRA EL DAÑO AXONAL EN UN MODELO VIRAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE. F. Loría, F. Docagne, D. Clemente, F. Correa, M. Hernangómez, L. Mestre, C. Guaza

11:00 O-2.7

ROLE OF THE CANNABINOID CB<sub>2</sub> RECEPTOR IN THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS. J. Palazuelos, E. Hatterer, B. Julien, M. Guzmán, S. Nataf, N. Davoust, I. Galve-Roperh

11:15 O-2.8

CANNABIDIOL REDUCED THE STRIATAL ATROPHY CAUSED BY 3-NITROPROPIONIC ACID *IN VIVO* BY MECHANISMS INDEPENDENT OF THE ACTIVATION OF CANNABINOID RECEPTORS. O. Sagredo, A. Decio, M. García-Arencibia, R. de Miguel, J.A. Ramos, R. Mechoulam y J. Fernández-Ruiz

## 11:30 Pausa (café)

12:00 O-2.9

LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES CB<sub>2</sub> MODULA LA CAPACIDAD DE RETIRADA *IN SITU* DE BETA AMILOIDE. E. Núñez, M.R. Pazos, J.P. Romero, C. Benito, R. M. Tolón y J. Romero

12:15 O-2.10

CANNABINOID EFFECTS ON MICROGLIAL CELL MIGRATION: RELEVANCE FOR ALZHEIMER'S DISEASE. A.M.Martín Moreno, M.L.de Ceballos

12:30 O-2.11

EFFECTO NEUROPROTECTOR EN U INVERTIDA DE LA OLEILETANOLAMIDA SOBRE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SUSTANCIA NEGRA *IN VITRO* E *IN VIVO*. B. Galán-Rodríguez, E. Fernández-Espejo, F. Rodríguez de Fonseca, F.J. Bermúdez-Silva, S. Ramiro-Fuentes, J. A. Flores

12:45 O-2.12

LOS AGONISTAS CANNABINOIDES, JWH-015 Y WIN-55,212-2, ACELERAN LA RESPUESTA MICROGLIAL *IN VIVO* FRENTE AL DAÑO CEREBRAL AGUDO. M.R. Pazos, C. Parkhurst, W. Gan y J. Romero

13:00 O-2.13

ROLE OF CB1 AND CB2 RECEPTORS IN NEUROPROTECTION BY WIN 55,212 IN A NEWBORN RAT MODEL OF HYPOXIC-ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY. D. Fernández-López, M.R. Pazos, R.M. Tolón, M.A. Moro, J. Romero, I. Lizasoain y J. Martínez-Orgado

13:15 Discusión General

**14:00h Comida (ofrecida por GW Pharmaceuticals y Almirall)**

**16:00-17:30 3ª Sesión de comunicaciones: "MEDICINAS BASADAS EN CANNABINOIDES"** (moderadores: Daniel García-Ovejero y Eduardo Muñoz)

16:00 O-3.1

ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA DE UN EXTRACTO (LX-252) DERIVADO DE UNA VARIEDAD DE CANNABIS SATIVA CON BAJO CONTENIDO EN THC. G. Sánchez-Duffhues, F.J. Caballero, M. A. Calzado, M.L. Schmitz, G.P. Grassi, L. Maxia, B. Fiebich, G. Appendino y E. Muñoz

16:15 O-3.2

CANNABIS EXTRACTS LOW IN  $\Delta^9$ -THC; OPTIMIZATION OF EXTRACTION PROCEDURES USING NMR SPECTROSCOPY. M. Politi, W. Peschel, N. Wilson, J.M. Prieto y M. Heinrich

16:30 O-3.3

EL DENBINOBIN AISLADO DEL CANNABIS SATIVA ES UN POTENTE INHIBIDOR DE LA REPLICACION DEL VIH-1 POR ACTUAR SOBRE LA RUTA DE NF-κB. G. Sánchez-Duffhues, F.J. Caballero, M. A. Calzado, L. Maxia, G. Appendino, L. Schmitz y E. Muñoz

16:45 O-3.4

FOLLOW UP STUDY OF PATIENTS WITH NEUROPATHIC PAIN, SPASTICITY SECONDARY TO MULTIPLE SCLEROSIS AND ANOREXIA CAQUEXIA SYNDROME TREATED WITH A WHOLE PLANT CANNABIS EXTRACT: PRELIMINARY RESULTS.

M. Duran, S. Abanades, D. Capellà and the SEGUIVEX study group

17:00 O-3.5

CANNABIS Y DOLOR CRÓNICO: CONSIDERACIONES CLÍNICAS. J.L.R. Martín, E. Martín Sánchez

17:15 Discusión General

**17:30 Pausa (café)**

**18:00h Mesa Redonda: Los cannabinoides como medicamentos: del laboratorio a la clínica** (moderadores: Eduardo Molina-Holgado y Carmen Guaza)

- Eduardo Muñoz (Universidad de Córdoba)
- José Luis R. Martín (FISCAM, Toledo)
- Brian Whittle (GW Pharmaceuticals, UK)
- José Miguel Vela (Laboratorios Dr. Esteve, Barcelona)

**19:30 Asamblea de la SEIC**

**21:00 Cena (libre)**

### Día 25 de Noviembre

**9:30 Presentación del premio a la mejor publicación sobre cannabinoides en el año 2006**

**10:00-12:00 4ª Sesión de comunicaciones: “CANNABINOIDES Y ASPECTOS NEUROPSIQUIÁTRICOS E INTERACCIÓN CON DROGAS DE ABUSO”** (moderadores: Diego Clemente y Angel Pazos)

10:00 O-4.1

CHANGES IN CB<sub>1</sub> CANNABINOID RECEPTOR IN POSTMORTEM PREFRONTAL CORTEX OF SCHIZOPHRENIC SUBJECTS. L. Urigüen, R. Díez-Alarcia, D. Arteta, J.A. García-Sevilla, L.F. Callado, J.J. Meana

10:15 O-4.2

REGULACION DEL ESTADO CONSTITUTIVO DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB<sub>1</sub> TRAS TRATAMIENTO CRÓNICO CON FLUOXETINA. E.M. Valdizán, S. Mato, y A. Pazos

10:30 O-4.3

MECHANISM INVOLVED IN THE DEPRESSIVE-LIKE PHENOTYPE OF CB<sub>1</sub> KNOCKOUT MICE. E. Aso, A. Ozaita, R. Maldonado, O. Valverde

10:45 O-4.4

SUBCHRONIC CANNABINOID AGONIST (WIN 55,212-2) TREATMENT DURING COCAINE ABSTINENCE ALTERS SUBSEQUENT COCAINE SEEKING BEHAVIOR. G. González-Cuevas, H. Aujla, R. Martin-Fardon, J.A. López-Moreno, M. Navarro, F. Weiss

11:00 O-4.5

LA EXPOSICIÓN A UN AGONISTA CANNABINOIDE EN LA ADOLESCENCIA COMO PUERTA DE ENTRADA A LA ADICCIÓN A LA COCAÍNA EN EDAD ADULTA: HALLAZGOS CONDUCTUALES Y METABÓLICOS. A. Higuera-Matas, M. Soto-Montenegro, N. del Olmo, M. Miguéis, J.J. Vaquero, C. García-Lecumberri, J. Sánchez, G. Montoya, M. Desco y E. Ambrosio

11:15 O-4.6

EL BLOQUEO LOCAL CB<sub>1</sub> EN EL NÚCLEO ACCUMBENS ANULA LA SENSIBILIZACIÓN Y RECOMPENSA A LA COCAÍNA, AFECTANDO A MARCADORES BIOQUÍMICOS EN EL ACCUMBENS PERO TAMBIÉN EN CORTEZA PREFRONTAL Y ESTRIADO DORSAL. S. Ramiro-Fuentes, J.A. Flores, B. Galán-Rodríguez, E. Fernández-Espejo

11:30 O-4.7

RIMONABANT PREVENTS THE NICOTINE-INDUCED RELAPSE TO ALCOHOL. J.A. López-Moreno, G. González-Cuevas, G. Moreno Sanz, F. Alen, R. Gómez, I. Crespo, M. Navarro

11:45 Discusión General

**12:00 Pausa (café)**

**12:30 Clausura**

**MULTIPLE FUNCTIONS FOR NOVEL DAG LIPASES IN ENDOCANNABINOID  
SIGNALLING THROUGHOUT THE LIFE OF A NEURON**

Patrick Doherty

Wolfson Centre for Age-Related Diseases, King's College London, London SE1 1UL, UK.

We have shown that a number of cell adhesion molecules (N-cadherin, NCAM and L1) promote axonal growth from a wide variety of neurons by activating an FGF receptor (FGFR) dependent signaling cascade in growth cones. Pharmacological evidence suggests that a previously uncharacterised DAG lipase (DAGL) activity is a key component in the pathway that couples the activated FGF receptor to a calcium influx response in growth cones<sup>1</sup>. DAGL activity generates 2-arachidonyl glycerol (2-AG), and 2-AG was subsequently identified as a full agonist at the CB1 and CB2 cannabinoid receptors. This has led us to test the involvement of the cannabinoid receptor system in the axonal growth responses stimulated by adhesion molecules and FGF. Our data show that CB1 antagonists can fully inhibit the neurite outgrowth response stimulated by N-cadherin and FGF. Furthermore, three CB1 agonists stimulate neurite outgrowth to a similar extent as N-cadherin and FGF. Like the response to CAMs and FGF, the response to the CB1 agonists was fully inhibited by a combination of N- and L-type calcium channel antagonists. As a control, the CB1 antagonists did not inhibit the neurite outgrowth response stimulated by BDNF. These data demonstrate that activation of CB1 receptors is necessary and sufficient to account for the axonal growth response stimulated by activation of the FGFR<sup>2</sup>.

The unexpected cross talk between adhesion molecules and the FGFR, and the FGFR and CB1 receptor, stimulated us adopt a bioinformatics approach to clone and characterise the first specific sn-1 DAGLs<sup>3</sup>. There are two closely related enzymes (DAGL $\alpha$  and DAGL $\beta$ ) that show similar patterns of expression during development and in the adult. The enzymes are first expressed by newly differentiated neurons, with expression studies in a variety of species, and gene deletion experiments in drosophila, supporting an important role for the enzymes in axonal growth and guidance. In contrast, the enzymes become restricted to dendrites in the adult nervous system where they are well placed to synthesize, on demand, an endocannabinoid for the retrograde control of synaptic strength and/or neuroprotection. I will also discuss new data that demonstrates that the enzymes also play a crucial role in promoting neurogenesis in the adult nervous system. The cloning and characterisation of these enzymes paves the way for a better understanding of the factors that regulate endocannabinoid signalling, a signalling pathway that can now be viewed as having multiple functions throughout the life of a neuron.

1. Williams, E. J., Furness, J., Walsh, F. S. & Doherty, P. Characterisation of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGF. *Development* 120, 1685-93 (1994).
2. Williams, E. J., Walsh, F. S. & Doherty, P. The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol* 160, 481-6 (2003).
3. Bisogno, T. et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163, 463-8 (2003).



**DISCOVERY OF 1,1-DIOXO-1,2,6-THIADIAZINE-5-CARBOXAMIDE  
DERIVATIVES AS CANNABINOID-LIKE MOLECULES WITH AGONIST AND  
ANTAGONIST ACTIVITY.**

R. Girón\*, E. Sánchez\*, M.I. Martín\*, C. Cano<sup>§</sup>, P. Goya<sup>§</sup> & J.A. Páez<sup>§</sup>.

\*Unidad de Farmacología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos.  
Avda. Atenas s/n, 28922 Alcorcón, Madrid.

<sup>§</sup>Instituto de Química Médica (CSIC). C/ Juan de la Cierva nº 3, 28006 Madrid.

The interest in the potential medicinal properties claimed for cannabinoids include attenuation of nausea and vomiting in cancer chemotherapy, management of glaucoma, suppression of muscle spasticity/spasm associated with multiple sclerosis and spinal cord injury, disorders in neurobiology and analgesic effectiveness. Cannabinoid receptor antagonists show potential therapeutic application as appetite suppressants, thus SR141716A (*N*-(piperidin-1-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide) has been introduced as an anti-obesity drug (Rimonabant; Acomplia®).

The purpose of this study has been the design, synthesis and the pharmacological evaluation of a set of compounds (2-substituted 1,1-dioxo-1,2,6-thiadiazine-5-carboxylate derivatives) based on the analogy between the pyrazole core of SR141716A (*N*-(piperidin-1-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide) and the 1,2,6-thiadiazine heterocyclic system focusing in the discovery of new cannabinoid ligands.

The biological activity of the new synthesized compounds (**24-42**) has been evaluated carrying out pharmacological experiments in the isolated tissue mouse vas deferens in order to determine if they behave as agonists or antagonists on cannabinoid receptors and compounds showing interesting profiles have been studied *in vivo* using the classic cannabinoid tetrad to test cannabinoid activity. The effect of the new compounds has been always compared with that of reference drugs: WIN 55,212-2 as cannabinoid agonist and SR141716A as cannabinoid antagonist.

Their potential functional activity on cannabinoid receptors has shown that two compounds (**37** and **39**) behave as cannabinoid agonists *in vitro*. Their potency is lower than that of the reference compound, WIN 55,212-2, but their efficacy is similar to that of this cannabinoid agonist, although no *in vivo* activity is observed. Another derivative (**38**) behaves as a cannabinoid antagonist both *in vitro* and *in vivo*, its efficacy and potency are similar to that of the well-known antagonist SR141716A.

**Acknowledgment:** This project has been supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain (SAF2003-08003-C02 and SAF2006-13391-C03).

## CARACTERIZACION DE RECEPTORES CANNABINOIDES EN PEZ CEBRA

I. Rodríguez Martín, M.J. Herrero Turrión, E. Marrón Fdez de Velasco y R.E. Rodríguez  
 Depto. Bioquímica y Biología Molecular. Instituto de Neurociencias.  
 Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

Recientemente se ha señalado al pez Cebra como un sistema para determinar la funcionalidad de proteínas codificadas por el genoma humano, así como para estudiar el desarrollo del sistema nervioso e identificar anomalías metabólicas. También se está empleando para el estudio de ciertas patologías humanas, como desórdenes hematopoyéticos, anomalías cardiovasculares, destacando entre ellas las malformaciones aórticas en el feto, problemas renales y algún tipo de sordera. Además, la industria farmacéutica está empezando a explotar la similitud en regiones de unión a determinados fármacos y drogas entre las proteínas del ser humano y el pez Cebra para el desarrollo de nuevas y mejores terapéuticas. Teniendo en consideración esto hechos estudiamos el sistema cannabinoide en pez Cebra:

a) *Existencia de sitios de unión cannabinoide en pez cebrá:* En homogeneizados de cerebro de pez cebrá el agonista no selectivo [3H]CP55940 se une con alta afinidad ( $KD=0.55\pm 0.08$  nM y  $B_{max}=1116\pm 82.26$  fmol/mg proteína) presentando un solo sitio de unión. El agonista CB2 selectivo H-WIN55212-2 también se une con gran afinidad a las membranas de cerebro y presenta un solo sitio de unión con  $KD=0.757\pm 0.13$  nM y  $B_{max}=1176\pm 65.46$  fmol/mg proteína. El estudio de la funcionalidad de estos sitios de unión mediante el ensayo [35S] GTP $\gamma$ S presentó el siguiente orden de potencias: HU-210 > WIN55212-2 > CP55940 > Anandamida

b) *Identificación del receptor cannabinoide CB1 en pez cebrá:* presenta una homología en su secuencia aminoacídica del 69% con la humana. Hemos demostrado que el receptor CB1 del pez cebrá es funcional utilizando para ello el ligando cannabinoide WIN55212-2 en estudios de unión a membranas obtenidas de células HEK 293 transfectadas con este receptor y que lo expresan de manera estable. Estudios de competición mostraron que sólo WIN55212-2, HU-120 y AM-251 desplazaban [3H]-WIN55212-2 exhibiendo dos sitios de unión. WIN55212-2 es además capaz de activar el receptor CB1 de pez cebrá inhibiendo la concentración intracelular de cAMP y provocando su internalización, algo que no se hasta ahora no se ha demostrado en animales no mamíferos.

c) *Identificación del receptor cannabinoide CB2 en pez cebrá:* se han caracterizado molecularmente dos duplicados CB2 presentes en el pez cebrá: CB2a y CB2b. Sus secuencias aminoacídicas comparten una homología del 56% con las del Takifugu y un 39% con la secuencia del receptor CB2 de humano, conservando algunos residuos específicos de los receptores cannabinoides. Ambos duplicados se expresan en tejidos periféricos como agallas, corazón, intestino y músculo, órganos reaccionados con el sistema inmune como el bazo, y también en Sistema Nervioso Central. Mediante la técnica de hibridación *in situ* se observó la expresión del mRNA de CB2b por primera vez en células adenohipofisarias de la pars distalis rostral y pars distalis proximal de la glándula pituitaria.

**GENETIC AND PHARMACOLOGICAL APPROACHES TO EVALUATE THE INTERACTION BETWEEN THE CANNABINOID AND CHOLINERGIC SYSTEMS IN COGNITIVE PROCESSES**

S.Andreea Bura<sup>1</sup>, Anna Castañé<sup>1</sup>, Catherine Ledent<sup>2</sup>, Olga Valverde<sup>1</sup> and Rafael Maldonado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>IRIBHM; Université Libre de Bruxelles, B-1070 Bruxelles, Belgium

Nicotine pharmacological responses can be modulated by the endocannabinoid system. The objective of this study was to investigate the possible interaction between the cannabinoid and cholinergic systems in memory and learning processes by using genetic and pharmacological approaches in two different behavioral models, the active avoidance and the object recognition tests. The effects induced by nicotine, physostigmine and scopolamine were studied in CB<sub>1</sub> knockout and wild-type mice in the active avoidance paradigm. Nicotine did not modify the performance of CB<sub>1</sub> knockout and wild-type mice in this model, whereas scopolamine impaired the performance in both genotypes. Physostigmine increased the active avoidance performance in wild-type but not in CB<sub>1</sub> knockout mice. In addition, the effects of the pretreatment with the CB<sub>1</sub> receptor antagonist rimonabant were evaluated on the responses induced by nicotine in the active avoidance and the object recognition tasks in wild-type mice. Rimonabant (0.3, 1, 3, and 10 mg/kg) given alone or co-administered with nicotine did not modify the performance in the active avoidance test. In contrast, nicotine enhanced the performance in the object recognition task, but this response was suppressed by rimonabant co-administration. The present findings revealed the involvement of CB<sub>1</sub> receptors in the cognitive effects of nicotine and physostigmine. Scopolamine effects are independent from CB<sub>1</sub> receptor activity.

**ELECTROPHYSIOLOGICAL EVIDENCE FOR REGULATION OF DORSAL  
RAPHE NUCLEUS NEURONS BY THE ENDOGENOUS CANNABINOID SYSTEM:  
POSSIBLE INVOLVEMENT OF THE GABAERGIC SYSTEM**

Aitziber Mendiguren, Joseba Pineda.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of the Basque Country  
(UPV/EHU), 48940-Leioa, Bizkaia, Spain.

Several studies have suggested that the dorsal raphe nucleus (DRN) is a pharmacological target of cannabinoid compounds. The aim of this work was to examine, by single-unit extracellular recordings, the role of the endogenous cannabinoid system in regulating the firing activity of DRN neurons in brain slices. For this purpose, we evaluated the effect of different CB<sub>1</sub> receptor antagonists and agonists on the firing rate of DRN neurons. The experiments were performed in the presence of the  $\alpha_1$  adrenoceptor agonist phenylephrine (15  $\mu$ M) to drive the firing activity of silent 5-HT neurons. In 9 out of 21 5-HT cells recorded in the DRN, perfusion with SR 141716A (1  $\mu$ M) inhibited the firing rate of these neurons to values below the 25<sup>th</sup> percentile (-0.5%) of the vehicle group. The maximal inhibitory effect achieved in these responsive cells was significantly stronger than that in the vehicle group (53% vs 3%; n=9 and n=18, respectively; p<0.05). Perfusion with AM 251 (1  $\mu$ M) also inhibited the firing activity in 6 out of 12 recorded 5-HT cells and the maximal inhibition reached in this responsive cells was higher than control (62%, n=6, p<0.05). In responsive cells, blockade of GABA<sub>A</sub> receptors with picrotoxin (20  $\mu$ M) attenuated by 81% the inhibitory effect of SR 141716A (1  $\mu$ M) (10%, n=5; p<0.05). Similarly, in the presence of picrotoxin (20  $\mu$ M), the inhibitory effect of AM 251 (1  $\mu$ M) in responsive cells was significantly lower (12%; n=3; p<0.05) than that in the absence of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist. In the DRN, non-5-HT cells are presumably GABAergic and regulate the neuronal activity of 5-HT cells. In our experiments, perfusion with the CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> receptor agonist WIN 55212-2 (10  $\mu$ M) failed to change the firing activity of DRN non-5-HT cells (n=7). On the other hand, perfusion with the endocannabinoid anandamide (10  $\mu$ M) inhibited the firing activity of a subpopulation of DRN 5-HT neurons (24 out of 47 5-HT cells) to values below the 25<sup>th</sup> percentile (-1.5%) of the vehicle group. The number of cells which were inhibited by anandamide (10  $\mu$ M) was higher than that in the vehicle group (n=24 vs n=34, p<0.05), and the maximal inhibitory effect achieved in responsive cells was 43% vs 11% of the vehicle group (n=24, p<0.0005). Unexpectedly, methanandamide (10  $\mu$ M) did not significantly change the firing activity of DRN 5-HT cells. Moreover, perfusion with SR 141716A (1  $\mu$ M) or AM 251 (1  $\mu$ M) failed to modify the inhibitory effect of anandamide (10  $\mu$ M) or the number of responsive cells to the endocannabinoid. Finally, it is known that anandamide potentiates effects mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. In our experiments, application of anandamide (10  $\mu$ M) did not change the parameters of the concentration-effect curves for 5-HT (1-200  $\mu$ M), which is mediated by this autoreceptor.

These results suggest the presence of a tonically active endocannabinoid system in the DRN, which seems to positively regulate the firing activity of a subpopulation of 5-HT neurons probably through a CB<sub>1</sub> receptor-mediated presynaptic inhibition of the GABAergic system. However, the inhibitory effect of anandamide may be mediated through an undetermined mechanism which is independent of CB<sub>1</sub> receptors and not related to 5-HT<sub>1A</sub> receptors.

## COLOCALIZATION OF THE CB<sub>1</sub> RECEPTOR WITH L1 AND GAP43 IN FOREBRAIN WHITE MATTER REGIONS DURING FETAL RAT BRAIN DEVELOPMENT

María Gómez<sup>1</sup>, Mariluz Hernández<sup>2</sup>, Ruth Pazos<sup>3</sup>, Rosa M. Tolón<sup>3</sup>, Marina Rubio<sup>1</sup>, Julián Romero<sup>3</sup> and Javier Fernández-Ruiz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, and

<sup>2</sup>Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid (Spain); <sup>3</sup>Laboratorio de Investigación, Fundación Hospital Alcorcón, 28922-Madrid (Spain)

Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors and their ligands emerge early in brain development and are abundantly expressed in certain brain regions that play key roles in processes related to cell proliferation and migration, neuritic elongation and guidance, and synaptogenesis. This would support the notion that the cannabinoid system might play a modulatory role in the regulation of these processes. We have recently presented *in vivo* evidence showing that this modulatory action might be exerted, among others, through regulating the synthesis of cell adhesion molecules, such as L1, both in fetal (Gómez et al., *Dev. Brain Res.* 147, 201-207, 2003) and early postnatal (Gómez et al., *Brain Res.* in press, 2006) ages. To further explore this issue, we conducted here some immunohistochemical studies aimed at identifying the cellular location of CB<sub>1</sub> receptor-L1 interactions in the brain during the fetal development, a period in which the activation of CB<sub>1</sub> receptors increases L1 synthesis in several forebrain white matter regions but not in grey matter areas (Gómez et al., *Dev. Brain Res.* 147, 201-207, 2003). Therefore, using selective antibodies for the CB<sub>1</sub> receptor and L1 in double labelling studies, we were able to observe colocalization of both proteins in fiber tracts such as the corpus callosum, the adjacent subcortical white matter, the internal capsule and the anterior commissure. We also found that CB<sub>1</sub> receptors colocalize with GAP43, a marker of growth cones, but not with synaptophysin, a marker of active synaptic terminals, in the same forebrain white matter regions, thus indicating that CB<sub>1</sub> receptors would be located in axons elongating through these white matter tracts. On the other hand, we also conducted some experiments using cultures of fetal cortical neurons, since we had already found that L1 is present mainly in neurons but not in glial cells (see SEIC, 2005), a fact corroborated by the results obtained in the double labelling studies. Using these cultures, we have now observed that the expression of the gene encoding for L1, measured by RT-PCR, seems to be subjected to a control exerted by the activation of CB<sub>1</sub> receptors, which support the data obtained *in vivo* (Gómez et al., *Dev. Brain Res.* 147, 201-207, 2003; Gómez et al., *Brain Res.* in press, 2006). In summary, we have demonstrated that the cannabinoid system controls the synthesis of L1 in several brain structures during those periods of development that better correlate with the periods of most atypical expression of CB<sub>1</sub> receptors in the developing brain. This function is facilitated by the colocalization of this cell adhesion molecule with CB<sub>1</sub> receptors in several forebrain white matter regions during fetal brain development, thus indicating that both proteins would be located in axons elongating through these white matter tracts. Considering the role played by L1 in different events related to neural development, our observations might support the occurrence of a physiological mechanism by which the cannabinoid system might regulate processes such as cell proliferation and migration, neuritic elongation and guidance, and synaptogenesis.

## **PAPEL DE LOS CANNABINOIDES EN LA REGULACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DEL ENDOTELIO CEREBRAL**

L. Mestre, F. Docagne, F. Correa, D. Clemente, F. Loría, M. Hernangómez, J. Borrell, C. Guaza

Grupo de Neuroinmunología, Departamento de Plasticidad Neural, Instituto Cajal (CSIC),  
Av. Doctor Arce 37, 28002, Madrid

En condiciones de neuroinflamación los leucocitos son reclutados desde el torrente sanguíneo hacia el parénquima nervioso mediante la actuación de moléculas de adhesión, por lo que resultan de gran interés aquellos estudios encaminados al conocimiento de su regulación. La inoculación intracraneal del virus de Theiler en cepas susceptibles de ratones induce una enfermedad desmielinizante autoinmune que se utiliza como modelo experimental animal de la esclerosis múltiple primaria progresiva. Trabajos previos de nuestro grupo demuestran que tanto la administración de cannabinoides como el aumento del tono cannabinoide endógeno mejora el déficit motor, disminuye la presencia de leucocitos infiltrados y reduce la reactividad microglial en este modelo (Arévalo-Martín y cols., 2003; Mestre y cols., 2005). En el presente estudio nos planteamos investigar el posible papel regulador de los cannabinoides sobre la expresión de moléculas de adhesión implicadas en la transmigración leucocitaria. En concreto, estudiamos el efecto del agonista cannabinoide sintético WIN 55,212-2 sobre la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales cerebrales en cultivo infectadas con TMEV. También evaluamos la regulación de estas moléculas de adhesión en fases tempranas de este trastorno desmielinizante y cómo la administración de WIN 55,212-2 puede afectar al establecimiento de la sintomatología. Nuestros resultados muestran como la infección, con el virus de Theiler, de células endoteliales aumenta la expresión de VCAM-1 como de ICAM-1 y como el tratamiento con WIN 55,212-2 es capaz de modificar este efecto por un mecanismo independiente de receptor CB<sub>1</sub> ó CB<sub>2</sub>. Además, el tratamiento con WIN 55,212-2 de animales durante estadios próximos a la infección (3 y 7 días postinfección) modifica el patrón de expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 y genera un retraso del establecimiento de la sintomatología clínica. Por lo tanto, los cannabinoides podrían afectar el desarrollo de patologías neuroinflamatorias del SNC como la esclerosis múltiple debido a su actuación sobre en el endotelio cerebral.

Agradecimientos: Dr. Moses Rodríguez [Departamento de Inmunología y Neurología, Clínica Mayo, Rochester Minnesota (E.E.U.U.)] por su amable donación del virus de Theiler, cepa DA.

Proyecto financiado por MCYT: SAF 2004/0416

## **MODULACIÓN DE LA MIELINIZACIÓN Y LA REMIELINIZACIÓN POR EL SISTEMA CANNABINOIDE**

A. Rubio-Araiz, O. Torres, A. Arévalo, D. García-Ovejero, F. Molina-Holgado, E. Molina-Holgado. Laboratorio de Neuroinflamación, Hospital Nacional de Parapléjicos, 45071-Toledo.

Cuando un axón mielinizado pierde su vaina de mielina a consecuencia de agresiones de diversa índole, hablamos de desmielinización. Aunque la célula oligodendroglial sobreviva y tan solo pierda las proyecciones citoplasmáticas que conforman la vaina de mielina, esta célula no será capaz de remielinizar. El proceso de remielinización lo llevan a cabo los precursores de oligodendrocitos que se encuentran en el SNC adulto y que migran hacia el lugar del daño, proliferan y se diferencian a células con capacidad de mielinizar. Dado que se ha comprobado la presencia de los receptores cannabinoides en oligodendrocitos, nos interesa determinar de qué forma el sistema endocannabinoide puede modular los procesos de remielinización, desde la migración de los precursores oligodendrogiales hasta la proliferación, diferenciación completa y correcta envoltura de los axones en patologías desmielinizantes del sistema nervioso. Para ello, estamos estudiando el efecto de agonistas sintéticos y endocannabinoides en un modelo animal tóxico desmielinizante mediante la inyección estereotáxica de lisofosfatidilcolina (lisolecitina) en el cuerpo calloso en ratas adultas. Una vez caracterizado este modelo de lesión, hemos realizado un tratamiento crónico con el agonista no selectivo CB1/CB2 HU210 y hemos analizado en la zona de la lesión el número de precursores oligodendrogiales reclutados, así como el número de precursores que han migrado a la zona de lesión y que se han diferenciado a oligodendrocitos maduros. De forma paralela, estamos analizando el efecto de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre la proliferación, migración y diferenciación de los precursores neurales hacia el linaje oligodendroglial utilizando cultivos de neuroesferas obtenidos de la corteza cerebral de ratas neonatales (P0).

## **EFFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DEL LIGANDO CD200**

M. Hernangómez, F. Correa, F. Docagne, F. Loría, D. Clemente, L. Mestre, C. Guaza  
Grupo de Neuroinmunología, Departamento de Plasticidad Neural; CSIC,  
Avda Dr. Arce 37, 28002 Madrid

La función inmune intracerebral está sometida a un estricto control y el privilegio inmune del cerebro viene determinado no sólo por la barrera hematoencefálica sino también por la existencia de señales de freno que hacen que la microglía, el macrófago del SNC, se mantenga en un estado quiescente cuando el tejido nervioso no se encuentra en una situación de estrés, a través de la interacción local del receptor CD200 (CD200R) y de su ligando CD200. El ligando CD200 (OX2) es una glicoproteína de membrana que se expresa en neuronas, endotelio, células del estroma y linfocitos; y proporciona una señal inhibitoria a células de la línea mieloide como la microglía. Cuando se produce una lesión inflamatoria en el cerebro, la microglía se activa y se produce un descenso en la expresión del CD200R, para hacer frente a la situación de daño, sin embargo esta señal debe ser controlada para que no sobrepase un umbral de tolerabilidad y contribuya al daño.

En el presente estudio, hemos analizado el posible control que los endocannabinoides pueden ejercer sobre la expresión del CD200R en células microgliales en respuesta a un estímulo proinflamatorio. Se realizó un curso temporal de la expresión de CD200R a nivel de ARNm y de proteína mediante RT-PCR y western blotting respectivamente. Posteriormente, se estudió el efecto del endocannabinoide anandamida que fue capaz de inducir un aumento en la expresión de CD200 receptor. Estos resultados abren nuevas expectativas de estudio sobre el papel inmunomodulador del sistema endocannabinoide en la regulación de las células de defensa del SNC. Actualmente estamos estudiando el papel de dicho sistema en la interacción microglía-neurona.



## BLOQUEO DE LOS EFECTOS DE CANNABINOIDES SOBRE PRÓSTATA DE RATA POR LOS ANTAGONISTAS SR141716A Y SR144528

M.V. Pello, I. Soria, A. Alsasua

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina U.C.M.

Los receptores de cannabinoides se encuentran presentes en la mayoría de los órganos reproductores de mamíferos (testículos, epidídimo, próstata, conductos deferentes) y parecen estar implicados en algunos mecanismos fisiológicos. Asimismo, se han descrito receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> en próstata de humanos (Ruiz-Llorente y cols, 2003) aunque no se puede descartar la existencia de otros subtipos de receptores (CB<sub>2</sub>) que participarían en los efectos del *Cannabis* y sus derivados sobre tejidos prostáticos. En este trabajo se ha estudiado la acción de dos antagonistas cannabinoides SR141716A y SR144528 (antagonistas de receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> respectivamente) sobre el efecto de WIN 55,212-2 y metanandamida, sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en próstata aislada de rata.

### **Material y métodos:**

Se utilizaron tiras de próstata de ratas Wistar, introducidas en un baño de órganos en condiciones fisiológicas. Se dejaron estabilizar durante 60min.y se estimularon (produciéndose una contracción) con las siguientes condiciones: trenes de estímulos: (frecuencia de 15 Hz., duración de 0.2 ms. y voltaje 70 v), duración 6 seg/1min/5min. Las contracciones se registraron y procesaron con un sistema acoplado a un programa MacLab/4e (paquete informático Chart v3.5.6). Las dosis de agonistas utilizadas fueron: WIN 55,212-2 y metanandamida ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$ M). Los antagonistas se emplearon a una dosis única de  $10^{-4}$ M.

### **Resultados:**

Efecto de los agonistas: Tanto Metanandamida como WIN 55,212-2 producen disminución de las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en próstata de rata, debido a su efecto inhibidor de la liberación de NA. Aunque ambos compuestos inhibieron las contracciones, solo Metanandamida lo hizo de una manera concentración-dependiente y estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ).

Efecto de los antagonistas: El antagonista del receptor CB<sub>1</sub> apenas bloqueó del efecto de ambos cannabinoides. Por el contrario, el SR144528 bloqueó la inhibición de las contracciones, efecto que en el caso de Metanadamide fue estadísticamente significativo a todas las dosis estudiadas ( $p<0.001$ ).

### **Conclusiones:**

Aunque no se puede afirmar con certeza estos estudios preliminares podrían indicar la existencia de receptores CB<sub>2</sub> en próstata de rata. Son necesarios más trabajos con objeto de demostrar la implicación de este subtipo de receptor en los efectos de los cannabinoides en tejido prostático normal y en tumores de próstata.

## HUMAN ENDOCRINE PANCREAS DISPLAYS A COMPLETE AND FUNCTIONAL ENDOGENOUS CANNABINOID SYSTEM

F.J. Bermudez-Silva<sup>1</sup>, J. Suárez-Pérez<sup>1</sup>, E. Baixeras<sup>1</sup>, M.D. Bautista<sup>2</sup>, N. Acosta<sup>1</sup>, I. Sánchez-Vera<sup>1</sup>, P. Juan-Picó<sup>3</sup>, E. Fuentes<sup>3</sup>, A.Nadal<sup>3</sup>, F. Rodríguez de Fonseca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Medicina Regenerativa, Fundación IMABIS, Hospital Carlos Haya, 29010 Málaga

<sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Carlos Haya, 29010 Málaga

<sup>3</sup>Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche, Elche 03202 Alicante

Increasing evidences suggest an outstanding role of peripheral cannabinoid system in modulating important metabolic processes involved in energy homeostasis. Up to date, endocannabinoid system from gastrointestinal tract, adipose tissue and liver are known to have an important role in the control of food intake and lipid metabolism. Recently, the presence of CB1 and CB2 receptors in islets of Langerhans, other main component of peripheral energy homeostasis system, have also been reported. Indeed, an intriguing CB1-modulated plasma glucose tolerance that could be, at least partially, mediated by endocrine pancreas have also been showed. Here he extend these findings showing by qPCR and immunohistochemistry that human endocrine pancreas displays not only the cannabinoid receptors but all the molecular machinery needed to synthesize and degradate the endogenous cannabinoids. Static secretion experiments with human isolated islets from cadaveric donors suggest an ability of both endogenous cannabionoids and synthetic cannabinoid receptors-specific drugs to induce changes in insulin and glucagon secretion. These results suggest a putative important role of endocannabinoid system from endocrine pancreas in modulating the activity of this key structure implicated, by means of their hormonal secretion, in glucose and lipid homeostasis contributing in a decisive way to energy balance.

## EFFECTO DE SR141716A SOBRE LA RESPUESTA INDUCIDA POR WIN 55,212-2 EN PRESIÓN ARTERIAL DE RATA

I. Soria<sup>1</sup>, M<sup>a</sup>.I. Martín<sup>2</sup>, M.V. Pello<sup>1</sup>, A. Alsasua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid.

<sup>2</sup>Universidad Rey Juan Carlos, Facultad Ciencias de la Salud, Dpto. Ciencias de la Salud, Unidad de Farmacología. Campus de Alcorcón. Madrid

Los efectos de los derivados del *Cannabis* sobre presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca (FC) son variables dependiendo de la especie estudiada, el grado de consciencia y el tipo de cannabinoide utilizado. En la rata anestesiada se produce una típica respuesta trifásica (fase I: depresora; fII: presora; fIII: depresora) (Varga y cols.1995, Malinowska y cols, 2001), habiéndose postulado un mecanismo diferente para cada una de ellas. Ha despertado gran interés la fase III hipotensora, que podría estar mediada por activación de receptores CB<sub>1</sub>. En este trabajo se ha estudiado el mecanismo por el cual el agonista sintético de cannabinoides WIN 55.212-2 produce su efecto hipotensor en la rata, así como la interacción entre WIN y el antagonista del receptor CB<sub>1</sub> SR141716A, con objeto de comprobar dicha hipótesis.

### **Material y métodos:**

Se utilizaron ratas Wistar anestesiadas con Uretano (1.5g/Kg), a las que se les administró WIN 55,212-2 a diferentes dosis acumulativas (0.01-1 mg/kg), a intervalos de 20 min. Se eligió la dosis más alta de WIN (1 mg/kg de peso/iv) para estudiar el antagonismo. Se empleó SR141716A a la dosis de 1.5 mg/kg de peso/iv. Diez minutos y una hora después de administrado el antagonista se volvió a administrar la misma dosis de WIN (1 mg/kg de peso/iv). Cada animal actuó como su propio control mediante una dosis inicial de WIN. Tanto PA como FC se registraron en la arteria carótida, a través de un sistema Power Macintosh 6200/75, (programa MacLab/4e (paquete informático Chart v3.5.6)).

### **Resultados:**

El WIN 55,212-2 a las dosis acumulativas utilizadas (0.01-1mg/Kg), provoca una respuesta trifásica muy similar a la descrita previamente para anandamida, acompañada de bradicardia. Este efecto es más acusado y estadísticamente significativo sobre la PA diastólica.

El SR141716A en ausencia de WIN apenas modifica ambos parámetros cardiovasculares. Por el contrario, en presencia de WIN 55,212-2, se producen efectos complejos y dosis-dependiente. La asociación del agonista con el antagonista produce un aumento progresivo de la PA media y de la FC a lo largo del tiempo. Asimismo aparece una modificación de la respuesta trifásica con potenciación de la fase I hipotensora, y disminución de los efectos correspondientes a las fases II y III, especialmente una disminución del efecto hipotensor que aparece en la fase III y que se correspondería con el bloqueo del receptor CB<sub>1</sub>.

**Conclusiones:** El presente trabajo demuestra que el WIN 55,212-2 induce variaciones en el aparato cardiovascular de la rata, actuando sobre receptores CB<sub>1</sub> (fase III) y sobre receptores vanilloides (fase I). El prolongado efecto hipotensor de WIN 55,212-2 (fase III) es bloqueado por el antagonista SR141716A. No se descarta que el aumento de la FC sea debido a que SR141716A bloquee la reducción del tono simpático producido por cannabinoides.

Este trabajo fue realizado con un proyecto CICYT, Ref: SAF 2003-08003-CO2-03

## THE MOST COMMONLY USED ANANDAMIDE UPTAKE INHIBITORS AFFECT C6 GLIOMA CELL VIABILITY AT PHARMACOLOGICALLY RELEVANT CONCENTRATIONS

Eva de Lago<sup>\*,#</sup>, Sofia B. Gustafsson<sup>\*</sup>, Javier Fernández-Ruiz<sup>#</sup>, Jonas Nilsson<sup>‡</sup>, Stig O.P. Jacobsson<sup>\*</sup>, and Christopher J. Fowler<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Department of Pharmacology and Clinical Neuroscience, Umeå University, Umeå. Sweden;

<sup>#</sup>Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad

Complutense, Madrid, Spain; <sup>‡</sup>Department of Molecular Biology, Umeå University, Umeå. Sweden

AM404, VDM11, UCM707 and OMDM2 are four compounds that block the uptake of the endocannabinoid anandamide. These compounds have been used in a number of *in vivo* and *in vitro* studies to explore the functions of the endogenous cannabinoid system in the central nervous system. In the present study, the effects of these compounds on the viability of C6 glioma cells have been investigated. All four compounds affected cell viability as measured by the ability of the cells to accumulate calcein. Comparison of concentration response curves for effects upon cell viability and the ability of the compounds to affect anandamide uptake in C6 glioma cells indicated that the potencies for these two processes overlapped in all cases. The compounds also reduced the total nucleic acid content, and increased the activity of lactate dehydrogenase recovered in the cell medium. AM404 (10  $\mu$ M) and VDM11 (10  $\mu$ M), acted rapidly, reducing cell viability after 3 h of exposure when cell densities of 5000 per well were used. UCM707 (30  $\mu$ M) and OMDM2 (10  $\mu$ M) produced a more slowly developing effect upon cell viability, although robust effects were seen after 6-9 h of exposure. These latencies are of course longer than needed to block the uptake of anandamide. Furthermore, at higher cell densities, the toxicities of AM404 and UCM707 were reduced. Comparison of the compounds with a number of related acyl compounds indicated that the toxicity of the arachidonoyl-based compounds was related primarily to the acyl side chain rather than the head group. FACS sorting of propidium iodide labelled cells suggested that the compounds produced apoptosis to roughly the same extent as seen with anandamide. In order to determine what processes were involved in the actions of the compounds, a variety of pretreatments were tested, but the only consistent protective treatment against the effects of these compounds was the antioxidant N-acetyl-L-cysteine. From these data, it can be concluded that AM404, VDM11, UCM707 and OMDM2 affect in a negative manner the viability of C6 glioma cells over the same concentration range as is required for inhibition of anandamide uptake *in vitro*.

## AMPHIREGULIN MEDIATES RESISTANCE OF GLIOMA CELLS TO CANNABINOID-INDUCED APOPTOSIS

Mar Lorente, Arkaitz Carracedo, Francesco Natali, Ainara Egia, Cristina Blázquez, Sofía Torres, Manuel Guzmán and Guillermo Velasco  
Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

Gliomas are one of the most malignant forms of cancer, mostly due to their high resistance to conventional therapies such as chemotherapy and radiation. The identification of the molecular mechanisms responsible for this resistance could be extremely interesting in order to improve the specificity and efficiency of current therapies.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC), the major active ingredient of marijuana, and other cannabinoids have been shown to reduce the growth of several types of tumor xenografts including gliomas. This anti-tumoral effect of cannabinoids relies, at least in part, on the ability of these compounds to induce apoptosis of transformed cells.

In order to identify the molecular markers associated with the resistance of tumor cells to cannabinoid treatment, we analyzed the gene expression profile of two subclones of the rat C6 glioma cell line: C6.9, which is THC-sensitive, and C6.4, which is THC-resistant. We found differences in the expression of several genes involved in cell proliferation, differentiation and adhesion. Subcutaneous tumor xenografts generated from C6.9 and C6.4 glioma cells showed a similar pattern of THC sensitivity and gene expression profile than cultured cells.

Interestingly, the EGFR ligand amphiregulin (AREG) was found to be highly over-expressed in the cannabinoid-resistant cell line C6.4. Moreover, basal ERK phosphorylation was also increased in these cells both *in vitro* and in tumor xenografts. In addition, silencing of AREG expression decreased the basal level of ERK phosphorylation and increased the sensitivity of C6.4 cells to cannabinoid treatment, suggesting that EGFR activation is associated with the resistance of C6.4 cells to cannabinoid-induced apoptosis. In line with this notion, reduction of AREG levels increased the expression of p8 and TRIB3 –two genes that have been previously implicated in the mechanism of cannabinoid-induced apoptosis.

In summary, our data support that increased AREG levels mediates resistance of glioma cells to cannabinoid treatment, at least in this model, and suggest that inhibition of the EGFR pathway may help to improve the efficiency of a potential antitumoral therapy with cannabinoids.

## DISMINUCION DE LA EXPRESIÓN Y LA FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB<sub>1</sub> EN MEMBRANAS DE GLIOBLASTOMAS HUMANOS

L.F. Callado<sup>1</sup>, M. López De Jesús<sup>1</sup>, J. Garibi<sup>2,3</sup>, J. Sallés<sup>1</sup>, J.J. Meana<sup>1</sup>.

Departamentos de <sup>1</sup>Farmacología y <sup>2</sup>Cirugía. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. <sup>3</sup>Servicio de Neurocirugía, Hospital de Cruces (Bizkaia).

Los tumores gliales son la neoplasia cerebral más común en humanos. Durante los últimos años se ha demostrado que diferentes compuestos cannabinoides son capaces de inducir apoptosis en células tumorales de origen glial.

El objetivo de este estudio fue valorar tanto la expresión como la funcionalidad de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> (CB<sub>1</sub>) en membranas de tumores de estirpe glial, y compararlas con las de tejido no-tumoral y otros tumores de estirpe no glial (meningiomas).

Para ello se utilizaron glioblastomas multiformes (n=10), astrocitomas de grado II-III (n=6) y meningiomas (n=8) que se obtuvieron en el transcurso de intervenciones neuroquirúrgicas en el Servicio de Neurocirugía del Hospital de Cruces. Los fragmentos tumorales fueron recogidos bajo un estricto protocolo aprobado por el Comité de Ética del Hospital, y tras haberse obtenido el consentimiento informado de cada paciente. Las muestras de cerebro humano control (n=16) procedieron de autopsias judiciales de sujetos sin ninguna patología previa y que fallecieron de manera accidental. Una vez extraídas, las muestras se congelaron a -80°C hasta el ensayo.

Para comparar los niveles de expresión de los receptores CB<sub>1</sub> se realizaron experimentos de western blot en preparados de membrana de cada uno de los tejidos, utilizando un anticuerpo comercial específico contra dichos receptores. En todas las muestras analizadas el anticuerpo reconoció bajo condiciones reductoras una banda de 60-kDa, que se corresponde con el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. Los niveles de expresión del receptor CB<sub>1</sub> estuvieron significativamente disminuidos en membranas de glioblastomas multiformes (-39%, p<0.005) respecto al tejido cerebral control no-patológico. Por el contrario no se encontraron diferencias significativas en la expresión del receptor CB<sub>1</sub> ni en astrocitomas ni en meningiomas cuando se compararon con el tejido control.

Con el fin de valorar la funcionalidad de los receptores CB<sub>1</sub> en los glioblastomas multiformes, se desarrollaron ensayos de fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS. Los experimentos se realizaron con alícuotas de membranas diluidas hasta una concentración de 0,1 mg de proteína/ml, en un tampón de ensayo conteniendo 0,5 nM [<sup>35</sup>S]GTPγS y el agonista cannabinoide WIN55-212,2 (10<sup>-11</sup>-10<sup>-3</sup> M). La fijación no específica se determinó en presencia de GTPγS a una concentración de 10 μM. En las membranas de cerebros control el WIN55-212,2 produjo un incremento del 83% en la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS, con una EC<sub>50</sub> de 1.2±0.1 μM. Sin embargo, cuando los experimentos se realizaron en membranas de glioblastomas multiformes se produjo un desplazamiento de la curva a la derecha con un efecto máximo del 34% y una EC<sub>50</sub> de 6.3±0.3 μM.

Los resultados del presente trabajo demuestran una reducción significativa de la expresión de los receptores CB<sub>1</sub> en los glioblastomas multiformes con respecto a tejido no tumoral, tumores de estirpe no glial, e incluso tumores gliales de menor grado de malignidad. Del mismo modo también se observa una disminución de la funcionalidad de los receptores CB<sub>1</sub> en glioblastomas multiformes con respecto al tejido control.

Financiado por el FIS (PI030498).

**EARLY MATERNAL SEPARATION IN RATS AS A MODEL FOR STUDYING  
MODULATION OF GLIAL CELLS AND CORTICOSTERONE RESPONSES BY  
SELECTIVE INHIBITORS OF ENDOCANNABINOID INACTIVATION:  
PRELIMINARY RESULTS.**

R. Llorente, A. Llorente, E.M. Marco, C. Prada, V. Di Marzo, C. Guaza, M. López-Gallardo,  
M.P. Viveros

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad  
Complutense, 28040, Madrid, Spain.

The endocannabinoid system appears to play a role in neuroprotection (Van der Stelt & Di Marzo 2005, *Neuromolecular Med* 7:37–50.). In a previous study, we showed that neuronal death induced by acute severe asphyxia in newborn rats was prevented by a single injection of WIN 55212-2 (WIN) (0.1 mg/kg, sc) (Martinez Orgado et al. 2003, *Brain Res Mol Brain Res* 114:132-9). More recently, we have found that a single injection of the same dose of WIN administered at PND 10 induced long-term anxiogenic-like and depressive-like responses, increased corticosterone levels and altered immunological parameters in adolescent rats (Llorente et al. 2005 *Behavioural pharmacology*. 16 (Supp 1): p S34, A34; Llorente et al. 2005, 6<sup>th</sup> SEIC Annual Meeting Book of Abstracts p16, O-1.14). In the present study we have used a rat model of schizophrenia based on the neurodevelopmental hypothesis [24 h maternal separation (MS), postnatal day (PND) 9-10] (Ellenbroek & Cools 2002, *Pharmacol Biochem Behav* 73:177-84) to study its detrimental effects (neurodegeneration-gliodegeneration) on hippocampus and the possible protective action of two compounds that modulate the endocannabinoid system, the fatty acid amide hydrolase inhibitor N-arachidonoyl-serotonin, AA-5-HT, and the endocannabinoid reuptake inhibitor OMDM-2. In theory, these compounds may be safer than direct cannabinoid agonists in terms of behavioural side effects. Pharmacological treatment consisted of daily sc injections during the period PND 7-12 and the animals were sacrificed at PND 13. Maternal separation induced a significant increase in corticosterone levels as well as gliosis (more glial fibrillary acidic protein (GFAP) positive cells) in CA1 and CA3. The endocannabinoid system modulators attenuated both the corticosterone responses and the astrogliosis induced by MS. The results also indicate sexual dimorphisms for some of the observed effects. Early maternal deprivation stress may be an adequate non-invasive model to evaluate the neuroprotective actions of pharmacological strategies based on the endocannabinoid system.

Acknowledgements: Supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología ref: SAF2006-07523

## REGULATION OF PI3K/AKT/GSK-3 PATHWAY BY ACUTE AND CHRONIC DELTA(9)-TETRAHYDROCANNABINOL IN THE BRAIN

A. Ozaita, E. Puighermanal, C. Fernández-Avilés, R. Maldonado  
Laboratori de Neurofarmacologia, Universitat Pompeu Fabra, 08003-Barcelona, Spain.

Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC), the main psychoactive component in *Cannabis sativa* preparations, exerts its central effects mainly through the G-protein coupled receptor CB1, a component of the endocannabinoid system. Several *in vitro* and *in vivo* studies have reported neuroprotective effects of cannabinoids in excitotoxicity and neurodegeneration models. However, the intraneuronal signaling pathways activated *in vivo* by THC underlying its central effects remain poorly understood. We report that THC acute administration (30 minutes after 10 mg/kg, i.p.) increases the phosphorylation of Akt at Ser473, in mouse hippocampus, striatum and cerebellum. This phosphorylation was mediated by CB1 receptors as it was blocked by the selective CB1 antagonist rimonabant (3 mg/kg, i.p. 30 minutes before THC administration). PI3K inhibition by wortmannin (1 nmol, i.c.v., 1 hour before THC administration) abrogated THC-induced phosphorylation of Akt in the hippocampus, but blockade of extracellular regulated protein kinases (ERKs) by SL327 (50 mg/kg, i.p. 30 minutes before THC administration) did not modify this activation/phosphorylation of Akt. Moreover, administration of the dopaminergic D1 (SCH 23390, 0.3 mg/kg, i.p. 30 minutes before THC administration) and D2 (raclopride, 0.3 mg/kg, i.p., 30 minutes before THC administration) receptor antagonists did not block the activation of PI3K/Akt pathway induced in the striatum by cannabinoid receptor stimulation, suggesting that this effect is independent of the dopaminergic system. Acute THC was found to reduced pro-apoptotic function by phosphorylating/inhibiting glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 $\beta$ ) in a CB1-dependent manner. In addition, THC chronic treatment (20 mg/kg, i.p., 4.5 days) did not modify the responsiveness of Akt phosphorylation to THC, but reduced the effect of acute THC on GSK-3 $\beta$  phosphorylation. Therefore, activation of the PI3K/Akt/GSK-3 signaling pathway may be related to the *in vivo* neuroprotective properties attributed to cannabinoids, and the sensitivity of this pathway might be altered by the long-term exposure to exogenous cannabinoids.



## **EFFECTOS NEUROPROTECTORES DE LOS CANNABINOIDES CONTRA EL DAÑO AXONAL EN UN MODELO VIRAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

F. Loría, F. Docagne, D. Clemente, F. Correa, M. Hernangómez, L. Mestre, C. Guaza.  
Grupo de Neuroinmunología, Dpto. Plasticidad Neural, Instituto Cajal (CSIC), Madrid.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica desmielinizante en la cual, adicionalmente al daño a la mielina y a los oligodendrocitos, la característica histopatológica principal es el daño axonal. En estudios anteriores hemos reportado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, la participación de procesos excitotóxicos en el desarrollo de la enfermedad desmielinizante inducida por el virus de la encefalopatía murina de Theiler (TMEV-IDD), y el efecto terapéutico y neuroprotector que tienen los endocannabinoides a través de una disminución de dichos procesos. No obstante, los cambios neurodegenerativos son muy relevantes en la progresión de la enfermedad, es por ello que el objetivo del presente trabajo fue determinar la relación entre los procesos excitotóxicos y la acción neuroprotectora de los cannabinoides específicamente a nivel axonal. Para ello, realizamos un tratamiento subcrónico con el agonista sintético del receptor CB1/CB2; HU-210, y determinamos el nivel de daño axonal en la médula espinal de ratones infectados con el TMEV y con una sintomatología establecida. Entre los resultados encontramos que el cannabinoide HU-210 además de producir mejoras en las manifestaciones clínicas de la enfermedad, como la coordinación motora y la movilidad física en general, redujo considerablemente el daño axonal en la médula espinal de los ratones infectados, en comparación con el grupo control.

Adicionalmente y como una forma de aproximarnos al estudio del papel que juegan los procesos excitotóxicos en el daño axonal observado en la EM y el grado en el que los cannabinoides están implicados en estos procesos, intentamos establecer un modelo *in vitro* de daño axonal. Se sabe que un aumento en la concentración de calcio intracelular puede mediar la degeneración neuronal central causada por la estimulación excesiva de los receptores de glutamato, debido a esto, estudiamos el efecto que tiene la exposición a un ionóforo selectivo de calcio, el A-23187, sobre la integridad de las neuronas y sus procesos en cultivos primarios mixtos de neuronas/astrocitos. Encontramos un porcentaje de daño y posteriormente de muerte, significativamente mayor en los cultivos mixtos de los ratones carentes del receptor CB1 en comparación con el grupo de ratones silvestres. La adición del antagonista de CB1 SR1, pero no del antagonista de CB2 SR2, potencia la muerte en los cultivos expuestos al ionóforo de calcio.

Actualmente y mediante dicho modelo estamos evaluando el efecto de la administración tanto de cannabinoides exógenos (HU-210, WIN 55 212,2) como de cannabinoides endógenos (AEA) en cultivos mixtos de ratones, y los resultados preliminares apuntan hacia un efecto neuroprotector tanto de WIN 55 212,2 como de AEA, efecto que en el caso del WIN 55212,2 es revertido con la co-administración del SR1. En resumen, nuestros hallazgos indican que se podrían obtener estrategias terapéuticas eficientes mediante la modulación del sistema cannabinoide endógeno o con la administración exógena de moléculas relacionadas con los cannabinoides, que quizá ayuden a disminuir el daño axonal y la discapacidad permanente relacionada con la EM.

## **ROLE OF THE CANNABINOID CB2 RECEPTOR IN THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS**

Javier Palazuelos<sup>1</sup>, Eric Hatterer<sup>2</sup>, Boris Julien<sup>1</sup>, Manuel Guzmán<sup>1</sup>, Serge Nataf<sup>2</sup>, Natalie Davoust<sup>2</sup>, Ismael Galve-Roperh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Complutense University, Madrid, Spain; <sup>2</sup>INSERM U433, Lyon, France.

Cannabinoids constitute promising agents for the development of therapeutic strategies aimed to the management of multiple sclerosis. In different animal models of this pathology, like experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), several alterations in the endocannabinoid system have been shown. Prominent cannabinoid actions in EAE include alleviation of symptoms (such as spasticity, tremor, neuropathic pain and nocturia) and the regulation of different processes involved in EAE progression including: lymphocyte and microglial activation, the degree of demyelination and oligodendrocyte survival, or axonal loss and neuroprotection. In the present work, by the use of CB2-deficient mice we have analyzed the role of this receptor in the development of EAE and its involvement in the regulation of microglial population dynamics. CB<sub>2</sub><sup>-/-</sup> mice showed increased clinical score than their wild-type littermates that correlated with extended axonal loss in inflamed spinal cords. CB2 deficient mice suffered a massive cell infiltration compared to wild-type mice, in particular T-lymphocytes (CD4+), microglia (CD11b+) and their progenitors (CD34+, CD11b+). Bone marrow cell composition was analyzed by flow cytometry and evidenced an expansion of myeloid microglial progenitors that correlates with increased CD34 expression in peripheral blood monocytic cells. Next we assessed the impact of selective CB2 activation by HU-308 administration in EAE wild-type mice. CB2 activation reduced the clinical score compared to vehicle-treated mice, and counteracted microglial recruitment. These results evidence the involvement of the CB2 cannabinoid receptor in the development of EAE by acting on microglial activation and the recruitment of bone marrow-derived progenitors.

Financiación: Acciones Integradas HF2005-0017.

**CANNABIDIOL REDUCED THE STRIATAL ATROPHY CAUSED BY 3-NITROPROPIONIC ACID *IN VIVO* BY MECHANISMS INDEPENDENT OF THE ACTIVATION OF CANNABINOID RECEPTORS**

Onintza Sagredo, Alessandra Decio, Moisés García-Arencibia, Rosario de Miguel, José A. Ramos, Raphael Mechoulam\* and Javier Fernández-Ruiz  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain; \*Department of Medicinal Chemistry and Natural Products, Medical Faculty, Hebrew University, Jerusalem 91120, Israel

We recently demonstrated the occurrence of profound alterations of cannabinoid receptor signaling during the neurodegeneration of the striatum caused by the exposure to 3-nitropropionic acid (3NP) *in vivo*, and that the administration of the plant-derived cannabinoid  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) was neuroprotective. This indicated that the early loss of cannabinoid receptor signaling could be instrumental in 3NP toxicity (Lastres-Becker et al., *Neuroreport* 15, 2375-2379, 2004). In the present study, we wanted to further explore the potential mechanisms involved in the neuroprotective effect exerted by this plant-derived cannabinoid, by examining in the same animal model a series of compounds with more selectivity for different elements of the cannabinoid signaling system. We used the CB<sub>1</sub> receptor agonist arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA), the CB<sub>2</sub> receptor agonist HU-308, the TRPV1 receptor agonist capsaicin, and cannabidiol (CBD), a phytocannabinoid with negligible affinity for the two cannabinoid receptor subtypes but exhibiting, as  $\Delta^9$ -THC, a notable antioxidant potential. As expected, the administration of 3NP caused a significant depletion of GABA contents in the striatum, accompanied by a parallel reduction in several markers of striatal GABAergic projection neurons, such as proenkephalin (PENK), substance P (SP) and neuronal-specific enolase (NSE), which indicated that 3NP caused the preferential degeneration of these neurons. We also found reductions in mRNA levels for superoxide dismutase-1 (SOD-1) and -2 (SOD-2), which supported the notion of a 3NP-induced loss in endogenous defenses against oxidative stress. The administration of CBD completely recovered 3NP-induced reductions in GABA contents and mRNA levels for SP, NSE and SOD-2, and partially attenuated the reductions in mRNA levels for SOD-1 and, to a lesser extent, PENK, thus indicating that CBD may be neuroprotective but acted preferentially on striatal neurons that project to the substantia nigra. Neither ACEA nor HU-308 mimicked these neuroprotective effects, thus indicating that CBD effects were not CB<sub>1</sub>- or CB<sub>2</sub>-mediated. In addition, capsaicin did not provide neuroprotection, thus discarding that TRPV1 receptors may be involved in CBD effects. In summary, the present study demonstrates that CBD may act as a neuroprotective agent reducing the striatal atrophy generated by the exposure to 3NP, which may be relevant for Huntington's disease, a neurodegenerative disorder characterized by the preferential loss of striatal projection neurons. This capability seems to be based on the antioxidant potential of CBD since this cannabinoid has negligible activity at the CB<sub>1</sub> or CB<sub>2</sub> receptors, whereas the use of selective agonists for both receptor types, and also for the related TRPV1 receptor, did not replicate CBD effects. We have also preliminary evidence that CBD effects are not related to an enhancement of adenosine signaling, as some authors recently suggested (see Carrier et al., *PNAS* 103, 7895-7900, 2006), since they were not reversed by blockade of A2A adenosine receptors.

Supported by MEC (SAF2003-08269) and Santander/Complutense (PR27/05-13975)

## LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES CB<sub>2</sub> MODULA LA CAPACIDAD DE RETIRADA *IN SITU* DE BETA AMILOIDE

E. Núñez, M.R. Pazos, J.P. Romero, C. Benito, R. M. Tolón y J. Romero  
Laboratorio de Apoyo a la Investigación. Fundación Hospital Alcorcón (Madrid)

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de placas ricas en el péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) y rodeadas por células de microglia y astrocitos activados. Estas células de microglia son activadas por el A $\beta$ , aumentando su capacidad fagocítica y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Se ha demostrado recientemente que los astrocitos adultos también son capaces de fagocitar el A $\beta$  de secciones de tejido de ratones transgénicos (Wyss-Coray et al, Nature Medicine 9(4):453-7, 2003).

Nuestro grupo ha demostrado previamente la presencia de receptores CB<sub>2</sub> en las células de microglia que rodean las placas en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Benito et al, J Neurosci 23(35):11136-41, 2003). El objetivo de este trabajo es determinar la función de los receptores CB<sub>2</sub> en las células de microglia expuestas al péptido  $\beta$ -amiloide. Para ello, se utilizaron diversas líneas celulares y se comprobaron sus capacidades fagocíticas de A $\beta$  en secciones de tejido congelado de cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Posteriormente, se utilizaron diversos ligandos cannabinoides para comprobar el posible papel de la activación de los receptores CB<sub>2</sub> en dicha actividad.

Nuestros resultados indican que la activación de los receptores CB<sub>2</sub> produce cambios en la actividad fagocítica de U373 y de macrófagos derivados de monocitos THP1. El agonista cannabinoide JW-015 produce un aumento de la capacidad fagocítica de los macrófagos derivados de las células THP-1, y una disminución de la misma en la línea U373MG.

**Agradecimientos:** Ministerio de Educación y Ciencia (SAF: 2004-00237).

## CANNABINOID EFFECTS ON MICROGLIAL CELL MIGRATION: RELEVANCE FOR ALZHEIMER'S DISEASE.

A.M.Martín Moreno, M.L.de Ceballos.

Neurodegeneration Group, Cajal Institute, CSIC. Av.Doctor Arce, 37, 28002 Madrid.

Microglial cells express CB<sub>1</sub> receptors, like all types of neural cells, but also CB<sub>2</sub> receptors, characteristic of the immune system. Cannabinoids promote microglial migration, an effect mediated through CB<sub>2</sub> receptors (1). In Alzheimer's disease (AD) activated microglia cluster at senile plaques, where  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) deposits exist. We have studied the effects of amyloid peptides and of cannabinoids on microglial migration, taking into account that indeed A $\beta$  possesses chemotactic properties on cultured cells (2), that may explain microglial recruitment to plaques.

To assess migration the microglial cell line N13 was used in the following assays: 1) chemotaxis chambers, with an upper chamber, where cells were seeded, and a lower chamber, where treatments were added, separated by a porous membrane (8  $\mu$ m); 2) A $\beta$  immobilized on nitrocellulose; 3) frontal cortex sections from AD patients as substrate of N13 cells labelled with the fluorescent dye Fast Blue. The effect of fibrillar and soluble A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>25-35</sub> scrambled peptide (SCR), the mixed CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> agonist WIN 55,212-2 and the selective CB<sub>2</sub> agonist JWH-133 were assayed.

The compounds *per se* did not promote migration and it was necessary to activate the cells with lipopolysaccharide (LPS). As expected, LPS and the chemotactic peptide f-Met-Leu-Phe induced migration in a dose-dependent manner. WIN and JWH activated cell migration, an effect mediated by CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> and CB<sub>2</sub> receptors respectively, as judged by blockade with the corresponding antagonists. Fibrillar A $\beta$  promoted migration as well, but soluble and SCR peptides were without effect. Cannabinoids increased the number of cells attracted by immobilized fibrillar. Few N13 cells were observed in sections from control subjects, while a higher number were found in sections from AD.

We have shown that A $\beta$  induces migration when added to microglial cultures, and to a greater extent when immobilized onto the plate surface or pathologically aggregated in AD brain. CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors mediate the effects of cannabinoids and they favour A $\beta$ -induced chemoattraction. Activated microglial cells in AD are the source of different neurotoxic molecules, but they also represent the mechanism of A $\beta$  degradation. Treatments which enhance A $\beta$ -induced migration, that may favour its degradation, would be important to reduce AD associated neurodegeneration.

1. Walter, et al. (2003) *J. Neuroscience* **23**: 1398.
2. Cui, et al. (2002) *J. Immunology* **168** :434.

*Funded by MCYT (SAF-2005-02845)*

## **EFECTO NEUROPROTECTOR EN U INVERTIDA DE LA OLEILETANOLAMIDA SOBRE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SUSTANCIA NEGRA IN VITRO E IN VIVO**

B. Galán-Rodríguez, E. Fernández-Espejo, F. Rodríguez de Fonseca <sup>1</sup>, F.J. Bermúdez-Silva <sup>1</sup>,  
S. Ramiro-Fuentes, J. A. Flores  
Departamento de Fisiología Médica, Facultad de Medicina de Sevilla, 41009 Sevilla.  
(1) Fundación IMABIS, Hospital Civil, 29009 Málaga.

Hay evidencias que indican que análogos cannabinoideos como la oleiletanolamida (OEA) podrían actuar como neuroprotectores. De hecho la OEA se acumula a nivel cerebral tras isquemia o la administración de neurotoxinas. Esta amida podría ser neuroprotectora de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, tanto in vivo (en modelos animales de parkinsonismo) como in vitro.

Para el estudio in vivo, se ha empleado el modelo retrógrado de parkinsonismo animal por medio de la inyección intraestriatal de 6-OHDA, donde la sustancia negra degenera progresivamente. La 6-OHDA es una toxina dopaminérgica que produce la muerte neuronal por procesos oxidativos principalmente. Las ratas se pretrataron con OEA (0, 0.5, 1, 5 y 15  $\mu\text{M}$ ) inyectado en el estriado derecho y vehículo en el izquierdo, 30 min antes de 6-OHDA bilateral (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 2 $\mu\text{L}$ ). La oxidación, respuesta glial, y neurodegeneración se evaluaron en ambos estriados y sustancias negras (SN) a 24 y 48 h (corto plazo) y 30 días (largo plazo) tras la lesión. A corto plazo, la señal de hemoxigenasa-1 (marcador de estrés oxidativo) y de GFAP (marcador de activación glial) eran significativamente menores en el estriado pretratado con 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) y 5  $\mu\text{M}$  de OEA ( $p < 0.01$ ), pero no con 0.5 o 15  $\mu\text{M}$ . A largo plazo se evaluó la degeneración dopaminérgica por medio de la densidad de fibras TH+ en estriado, la expresión de sinaptofisina y TH en el estriado, y el número de neuronas TH+ en sustancia negra. La densidad TH+ en el estriado pretratado con OEA fue mayor a 5  $\mu\text{M}$  que en el no tratado, siguiendo una dependencia de dosis en U invertida (5 $\mu\text{M}$  OEA,  $p < 0.01$ ). La densidad de TH y sinaptofisina en el estriado se redujo tras 6-OHDA, pero dicha reducción fue significativamente menor tras el tratamiento con OEA 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ). Es de destacar que la tasa de muerte neuronal en la sustancia negra también siguió un cambio en U invertida tras tratar el estriado con OEA, siendo las dosis de 1 y 5 $\mu\text{M}$  las que poseían capacidad neuroprotectora.

Respecto al estudio in vitro, se ha puesto a punto un cultivo de neuronas de sustancia negra de rata en día post-natal 1, y se ha ensayado la muerte celular con varias dosis de 6-OHDA utilizando el ensayo colorimétrico de la LDH (lactato deshidrogenasa), que permite medir la tasa de muerte y lisis celular. Tras conseguir una muerte celular dosis-dependiente con 6-OHDA (40, 60 y 80  $\mu\text{M}$ ), se han probado los efectos neuroprotectores de la OEA (0, 1, 5 y 15  $\mu\text{M}$ ). Se ha comprobado que la OEA a 1  $\mu\text{M}$  ejerce una protección significativa de la muerte celular tras 6-OHDA ( $p < 0.01$ ), y los efectos de nuevo siguen un curso en U, al igual que sucede in vivo, pero con menor dosis efectiva de OEA. En definitiva, la OEA parece tener capacidad antioxidante y neuroprotectora en modelos de parkinsonismo animal in vivo y de toxicidad dopaminérgica in vitro, pero dentro de un rango de dosis, con un claro efecto en U invertida.

*Financiado por Red de trastornos adictivos (Instituto Carlos III, G03/05), Plan Andaluz de Investigación (CVI127), y Plan Nacional sobre Drogas (3SI/05/14).*

## LOS AGONISTAS CANNABINOIDES, JWH-015 Y WIN-55,212-2, ACELERAN LA RESPUESTA MICROGLIAL *IN VIVO* FRENTE AL DAÑO CEREBRAL AGUDO

M.R. Pazos<sup>1</sup>, C. Parkhust<sup>2</sup>, W. Gan<sup>2</sup> y J. Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Fundación Hospital Alcorcón (Madrid). <sup>2</sup> Molecular Neurobiology Laboratory, Skirball Institute of Biomolecular Medicine (New York).

Datos previos sugieren que las células microgliales juegan un papel importante en los procesos neuroinflamatorios y forman la primera línea de defensa del sistema nervioso central. En condiciones normales, estas células se encuentran en un estado de reposo pero ante cualquier tipo de daño se activan y sufren cambios tanto morfológicos como funcionales.

Para estudiar la respuesta de esta población celular frente a un daño en un modelo *in vivo*, hemos utilizado una cepa de ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente en las células microgliales (*Cx3cr1*<sup>GFP/+</sup>). Mediante el uso de la microscopía multifotónica transcraneal podemos visualizar dichas células y analizar su comportamiento *in vivo*.

Tras anestesiarse a los ratones se practicó una cirugía para abrir una ventana en el cráneo que permitió visualizar la respuesta celular en reposo y tras la lesión. Los distintos ligandos cannabinoides testados (JWH-015, AM-630, WIN-55, 212-2, AM-251 y UCM-707) se aplicaron de forma tópica directamente sobre la corteza cerebral. Posteriormente se causó un daño agudo y localizado utilizando un microscopio multifotónico, mediante un disparo-láser de 800nm de longitud de onda. Se tomaron imágenes durante la hora siguiente al disparo y se analizaron con el software ImageJ (NIH) para cuantificar la velocidad de respuesta de las células microgliales cercanas a la lesión.

Nuestros resultados indican que los receptores cannabinoides están implicados en la respuesta microglial aguda ya que los agonistas cannabinoides parecieron acelerar dicha respuesta. Sin embargo, el tratamiento con UCM-707 no tuvo un efecto significativo sobre la respuesta de las células, aunque sí exhibió una tendencia similar a la del tratamiento con agonistas.

**Agradecimientos:** Ministerio de Educación y Ciencia (SAF: 2004-00237).

## ROLE OF CB1 AND CB2 RECEPTORS IN NEUROPROTECTION BY WIN 55,212 IN A NEWBORN RAT MODEL OF HYPOXIC-ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY

David Fernández-López (1), M Ruth Pazos (2), Rosa M Tolón (2), M Angeles Moro (1), Julián Romero (2), Ignacio Lizasoain (1), and José Martínez-Orgado (3)

(1) Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040-Madrid; and (2) Laboratorio de Apoyo a la Investigación and (3) Área de Pediatría y Neonatología, Fundación Hospital Alcorcón; Budapest 1; 28922-Alcorcón (Madrid). Spain.

**Aim.** To study the participation of CB1 and CB2 receptors in the neuroprotective effect induced by the cannabinoid agonist WIN55212 (WIN) in a standard newborn rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE).

**Methods.** Following the Rice-Vannucci model, left common carotid artery was ligated and sectioned under anesthesia in 7-day-old Wistar rats, which were then exposed to 8% O<sub>2</sub> during 120 minutes. After recovery, single doses of vehicle (0.5% DMSO in PBS/BSA; HI+VEH, n=10), WIN (0.1 mg/kg; HI+WIN, n=13), WIN+SR141716A (3mg/kg; HI+WIN+SR1, n=6) or WIN+SR144528 (2 mg/kg; HI+WIN+SR2, n=6) were administered subcutaneously. Control group had sham surgery with no hypoxia or treatment. To assess brain damage, magnetic resonance imaging (T2WI, DWI, ADC maps) was performed 24h, 72h and 7 days after hypoxia-ischemia (Biospec 47/40, 7 Tesla). Then, rats were perfused intracardiacally with 4% paraformaldehyde (in 0.1M PBS, pH 7.4) and brains were removed, postfixed and crioprotected for histopathological study of neurons (Nissl staining), astrocytes (GFAP immunofluorescence) and microglia (CD28 immunofluorescence).

**Results.** Hypoxia-ischemia led to an area of cytotoxic and vasogenic edema at P8 in HI+VEH, including ipsilateral parietotemporal cortex, hippocampus, thalamus and striatum, evolving to necrosis at P14. HI+WIN showed a similar damaged area to that of HI+VEH at P8, but the final necrotic area was reduced by 66%. In concordance with MRI, the histopathological study revealed a massive neuronal loss associated with gliosis in cortex and hippocampus in HI+VEH, which was prevented by WIN. The co-administration of SR141617 fully reversed the effect of WIN, both in MRI and histopathological study. The coadministration of SR14158, however, reversed the effects of WIN in cortex, but not in hippocampus.

**Conclusions:** 1) Both CB1 and CB2 receptors are involved in WIN-induced neuroprotection in the newborn rat model of HIE. 2) Activation of CB1 receptors mediates WIN neuroprotection in cortex and hippocampus, whereas activation of CB2 receptors is involved in WIN neuroprotection in cortex but not hippocampus. 3) These results support a role for CB2 receptors in cannabinoid neuroprotective effect, and suggest regional and/or functional differences between CB1 and CB2 receptors in newborn brain.

Supported by grants from Sociedad Española de Neonatología 2000, FIS-PI021540, Premio FHA-Fundación Mapfre Medicina 2005, SAF2006-01753, SAF 2004-00237, and SAF2005-05960.



## ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA DE UN EXTRACTO (LX-252) DERIVADO DE UNA VARIEDAD DE CANNABIS SATIVA CON BAJO CONTENIDO EN THC

G. Sánchez-Duffhues, F.J. Caballero, M. A. Calzado<sup>#</sup>, M.L. Schmitz<sup>#</sup>, G.P. Grassi<sup>†</sup>, L. Maxia<sup>\*</sup>, B. Fiebich<sup>\*\*</sup>, G. Appendino<sup>\*</sup> and E. Muñoz.

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba; <sup>#</sup> University of Giessen, Germany; <sup>\*</sup>Universidad de Novara, Italy; <sup>\*\*</sup>Universidad de Freiburg, Germany; and <sup>†</sup>ISCI, Rovigo, Italy.

El uso del Cannabis medicinal se remonta a miles de años y aunque muchas de sus aplicaciones terapéuticas son atribuidas a su principio psicoactivo  $\Delta$ -THC se conoce que esta planta contiene más de 60 cannabinoides y otros compuestos bioactivos no psicotrópicos que pueden ser relevantes para explicar y explotar las propiedades terapéuticas del Cannabis. En nuestro laboratorio hemos estudiado la actividad anti-inflamatoria de varios extractos obtenidos de diferentes variedades de *Cannabis sativa* seleccionadas por su bajo o nulo contenido en THC. De todos ellos el que mejor perfil dio en los cribados primarios fue el extracto LMX-252. El análisis fotoquímico de este extracto nos ha revelado el siguiente contenido mayoritario de compuestos conocidos: Cannabigerol, Cannabidiol, Cannabinochromene, Cannabispiranol, Canniprene, Canflavin A y algo de THC. También hemos detectado la presencia de la antraquinona denbinobin (1%), un compuesto bioactivo identificado por primera vez en la orquídea *Dendrobium moniliforme*.

El estudio del extracto LMX-252 sobre la señalización celular mostró una inhibición selectiva de la ruta canónica de NF- $\kappa$ B sin afectar la activación de las MAPKs (p38, ERK 1+2 y JNK) en diferentes tipos celulares. LMX-252 inhibió la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , la unión de NF- $\kappa$ B al ADN y actividad transcripcional de este factor en células Jurkat estimuladas con TNF $\alpha$ . El estudio de los componentes mayoritarios del extracto nos indicó que el denbinobin es posiblemente el compuesto responsable de la actividad inhibidora de LMX-252 sobre NF- $\kappa$ B (IC<sub>50</sub> de 0,75  $\mu$ M). Tanto el LMX-252 como el denbinobin fueron capaces de inhibir la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias en monocitos primarios.

Ya que la activación de NF- $\kappa$ B y las citoquinas IL-1 y TNF $\alpha$  están involucradas en distintas enfermedades inflamatorias nos propusimos estudiar el efecto “in vivo” del LMX-252 por vía oral en cuatro modelos murinos de inflamación; 1) Colitis inflamatoria inducida por DSS; 2) Artritis inducida por colágeno; 3) Shock séptico inducido por LPS; y 4) Inflamación de pata inducida por carragenina. Los resultados indican que el extracto es muy bien tolerado por vía oral y aunque los resultados han sido positivos en los cuatro modelos de inflamación hemos observado que el LMX-252 es especialmente activo en prevenir las lesiones macroscópicas y microscópicas en la enfermedad inflamatoria intestinal inducida por el sulfato de dextrano.

*Financiado parcialmente por la UE. CANNABIS- COOP-CT-2004-512696 (UE-VI-PM).*

## CANNABIS EXTRACTS LOW IN $\Delta^9$ -THC; OPTIMIZATION OF EXTRACTION PROCEDURES USING NMR SPECTROSCOPY

Politi M, Peschel W, Wilson N, Prieto JM, Heinrich M

Centre for Pharmacognosy and Phytotherapy, The School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London (UK), WC1N 1AX

As part of its sixth Framework Programme for Research and Technical Development (FP6), the EU currently funds a consortium of European Small and Medium-size Enterprises (SME's) and research organisations to develop standardised extracts of cannabis for the treatment of rheumatoid arthritis and migraine [1]. The total value of the project is Euros 1.4m and involves partners from five EU member states and Switzerland. The consortium has complementary expertise in the areas of pharmacognosy, molecular pharmacology, neurobiology, biochemistry and phyto-pharmaceuticals. The project will last two years (2005–2007) with the object of producing scientifically-validated extracts together with extract production methods and pharmaceutical formulations for the treatment of migraine and rheumatoid arthritis. It is the consortium's objective that the extracts it produces will be low in psychoactive constituents i.e.  $\Delta^9$ -THC. In order to obtain cannabis extract low in psychotropic  $\Delta^9$ -THC, we performed the hot water extraction of the aerial part of an indoor cultivated *Cannabis sativa* species. The lyophilised material from the water extract was fractionated by precipitation in methanol solution obtaining a precipitate and a soluble part. The latter was separated by size exclusion chromatography obtaining six major fractions. The crude extract and all the fractions were analysed by NMR spectroscopy and tested for the anti-inflammatory activity using cells assays to monitor the Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) inhibition. Moreover, cannabis tinctures (alcohol/water mixture used to extract the plant) [2] using different alcohol strength were prepared in our lab and analysed by NMR. Comparison of the spectra shows how the use of different amounts of alcohol to prepare the Cannabis tinctures affects the final metabolites content, and data of this ongoing study are presented.

*We thank the European Union (COOP-CT-2004-512696) for financial support.*

[1] <http://www.craft-cannabis.org>

[2] European Pharmacopoeia, 3<sup>rd</sup> edition, 1997, p. 1647

**EL DENBINOBIN AISLADO DEL CANNABIS SATIVA ES UN POTENTE  
INHIBIDOR DE LA REPLICACION DEL VIH-1 POR ACTUAR SOBRE LA RUTA  
DE NF- $\kappa$ B .**

G. Sánchez-Duffhues, F.J. Caballero, M. A. Calzado\*\*, L. Maxia\*, G. Appendino, Lienhard Schmitz\*\* y E. Muñoz.

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba;

\*Universidad de Novara, Italia; \*\* Universidad de Giessen, Alemania.

La planta *Cannabis sativa* se ha venido empleando como planta medicinal durante años. Más recientemente, el uso del *Cannabis* terapéutico se ha centrado en el tratamiento paliativo en enfermos de cáncer sometidos a quimio- y radioterapia, en enfermos de esclerosis múltiple y en pacientes de SIDA entre otros. Está ampliamente demostrado que el principio psicoactivo de esta planta, el  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), es el principal responsable de los efectos terapéuticos del *Cannabis* ya que activa los receptores de cannabinoides (CB1 y CB2). Sin embargo otros compuestos no psicoactivos presentes en la planta pueden también ejercer una importante actividad biológica. En este sentido hemos identificado por primera vez la presencia de la antraquinona debinobina en una variedad de *Cannabis sativa* con bajo contenido en THC, este compuesto tiene una potente actividad inhibitoria sobre la ruta de activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y ya que este factor es esencial en la replicación del VIH-1 hemos estudiado la capacidad de este compuesto sobre el ciclo replicativo del virus.

Nuestros resultados mostraron que este compuesto bloquea la replicación del virus HIV-1 pseudotipado con la envoltura del virus de estomatitis vesicular en células T Jurkat y en MT2. El estudio mecanismo de acción del denbinobin sobre el ciclo infeccioso demostró que este compuesto no inhibe la actividad de la transcriptasa inversa ni la integración del virus en el genoma de la célula huésped. Sin embargo, esta antraquinona inhibió la actividad transcripcional del virus inducida tanto por TNF $\alpha$ , PMA o AcMo anti- CD3/CD28 en un modelo celular de latencia viral. El denbinobin no afectó a la transcripción del HIV-1 inducida por la proteína viral Tat confirmando que realiza su efecto por actuar sobre dianas celulares. Nuestros resultados indican que el denbinobin inhibe la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  lo que implica que actúa sobre una kinasa por encima del nivel de fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ . Mediante experimentos de cotransfección con dominantes positivos de la ruta de NF- $\kappa$ B (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , MEK, NIK, TAB, TREF-2, y TBK1) hemos identificado que el denbinobin es potencialmente un inhibidor selectivo de la kinasa TAK1 que juega un papel relevante en la ruta canónica de activación de NF- $\kappa$ B.

Los resultados de nuestro grupo vienen a sumarse a los datos de muchos otros grupos de investigación que avalan el potencial terapéutico de los compuestos no psicoactivos presentes en una planta medicinal empleada durante milenios para el tratamiento de diferentes tipos de dolencias.

*Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto CANNABIS- COOP-CT-2004-512696 (UE-VI-PM).*

**FOLLOW UP STUDY OF PATIENTS WITH NEUROPATHIC PAIN, SPASTICITY  
SECONDARY TO MULTIPLE SCLEROSIS AND ANOREXIA CAQUEXIA  
SYNDROME TREATED WITH A WHOLE PLANT CANNABIS EXTRACT:  
PRELIMINARY RESULTS**

Marta Duran<sup>1,3</sup>, Sergio Abanades<sup>2,3</sup>, Dolors Capellà<sup>3</sup> and the SEGUIVEX study group<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Fundació Institut Català de Farmacologia.* <sup>2</sup>*Unitat de Farmacologia de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica.* <sup>3</sup>*Universitat Autònoma de Barcelona.* <sup>4</sup> 24 clinicians from 6 University Hospitals in Barcelona, 3 nurses, 6 Hospital Pharmacists and 71 community pharmacists.

Barcelona. Spain

**Introduction:** Cannabis based medicines have been evaluated for the treatment of pain and spasticity associated with multiple sclerosis (MS), chemotherapy-induced nausea and vomiting, appetite stimulation and analgesia. Recently, a cannabis extract (CE) has been approved in Canada as an adjunctive treatment for neuropathic pain in adults with MS. An observational follow up study of patients receiving CE as a foreign medication or as compassionate use is on-going in Catalonia. The results of the first 10 months of study are the object of this communication. **Objective:** The first aim of the study is to describe the clinical and epidemiological characteristics of patients receiving a self-administered CE oromucosal spray. As second aims effectiveness, toxicity, well being, dose used and patient and health care professional satisfaction will be assessed. **Methods:** The study is conducted in six University hospitals in Barcelona. A network of neurologists, anesthetists, oncologists, infectious disease specialists, hospital pharmacists and community pharmacists has been set-up. A specific training programme has been conducted for each group of health care professionals. Patients with MS, neuropathic pain and wasting syndrome not responding to the reference treatments are included by their hospital doctors who are in charge of the data collection regarding clinical follow-up and quality of life. The CE is dispensed by hospital pharmacists. Community pharmacists train the patients how to self-administer the CE. Data regarding dosage administration and side effects is collected in a patient diary and supervised by community pharmacists. The duration of the study is planned to be two years. **Results:** From January to October 2006, 126 patients had joined the compassionate use programme (46 with neuropathic pain, 33 with spasticity and MS, 18 with neurophatic pain due to MS and 29 with wasting syndrome). Mean age is 49 years old (25-80) and 51% are women. Thirty-six percent had used cannabis previously, most of them for therapeutic reasons. Most patients had a low score in the quality of life questionnaire and use more than three concomitant drugs for the same indication as the CE. Most patients (64%) continue on treatment and 36% have withdrawn due to lack of efficacy or to adverse effects. The most frequent adverse effects had been dry mouth, somnolence and dizziness. **Conclusions:** The initial experience with the clinical use of the CE suggest that this drug would be an adjuvant for patients not responding to standard treatments. The promotion of this project represents a rigorous approach to evaluate the effectiveness of a controversial drug through a collaborative multidisciplinary network at the various levels and settings of the health system.

**Acknowledgements:** *Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, Col·legi Oficial de Farmacèutics de Barcelona, Institut Municipal d'Investigació Mèdica and SEGUIVEX study Group.*

## CANNABIS Y DOLOR CRÓNICO: CONSIDERACIONES CLÍNICAS

J.L.R. Martín, E. Martín Sánchez

Área de Investigación Clínica

Fundación para la Investigación Sanitaria en Castilla la Mancha (FISCAM), Toledo.

### Objetivo:

Aportar evidencia científica sobre la eficacia y seguridad del empleo del cannabis o sus derivados en el tratamiento del dolor crónico asociado a cualquier patología, mediante la realización de una revisión sistemática de la literatura científica y meta-análisis de ensayos clínicos.

### Métodos:

Revisión de la literatura y localización de todos los ensayos clínicos aleatorizados, realizados a doble ciego sobre sujetos con dolor crónico en los que la intervención experimental fuera cannabinoides naturales o sintéticos solos o combinados, aplicados mediante cualquier forma farmacéutica y vía de administración, frente a intervenciones control constituidas por preparados placebo o cualquier intervención farmacológica o no, para el tratamiento del dolor. La eficacia analgésica del cannabis se ha evaluado mediante el estudio de la variable intensidad de dolor, medida a partir del cambio desde la línea de base (diferencia entre los niveles inicial y final de dolor). Para evaluar la seguridad, se ha calculado el riesgo relativo (RR) asociado al empleo del cannabis, a partir de los datos de eventos adversos experimentados por los sujetos de cada grupo.

### Resultados:

Se localizaron 82 estudios que potencialmente podían ser incluidos en esta revisión, de los cuales, finalmente sólo se incluyeron 13 (63 no cumplían los requisitos metodológicos, 6 eran estudios en curso). El análisis de eficacia frente a placebo mostró una diferencia de medias estandarizada de 2,04 (1,45-2,64);  $P < 0,00001$ , ( $n=6$  estudios) a favor del grupo experimental, sin encontrar heterogeneidad entre estudios ( $P=0,72$ ;  $I^2=0\%$ ). El análisis de seguridad mostró un RR en contra de la intervención con cannabis para todos los grupos de eventos estudiados experimentados de forma aguda (sistema gastro-intestinal y sistema nervioso central). Así, el RR encontrado para efectos derivados de alteraciones en la percepción es de 3,91 (2,38-6,41);  $P < 0,00001$ , lo que supone un número necesario a dañar (NNH) de 5 (4-6). Para alteraciones en la función motora, el RR es de 2,99 (1,94-4,61);  $P < 0,00001$ , con un NNH de 4 (3-5). Según estos datos, de cada cinco sujetos con dolor crónico tratados con cannabis, uno experimentará una alteración en la percepción, y del mismo modo, de cada cuatro sujetos, uno experimentará una alteración en la función motora, ambos a corto plazo.

### Discusión:

Los resultados obtenidos indican que el uso terapéutico de cannabis en sujetos con dolor crónico podría ser eficaz a corto plazo, aunque la decisión de emplearlo o no con tal fin debería ir precedida de una mayor evidencia, probablemente constituida por ensayos clínicos de mayor calidad, que determine si el cociente riesgo-beneficio generado por el empleo de tal sustancia beneficia a este grupo de pacientes.

Este estudio ha sido financiado parcialmente mediante la ayuda concedida por el Plan Nacional de Drogas (Ministerio de Sanidad y Consumo)

## CHANGES IN CB<sub>1</sub> CANNABINOID RECEPTOR IN POSTMORTEM PREFRONTAL CORTEX OF SCHIZOPHRENIC SUBJECTS

L. Urigüen<sup>1</sup>, R. Díez-Alarcia<sup>1</sup>, D. Arteta<sup>1</sup>, J.A. García-Sevilla<sup>2</sup>, L.F. Callado<sup>1</sup>, J.J. Meana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of the Basque Country, Leioa, Bizkaia, Spain and <sup>2</sup>Neuropharmacology Laboratory, IUNICS, University of the Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain.

Large body of evidence suggests a role of the endogenous cannabinoid system in the development and pathophysiology of schizophrenia.

The hypothesis that a dysfunction in endocannabinoid signalling may be involved in schizophrenia is supported by studies showing elevated endocannabinoid levels in plasma (Yao *et al.*, 2002; de Marchi *et al.*, 2003) and cerebrospinal fluid (Leweke *et al.*, 1999b; Giuffrida *et al.*, 2004) of schizophrenic subjects. Moreover, it has been reported that CB<sub>1</sub> receptor expression may change in different brain regions closely related to schizophrenia (Dean *et al.*, 2001; Zavitsanou *et al.*, 2004; Newell *et al.*, 2006).

Moreover, some studies indicate that clozapine, an atypical antipsychotic drug, may decrease the CB<sub>1</sub> receptor expression in rat brain (Sundram *et al.*, 2005). However, little is known about the role that endogenous cannabinoid system plays in the therapeutic efficacy of antipsychotic drugs.

The aim of this study was to evaluate the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor expression in post-mortem prefrontal cortex of schizophrenic suicidal drug-free and treated subjects.

For that purpose, gene expression studies and protein analyses were carried out in schizophrenic suicidal drug-free subjects (n=11), schizophrenic suicidal subjects treated with antipsychotics (n=11), non-schizophrenic suicidal subjects (n=11) and in sex, age and postmortem delay-matched controls (11).

Gene expression analyses were carried out using the Affymetrix® GeneChip® technology and synthesized cRNAs from total RNA isolated from tissue samples were used for the chips hybridization. Immunodetection of CB<sub>1</sub> protein was made in total homogenates of prefrontal cortex by western blot experiments using the rabbit polyclonal anti-human CB<sub>1</sub> (hCB1) isoform antibody, purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) as previously described by López de Jesús *et al.* (2006).

Gene expression results indicate that CB<sub>1</sub> gene is up-regulated (fold change=1,28; P-value=0,03) in drug-free schizophrenic subjects as well as in those treated with antipsychotic drugs (fold change=1,32; P-value=0,008) when comparing to their controls. The immunoreactivity of the CB<sub>1</sub> protein (60 kDa band) in drug-free schizophrenic subjects was increased when comparing to their controls, although it was not statistically significant. On the contrary, CB<sub>1</sub> protein expression was significantly decreased in schizophrenic suicidal subjects treated with antipsychotics ( $\Delta$ = -32.64%; SEM=14.40; p<0.05) while no changes were observed in non-schizophrenic suicidal subjects.

Taken together, data suggest not only that CB<sub>1</sub> receptor is involved in schizophrenia but also that antipsychotic treatment is able to modulate the endocannabinoid system in schizophrenic subjects.

Supported by FIS 03/0498 to L.F. Callado and FIS 04/0190 to J.J. Meana

## REGULACION DEL ESTADO CONSTITUTIVO DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB<sub>1</sub> TRAS TRATAMIENTO CRÓNICO CON FLUOXETINA

E.M. Valdizán, S. Mato, y A. Pazos.

Universidad de Cantabria, Facultad de Medicina. C/ Cardenal Herrera Oria, 39011, Santander.

La depresión mayor es la enfermedad neuropsiquiátrica más frecuentemente diagnosticada en los países desarrollados, con una perspectiva claramente creciente en cuanto a incidencia futura. En cuanto a sus bases patogénicas, las hipótesis más clásicas contemplan que los trastornos depresivos se asocian a un déficit en la neurotransmisión monoaminérgica cerebral. De hecho, la terapia antidepresiva actual se basa en fármacos que inhiben la recaptación de aminas, serotonina (5-HT) y/o noradrenalina (NA), y los estudios tras tratamiento crónico con dichos fármacos en el animal de experimentación indican que dan lugar a cambios regulatorios en las propiedades de los receptores para 5-HT y NA. El papel que el sistema cannabinoide endógeno juega como modulador de la actividad de los distintos sistemas de neurotransmisión aminérgicas es bien conocido. Recientemente se han presentado evidencias de que las propiedades de los receptores CB<sub>1</sub> se encuentran modificadas en muestras cerebrales *postmortem* de sujetos deprimidos, y que estas modificaciones parecen depender del cumplimiento de un tratamiento antidepresivo. Algunos datos también sugieren que la manipulación del sistema endocannabinoide podría ser de utilidad en el tratamiento de la depresión.

Por otra parte, el fenómeno de la actividad constitutiva de receptores y la posibilidad de utilizarlo desde el punto de vista terapéutico está adquiriendo una relevancia creciente. En ese sentido, la existencia de fenómenos de agonismo inverso y actividad constitutiva dentro del sistema cannabinoide está bien documentada.

En un estudio previo nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina incrementa la respuesta efectora al estímulo CB<sub>1</sub> en cerebro de rata. En el presente estudio se ha analizado la posible modificación inducida por antidepresivos sobre la respuesta de agonismo inverso mediada por SR141716A. Para ello se ha cuantificado la estimulación de la actividad de adenililciclase inducida por SR141716A en corteza cerebral de rata después del tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg día, 14 días). A partir de estos ensayos se ha observado que este tratamiento provoca una hipersensibilidad de la respuesta (estimuladora) inversa mediada por SR141716A sobre la producción de AMP cíclico (%Emax 35,2±3,9 en el grupo control vs %59,0±7,6 en el grupo tratado, p<0,05). Además se observó una correlación significativa entre los valores individuales de Emax en esta ensayo y aquellos previamente obtenidos en la respuesta de inhibición de adenililciclase mediada por el agonista positivo WIN55,212-2 (r 0,94, p<0,05). En conjunto, estos resultados refuerzan el papel de los receptores CB<sub>1</sub> en las respuestas terapéuticas de los antidepresivos.

Proyecto financiado por CICYT (SAF04-00941) y Plan Nacional sobre Drogas

## **MECHANISM INVOLVED IN THE DEPRESSIVE-LIKE PHENOTYPE OF CB1 KNOCKOUT MICE**

E. Aso, A. Ozaita, R. Maldonado, O. Valverde

Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut,  
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Lack of CB1 receptor induces a depressive-like phenotype in mice revealed by an anhedonic state, high anxiety levels and increased susceptibility to stress. The aim of the present study was to investigate the mechanism involved in the manifestation of this depressive-like phenotype. The analysis of BDNF neurotrophic factor levels in brain areas directly related to depression, such as the hippocampus and frontal cortex, showed that CB1 knockout mice have a deficiency of BDNF at basal levels in the hippocampus and in both brain areas after stress. This BDNF impairment has been also described in other animal models of depression and in depressed patients. Direct administration of BDNF in the hippocampus of CB1 knockout completely reversed the depressive-like phenotype exhibited in the tail suspension test, revealing the crucial role of this neurotrophic factor in the depressive-like manifestations of these mutant mice. BDNF modulates neuron plasticity and survival activating different signalling pathways that include the reduction of the activity of the GSK3 kinase by phosphorylation. GSK3 activity regulates apoptosis and has been related to depression since an increased GSK3 activity has been reported in the frontal cortex of depressed patients and antidepressant treatment inhibits GSK3 activity. In CB1 knockout mice, GSK3 expression was significantly increased in response to a repeated stress in hippocampus and frontal cortex. A similar increase was also observed in the hippocampus in basal conditions. Therefore, we observed a parallelism between the increased expression of GSK3 and the decreased BDNF levels, suggesting that these mechanisms could be directly related to the depressive-like phenotype exhibited by CB1 knockout mice.



## SUBCHRONIC CANNABINOID AGONIST (WIN 55,212-2) TREATMENT DURING COCAINE ABSTINENCE ALTERS SUBSEQUENT COCAINE SEEKING BEHAVIOR

Gustavo González-Cuevas<sup>1</sup>, Harinder Aujla<sup>2</sup>, Rémi Martin-Fardon<sup>2</sup>, José Antonio López-Moreno<sup>1</sup>, Miguel Navarro<sup>1,3</sup>, Friedbert Weiss<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Psicobiología. Universidad Complutense de Madrid. Madrid (Spain)

<sup>2</sup>Molecular and Integrative Neurosciences Department (MIND). The Scripps Research Institute. La Jolla, California (USA)

<sup>3</sup>Both authors contributed equally to this work.

The co-abuse of marijuana with cocaine is wide-spread, but it has not been until recently that the relationship between the behavioral effects of cannabinoids and cocaine has begun to be unveiled in animal models. Male Wistar rats were trained to intravenously self-administer cocaine until a stable baseline was reached. Rats then were subjected to a 5-day cocaine deprivation period during which they were treated daily with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 (R-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate) (0, 0.3, 1 and 3 mg/kg; i.p.). Following this subchronic treatment, rats were tested, in counterbalanced order, in a test of anxiety (elevated plus-maze), as well as extinction and cue-induced reinstatement tests, the latter conducted according to a between-within procedure. Subchronic administration of WIN 55,212-2 was found to produce dose-dependent alterations of performance in the extinction, reinstatement, and anxiety tests with the lowest dose of WIN 55,212-2 producing the highest resistance to extinction and reinstatement, and the highest dose of WIN 55,212-2 producing the highest anxiolytic activity. Subchronic treatment with WIN 55,212-2 in rats without a history of cocaine self-administration did not affect anxiety levels. The results suggest an important role of the cannabinoid system in neuronal processes underlying cocaine seeking behavior. However, further studies will be necessary to understand possible implications of these findings for a role of the cannabinoid system as a treatment target for human cocaine abuse.

## LA EXPOSICIÓN A UN AGONISTA CANNABINOIDE EN LA ADOLESCENCIA COMO PUERTA DE ENTRADA A LA ADICCIÓN A LA COCAÍNA EN EDAD ADULTA: HALLAZGOS CONDUCTUALES Y METABÓLICOS

A. Higuera-Matas (1), M. Soto-Montenegro(2), N. del Olmo(1), M. Miguéis(1), J.J. Vaquero(2), C. García-Lecumberri(1), J. Sánchez(2), G. Montoya(1,2), M. Desco(2) y E. Ambrosio(1)

1 Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología. UNED. 28040 Madrid

2 Laboratorio de Imagen Médica. Unidad de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital Gregorio Marañón.

Datos epidemiológicos muestran de manera consistente un efecto de vulnerabilidad al consumo adulto de cocaína en individuos expuestos en la adolescencia al cannabis. Sin embargo los estudios en humanos pueden estar afectados por variables socio-económicas y educativas. Por lo tanto el uso de modelos animales es fundamental para validar esta "Teoría de la Puerta de Entrada". Con este fin, inyectamos un agonista no selectivo de los receptores de cannabinoides -CP 55,940- (CP) a una dosis de 0,4 mg/kg a ratas hembra y macho de la raza Wistar, desde el día postnatal 28 hasta el 38, que equivale al período peripuberal humano. Cuando llegaron a la edad adulta (P100) se les sometió a un protocolo de autoadministración de cocaína (1mg/kg) en dos fases (adquisición y mantenimiento). Las hembras tratadas con el agonista cannabinoide se autoadministraron un mayor número de inyecciones en la fase de adquisición. Con el fin de probar la especificidad de este efecto, en un grupo paralelo de animales, tratados de manera idéntica con el agonista cannabinoide, realizamos un estudio de conducta operante reforzada con comida. No obtuvimos diferencias significativas entre ninguno de los grupos confirmando nuestra hipótesis de que la vulnerabilidad observada se relacionaba específicamente con las drogas de abuso-cocaína en este caso-, y no con cualquier reforzador natural. Con el fin de conocer los posibles sustratos neurales de esta vulnerabilidad al consumo de psicoestimulantes inducido por el tratamiento crónico con CP en edad adolescente, en un tercer grupo de animales sometidos al mismo régimen de tratamiento farmacológico, realizamos un estudio de neuroimagen funcional durante la edad adulta, mediante tomografía por emisión de positrones (TEP). Encontramos que las hembras tratadas mostraban una hiperactivación en el córtex frontal así como una hipoactivación en la corteza amígdalo-entorrinal.

Nuestros datos conductuales parecen confirmar el papel del cannabis consumido durante la adolescencia como factor de predisposición a la adicción a cocaína en edad adulta y además describimos algunos cambios en el metabolismo cerebral provocados por el tratamiento que podrían explicar, al menos en parte, el efecto encontrado.

**EL BLOQUEO LOCAL CB1 EN EL NÚCLEO ACCUMBENS ANULA LA SENSIBILIZACIÓN Y RECOMPENSA A LA COCAÍNA, AFECTANDO A MARCADORES BIOQUÍMICOS EN EL ACCUMBENS PERO TAMBIÉN EN CORTEZA PREFRONTAL Y ESTRIADO DORSAL**

S. Ramiro-Fuentes, J.A. Flores, B. Galán-Rodríguez, E. Fernández-Espejo  
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, 41009 Sevilla.

La administración repetida de cocaína induce sensibilización motora en ratas, aparte de sus efectos reforzadores de recompensa. A nivel del núcleo accumbens, la cocaína induce un aumento de la liberación de glutamato por medio del bloqueo de la liberación de cannabinoides endógenos. Por tanto, los cannabinoides endógenos se relacionan con la acción de la cocaína a nivel del núcleo accumbens, y el objetivo fue discernir si el bloqueo local de receptores CB1 en el núcleo accumbens afecta a la sensibilización y recompensa a la cocaína, y cuáles son sus efectos bioquímicos en áreas del circuito mesolímbico y nigroestriatal.

Para la sensibilización se empleó un tratamiento repetido de cocaína (0, 2 y 10 mg/kg IP diaria) durante tres días (fase de inducción) y luego el día 8 (fase de expresión), y la actividad locomotora se midió durante 2 h tras la cocaína. El antagonista CB1 SR141716A se inyectó bilateralmente en el accumbens mediante cánulas (0, 0,5 y 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 0,5  $\mu\text{L}$ ) antes de las dosis de cocaína bien en la fase de inducción o en la de expresión. Los datos indicaron que la sensibilización se bloqueaba sólo si se inyectaba el SR141716A en la fase de expresión, siendo el efecto dependiente de dosis. A nivel bioquímico, se observó mediante western blotting que la cocaína regulaba al alza la proteína-quinasa A (PKA) en el núcleo accumbens, y que dicho efecto era bloqueado por el antagonista CB1, lo que podría explicar sus efectos motores. De modo interesante se observaron también efectos bioquímicos reactivos en otras áreas como la corteza prefrontal (CPF) y el estriado dorsal. Así el SR141716A intraaccumbens regulaba a la baja la expresión de marcadores como delta-Fos-beta en estriado dorsal y CPF, y de tirosina-hidroxilasa en estriado dorsal.

Respecto a la recompensa, se evaluó mediante la preferencia de lugar con tres compartimentos, utilizando dosis de cocaína de 0, 2 y 10 mg/kg e inyectando el antagonista CB1 5 min antes de que la rata se colocara en cada compartimento. Los resultados indicaron que el SR141716A bloqueaba la recompensa a cocaína 10 mg/kg, e incluso inducía aversión de un modo dependiente de dosis ( $p < 0.05$ ). A una dosis de cocaína no reforzadora (2 mg/kg), el SR141716A también indujo aversión a la máxima dosis. Tras los experimentos se comprobó la localización de las cánulas en el núcleo accumbens shell mediante histología.

En resumen, el antagonismo CB1 en el núcleo accumbens es capaz de bloquear la sensibilización a cocaína en su fase de expresión, a través de una inhibición de la regulación al alza de PKA; y también bloquea la recompensa a la cocaína induciendo aversión a la droga. Es también novedoso que se observaron cambios bioquímicos reactivos en otras áreas del circuito mesolímbico y nigroestriatal, lo que indica que el bloqueo de receptores CB1 en el núcleo accumbens afecta indirectamente a regiones como la corteza prefrontal y el estriado dorsal.

*Financiado por Red de trastornos adictivos (Instituto Carlos III, G03/05), Plan Andaluz de Investigación (CVII27), y Plan Nacional sobre Drogas (3SI/05/14).*

**RIMONABANT PREVENTS THE NICOTINE-INDUCED RELAPSE TO ALCOHOL**

J.A. López-Moreno, G. González-Cuevas, G. Moreno Sanz, F. Alen, R. Gómez, I. Crespo, M. Navarro

Laboratorio de Psicobiología de la Universidad Complutense, 28223 - Madrid

Nicotine and alcohol are the two legal drugs most widely co-abused. Preclinical and clinical research shows that the cannabinoid brain receptor type 1 (CB<sub>1</sub>), modulates alcohol- and nicotine-related behaviors. In this study, male Wistar rats with an extended background of operant alcohol (10 % w/v) self-administration were used. Additional groups responding to a natural reinforcer (sucrose at 0.25 % and 5 % w/v) were added. The relapse to alcohol was evaluated in two situations: a) after a period of only forced abstinence, where a temporal increase in responding for alcohol limited to one/two days (Alcohol Deprivation Effect) was observed; and b) after a period of abstinence but with nicotine treatment (0.8 mg/kg s.c.). Throughout the nicotine-induced relapse to alcohol, the rats were pre-treated for 10 days with the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor antagonist rimonabant (0, 0.03, 0.3 and 3.0 mg/kg i.p.). In this condition a long-lasting nicotine-induced relapse to alcohol was observed, this effect being dose-dependently reversed with rimonabant. Surprisingly, rats that were not exposed to nicotine developed tolerance to the effects of rimonabant from the sixth day. In addition, 3.0 mg/kg of rimonabant was able to reduce the responding for sucrose. In contrast, nicotine did not alter this response, either with 0.25% or 5% w/v solution. Evaluation in the Elevated Plus-Maze at the end of nicotine treatment did not reveal anxiogenic effects. Finally, at the cease of rimonabant treatment, a rapid reinstatement in the alcohol consumption was detected. These results suggest that rimonabant can prevent the relapse to alcohol even when an interaction with nicotine exists, which is the most frequent situation in human drug abuse.