

**3ª REUNION NACIONAL  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACION  
SOBRE CANNABINOIDES**



**FUNDACION HOSPITAL CARLOS HAYA  
(Málaga)  
15-16 de Noviembre de 2002**

# 3ª Reunión Nacional

## Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides

### Málaga, 15 y 16 de Noviembre de 2002

---

### Programa científico de la reunión

#### Día 15 de Noviembre

(sesiones en el Ilustre Colegio de Médicos de Málaga -Sala Barahona- c/Curtidores nº 1, 29006-Málaga)

#### 16:00 Inauguración

- Francisco José Juan Ruiz, Presidente del Patronato de la Fundación Hospital Carlos Haya
- Fernando Rodríguez de Fonseca, Director de Investigación de la Fundación Hospital Carlos Haya
- José Antonio Ramos Atance, Presidente de la SEIC

#### 16:30 Conferencia Invitada (presentada por Fernando Rodríguez de Fonseca)

REWARDING PROPERTIES OF CANNABINOIDS AND THEIR INTERACTIONS WITH OPIOIDS

Walter Fratta, Department of Neuroscience, University of Cagliari, Italy

#### 17:30 Pausa (café)

#### 18:00 1ª Sesión de comunicaciones orales (moderadores: Inés Díaz-Laviada e María Luz López Rodríguez)

##### 18:00 O-1.1

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS INHIBIDORES DEL TRANSPORTADOR DE ENDOCANNABINOIDES

María L. López-Rodríguez, Alma Viso, Silvia Ortega-Gutiérrez, Christopher J. Fowler, Gunnar Tiger, Eva de Lago, J. J. Fernández-Ruiz, J. Antonio Ramos

18:15 O-1.2

CARACTERIZACION DE UN TRANSPORTE ESPECIFICO PARA ANANDAMIDA EN CÉLULAS TUMORALES PROSTÁTICAS PC-3.

L. Ruiz-Llorente, S. Ortega, M.G. Sánchez, A. Viso, M.L. López-Rodríguez, J.A. Ramos, I. Díaz-Laviada.

18:30 O-1.3

POTENCIACION POR EL INHIBIDOR DE LA RECAPTACION DE ENDOCANNABINOIDES, UCM707, DE LA ACCION HIPOQUINETICA Y ANALGESICA DE LA ANANDAMIDA

Eva de Lago, Javier Fernández-Ruiz, Silvia Ortega-Gutiérrez, Alma Viso, María Luz López-Rodríguez, José A. Ramos

18:45 O-1.4

INHIBICIÓN DE LA FIJACIÓN BASAL DE [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S EJERCIDA POR EL "AGONISTA INVERSO" DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB<sub>1</sub> SR141716A EN CEREBRO HUMANO POSTMORTEM.

Lorena Hernández-García, J. Javier Meana y Rafael Rodríguez-Puertas.

19:00 O-1.5

LA ANANDAMIDA INHIBE LA NEUROGÉNESIS A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA VÍA ERK

D. Rueda, B. Navarro, T. Aguado, A. Martínez-Serrano, M. Guzmán, I. Galve-Roperh

19:15 O-1.6

ACTIVACIÓN DE LA CASCADA DE PI3K POR CANNABINOIDES EN CÉLULAS TUMORALES DE PRÓSTATA.

M.G. Sánchez, L. Ruiz-Llorente, I. Díaz-Laviada.

19:30 O-1.7

LOS CANNABINOIDES PROTEGEN A LOS ASTROCITOS DE APOPTOSIS VÍA PI3K/PKB

T. Gómez del Pulgar, M. L. de Ceballos, A. Carracedo, M. Guzmán, G. Velasco

19:45 Discusión General

21:00      **Cena**

**Día 16 de Noviembre**

(sesiones en el Hotel NH Málaga, Avda. del Río Guadalmedina s/n, 29007-Málaga)

**9:00 2ª Sesión de comunicaciones orales** (moderadores: Paz Viveros e Ismael Galve-Roperh)

9:00 O-2.1

REFLEXIONES SOBRE EL PAPEL DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN EL DESARROLLO DEL CEREBRO: DESDE LAS EVIDENCIAS A LAS NUEVAS PROPUESTAS

María Gómez, Mariluz Hernández, José Antonio Ramos, Javier Fernández-Ruiz

9:15 O-2.2

LA HIPERFAGIA INDUCIDA POR CANNABINOIDES SE PRODUCE A TRAVÉS DE UN MECANISMO PERIFÉRICO

Raquel Gómez, Miguel Navarro, Belén Ferrer, José M. Trigo, Ainhoa Bilbao, Ignacio Del Arco, Andrea Cippitelli, Felice Nava, Daniele Piomelli y Fernando Rodríguez de Fonseca

9:30 O-2.3

PAPEL DEL SISTEMA OPIOIDE EN LOS EFECTOS ANSIOLÍTICOS INDUCIDOS POR EL  $\Delta^9$ -TETRAHIDROCANNABINOL

F. Berrendero, R. Maldonado

9:45 O-2.4

ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES ENTRE LOS SISTEMAS OPIOIDE Y CANNABINOIDE EN LA MODULACIÓN DE RESPUESTAS DE ANSIEDAD Y ACTIVIDAD ADRENOCORTICAL

J. M. Biscaia, S. Marín, E. Marco, B. Fernández, M. Rubio, C. Guaza, H. Schmidhammer, M. P. Viveros

10:00 O-2.5

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO Y LA NICOTINA DESDE UNA PERSPECTIVA COMPORTAMENTAL

A. Castañé, E. Valjent, C. Ledent, M. Parmentier, R. Maldonado, O. Valverde

10:15 O-2.6

EFFECTOS AGUDOS DEL ETANOL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANANDAMIDA EN EL CEREBRO DE LA RATA

B. Ferrer, A. Bilbao, A. Serrano, I. Del Arco, D. Piomelli, M. Navarro, F. Rodríguez de Fonseca.

10:30 O-2.7

REDUCCIÓN DEL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A LOS CANNABINOIDES EN RATONES DOBLE MUTANTES DE LOS RECEPTORES OPIOIDES MU Y DELTA.

Patricia Robledo, Anna Castañé, Brigitte L. Kieffer y Rafael Maldonado.

10:45 Discusión General

**11:00 Pausa (café)**

**11:30 Visita a la zona de paneles**

P-1 ACCIONES ANTI-INFLAMATORIAS DE CANNABINOIDES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

L. Mestre Nieto, A. Arévalo-Martín, E. Molina-Holgado, JM Vela, E.M. Romero J. Borrell y C. Guaza

P-2 EFICACIA DE LOS CANNABINOIDES EN EL TRATAMIENTO DEL DOLOR ONCOLÓGICO

M Duran, D Capellà, JR Laporte.

P-3 EFECTOS DEL INHIBIDOR DE LA RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA, AM 404, EN LA AUTOADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE MORFINA EN RATAS WISTAR

J.M. Trigo-Díaz, J.A. López-Moreno, F. Rodríguez de Fonseca, M. Navarro.

P-4 EFECTOS LOCALES DEL ANTAGONISTA CANNABINOIDE SR141716A EN LOS GANGLIOS BASALES EN RATAS PARKINSONIANAS

Fadwa El Banoua, Isabel Caraballo, Juan A. Flores, Beatriz Galán, Emilio Fernández Espejo

P-5 MECANISMO DE INHIBICION DE NF- $\kappa$ B POR EL ENDOCANNABINOIDE ANANDAMIDA

Rocío Sancho, Marco A. Calzado, Giovanni Appendino y Eduardo Muñoz

- P-6 EFECTO DE LA ANANDAMIDA EN AORTA DE RATA  
V. López-Miranda, C. Goicoechea, D. Pascual, M.I. Martín
- P-7 EDAD Y POBLACIÓN DE RECEPTORES CB1 DE PLEXO MIENTÉRICO DE ÍLEON DE COBAYO. RESULTADOS PRELIMINARES.  
R. Abalo, A., Rivera, M.I. Martín, E. García-Poblete, H. Fernández, E. Moro.
- P-8 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA *IN VIVO* DE UN NUEVO ANTAGONISTA CANNABINOIDE  
M. Suardíaz, D. Pascual, L. Hernández-Folgado, N. Jagerovich, P. Goya, M. Martín.
- P-9 CONDUCTA DE AUTOADMINISTRACION DE MORFINA Y ACTIVIDAD DOPAMINERGICA MESOLIMBICA EN RATAS ADULTAS EXPUESTAS PERINATALMENTE A  $\Delta^9$ -TETRAHIDROCANNABINOL  
Begoña González, Rosario de Miguel, Sonsoles Martín, Onintza Sagredo, Julián Romero, Carmen García-Lecumberri, Javier Fernández-Ruiz, José Antonio Ramos, Emilio Ambrosio
- P-10 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS CAMBIOS QUE LA EXPOSICION PROLONGADA A DIVERSAS DROGAS DE ABUSO PRODUCE SOBRE LA ACTIVIDAD ENDOCANNABINOIDE EN ESTRUCTURAS DEL SISTEMA LIMBICO  
Sara González, Javier Fernández-Ruiz, Maribel Cebeira, José Antonio Ramos
- P-11 LA VARIANTE Faah<sup>Thr129</sup> NO ES UN FACTOR DE VULNERABILIDAD AL ALCOHOLISMO EN PACIENTES ESPAÑOLES  
I. Ampuero, G. Ponce, G. Rubio, M.A. Jiménez, T. Palomo, J. Ramos, J. Hoenicka.
- P-12 MECANISMO DE LA INHIBICION DE LA LIBERACION DE GLUTAMATO POR AGONISTAS DE RECEPTORES DE CANNABINOIDES  
M.C. Godino y J. Sánchez-Prieto

**13:00**      **Comida**

**15:00**      **3ª Sesión de comunicaciones orales** (moderadores: Pilar Goya e Ignacio del Arco)

15:00 O-3.1

ESTADO DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES EN LA CORTEZA FRONTAL DE RATAS CRÓNICAMENTE TRATADAS CON FLUOXETINA

S. Mato, E.M. Valdizán y A. Pazos.

15:15 O-3.2

CONSUMO DE CANNABIS Y VULNERABILIDAD A LA PSICOSIS: el caso de tres parejas de hermanos.

Luis Núñez Domínguez

15:30 O-3.3

PAPEL DE LA ACTIVACION GLIAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON. EFECTO NEUROPROTECTOR DEL AGONISTA CANNABINOIDE HU-210

Isabel Lastres Becker, Francisco Molina-Holgado, Robin J.M. Franklin, José Antonio Ramos, Javier Fernández-Ruiz,

15:45 O-3.4

LOS ANTAGONISTAS CANNABINOIDES CB1 EJERCEN EFECTO ANTIPARKINSONIANO TRAS DEGENERACIÓN EXTENSA DE LA SUSTANCIA NEGRA EN RATAS

Emilio Fernández Espejo, Isabel Caraballo, Fadwa El Banoua, Juan A. Flores, Beatriz Galán.

16:00 O-3.5

ALTERACIONES DE LA ACTIVIDAD ENDOCANNABINOIDE EN EL CUERPO ESTRIADO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSIS MULTIPLE EN RATAS

Ana Cabranes, Katerina Venderova, Filomena Fezza, Antonio Sánchez, Antonio García-Merino, José Antonio Ramos, Vincenzo Di Marzo, Javier Fernández-Ruiz

16:15 O-3.6

CANNABINOIDES Y OLIGODENDROCITOS: IMPLICACIÓN EN PROCESOS DE REMIELINIZACIÓN

E. Molina-Holgado, A. Arévalo-Martín, J.M. Vela, F. Molina-Holgado, G. Almazán y J. Borrell y C. Guaza.

16:30 O-3.7

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES CB1 Y CB2 Y LA AMIDO HIDROLASA DE ÁCIDOS GRASOS EN MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Julián Romero, Rosa M. Tolón, Cristina Benito, Estefanía Núñez, Cecilia J. Hillard, Alberto Rábano.

16:45 O-3.8

UTILIDAD DE LOS BLOQUEANTES DE RECAPTACION DE ANANDAMIDA EN EL TRATAMIENTO DE PATOLOGIAS NEUROPSIQUIATRICAS: ESTUDIOS EN MODELOS DE ESQUIZOFRENIA

A. Bilbao, B. Ferrer, I. del Arco, M.A. Gorriti, M. Navarro, F. Rodríguez de Fonseca

17:00 O-3.9

LOS CANNABINOIDES INHIBEN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL

C. Blázquez, M.L. Casanova, A. Planas, T. Gómez del Pulgar, C. Villanueva, M.J. Fernández-Aceñero, J. Aragonés, J.W. Huffman, J.L. Jorcano, M. Guzmán

17:15 *Discusión General*

**17:30**      **Pausa (café)**

**18:00**      **Asamblea de la SEIC**

**19:00**      **Clausura**



**REWARDING PROPERTIES OF CANNABINOIDS AND THEIR INTERACTIONS WITH OPIOIDS**

Walter Fratta

Department of Neuroscience, University of Cagliari, Italy

Despite the fact that cannabis is one of the oldest abused drugs and still represents the most widely used illicit recreational drug it has been difficult for a long time to demonstrate cannabis rewarding effects in laboratory animals. Apparently this could be considered as a problem of scarce interest, since the history of cannabis abuse represents by itself the best and unequivocal evidence of cannabis reinforcing properties. However the possibility to use reliable animal models is of fundamental importance in the study of neurobiology and pharmacology of cannabis. Currently, different laboratories, including ours, have developed reliable animal models for studying cannabinoid rewarding effects. By means of these models it has been possible to demonstrate that cannabinoids act in a way qualitatively similar to other drugs abused by humans. Furthermore, it has been possible to demonstrate an important, specific functional interaction between cannabinoid and opioid systems. Thus, results of several independent studies suggest that cannabinoid system plays an important role for the expression of opioid rewarding effects and viceversa. From a neurobiological, pharmacological and clinical point of view such interactions might be of great relevance. Finally a major clinical concern is represented by relapse to drug seeking. Studies in progress in our laboratory indicate that cannabinoid system is also involved in the mechanisms of relapse to opioid seeking. Theoretically, this aspect could be of great interest for possible clinical developments in preventing opioid relapse.

## O-1.1

## DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS INHIBIDORES DEL TRANSPORTADOR DE ENDOCANNABINOIDES

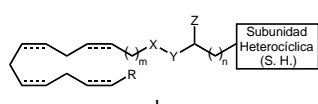
María L. López-Rodríguez,<sup>a</sup> Alma Viso,<sup>a</sup> Silvia Ortega-Gutiérrez,<sup>a</sup> Christopher J. Fowler,<sup>b</sup> Gunnar Tiger,<sup>b</sup> Eva de Lago,<sup>c</sup> J. J. Fernández-Ruiz,<sup>c</sup> J. Antonio Ramos<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas y <sup>c</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, E-28040 Madrid. <sup>b</sup>Dpt. of Pharmacology and Clinical Neuroscience, Umeå University, Sweden

Entre los elementos que constituyen el sistema cannabinoide endógeno (SCE), el transportador de endocannabinoides (ANT) constituye actualmente un foco de creciente atención debido a la prometedora aplicabilidad terapéutica de fármacos que bloqueen selectivamente su acción. Estos compuestos destacan tanto por sus efectos antinociceptivos como por su potencial capacidad para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas entre las que se destacan la esclerosis múltiple o el corea de Huntington.<sup>1</sup>

Así, en nuestro grupo de investigación y con el fin de obtener nuevos inhibidores del ANT con utilidad farmacológica, hemos llevado a cabo el diseño y síntesis de una nueva serie<sup>2</sup> compuesta por más de treinta derivados de ácido araquidónico de estructura general **I**. Se ha determinado la capacidad de estos compuestos para inhibir la recaptación de anandamida así como su afinidad tanto por el resto de elementos del SCE (receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> y enzima amido hidrolasa de ácidos grasos -FAAH-) como por los receptores de vanilloides VR<sub>1</sub>. La mayoría de los compuestos sintetizados exhiben una elevada afinidad por el transportador de anandamida resultando además inactivos en el resto de las dianas analizadas. La tabla recoge alguno de los resultados más representativos.

Este estudio está permitiendo profundizar en el conocimiento de los principales requerimientos estructurales implicados en el reconocimiento de sustratos por el transportador de endocannabinoides. Entre todos los compuestos sintetizados destaca especialmente el **UCM707**, el inhibidor más potente descrito hasta la fecha, cuyo prometedor perfil *in vitro* está siendo actualmente confirmado por los recientes resultados obtenidos *in vivo* que muestran su capacidad para potenciar los efectos de antinocicepción e hipolocomoción inducidos por una dosis subefectiva de anandamida.<sup>3</sup>



m = 3, 4; n = 0, 1  
X = CO, CH<sub>2</sub>; Y = O, S, N-Z; Z = H, CH<sub>3</sub>  
R = H, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>

Comp.	S. H.	m	n	X	Y	Z	R	CI <sub>50</sub> (μM)		K <sub>i</sub> (nM)		
								ANT	FAAH	CB <sub>1</sub>	CB <sub>2</sub>	VR <sub>1</sub>
<b>UCM312</b> Δ <sup>5,8,11,14</sup>		3	0	CO	O	H	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	3±2	84	>5000	>5000	>5000
<b>UCM707</b> Δ <sup>5,8,11,14</sup>		3	0	CO	NH	H	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	0,8±0,4	30	4700±80	67±6	>5000
<b>UCM119</b> Δ <sup>9,12</sup>		4	0	CO	NH	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,4±0,7	8,9	>5000	>1000	a

<sup>a</sup>Este compuesto muestra una cierta capacidad para desplazar [<sup>3</sup>H]-RTX (K<sub>i</sub>(VR<sub>1</sub>) < 5000 nM)

Todos estos datos hacen del **UCM707** un prometedor candidato como agente terapéutico para el tratamiento de graves patologías para las cuales no existen aún terapias médicas satisfactorias.

[1] Pertwee, R. G. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1513. [2](a) López-Rodríguez, M. L. *et al.* PCT/ES01/00305 (WO 02/12167 A1), **2001**. (b) López-Rodríguez, M. L. *et al.* *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4505. [3] De Lago, E. *et al.* *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *449*, 99.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BQU 2001-1459).

**O-1.2****CARACTERIZACION DE UN TRANSPORTE ESPECIFICO PARA ANANDAMIDA EN CÉLULAS TUMORALES PROSTÁTICAS PC-3.**

L. Ruiz-Llorente\*, S. Ortega $\chi$ , M.G. Sánchez\*, A. Viso $\chi$ , M.L. López- Rodríguez $\chi$ , J.A. Ramos}, I. Díaz-Laviada\*.

\*Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Madrid.

$\chi$ Dpto. Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, Madrid.

}Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

Al igual que otras moléculas endógenas con función neuromoduladora, los endocannabinoides tienen un sistema específico encargado de su inactivación que incluye un proceso de recaptación mediado por un transportador de membrana y una posterior hidrólisis catalizada por la enzima intracelular amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*).

Los primeros estudios acerca del transportador fueron llevados a cabo en neuronas y astrocitos y revelaron que se trataba de un transporte rápido, saturable, específico, dependiente de la temperatura e independiente de iones  $\text{Na}^+$  y de ATP (Beltramo et al., 1997; Hillard et al., 1997). Posteriormente, el transportador de endocannabinoides ha sido estudiado y caracterizado en múltiples líneas celulares y tejidos, tanto nerviosos como periféricos. De esta manera, se ha descrito en células endoteliales (Maccarrone et al., 2000) y también en el sistema inmune (Jacobsson y Fowler, 2001).

El objetivo de este trabajo ha sido demostrar la existencia de un sistema de captación de endocannabinoides en la línea tumoral prostática humana PC-3 así como la caracterización de un posible transportador de anandamida en esas células. De esta manera, se ha observado que la acumulación de  $^3\text{H}$ -anandamida en PC-3 es un proceso dependiente de la temperatura, de la concentración y del tiempo. Además esa incorporación de  $^3\text{H}$ -anandamida a  $37^\circ\text{C}$  es un proceso saturable e inhibido de forma dosis dependiente por inhibidores del transportador como AM 404 y UCM 707.

Debido a la existencia en estas células tanto de  $\text{CB}_1$  como de  $\text{CB}_2$  así como la posible presencia de  $\text{VR}_1$ , se realizaron experimentos en los que se determinó que al incubarse conjuntamente con los tres antagonistas la captación de anandamida era aproximadamente un 50% de la total. Para evitar la unión de anandamida a estos receptores y poder discriminar la unión de anandamida al transportador los ensayos se realizaron en presencia de esos tres antagonistas.

**O-1.3****POTENCIACION POR EL INHIBIDOR DE LA RECAPTACION DE ENDOCANNABINOIDES, UCM707, DE LA ACCION HIPOQUINETICA Y ANALGESICA DE LA ANANDAMIDA**

Eva de Lago, Javier Fernández-Ruiz, Silvia Ortega-Gutiérrez\*, Alma Viso\*, María Luz López-Rodríguez\* and José A. Ramos

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040-Madrid; \*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040-Madrid

Hasta el presente, el compuesto UCM707 (*N*-(3-furilmetil)eicosa-5,8,11,14-tetraenamida) es el inhibidor del transportador de endocannabinoides que presenta mayor potencia y selectividad en ensayos *in vitro*, lo que le capacita para ser utilizado en la potenciación de la actividad endocannabinoide, con mínimos efectos secundarios, en el tratamiento de diversos tipos de patologías. No existen, sin embargo, datos acerca de como se comporta este compuesto en ensayos *in vivo* relacionados con algunos de los efectos más comunes de los endocannabinoides, como son la depresión motora o la analgesia. En este trabajo, nos hemos propuesto abordar precisamente este aspecto realizando en ratas dos tipos de estudios: (i) se han analizado los efectos dosis-respuesta del UCM707 en el test de campo abierto (para medir actividad motora) y en la placa caliente (para medir analgesia), y (ii) se ha estudiado la capacidad del UCM707 de potenciar la acción hipoquinética y/o analgésica producida por una dosis subefectiva de anandamida, el principal endocannabinoide cerebral. Los resultados han puesto de manifiesto que la administración de diferentes dosis de UCM707 no produjo en ningún caso efectos significativos sobre la inactividad y sobre las actividades ambulatoria, exploratoria y estereotipadas en el test de campo abierto. Tampoco se observaron efectos sobre la sensibilidad a un estímulo térmico en el test de la placa caliente. Sólo las dosis más altas de este compuesto apuntaron cierto efecto analgésico e hipoquinético atribuible a una capacidad de potenciar el tono endógeno cannabinoide. Esta propiedad del UCM707 se puso más claramente de manifiesto en experimentos posteriores en los que se observó que la administración de una dosis del inhibidor que no producía efectos por sí misma, sí que era capaz de potenciar la acción hipoquinética y analgésica de una dosis también subefectiva de anandamida y que tampoco había producido ningún efecto significativo por sí misma. Por tanto, la combinación de ambos compuestos produjo una marcada reducción de la actividad exploratoria y sobre todo de la ambulación, incrementando el tiempo que el animal permanece en inactividad en el test de campo abierto. También produjo una potenciación significativa de la latencia de respuesta a un estímulo térmico en el test de la placa caliente. Por consiguiente, el compuesto UCM707, como sugerían de antemano sus propiedades *in vitro*, también se comporta *in vivo* como un potente y selectivo inhibidor del transportador de endocannabinoides mostrando una clara ausencia de capacidad de activar de forma directa los distintos receptores para los endocannabinoides pero potenciando la acción de estos compuestos endógenos. Esto permite aventurar para este compuesto una prometedora aplicabilidad terapéutica, administrado solo o en combinación con endocannabinoides en el tratamiento de diversos tipos de enfermedades neurológicas

Financiado por la Comunidad de Madrid (proyecto 08.5/0063/2001)

**O-1.4****INHIBICIÓN DE LA FIJACIÓN BASAL DE [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S EJERCIDA POR EL “AGONISTA INVERSO” DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB<sub>1</sub> SR141716A EN CEREBRO HUMANO POSTMORTEM.**

Lorena Hernández-García, J. Javier Meana y Rafael Rodríguez-Puertas.

Dpto. Farmacología, Fac. Medicina y Odontología, Universidad País Vasco, UPV/EHU, Leioa.

Los receptores cannabinoides pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y constituyen unos de los receptores más abundantes en el SNC, con niveles diez veces superiores a otros GPCRs. Estos receptores exhiben una amplia distribución en todo el SNC. Recientemente se ha observado que muchos de estos receptores son capaces de desarrollar actividad constitutiva o intrínseca en ausencia de agonista, tanto en cultivos celulares como en estudios funcionales en órgano aislado. Se ha descrito que ciertos ligandos, que hasta la fecha habían sido considerados antagonistas, son capaces de inhibir esta actividad constitutiva de los receptores. Estos compuestos se han denominado agonistas inversos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el fenómeno de agonismo inverso en cerebro humano *postmortem* mediante la técnica de marcaje con [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S. Se analizó la capacidad de compuestos descritos como antagonistas selectivos del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> (SR141716A, AM251 y AM281) de inhibir la fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, comportándose por lo tanto como agonistas inversos. Los ensayos fueron realizados en membranas aisladas de córtex prefrontal y cerebelo.

Los mayores porcentajes de inhibición de la fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S se obtuvieron con concentraciones de GDP en el rango milimolar y en presencia de NaCl 100 mM. Las potencias desarrolladas por los fármacos fueron SR141716A>AM281>AM251. Con el fin de determinar si la inhibición observada en la fijación de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S era mediada por proteínas G, se preincubó las membranas con el agente alquilante de las proteínas G<sub>i/o</sub> N-etilmaleimida (NEM). NEM 100  $\mu$ M no bloqueó la inhibición producida por SR141716A. El agonista del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> WIN 55,212-2 no fue capaz de bloquear dicho efecto. En cerebelo, SR141716A también fue capaz de producir una inhibición de la fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, pero de menor magnitud que la producida en el córtex. Además, se realizaron ensayos de competición del radioligando [<sup>3</sup>H]SR141716A con el agonista WIN 55,212-2 en presencia y en ausencia de GDP para demostrar la especificidad de SR141716A por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> humano.

Este estudio muestra la validez de la técnica de marcaje con [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S para observar y cuantificar el fenómeno de agonismo inverso en cerebro humano *postmortem*. No obstante, los resultados obtenidos cuestionan que la inhibición de la fijación basal de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S ejercida por SR141716A observada sea mediada a través del acople del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> a proteínas G<sub>i/o</sub>.

Agradecimientos: este estudio ha sido financiado por GV (PI98/8) y FIS 01/0358.

**LA ANANDAMIDA INHIBE LA NEUROGÉNESIS A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA VÍA ERK**

D. Rueda (1), B. Navarro (2), T. Aguado (1), A. Martínez-Serrano (2), M. Guzmán (1), I. Galve-Roperh (1)

(1) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid

(2) Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma, Madrid

Recientemente se ha propuesto que los cannabinoides participan en el control del destino celular en el sistema nervioso. Sin embargo, se desconoce en la actualidad el posible papel del sistema endocannabinoide en el control de la neurogénesis. El tratamiento con anandamida (AEA) inhibió el desarrollo de precursores neuronales E17 a neuronas maduras. Este proceso depende del receptor CB<sub>1</sub> y conlleva la disminución en el número de células con neuritas, así como el descenso en la expresión de marcadores neuronales  $\beta$ -tubulina III y Neu N. Así mismo, el tratamiento con meta-AEA *in vivo* redujo de modo significativo la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo en ratas adultas, y el SR141716 ejerció el efecto contrario. Utilizando como modelo de diferenciación neuronal células PC12 se observó que diferentes cannabinoides inhiben a través de CB<sub>1</sub> la diferenciación inducida por NGF. La diferenciación de células PC12 inducida por NGF se debe a una activación prolongada de la vía ERK mediada por la ruta de señalización Rap1/B-Raf/MEK. Así, los cannabinoides inhibían la activación sostenida de ERK inducida por el NGF, observándose un menor grado de activación de Rap1 y B-Raf. Igualmente, una forma constitutivamente activa de Rap1, pero no de Ras, era capaz de prevenir el efecto de los cannabinoides. En resumen, los cannabinoides ejercen un efecto inhibitorio de la neurogénesis a través de su receptor CB<sub>1</sub> interfiriendo en la activación sostenida de ERK dependiente de Rap1 y B-Raf.

**O-1.6****ACTIVACIÓN DE LA CASCADA DE PI3K POR CANNABINOIDES EN CÉLULAS TUMORALES DE PRÓSTATA.**

M.G. Sánchez, L. Ruiz-Llorente, I. Díaz-Laviada.

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

Aunque la investigación en cannabinoides ha incrementado enormemente en los últimos años, son muchas las cuestiones que quedan por resolver especialmente relativas a sus mecanismos de actuación. Los receptores de cannabinoides descritos hasta el momento pertenecen a la superfamilia de receptores de siete fragmentos transmembrana a través de proteínas G, regulan la concentración intracelular de AMPc.

Estudios recientes parecen indicar que el receptor central de cannabinoides CB<sub>1</sub> activa la vía fosfoinositido-3 kinasas (PI3K)/PKB en células transfectadas. (Gómez del Pulgar et al, 347:369-373 (2000).

La vía PI3K/PKB, está implicada en la regulación del crecimiento celular, proliferación diferenciación y cambios en el citoesqueleto. La PKB regula respuestas antiapoptóticas de la célula y ha de ser fosforilada en dos residuos: Thr<sup>308</sup> y Ser<sup>473</sup> para su completa activación.

En este trabajo hemos estudiado la implicación de la vía fosfoinositido-3 kinasa (PI3K)/PKB en el mecanismo de acción de los cannabinoides en células epiteliales de próstata PC-3.

Las células PC-3 cuando son sometidas a dosis bajas tanto de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), como de R-(+)-methanandamida (MET), incrementan la fosforilación de PKB, necesaria para su activación. La estimulación de PKB inducida por cannabinoides es inhibida tanto por el antagonista de CB<sub>1</sub>, SR141716, como por el antagonista de CB<sub>2</sub>, SR144528 y por el inhibidor de PI3K, LY 294002. Estos resultados indican que los cannabinoides estimulan la ruta de PI3K/PKB, en células PC-3, a través de los dos receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> expresados en estas células.

Por otro lado, THC y MET inducen la translocación de Raf-1 a la membrana fenómeno indicativo de su activación. Este efecto está bloqueado tanto por antagonistas de los dos receptores como por el inhibidor de PI3K. Estos resultados demuestran la conexión secuencial entre receptores de cannabinoides/la ruta de PI3K/Akt y Raf-1 en células de próstata PC-3. Hemos comprobado también que esta ruta está involucrada en la inducción de NGF por cannabinoides en estas células.

**O-1.7****LOS CANNABINOIDES PROTEGEN A LOS ASTROCITOS DE APOPTOSIS VÍA PI3K/PKB**

T. Gómez del Pulgar (1), M. L. de Ceballos (2), A. Carracedo (1), M. Guzmán (1), G. Velasco (1)

(1) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid

(2) Grupo de Neurodegeneración, Instituto Cajal, CSIC, Madrid

Recientemente se ha propuesto que los cannabinoides participan en el control del destino celular en el sistema nervioso. Sin embargo, estos estudios se han desarrollado en neuronas, mientras que no se ha prestado ninguna atención a las células gliales. En este trabajo utilizamos un modelo de apoptosis inducida por ceramida para estudiar el efecto protector de los cannabinoides en astrocitos. Los datos muestran que (i) los cannabinoides rescatan a los astrocitos de apoptosis inducida por ceramida de manera dependiente del tiempo y la dosis; (ii) este efecto depende de la activación del receptor CB<sub>1</sub> y de la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/PKB); (iii) ERK y RSK también podrían estar implicadas en este efecto protector; (iv) los cannabinoides protegen a los astrositos de la administración local de ceramida *in vivo*. En resumen, los resultados muestran que los cannabinoides protegen a los astrositos de apoptosis mediante activación de la PI3K/PKB. Estos datos constituyen la primera evidencia de un efecto “astroprotector” de los cannabinoides.



## O-2.1

## REFLEXIONES SOBRE EL PAPEL DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN EL DESARROLLO DEL CEREBRO: DESDE LAS EVIDENCIAS A LAS NUEVAS PROPUESTAS

María Gómez, Mariluz Hernández\*, José Antonio Ramos, Javier Fernández-Ruiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040-Madrid; \*Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense, 28040-Madrid

De entre las funciones atribuidas al sistema endocannabinoide en el cerebro, la implicación en el desarrollo cerebral no es de las más conocidas, pero sí que cuenta ya con algunas sólidas evidencias experimentales, aunque aún no estén claros los fenómenos específicos del desarrollo en los que participa. El objetivo de esta comunicación es hacer un repaso de los estudios que proporcionan evidencias a favor de este papel, hasta llegar a la formulación de nuevas propuestas e hipótesis cuya validación deberá ser trabajo de los próximos años. De las evidencias, vamos a destacar tres:

- Elementos del sistema endocannabinoide (receptores CB<sub>1</sub>, ligandos) aparecen de forma muy temprana en el desarrollo del cerebro, de forma que su localización, significativamente diferente de la del cerebro adulto, hacen pensar en que no se trata exclusivamente de un normal proceso de maduración ontogénica de este sistema (Berrendero et al., *Development* 125 : 3179-3188, 1998)
- La administración de cannabinoides durante el desarrollo cerebral modifica el patrón normal de maduración de varios neurotransmisores y provoca disfunciones en la edad adulta en los procesos comportamentales y neuroendocrinos regulados por estos neurotransmisores (Fernández-Ruiz et al., *Life Sci.* 65 : 725-736, 1999)
- Células neuronales o gliales obtenidas de cerebros embrionarios o neonatales contienen receptores CB<sub>1</sub> implicados en fenómenos de interacción neurona-glia, expresión de genes de transcripción temprana, modulación del metabolismo energético y otros procesos relacionables con el desarrollo cerebral (Fernández-Ruiz et al., *TINS* 23 : 14-20, 2000)

De las nuevas propuestas, vamos también a destacar tres:

- El sistema endocannabinoide podría jugar un papel en la expresión de genes-claves para el desarrollo de determinados neurotransmisores, como el caso del gen de la tirosina hidroxilasa o el gen de la proencefalina, ejemplos para los que ya se dispone de evidencias de una modulación por cannabinoides
- El sistema endocannabinoide podría jugar un papel en la expresión y/o función de diversas proteínas de adhesión celular, dada la presencia de elementos de este sistema, en particular de los receptores CB<sub>1</sub> en regiones relacionadas con los procesos de proliferación neuronal o glial, migración celular y/o elongación axonal, procesos en los que estas proteínas tienen una importante función
- El sistema endocannabinoide podría jugar un papel en los procesos apoptóticos que se producen durante el desarrollo, dada la capacidad demostrada para los cannabinoides de controlar la decisión muerte/supervivencia en células adultas, y la presencia de elementos del sistema endocannabinoide durante el desarrollo en grupos celulares que, o bien son específicos de esta etapa, o bien no contienen estos elementos en la vida adulta.

Los próximos años habrán de dar respuesta al desafío de definir de forma completa aquellos procesos del desarrollo cerebral en los que el sistema endocannabinoide tiene una función determinada.

**O-2.2****LA HIPERFAGIA INDUCIDA POR CANNABINOIDES SE PRODUCE A TRAVÉS DE UN MECANISMO PERIFÉRICO**

Raquel Gómez<sup>1</sup>, Miguel Navarro<sup>1</sup>, Belén Ferrer<sup>2</sup>, José M. Trigo<sup>1</sup>, Ainhoa Bilbao<sup>2</sup>, Ignacio Del Arco<sup>2</sup>, Andrea Cippitelli<sup>3</sup>, Felice Nava<sup>3</sup>, Daniele Piomelli<sup>3</sup> y Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Psicobiología. Universidad Complutense de Madrid, 28223-Madrid, Spain;

<sup>2</sup>Fundación de Investigación Carlos Haya, 29010-Málaga, Spain; <sup>3</sup>Department of Pharmacology, University of California, 360 Med Surge II, 92697-4625, Irvine, CA, USA.

Estudios recientes sugieren que el sistema endocannabinoide regula la ingesta de comida. Aunque se han propuesto mecanismos centrales para explicar la hiperfagia inducida por cannabinoides, no se ha descartado la existencia de mecanismos periféricos implicados en estas acciones farmacológicas. Para estudiar esta hipótesis hemos investigado: 1) los efectos de la ingesta y la privación de comida sobre la producción de anandamida en el intestino; 2) los efectos de la administración central (intracerebroventricular) y periférica (intraperitoneal) del cannabinoide endógeno anandamida, el agonista cannabinoide WIN 55,212-2, y el antagonista selectivo del receptor CB1 SR141716A sobre la ingesta de comida en ratas parcialmente saciadas, y 3) los efectos de la desafrentación sensorial sobre la modulación cannabinoide de la ingesta. La privación de comida incrementó en 7 veces los niveles de anandamida en intestino, pero no en el estómago o el cerebro. La realimentación produjo una normalización en la liberación de anandamida. La administración periférica, pero no la central, de anandamida o de WIN 55,212-2 produjo hiperfagia en animales saciados parcialmente. De la misma manera, la administración periférica, pero no la intracerebroventricular de SR141716A redujo la ingesta de manera dosis-dependiente. La desafrentación sensorial inducida por el tratamiento con la neurotoxina capsaicina abolió los efectos sobre la ingesta tanto de los agonistas cannabinoides como la del antagonista selectivo del receptor CB1. Estos efectos sugieren que los endocannabinoides modulan la ingesta mediante la estimulación de receptores CB1 localizados en los terminales sensoriales sensibles a capsaicina. La oleiletanolamida, una aciletanolamida que actúa periféricamente en un lugar diferente del receptor CB1, y que se produce en el intestino tras la ingesta, bloqueó la hiperfagia inducida por la anandamida. El pretratamiento con SR141716A potenció la hipofagia inducida por la oleiletanolamida. Estos resultados sugieren que la anandamida y la oleiletanolamida actúan periféricamente como señales coordinadas reguladoras de la ingesta.

Financiado por la Fundación Rodríguez Pascual; MCYT, FIS 2001/0654 y Plan Nacional Sobre Drogas (M.N., F.R.F.) y NIDA (D.P.).

**O-2.3****PAPEL DEL SISTEMA OPIOIDE EN LOS EFECTOS ANSIOLÍTICOS INDUCIDOS POR EL  $\Delta^9$ -TETRAHIDROCANNABINOL**

F. Berrendero, R. Maldonado

Laboratori de Neurofarmacologia, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra, C/ Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona

Numerosos estudios indican la existencia de una interacción funcional entre los sistemas opioide y cannabinoide, principalmente en los fenómenos relacionados con la antinocicepción y las respuestas conductuales de estas drogas. En el presente trabajo, se ha evaluado el papel del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> así como el de los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  en los efectos ansiolíticos inducidos en los ratones por la administración de  $\Delta^9$ -THC. Para la realización de este estudio se ha utilizado el modelo de ansiedad de la caja blanca y negra. En este modelo los ratones se exponen a un conflicto representado por la novedad de explorar nuevos ambientes y las características aversivas de un compartimento fuertemente iluminado. El efecto ansiolítico inducido por una dosis baja de  $\Delta^9$ -THC (0.3 mg/kg) fue bloqueado por el antagonista cannabinoide SR 141716A (0.5 mg/kg), confirmando la participación de los receptores CB<sub>1</sub> en la mediación de este efecto. Los antagonistas de los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$ ,  $\beta$ -funaltrexamina (5 mg/kg) y naltrindol (2.5 mg/kg) respectivamente, también bloquearon las propiedades ansiolíticas inducidas por el  $\Delta^9$ -THC. Sin embargo, el antagonista específico de los receptores opioides  $\kappa$ , nor-binaltorfimina (2.5 mg/kg), no indujo ningún cambio en el efecto ansiolítico inducido por el agonista cannabinoide. Estos datos demuestran la participación del sistema opioide, a través de los receptores  $\mu$  y  $\delta$ , en la regulación que los cannabinoides ejercen sobre el comportamiento de tipo emocional.

**O-2.4****ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES ENTRE LOS SISTEMAS OPIOIDE Y CANNABINOIDE EN LA MODULACIÓN DE RESPUESTAS DE ANSIEDAD Y ACTIVIDAD ADRENOCORTICAL**

J. M. Biscaia<sup>a</sup>, S. Marín<sup>a</sup>, E. Marco<sup>a</sup>, B. Fernández<sup>a</sup>, M. Rubio<sup>a</sup>, C. Guaza<sup>b</sup>, H. Schmidhammer<sup>c</sup>, M. P. Viveros<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal), Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040-Madrid, España. <sup>b</sup> Instituto Cajal, Madrid, España. <sup>c</sup> Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Innsbruck, Innrain 52 A, A-6020 Innsbruck, Austria.

En este trabajo hemos investigado las posibles interacciones entre tres antagonistas selectivos de los receptores opioides  $\kappa$  (nor-binaltorfimina, 5 mg/kg),  $\mu$  (ciprodime, 10 mg/kg) y  $\delta$  (naltrindol, 1 mg/kg) y el agonista cannabinoide CP 55,940, en la modulación de respuestas relacionadas con la ansiedad (laberinto en cruz elevado) y actividad adrenocortical (niveles de corticosterona en suero medidos por radioinmunoensayo), en ratas Wistar macho de aproximadamente 100 días de edad. Se utilizó el tablero con agujeros para evaluar la actividad motora y exploratoria. El CP 55,940 a una dosis de 75  $\mu$ g/kg, pero no a 10  $\mu$ g/kg, indujo un efecto de tipo ansiogénico (disminución significativa del porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto en cruz,  $P < 0,05$ ), que fue antagonizado por la nor-binaltorfimina. Ni el ciprodime ni el naltrindol revertieron el efecto de tipo ansiogénico del agonista cannabinoide. El CP 55,940 (75  $\mu$ g/kg) también indujo reducciones significativas en la actividad motora (deambulación externa y postura erguida,  $P_s < 0,05$ ) y en la actividad exploratoria (frecuencia y tiempo de exploración de agujeros,  $P_s < 0,05$ ) en el tablero con agujeros, así como estimulación de actividad adrenocortical (aumento significativo en los niveles séricos de corticosterona,  $P < 0,05$ ). Estos efectos no fueron revertidos por ninguno de los tres antagonistas opioides. Tanto el ciprodime como el naltrindol, cuando se administraron solos, indujeron disminuciones significativas en los parámetros relacionados con la actividad motora, efectos de tipo ansiogénico, y aumentos significativos en los niveles de corticosterona. La nor-binaltorfimina, cuando se administró sola, no modificó las respuestas de ansiedad, pero estimuló la actividad adrenocortical. En conjunto, nuestros resultados indican que, tanto el agonista cannabinoide como los tres antagonistas opioides estimularon la actividad adrenocortical, aunque produjeron efectos distintos sobre las respuestas relacionadas con la ansiedad. El antagonista  $\kappa$ -opioide revirtió el efecto de tipo ansiogénico del CP 55,940, pero no el efecto de este agonista cannabinoide sobre la actividad adrenocortical. Así pues, es probable que los efectos de los agonistas cannabinoides sobre la ansiedad y sobre la actividad adrenocortical estén mediados por mecanismos distintos. Nuestros datos proporcionan la primera evidencia farmacológica acerca de la implicación del receptor  $\kappa$ -opioide en el efecto de tipo ansiogénico de un agonista cannabinoide.

Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, Proyecto BFI2000-0611

**O-2.5****ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO Y LA NICOTINA DESDE UNA PERSPECTIVA COMPORTAMENTAL**

A. Castañé<sup>1</sup>, E. Valjent<sup>1</sup>, C. Ledent<sup>2</sup>, M. Parmentier<sup>2</sup>, R. Maldonado<sup>1</sup>, O. Valverde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratori de Neurofarmacologia, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra, C/ Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona; <sup>2</sup>IRIBHN. Université libre de Bruxelles, N-1070 Bruxelles, Belgium

Diversas interacciones han sido descritas entre los compuestos cannabinoides y otras drogas de abuso como los opioides. No obstante, la posible interacción entre el sistema cannabinoide y la nicotina ha sido muy poco estudiada hasta el momento. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la posible participación del receptor cannabinoide CB1 en los efectos inducidos tras la administración aguda y crónica de nicotina. Para ello, se han utilizado ratones genéticamente modificados deficientes en el receptor cannabinoide CB1 y ratones normales. La administración aguda de nicotina (0.5, 1, 3 y 6 mg/kg, sc) produjo efectos hipolocomotores y antinociceptivos en ambos grupos de animales. No obstante, en los ratones sin el receptor cannabinoide CB1 se observó una facilitación del efecto antinociceptivo medido en el ensayo de inmersión de la cola a las dosis de 3 y 6 mg/kg de nicotina. Por otro lado, los efectos reforzantes inducidos por nicotina (0.5 mg/kg, sc) en el modelo de la preferencia de plaza condicionada fueron bloqueados en los ratones sin el receptor cannabinoide CB1, lo que parece indicar que la presencia de dicho receptor resulta necesaria para la expresión de los efectos de recompensa de esta droga. Finalmente, tras poner a punto un modelo de dependencia física de la nicotina, se observó que la expresión de los signos somáticos del síndrome de abstinencia a la nicotina fue similar en los ratones normales y en los ratones deficientes en el receptor cannabinoide CB1. En conclusión, estos resultados aportan evidencias de que el sistema cannabinoide endógeno, a través del receptor CB1, está involucrado en algunos de los efectos de la nicotina y permite avanzar en el conocimiento de las interacciones que pueden ocurrir cuando el tabaco y el cannabis se consumen conjuntamente.

**O-2.6****EFFECTOS AGUDOS DEL ETANOL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANANDAMIDA EN EL CEREBRO DE LA RATA**

B. Ferrer<sup>1</sup>, A. Bilbao<sup>1,2</sup>, A. Serrano<sup>1</sup>, I. Del Arco<sup>1</sup>, D. Piomelli<sup>3</sup>, M. Navarro<sup>2</sup>, F. Rodríguez de Fonseca<sup>1</sup>.

[1] Fundación Hospital Carlos Haya, Unidad de Investigación, Avenida Carlos Haya 82, 29010, Málaga. [2] Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid. [3] Departamento de Farmacología. Universidad de California en Irvine.

Estudios recientes han demostrado que el sistema cannabinoide endógeno participa en las acciones neurofarmacológicas del etanol administrado crónicamente. Sin embargo, no hay estudios que hayan investigado las acciones agudas de este agente psicotropo, considerado como la principal droga de abuso en el mundo occidental junto con la nicotina. Para ello hemos estudiado los efectos de la administración aguda de alcohol (4 gr/kg) en la rata Wistar sobre los niveles plasmáticos y cerebrales de anandamida, así como sobre la actividad de las enzimas de síntesis del precursor (N-aciltransferasa) y degradación (amidohidrolasa) de este endocannabinoide. La administración aguda de etanol produjo disminuciones significativas de anandamida en cerebelo, nucleus accumbens e hipocampo, así como en plasma. Estas acciones se observaron a los 45 y 90 min post-inyección, coincidiendo con los máximos niveles de etanol en sangre. La disminución de anandamida no afectó ni a la actividad *in vivo* ni a la *in vitro* de la N-aciltransferasa ni de la amidohidrolasa, sugiriendo que el etanol actúa sobre la fosfolipasa-D específica cuya actividad se estimula por despolarización o activación de receptores de glutámico o dopamina. Dado que el etanol es un potente inhibidor de la transmisión glutamatérgica, proponemos que la inhibición aguda de la liberación de anandamida inducida por el alcohol puede venir mediada por este mecanismo.

Financiado por la Fundación Rodríguez Pascual; MCYT, FIS 2001/0654 y Plan Nacional Sobre Drogas (M.N., F.R.F.) y NIDA (D.P.).

**O-2.7****REDUCCIÓN DEL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A LOS CANNABINOIDES EN RATONES DOBLE MUTANTES DE LOS RECEPTORES OPIOIDES MU Y DELTA.**

Patricia Robledo<sup>1</sup>, Anna Castañé<sup>1</sup>, Brigitte L. Kieffer<sup>2</sup> y Rafael Maldonado<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratori de Neurofarmacologia. Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida. Universitat Pompeu Fabra, c/Dr. Aiguader 80. 08003 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>CNRS UPR 9050, ESBS, Parc d'innovation, Bld S. Brandt 67400 Illkirch France

La existencia de una interacción funcional entre los sistemas cannabinoide y opioide ha sido demostrada en numerosos estudios. Sin embargo, se ha observado recientemente que las respuestas farmacológicas producidas por la administración aguda de  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), así como la dependencia física a esta sustancia, no fueron modificadas en ratones knockout deficientes en un único receptor opioide (mu, delta o kappa) (Ghozland et al., 2002). Con el fin de investigar el sustrato neurobiológico de la dependencia a los cannabinoides, hemos evaluado en este estudio las respuestas farmacológicas agudas, la tolerancia y la dependencia al THC en ratones doble mutantes de los receptores opioides mu/delta. La hipotermia y la hipolocomoción inducida por una administración aguda de THC no se vieron alteradas, mientras que las respuestas nociceptivas se redujeron en estos ratones mutantes. Durante el tratamiento crónico con THC, el desarrollo de la tolerancia a sus efectos hipotérmicos se vio enlentecido en los ratones doble mutantes comparados con los ratones control. Sin embargo, el desarrollo de la tolerancia a los efectos antinociceptivos y a los efectos sobre el peso corporal del THC, no se vieron afectados. Por el contrario, el síndrome de abstinencia al THC inducido por la administración aguda del antagonista de los receptores CB1, el SR141716A, se redujo significativamente en los ratones mutantes. Una reducción particularmente intensa se observó en la incidencia de dos signos de abstinencia cannabinoide, las sacudidas y el temblor de patas. Estos resultados indican que una acción cooperativa entre los receptores opioides mu y delta es necesaria para la completa expresión del síndrome de abstinencia al THC.

## Referencias:

Ghozland S, Matthes HWD, Simonin F, Filliol D, Kieffer L and Maldonado R (2002) Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *J Neurosci* 22:1146-1154.

## O-3.1

**ESTADO DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES EN LA CORTEZA FRONTAL DE RATAS CRÓNICAMENTE TRATADAS CON FLUOXETINA**

S. Mato, E.M. Valdizán 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, y la más comunmente asociada al suicidio (Stahl, 2000). A pesar de que hoy en día las bases patogénicas de la depresión mayor siguen siendo objeto de estudio, evidencias de distinto tipo sugieren que los trastornos depresivos se asocian a un déficit en la neurotransmisión monoaminérgica cerebral. De hecho, la terapia antidepresiva actual se basa en la inhibición de las proteínas recaptadoras de serotonina (5-HT) y/o noradrenalina (NA), y los estudios de tratamiento crónico con distintos antidepresivos en el animal de experimentación indican que estos fármacos provocan modificaciones en las propiedades de los receptores para 5-HT y NA.

Por otro lado, estudios recientes sugieren además que el sistema cannabinoide endógeno juega un papel modulador de la actividad de los distintos sistemas de neurotransmisión en condiciones fisiológicas (Wilson y Nicoll, 2001). En relación con los trastornos depresivos, el consumo agudo de derivados cannabinoideos se acompaña de una fase inicial y transitoria de euforia, aunque no existe un consenso sobre los posibles efectos de los compuestos cannabimiméticos sobre el estado de ánimo a largo plazo. Datos propios sugieren además que la capacidad funcional de los receptores CB<sub>1</sub> se encuentra incrementada en la corteza frontal *postmortem* de los sujetos deprimidos, y esta modificación parece depender del cumplimiento de un tratamiento antidepresivo (Mato y cols., 2001). Sin embargo, hasta el momento no se ha analizado el estado de los receptores CB<sub>1</sub> en el animal de experimentación después de un tratamiento crónico con fármacos antidepresivos.

El presente estudio ha pretendido establecer los cambios que se producen en el nivel de expresión y propiedades transduccionales de los receptores CB<sub>1</sub> en la corteza frontal de ratas crónicamente tratadas con el fármaco antidepresivo fluoxetina (10 mg/kg día, 14 días). Para ello se han realizado experimentos de saturación con los agonistas cannabinoideos [<sup>3</sup>H]CP55,940 (0.0125-3.2 nM) y WIN55,212-2 (1 μM), así como ensayos funcionales de estimulación de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS y de inhibición de la actividad adenililciclase por WIN55,212-2 (1 nM-100 μM). A partir de estos ensayos se ha observado que los receptores CB<sub>1</sub> exhiben una mayor capacidad inhibitoria de la adenililciclase después del tratamiento crónico con fluoxetina (%E<sub>Imax</sub> = 69,5±2 vehículo *vs* 59,8±2.0 fluoxetina; *p*<0,05). En cambio, no se han encontrado modificaciones a nivel receptorial: al analizar su actividad funcional a través de la fijación de [<sup>35</sup>S]GTPγS no ha habido cambios (%E<sub>max</sub> = 40,9±4 vehículo *vs* 39±3 fluoxetina; *p*=0.71). Estos resultados indican que el tratamiento crónico con antidepresivos provoca modificaciones en la funcionalidad de los receptores CB<sub>1</sub>, y que por lo tanto, la neurotransmisión cannabinoide podría participar en la instauración de los efectos a largo plazo de estos fármacos.

Proyecto financiado por la Fundación “Marqués de Valdecilla”.



**O-3.2****CONSUMO DE CANNABIS Y VULNERABILIDAD A LA PSICOSIS: el caso de tres parejas de hermanos.**

Luis Núñez Domínguez

Clínica San Francisco Javier, Pamplona

En los últimos años han sido numerosas las publicaciones que se han referido a las relaciones entre el consumo de cannabis y la psicosis: la aparición de una psicosis cannábica, la influencia en los síntomas de la esquizofrenia, o incluso el posible papel etiológico del cannabis en la génesis de la esquizofrenia.

El artículo de Andreasson et al.(1987) recuperó la hipótesis acerca del papel etiológico de las drogas en la esquizofrenia (en concreto del cannabis, riesgo 6 veces mayor) pero no aportan datos si dicho riesgo se debe a la presencia de determinadas características que podían determinar la presencia de una vulnerabilidad hacia la psicosis (factores genéticos, personalidad premórbida, policonsumo). Son escasos los estudios en los que se esclarezca el papel de los factores genéticos en el riesgo de padecer psicosis por parte de los consumidores de cannabis. Tsuang et al. (1982) y McGuire et al. (1985) encuentran un alto porcentaje de antecedentes familiares de esquizofrenia entre los sujetos con psicosis cannábica. Varma y Sharma (1983) encuentran un treinta por ciento de antecedentes de consumo de cannabis entre los familiares de su grupo de enfermos con esquizofrenia.

Estos hechos apuntan a una interrelación entre el consumo de cannabis y la esquizofrenia. El presente trabajo dirige su atención a dos aspectos relacionados con la vulnerabilidad, aspectos genéticos y de sensibilización, al mostrar las historias psiquiátricas de tres parejas de hermanos. En todos los pares existe consumo de sustancias tóxicas y evoluciones distintas: hacia psicosis funcional en un miembro y hacia psicosis cannábica en otro miembro de cada familia.

**O-3.3****PAPEL DE LA ACTIVACION GLIAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON. EFECTO NEUROPROTECTOR DEL AGONISTA CANNABINOIDE HU-210**

Isabel Lastres Becker, Francisco Molina-Holgado\*, Robin J.M. Franklin\*, José Antonio Ramos, Javier Fernández-Ruiz,

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040-Madrid; \*Neurology Unit, Department of Clinical Veterinary Medicine, University of Cambridge, Madingley Road, Cambridge CB3 0ES (UK)

Junto con los elementos patogénicos clásicos (excitotoxicidad, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial), recientes datos apuntan que en la enfermedad de Huntington (EH), así como en otras enfermedades neurodegenerativas, también aparecen fenómenos de tipo inflamatorio que pueden contribuir en el inicio o progreso de la enfermedad. Las interacciones recíprocas entre el sistema nervioso y el sistema inmune, que normalmente son pocas en cerebros sanos, se incrementan considerablemente en condiciones neuropatológicas. En relación con enfermedades neurodegenerativas, existen evidencias de un papel patogénico de la microglía activada y otros constituyentes inmune/inflamatorios. Tanto el estrés oxidativo como la activación microglial son componentes significativos en la patología de la EH, aunque sus contribuciones no son claras. Cuando la glía se activa, se produce la liberación de diversos factores tróficos y mediadores inflamatorios como el TGF- $\beta$ , óxido nítrico (NO), interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) o el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Estudios previos, realizados en un modelo de ratones transgénicos para EH, han demostrado que existe una relación entre la enzima proteolítica de la IL-1 $\beta$  (ICE o caspasa-1) y la supervivencia y aparición de síntomas, indicando que la IL-1 $\beta$  podría ser un mediador crítico en la patogénesis de la enfermedad. Por ello en este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos: i) elucidar el papel de la activación glial, y más en concreto, el papel de la IL-1 $\beta$  en la EH; ii) ver el efecto del agonista cannabinoide HU-210 sobre dicha activación glial, y su repercusión para la EH. Para ello hemos realizado una serie de experimentos: en una primera fase se han tratado a cultivos mixtos de glía tanto de ratones neonatales C57BL/6 controles (WT) como de ratones KO para IL-1 $\beta$  con LPS, una endotoxina que activa a la glía, ácido 3-nitropropiónico (3NP), una toxina utilizada para generar modelos de enfermedad de Huntington, o LPS + 3NP por 24 horas. Se midió la muerte celular, niveles de óxido nítrico y se recogieron los medios condicionados para tratar en una segunda fase a cultivos de neuronas granulares cerebelares (NGC), donde también se midió la muerte celular y niveles de óxido nítrico. Lo que observamos fue que: i) la liberación de óxido nítrico producida por 3NP en cultivos mixtos de glía está mediada en parte por la IL-1 $\beta$ ; la activación glial con LPS modula la liberación de óxido nítrico producida por 3NP; ii) el HU-210 no produce ningún efecto sobre la liberación del óxido nítrico inducida por 3NP; iii) en los cultivos de NGC, la inducción de muerte neuronal por exposición a 3-NP, fue reducida cuando las neuronas fueron expuestas a medios condicionados (MC) con 3NP de cultivos de glia WT y de forma más significativa cuando los MC fueron obtenidos en cultivos de glía IL-1 $\beta$  KO; iv) el HU-210, protegió de manera directa a las neuronas de la muerte celular inducida por 3-NP, aumentando la supervivencia neuronal de forma dosis dependiente. Este efecto neuroprotector fue más significativo, de manera indirecta, cuando las neuronas tratadas con 3-NP fueron expuestas a MC con HU-210 provenientes de cultivos WT o IL-1 $\beta$  KO. Nuestros resultados indican que durante el proceso de neurodegeneración en la EH se produce activación glial, y que la IL-1 $\beta$  tiene un papel importante en el proceso de inflamación, con repercusión en la muerte neuronal. El HU-210 tiene un papel neuroprotector en la muerte neuronal mediada por la activación glial.

**O-3.4****LOS ANTAGONISTAS CANNABINOIDES CB1 EJERCEN EFECTO ANTIPARKINSONIANO TRAS DEGENERACIÓN EXTENSA DE LA SUSTANCIA NEGRA EN RATAS**

Emilio Fernández Espejo, Isabel Caraballo, Fadwa El Banoua, Juan A. Flores, Beatriz Galán.  
Departamento de Fisiología Médica. Facultad de Medicina. 41009 Sevilla.

Se ha postulado que la modulación del sistema endocannabinoide endógeno podría ser útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Hemos comprobado que, en el modelo animal de parkinsonismo por degeneración unilateral de la sustancia negra tras 6-hidroxidopamina en la rata, la administración sistémica de SR141716A y AM251, antagonistas del receptor CB1, ejerce efectos antiparkinsonianos significativos (dentro de un rango de dosis) tras degeneración extensa, pero no moderada, de la sustancia negra (pérdida de neuronas dopaminérgicas superior al 94%, estimada por estereología). Así, se observó una mejoría de síntomas parkinsonianos como el giro inducido por anfetamina, la aquinesia y el déficit sensoriomotor. En búsqueda del locus nervioso de acción, se realizaron infusiones locales de SR141716A en estriado dorsal, globus pálido y sustancia negra. Las infusiones en el estriado dorsal y el pálido correspondiente del circuito dañado disminuyeron de modo significativo el giro inducido por anfetamina en todas las ratas parkinsonianas. Sin embargo, las infusiones intranígricas aumentaron el giro, excepto en ratas con lesión superior al 94% en la sustancia negra. Se observó también que las inyecciones eran más efectivas en el circuito nigroestriado degenerado que en el normal. Los resultados sugieren: a) que la administración sistémica de antagonistas CB1 en ratas con degeneración moderada de la sustancia negra no es beneficiosa porque el efecto positivo mediado por el estriado y el pálido es antagonizado por la acción nigrica, y b) los antagonistas CB1 ejercen acción antiparkinsoniana cuando la degeneración de la sustancia negra es superior al 94%, de modo que predomina el efecto positivo estriatopalidal. En fin, los antagonistas CB1, que no poseen acción psicomimética, podrían ser de utilidad por vía sistémica en la enfermedad de Parkinson humana avanzada, hecho que merece ser ensayado a nivel clínico.

Subvencionado a EFE por Ministerio de Educación y Cultura (PM98-015), Plan Andaluz de Investigación (CVI-127) y Laboratorios Dr. Esteve.

**O-3.5****ALTERACIONES DE LA ACTIVIDAD ENDOCANNABINOIDE EN EL CUERPO ESTRIADO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN RATAS**

Ana Cabranes, Katerina Venderova\*, Filomena Fezza\*, Antonio Sánchez\*\*, Antonio García-Merino\*\*, José Antonio Ramos, Vincenzo Di Marzo\*, Javier Fernández-Ruiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040-Madrid; \*Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 80078-Pozzuoli, Nápoles (Italia); \*\* Servicio de Neurología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, 28035-Madrid

En los últimos años se han empezado a desarrollar diversos estudios encaminados a explicar desde un punto de vista experimental el porqué de ciertas evidencias anecdóticas o preclínicas que sugerían que los cannabinoides podrían ser útiles en el tratamiento de algunos de los síntomas, en particular los de tipo motor, que se producen en los enfermos de esclerosis múltiple. Sin embargo, solo unos pocos estudios han examinado el estado de la neurotransmisión endocannabinoide en modelos experimentales de esta enfermedad (Baker et al., *FASEB J.* 15 : 300-302, 2001; Berrendero et al., *Synapse* 41 : 195-202, 2001). Con este estudio, hemos querido contribuir a este aspecto analizando las concentraciones de endocannabinoides (anandamida y 2-araquidonilglicerol), la densidad y los niveles de ARNm para el receptor CB<sub>1</sub>, y la capacidad de activación de este receptor en el cuerpo estriado (un área clave dentro de los ganglios basales) de ratas Lewis con encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo experimental de esclerosis múltiple generado por inoculación de proteína básica de mielina de cobaya. Tras la inoculación, los animales fueron examinados diariamente para detectar la aparición de síntomas neurológicos, síntomas que aparecieron a partir del día 10 post-inoculación, alcanzando un valor máximo en el día 13, día en el que los animales fueron sacrificados para proceder al análisis de la transmisión endocannabinoide en el cuerpo estriado. Nuestros datos indicaron que se produce una importante reducción de esta actividad en las ratas con EAE ya que se observaron los siguientes hechos: (i) los niveles de anandamida se redujeron significativamente en el cuerpo estriado aunque esto no se produjo con los de 2-araquidonilglicerol, (ii) la densidad de receptores CB<sub>1</sub> disminuyó tanto en la parte lateral como en la parte medial del cuerpo estriado de las ratas con EAE, y (iii) también se produjo un descenso de los niveles de ARNm para este receptor. En paralelo a esta reducción de la actividad endocannabinoide en el cuerpo estriado de ratas con EAE pudimos demostrar que se produjo una hipersensibilización de los receptores CB<sub>1</sub>, posiblemente derivada de la reducción de sus ligandos endógenos (anandamida), como demuestran los datos de unión de GTPγS estimulada por agonistas de estos receptores. Estos cambios en la transmisión endocannabinoide en las ratas con EAE parecen ser exclusivos ya que no evidenciamos cambios en otros neurotransmisores también activos a nivel de los ganglios basales, como la dopamina, el GABA, el glutamato y la serotonina. Por tanto, nuestros datos apoyan que la transmisión endocannabinoide está reducida en el cuerpo estriado de ratas con EAE, lo que podría explicar el deterioro motor que se observa en estas ratas, y por extensión en los pacientes, y justificar que la “recuperación” de esta transmisión mediante la administración de agonistas reduzca alguno de los signos de alteración motora en estos animales.

Financiado por una beca del FIS (01/0048-02)

**O-3.6****CANNABINOIDES Y OLIGODENDROCITOS: IMPLICACIÓN EN PROCESOS DE REMIELINIZACIÓN**

E. Molina-Holgado, A. Arévalo-Martín, J.M. Vela, Molina-Holgado F., Almazán G. y Borrell J. y Guaza C.

Grupo de Neuroinmunología; Departamento de Plasticidad Neural., Instituto Cajal, CSIC, Avda Dr. Arce 37; 28002 Madrid

Los resultados de investigaciones recientes muestran que los cannabinoides ejercen acciones pleiotrópicas en el Sistema Nervioso Central, entre las que se incluyen, la inhibición de respuestas inflamatorias y la potenciación de la supervivencia neuronal en situaciones de daño cerebral. Los oligodendrocitos, (OLs) células del SNC encargadas de mielinizar los axones neuronales, son muy vulnerables a situaciones de hipoxia/isquemia, al estrés oxidativo, y al daño humoral y celular mediado por el sistema inmune. Sin embargo, existen células precursoras de oligodendrocitos en el cerebro adulto que se reclutan en las áreas desmielinizadas en modelos experimentales de desmielinización y en la esclerosis múltiple (EM), con objeto de remielinizar los axones desnudos. Por tanto, la identificación y caracterización de señales que promuevan y faciliten la proliferación, supervivencia y diferenciación de los progenitores de OLs es crucial en el desarrollo de estrategias reparativas en las patologías desmielinizantes. En este estudio se demuestra que los oligodendrocitos expresan receptores cannabinoides in vivo e in vitro, y que la activación de los mismos protege a los progenitores de la muerte celular por apoptosis inducida por falta de soporte trófico. En estas acciones protectoras está implicada la vía de PI3K/Akt y parece ser mediada por la activación del receptor CB1 y del receptor CB2 que también se expresa en células oligodendrogiales. Para evaluar el potencial remielizante de los cannabinoides utilizamos un modelo experimental de EM, la encefalomiелitis murina por infección con el virus de Theiler, que semeja la patología de la EM en su fase crónica progresiva. En este modelo la administración, una vez establecida la sintomatología, de agonistas CB1 (ACEA) pero también la administración de agonistas CB2 (JW H-015), promueve la remielinización de manera que el porcentaje de axones remielinizados es más de dos veces superior en los ratones tratados con cannabinoides que en los ratones que recibieron el vehículo. Puesto que el proceso de remielinización implica en primer lugar que los progenitores de los oligodendrocitos proliferen y se concentren en el área desmielinizada y en segundo lugar que se diferencien en oligodendrocitos capaces de formar las capas de mielina, estamos tratando de elucidar en el modelo de Theiler si los cannabinoides regulan estos procesos.

Este estudio se ha realizado gracias a la ayuda del MCYT (SAF 01/1246).

**O-3.7****CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES CB1 Y CB2 Y LA AMIDO HIDROLASA DE ÁCIDOS GRASOS EN MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Julián Romero<sup>1</sup>, Rosa M. Tolón<sup>1</sup>, Cristina Benito<sup>1</sup>, Estefanía Núñez<sup>1</sup>, Cecilia J. Hillard<sup>2</sup>, Alberto Rábano<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Apoyo a la Investigación. Fundación Hospital Alcorcón. 28922. Alcorcón. Madrid. Spain. <sup>2</sup>Dept. of Pharmacology and Toxicology. Medical College of Wisconsin. Milwaukee, WI. 53226. USA.

El conocimiento que se tiene sobre la distribución y la función del Sistema Cannabinoide Endógeno (SCE) en el ser humano es todavía muy pobre y más aún en los principales procesos patológicos que le afectan. Presentamos los resultados que hemos obtenido del estudio de muestras de tejido cerebral de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer. Mediante el empleo de anticuerpos específicos dirigidos contra los principales elementos del SCE, como son los receptores CB1 y CB2 y la enzima degradativa de los principales endocannabinoides, la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), hemos hecho un estudio inmunohistoquímico en secciones de tejido que incluían el hipocampo y las cortezas entorrinal y parahipocampal, que son las áreas que, se sabe, son más severamente afectadas por esta enfermedad neurodegenerativa. Nuestras observaciones indican que, mientras que los receptores CB1 permanecen prácticamente inalterados (con cierto descenso en su densidad global), los receptores CB2 y la FAAH experimentan un importante incremento en su presencia en estas regiones cerebrales, de forma específica en las células gliales que se localizan en la vecindad de las placas neuríticas. Además, este incremento se produjo, específicamente, en células de microglía, para los receptores CB2, y de astrogliá, para la FAAH. Estos resultados apuntan a un posible papel relevante del SCE en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y procesos asociados.

Financiado por Comunidad Autónoma de Madrid (08.5/0005.1/2001) y Fondo de Investigaciones Sanitarias (00/0260 y 00/0251).

## O-3.8

**UTILIDAD DE LOS BLOQUEANTES DE RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA EN EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS NEUROPSIQUIÁTRICAS: ESTUDIOS EN MODELOS DE ESQUIZOFRENIA**

A. Bilbao<sup>1,2</sup>, B. Ferrer<sup>1,2</sup>, I. del Arco<sup>1</sup>, Gorriti, M<sup>2</sup>., M. Navarro<sup>2</sup>, F. Rodríguez de Fonseca<sup>1</sup>

[1] Fundación Hospital Carlos Haya, Unidad de Investigación, Avenida Carlos Haya 82, 29010, Málaga. [2] Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid.

El sistema cannabinoide endógeno es un sistema neuromodulador sobre el que actúan los principios activos de los preparados del *cannabis sativa* (genéricamente denominados cannabinoideos), como el hashish y la marihuana. Dado que la utilización del cannabis se asocia significativamente con una mayor incidencia de trastornos psiquiátricos, incluyendo la adicción a drogas y la esquizofrenia, se ha generado un gran interés en la comunidad científica por estudiar el papel que este sistema endógeno juega en dichas patologías. Una de las vías de estudio es la utilización de nuevos fármacos capaces de interferir selectivamente con el sistema cannabinoide endógeno en modelos animales de enfermedades neuropsiquiátricas. En este estudio hemos utilizado uno de estos tipos de fármacos, los inhibidores de la recaptación de anandamida, para evaluar el papel del sistema cannabinoide endógeno en un modelo farmacológico de esquizofrenia. En este modelo se evaluaron las acciones del inhibidor de la recaptación de anandamida AM404 en las respuestas motoras evocadas por el agonista dopaminérgico indirecto anfetamina, el antagonista del receptor glutamatérgico tipo NMDA MK801 y el agonista 5HT2 serotoninérgico DOI. El AM404 bloqueó la hiperactividad inducida por anfetamina y MK801, y redujo las estereotipias inducidas por DOI. Estos efectos indican que la elevación de la disponibilidad sináptica de anandamida inducida por AM404 tiene el mismo resultado que la administración de un neuroléptico atípico, indicando una clara interacción entre los receptores implicados en la sintomatología positiva de la esquizofrenia y el sistema cannabinoide endógeno. Este descubrimiento apoya la idea de que el consumo crónico de marihuana puede inducir cambios en los sistemas endógenos de regulación sináptica que faciliten la génesis de un brote esquizofrénico.

**O-3.9****LOS CANNABINOIDES INHIBEN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL**

C. Blázquez<sup>1\*</sup>, M.L. Casanova<sup>2\*</sup>, A. Planas<sup>3</sup>, T. Gómez del Pulgar<sup>1</sup>, C. Villanueva<sup>4</sup>, M.J. Fernández-Aceñero<sup>4</sup>, J. Aragonés<sup>5</sup>, J.W. Huffman<sup>6</sup>, J.L. Jorcano<sup>2</sup>, M. Guzmán<sup>1</sup>

\*Estas autoras contribuyeron igualmente al trabajo

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular y Molecular y Terapia Génica, CIEMAT, Madrid

<sup>3</sup>Departamento de Farmacología y Toxicología, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona

<sup>4</sup>Departamento de Patología, Hospital General de Móstoles, Madrid

<sup>5</sup>Departamento de Inmunología, Hospital de la Princesa, Madrid

<sup>6</sup>Department of Chemistry, Clemson University, Clemson, South Carolina, USA

Durante los últimos años se ha descrito que los cannabinoides inducen la regresión de diversos tipos de tumores en modelos animales. Aunque los cannabinoides inhiben la proliferación o inducen apoptosis en distintas células transformadas en cultivo, se desconoce aún el mecanismo preciso por el cual ejercen su acción antitumoral *in vivo*. Puesto que el crecimiento de los tumores sólidos depende críticamente de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), nos planteamos si los cannabinoides podrían afectar a este proceso. Los análisis de inmunohistoquímica y las pruebas de permeabilidad vascular muestran que la administración local de un cannabinoide no psicoactivo (JWH-133) a ratones inhibe la angiogénesis de gliomas malignos. Diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* indican además que dicho efecto anti-angiogénico podría depender de al menos dos mecanismos: (a) inhibición directa de la migración y supervivencia de células endoteliales vasculares; (b) disminución de la expresión de factores pro-angiogénicos (VEGF, angiopoyetina-2) y metaloproteinasas de matriz (MMP-2) en los tumores. Estos datos podrían contribuir al diseño de terapias antitumorales con cannabinoides.



## **ACCIONES ANTI-INFLAMATORIAS DE CANNABINOIDES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

L. Mestre Nieto\* A. Arévalo-Martín\*, E. Molina-Holgado, JM Vela, E.M. Romero J. Borrell y C. Guaza

Grupo de Neuroinmunología; Departamento de Plasticidad Neural., Instituto Cajal, CSIC, Avda. Dr. Arce 37; 28002 Madrid

En los últimos años se está acumulando evidencia experimental a favor de la utilidad terapéutica de los cannabinoides en trastornos inflamatorios de diversa índole, que incluyen modelos experimentales de artritis reumatoide, de colitis ulcerosa, inflamación aguda, o en dolor crónico inflamatorio. La esclerosis múltiple (EM) es una de las enfermedades desmielinizantes crónicas inflamatorias del SNC más frecuente en los jóvenes adultos. En el presente estudio se ha utilizado como modelo experimental de EM la encefalomiелitis murina por infección con el virus de Theiler (TMEV). La inoculación intracerebral de TMEV a cepas de ratones susceptibles (SJL/J) conduce al desarrollo de una patología inflamatoria desmielinizante con sintomatología similar a la EM en su fase crónica progresiva. Nuestro objetivo es investigar los efectos de la administración de cannabinoides fundamentalmente de agonistas de los receptores CB2, presentes principalmente en células inmunológicas, pero también en células microgliales que representan a los macrófagos residentes del SNC, en la expresión de moléculas inflamatorias en la médula espinal de los ratones infectados. Las células de la estirpe microglía/macrófago han sido implicadas previamente en la desmielinización inducida por TMEV. La administración subcrónica (10 días) de un agonista cannabinoide CB2. (JWH-015) disminuyó significativamente el porcentaje de células microgliales de morfología reactiva y suprimió la expresión de moléculas MHC clase II. Se está valorando la posibilidad de que el agonista selectivo CB2 (JWH-155) así como el compuesto anti-inflamatorio, palmitoiletanolamida (PEA) que no tiene afinidad significativa por los receptores CB2 disminuya la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , y de enzimas como la sintasa inducible del óxido nítrico (NOS II) y la ciclooxigenasa-2 y que promuevan la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 en la médula espinal de los ratones infectados.

\* Igual participación en el trabajo. Este estudio se ha realizado gracias a la ayuda del MCYT (SAF 01/1246).

## EFICACIA DE LOS CANNABINOIDES EN EL TRATAMIENTO DEL DOLOR ONCOLÓGICO

Duran M, Capellà D, Laporte JR.

Fundació Institut Català de Farmacologia

**Introducción:** La incidencia de dolor en pacientes con cáncer es de 30 a 90% según la fase evolutiva de la enfermedad. La mayoría de pacientes requieren tratamiento con analgésicos opiáceos.<sup>1</sup> En modelos de experimentación animal los cannabinoides han mostrado actividad antinociceptiva y efecto sinérgico con los opiáceos. Sin embargo, hay dudas sobre su eficacia analgésica en clínica. **Objetivo:** Evaluar las pruebas disponibles y los estudios en curso sobre la eficacia de los cannabinoides en el tratamiento del dolor oncológico, describir su posible lugar en terapéutica en el momento actual y definir posibles propuestas de futuros proyectos de investigación en esta indicación. **Métodos:** Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en las bases de datos PubMed y Cochrane, desde el inicio de cada una de ellas hasta febrero de 2002. Se han seleccionado los ensayos clínicos (AC) en fase III con asignación aleatoria y comparativos con placebo y/o tratamiento activo que evaluaran la eficacia analgésica de los cannabinoides en el tratamiento del dolor oncológico. Se han recogido sistemáticamente variables de calidad de los estudios, características de los pacientes, tratamientos de base, cannabinoides y dosis evaluadas, tratamiento de control y variables de eficacia y toxicidad. **Resultados:** Se han identificado 17 AC y se han excluido 13. Los cuatro restantes eran AC cruzados, a doble ciego y aleatorizados que evaluaron la eficacia analgésica de dosis únicas de cannabinoides en 118 pacientes oncológicos de entre 21 y 77 años con neoplasias diversas. Los resultados indican que el THC (10-20 mg) y un análogo nitrogenado del mismo (4 mg) administrados por vía oral tendrían una eficacia analgésica similar a codeína (60-120 mg) y superior a placebo con efectos indeseados neuropsiquiátricos limitantes de la dosis. **Conclusiones:** Las pruebas clínicas disponibles sobre la eficacia analgésica de los cannabinoides en pacientes con cáncer son escasas y con limitaciones metodológicas. Los cannabinoides tendrían una eficacia analgésica similar a codeína, con efectos indeseados limitantes de la dosis. Dado que una parte importante de los pacientes con dolor oncológico requieren tratamiento con opiáceos, los cannabinoides podrían ofrecer algún beneficio mejorando el perfil efectos indeseados en este grupo de pacientes. Son necesarios nuevos ensayos clínicos que evalúen la eficacia analgésica del tratamiento crónico con cannabinoides como adyuvantes de los opiáceos en pacientes con cáncer. Estos estudios deberían incluir variables de mejoría del dolor, necesidad de opiáceos y calidad de vida. En la actualidad hay en curso en el Reino Unido diversos estudios que cumplen estos criterios metodológicos.

1 Lancet 1999; 353: 1695-1700.

**EFFECTOS DEL INHIBIDOR DE LA RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA, AM 404, EN LA AUTOADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE MORFINA EN RATAS WISTAR**

J.M. Trigo-Díaz, J.A. López-Moreno, F. Rodríguez de Fonseca, M. Navarro.

Laboratorio de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense, Campus de Somosaguas, Madrid.

En estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio, mostramos que el antagonista del receptor cannabinoide CB1, SR141716A, era capaz de modificar la autoadministración de morfina y heroína, tanto en ratas como en ratones, utilizando un paradigma de refuerzo continuo (Navarro y cols., *J. Neuroscience*, 21(2001):5344). El presente estudio estuvo orientado a estudiar si el inhibidor de la recaptación de anandamida AM404 (0.4, 2, 10 y 50 mg/kg, i.p.) sería capaz de modificar la autoadministración intravenosa de morfina en ratas Wistar macho, utilizando tanto el paradigma de refuerzo continuo (FR 1) como el de razón progresiva. Los resultados obtenidos sugieren que el AM404 no es capaz de modificar la autoadministración de morfina a dosis que interactúan con el transportador de anandamida. Sin embargo, la dosis más elevada utilizada en este estudio (50 mg/kg) disminuye el número de respuestas operantes para obtener morfina. Debido a que ha sido descrito en la bibliografía (Zygmung y cols., *Eur. J. Pharmacol.* 396(2000): 39, Smart y Jerman, *Trends Pharmacol. Sci* 21(2000): 134, Jerman y cols., *Br. J. Pharmacol* 129(2000): 73) que el AM404 pierde su selectividad por el transportador de anandamida a concentraciones micromolares, posiblemente los efectos de la dosis de 50 mg/kg de AM404 podrían no ser debidos al bloqueo del transportador sino a sus efectos en los receptores vaniloideos o adrenérgicos (De Petrocellis y cols., *FEBS lett* 483 (2000): 52; Beltramo y cols., *J. Neuroscience* 20(2000): 340). Estos resultados sugieren que la autoadministración de morfina aparentemente no afecta a la producción de anandamida en el circuito de recompensa.

Este trabajo fue posible gracias a la financiación del MCYT y del Plan Nacional Sobre Drogas.

## **EFFECTOS LOCALES DEL ANTAGONISTA CANNABINOIDE SR141716A EN LOS GANGLIOS BASALES EN RATAS PARKINSONIANAS**

Fadwa El Banoua, Isabel Caraballo, Juan A. Flores, Beatriz Galán, Emilio Fernández Espejo  
Departamento de Fisiología Médica. Universidad de Sevilla. 41009 Sevilla.

En nuestro laboratorio se ha observado el efecto antiparkinsoniano positivo del SR141716A sistémico, antagonista cannabinoide CB1, en ratas con degeneración extensa del circuito nigroestriado inducida por 6-hidroxidopamina. Por este motivo, se han evaluado los efectos locales del SR141716A en estriado dorsal, globo pálido, sustancia negra y núcleo subtalámico del circuito dañado, en combinación con ligandos dopaminérgicos y GABAérgicos. En estriado dorsal y globo pálido, la infusión local de SR141716A ejerce un efecto positivo dependiente de dosis, disminuyendo el giro inducido por anfetamina. En el estriado, este efecto está mediado por la estimulación de los receptores D1 de dopamina y el bloqueo de los D2. Sin embargo, no se ha detectado interacción del antagonista cannabinoide con antagonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>, indicando que la actividad GABA del estriado no participa en los efectos del SR141716A. En el globo pálido, los receptores D1 y D2 parece que no participan en el efecto del fármaco cannabinoide. En la sustancia negra, se ha observado que el SR141716A ejerce efectos opuestos dependiendo del grado de lesión de la misma. Así, existe un efecto negativo con aumento del giro inducido por anfetamina en ratas con lesión moderada (inferior al 94%, medido mediante contaje celular), pero dicho efecto es positivo en ratas con lesión extensa. Esto concuerda con los datos de la administración sistémica, donde solo las ratas con lesión extensa responden al SR141716A. Además, el antagonismo GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> ejerce efectos opuestos también dependiendo del grado de lesión, pues el efecto es positivo en ratas con lesión moderada y negativo en ratas con lesión extensa. Esto indica que el grado de lesión altera la normal actividad GABAérgica en la sustancia negra. Sin embargo, no hay interacción entre el SR141716A y los antagonistas GABA, mostrando que el efecto del SR141716A no se debe a cambios en la actividad GABAérgica. Finalmente, se han detectado efectos bifásicos en el núcleo subtalámico, dependiendo de la dosis.

Subvencionado a EFE por Ministerio de Educación y Cultura (PM98.015), Plan Andaluz de Investigación /CVI-127) y Laboratorios Dr. Esteve.

## MECANISMO DE INHIBICIÓN DE NF- $\kappa$ B POR EL ENDOCANABINOIDE ANANDAMIDA

Rocío Sancho\*, Marco A. Calzado\*, Giovanni Appendino<sup>#</sup> y Eduardo Muñoz

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, España, y <sup>#</sup>DiSCAFF, Università Piemonte, Novara, Italia.

\*Contribuyen igualmente.

La Anandamida (2-arachidonoyl-ethanolamide, AEA), es un ligando endógeno tanto para el receptor de cannabinoides (CB1) como para el receptor de vanilloides (VR1), siendo considerado en la actualidad un endovanilloide/endocanabinoide. Esta molécula es sintetizada por el propio organismo en respuesta a determinadas situaciones de stress, y está implicada en procesos analgésicos mediante su unión a estos receptores neuronales. Aunque todavía es un dato controvertido, la interacción de AEA con VR1 puede inducir desensibilización de neuronas nociceptivas (VR1<sup>+</sup>). Independientemente de sus acciones sobre el sistema nervioso, la AEA presenta otras acciones biológicas de las que podemos destacar sus efectos anti-inflamatorios y reguladores de la respuesta inmune. Estos efectos biológicos parecen estar mediados por mecanismos independientes de los receptores VR1 y CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>. Debido al importante papel que desempeña el factor de transcripción NF- $\kappa$ B en los procesos inflamatorios y en la regulación del sistema inmune, hemos estudiado la posible implicación de la AEA y otras N-acyl-vanillaminas en la ruta de activación de NF- $\kappa$ B.

Nuestro trabajo demuestra que la AEA inhibe la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$  mediante inhibición directa del complejo IKK, dato que correlaciona con la inhibición de la actividad quinasa de las IKKs y la posterior degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , unión de NF- $\kappa$ B al DNA y de la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B. Mediante experimentos de sobre-expresión de kinasas de la ruta de NF- $\kappa$ B (MEKK, NIK, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ ) hemos identificado que la diana de este endocanabinoide radica preferentemente en la subunidad IKK $\beta$  del complejo IKK. Este efecto inhibitorio es independiente de la activación de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en las líneas celulares A549 y Jurkat 5.1, que no expresan VR1, y no es mediado por los productos de hidrólisis de la AEA generados por la FAAH (*fatty acid amide hydrolase*).

La modificación por síntesis química de la AEA nos ha mostrado una estrecha relación estructura-actividad de la molécula con su actividad inhibidora de NF- $\kappa$ B. La sustitución de cola alkyl con ácidos grasos menos saturados generalmente reduce o incluso suprime la actividad NF- $\kappa$ B-inhibidora de la AEA. Por el contrario el cambio de la etanolamina por un grupo vanilloide incrementa la actividad inhibidora para ese factor.

Estos datos no sólo ayudan a dilucidar el mecanismo por el cual la AEA ejerce sus funciones biológicas sino que también proporcionan nuevos conocimientos para el desarrollo de moléculas anti-inflamatorias con gran potencial farmacológico.

## **EFFECTO DE LA ANANDAMIDA EN AORTA DE RATA**

V. López-Miranda, C. Goicoechea, D. Pascual, M.I. Martín

Universidad Rey Juan Carlos, Facultad CC de la Salud, Dpto. CC de la Salud, Área de Farmacología. Avda. Atenas s/n, 28922 Alcorcón.

Investigaciones recientes han implicado al sistema cannabinoide endógeno en la regulación del tono vascular. En el territorio vascular, los cannabinoides causan vasodilatación, si bien ésta es de magnitud variable según el lecho vascular de que se trate (J Pharm Exp Ther 2000; 294:27-32). Los mecanismos implicados en dicha vasodilatación se desconocen hasta el momento, pero se han propuesto como posibles, acciones directas de los cannabinoides en el endotelio o la musculatura lisa vascular (J Pharmacol Exp Ther 1997; 281:1030-1037), inhibición de la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas perivasculares (Br J Pharmacol 1999; 126:457-466), hiperpolarización (Trends Pharmacol Sci 1998; 19:55-58) y/o activación de los receptores vanilloides (VR1) localizados en las terminaciones nerviosas perivasculares con la consecuente liberación de péptidos vasodilatadores (Nature 1999; 400:452-457).

El objetivo de nuestro trabajo ha sido evaluar las respuestas vasculares producidas por anandamida en preparaciones de aorta aislada de rata. Para ello, tras sacrificar a los animales (ratas macho Wistar adultas de 225-250 g) se extrajo la porción torácica de la aorta, se limpió y se cortó en anillos de 1-2 mm de ancho que se colocaron en un baño de órganos que contiene como líquido nutricio solución Krebs-Kenseleit a 37°C burbujeada con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). En arterias precontraídas con fenilefrina (10<sup>-6</sup> M) se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta de carbacol (10<sup>-10</sup> M - 10<sup>-5</sup> M) y anandamida (10<sup>-9</sup> M - 10<sup>-4</sup> M) en presencia y/o ausencia de un inhibidores selectivos de receptores cannabinoides CB1 (SR141716A, 3 µM), de la óxido nítrico sintasa (L-NAME, 100 µM) y de la ciclooxigenasa (indometacina, 10 µM).

En aorta de rata, carbacol y anandamida producen una vasorelajación concentración-dependiente, que es mayor en el caso del carbacol (Carbacol Emax: 84.2% ± 9.5%; Anandamida Emax: 43.0% ± 8.1%). El SR141716A bloqueó parcialmente y de forma significativa tanto la relajación inducida por carbacol (Emax: 65.7% ± 8.4%; p ≤ 0.05) como la relajación inducida por anandamida (Emax: 26.9% ± 5.6%). Por otra parte, L-NAME e indometacina bloquearon totalmente la relajación inducida por carbacol (Emax: 6.8% ± 3.7%, p ≤ 0.05) y únicamente de forma parcial pero también significativa la relajación inducida por anandamida (Emax: 25.1% ± 4.4%, p ≤ 0.05).

De estos resultados podríamos concluir que la anandamida es vasodilatadora en aorta de rata y que dicha vasodilatación podría implicar dos mecanismos: uno dependiente de óxido nítrico y otro dependiente de receptores CB1.

Este proyecto está financiado por la Universidad Rey Juan Carlos (PIGE-02-16)

## EDAD Y POBLACIÓN DE RECEPTORES CB1 DE PLEXO MIENTÉRICO DE ÍLEON DE COBAYO. RESULTADOS PRELIMINARES.

R. Abalo, A., Rivera, M.I. Martín, E. García-Poblete, H. Fernández, E. Moro.  
Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Madrid.

**Introducción.** Los estudios de farmacología básica utilizando la preparación de fibra longitudinal-plexo mientérico de íleon de cobayo (FL-PM) han demostrado que existen receptores cannabinoides CB1 en el plexo, cuya estimulación conduce a la inhibición de la respuesta contráctil de la preparación. También se han realizado estudios *in vivo* en diferentes especies de animales, que han mostrado la influencia inhibitoria de los agonistas cannabinoides sobre la motilidad del tracto gastrointestinal (peristaltismo, etc.). Últimamente, mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha localizado el receptor CB1 en el sistema nervioso entérico de diferentes animales. Concretamente, en plexo mientérico de íleon de cobayo se ha demostrado una gran población de neuronas inmunoreactivas para CB1 y su localización con diferentes marcadores (calretinina, calbindina, acetilcolina transferasa...). Se ha descrito en plexo mientérico que existe degeneración neuronal con la edad, pero no se sabe con certeza si se trata de una degeneración inespecífica o si existen poblaciones celulares especialmente afectadas o conservadas.

**Objetivo.** Determinar en plexo mientérico de íleon de cobayo si se produce una variación asociada a la edad en la presencia de receptores CB1 y su colocalización con calretinina.

**Material y métodos.** Se utilizaron cobayos albinos hembra de dos grupos de edad: 1-2 meses (grupo 1) y de 9-10 meses (grupo 2). Se aislaron preparaciones de FL-PM para cada grupo y se sometieron a marcaje inmunohistoquímico con diferentes marcadores:

- anti-Hu: marca selectivamente todos los cuerpos neuronales
- anti-CR: marca las neuronas y fibras que contienen calretinina
- anti-CB1: para localizar las neuronas con receptores cannabinoides CB1

La siguiente tabla muestra los anticuerpos (Ab) primarios y secundarios utilizados:

Ab primario	Dilución	Ab secundario	Dilución
Hu biotinilado	1:500	Streptavidina-AlexaFluor 488	1:1000
CR (cabra)	1:1000	Anti-cabra – RRX	1:100
CB1 (conejo)	1:100	Anti-conejo – CY5	1:100

Tras su montaje, las preparaciones se observaron mediante microscopía de fluorescencia y confocal y se realizó el recuento de células totales (Hu), de células positivas para calretinina (CR) y de células positivas para CB1 (CB1), así como la colocalización de CR y CB1. Los resultados se expresan como la media de densidad para cada población neuronal  $\pm$  error estándar de la media ( $n = n^\circ$  de muestras). Para el análisis estadístico se utilizó la t de student.

**Resultados.** No se observó modificación significativa en la densidad total de neuronas en área ganglionar cuando se compararon los dos grupos de edad. En el grupo 1, un 92% del total de células fueron inmunorreactivas para CB1 (CB1+) y un 15%, para calretinina (CR+). La población de células CR+ disminuyó significativamente en el grupo 2 (30%,  $p=0.0076$ ). La población de células CB1+, en cambio, se mantuvo inalterada, como se refleja en la tabla:

	CB1 total	CB1+/CR+	CB1+/CR-
<b>Grupo 1 (jóvenes)</b>	1479 $\pm$ 65.98 (5)	170.0 $\pm$ 31.19 (3)	1238 $\pm$ 70.76 (3)
<b>Grupo 2 (adultos)</b>	1394 $\pm$ 75.79 (3)	151.3 $\pm$ 5.175 (3)	1242 $\pm$ 70.81 (3)

**Conclusiones.** Frente a lo que sucede con otras poblaciones neuronales (inmunorreactivas para calretinina), las neuronas que expresan receptores cannabinoides CB1 parecen ser preservadas en el plexo mientérico de cobayos adultos, lo que podría significar que son neuronas especialmente importantes para el mantenimiento de la función mientérica.

**Agradecimientos.** Financiado por la Universidad Rey Juan Carlos (PGRAL-2001/11 y PGRAL-2001/3). El Dr. Ken Mackie (Univ. Washington) nos proporcionó el anti-CB1.

## CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA *IN VIVO* DE UN NUEVO ANTAGONISTA CANNABINOIDE

Suardíaz, M., Pascual, D., \*Hernández-Folgado, L., \*Jagerovich, N., \*Goya, P., Martín, M. Unidad de Farmacología. Departamento CC. De la Salud. Fac CC. de la Salud. Universidad Rey Juan Carlos. Alcorcón 28922. Madrid.\* Instituto de Química Médica. CSIC. Madrid

A partir de la estructura química de los cannabinoides naturales y endógenos se han desarrollado numerosos ligandos sintéticos, agonistas y antagonistas selectivos de los receptores CB1 y CB2. El LH1.21 (5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-3-hexil-1*H*-1,2,4-triazol) es compuesto sintético con propiedades cannabimiméticas, demostradas mediante experimentos realizados *in vitro*, en la preparación FL-PM de íleon de cobayo y deferente de ratón, donde se ha comportado como antagonista cannabinoide, actuando probablemente sobre el receptor CB1.

El **OBJETIVO** de este trabajo fue la valoración de la actividad *in vivo* del compuesto LH1.21.

### Material y métodos.

La evaluación funcional se llevó a cabo mediante la realización de la clásica tetrada de tests en ratones para valorar efectos cannabinoides: **analgesia, catalepsia, hipotermia y disminución de la actividad espontánea**. Las pruebas a las que fueron sometidos los animales son el test de la placa caliente como test de analgesia, el “ring test”, descrito por Pertwee, para determinar la catalepsia, la valoración de la temperatura rectal y los cambios en la actividad locomotora, que se valoraron mediante un actímetro.

Los compuestos utilizados como fármacos patrón fueron el WIN55-212-2 (WIN) (1.5 mg/kg), como agonista de los receptores CB1/CB2, y el SR141716A (SR) (1 mg/kg), como antagonista/agonista inverso del receptor CB1. Los efectos fueron comparados con el LH1.21 (0.25 a 1 mg/kg). Todos los fármacos fueron administrados por vía intraperitoneal.

### RESULTADOS

La administración del agonista cannabinoide WIN produjo una disminución de la temperatura rectal de aproximadamente 2 C°. El LH1.21 fue capaz de bloquear significativamente esta hipotermia, al igual que el SR. Ambos compuestos, SR y LH1.21 bloquearon de forma significativa la analgesia producida por el agonista cannabinoide reduciéndola a valores similares a los del control. Tanto LH como SR fueron capaces de reducir en un 50% el tiempo de inmovilidad catatónica inducido por WIN. El antagonista patrón y el compuesto LH1.21 también consiguieron antagonizar las disfunciones motoras de producidas por el agonista cannabinoide.

Test	Hipotermia C°	Analgesia (M.E.P.)	“Ring test” (t° inmovilidad)	Actividad motora (n° cruces)
WIN	-2,17	54 ± 12,6 %	2' 38''	706
WIN+SR	-0.01***	12 ± 6%*	1' 25''***	1333 *
WIN+LH	-0.66 ***	17 ± 5%*	1' 36''***	1440 *

### CONCLUSIÓN

Aunque es necesaria la realización de más estudios, el compuesto de nueva síntesis LH1.21 se muestra como un antagonista cannabinoide de potencia similar al SR141716A.

Agradecimientos: Este trabajo está financiado por CICYT SAF2000-0114-C02-02



**P-9****CONDUCTA DE AUTOADMINISTRACION DE MORFINA Y ACTIVIDAD DOPAMINERGICA MESOLIMBICA EN RATAS ADULTAS EXPUESTAS PERINATALMENTE A  $\Delta^9$ -TETRAHIDROCANNABINOL**

Begoña González, Rosario de Miguel\*, Sonsoles Martín, Onintza Sagredo\*, Julián Romero\*\*, Carmen García-Lecumberri, Javier Fernández-Ruiz\*, José Antonio Ramos\*, Emilio Ambrosio Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, UNED, Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid; \*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040-Madrid, \*\*Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Fundación Hospital Alcorcón, c/Budapest s/n, 28922-Alcorcón

La exposición perinatal a  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) en ratas afecta al desarrollo de diversos neurotransmisores, entre ellos las neuronas opioidérgicas, originando en la edad adulta alteraciones a nivel de la sensibilidad al dolor, control neuroendocrino y respuesta a drogas reforzantes. En el presente estudio, se han estudiado los efectos de la exposición perinatal a  $\Delta^9$ -THC sobre la conducta de autoadministración de morfina en ratas adultas de ambos sexos, utilizando un programa de reforzamiento de razón progresiva por el que el animal tiene que ir incrementando progresivamente sus respuestas operantes para obtener el reforzador. Un grupo aparte de animales ejecutaron el mismo programa de reforzamiento pero empleando alimento como reforzador. Los estudios comportamentales fueron completados con análisis de los contenidos de dopamina (DA) y su principal metabolito, DOPAC, en regiones del sistema límbico durante tres fases diferentes del procedimiento experimental: (i) antes de someter al animal al modelo de autoadministración intravenosa de morfina; (ii) inmediatamente después del periodo de autoadministración; y (iii) después de la extinción de esa conducta. Los resultados demostraron que, con ambos reforzadores, morfina o alimento, las hembras alcanzaban mayores frecuencias de autoadministración que los machos, y que este efecto era independiente del tratamiento con  $\Delta^9$ -THC. Esta observación se corresponde con la evidencia de una mayor actividad dopaminérgica en el núcleo accumbens de las hembras antes de ser sometidas al desafío con morfina, como reflejaron los datos de la relación DOPAC/DA. Curiosamente, las hembras tratadas perinatalmente con  $\Delta^9$ -THC no presentaban esta elevación pareciéndose en sus valores, tanto en el núcleo accumbens como en el área ventral-tegmental, a los machos controles y tratados con  $\Delta^9$ -THC. No obstante, una vez iniciado el proceso de autoadministración de morfina, todos estos cambios neuroquímicos desaparecieron, y no volvieron a aparecer tras 15 días de extinción de la conducta de autoadministración de morfina. En conclusión, nuestros datos sugieren que las ratas hembras son más vulnerables que los machos en paradigmas de condicionamiento operante reforzados con morfina o comida, y que este efecto no es influenciado por la exposición a  $\Delta^9$ -THC durante la época del desarrollo prenatal y postnatal. Es posible que ello se deba a la mayor actividad de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas en las hembras previamente al desafío con morfina, aunque, desde el punto de vista neuroquímico, la exposición perinatal a  $\Delta^9$ -THC sí que redujo la actividad de estas neuronas en las hembras, aunque esto no tuvo un reflejo a nivel comportamental.

Financiado por el MCYT (PM99-0056) y la Comunidad de Madrid (08.5/0063/2001 y 08.8/004/97.2)

## P-10

## ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS CAMBIOS QUE LA EXPOSICION PROLONGADA A DIVERSAS DROGAS DE ABUSO PRODUCE SOBRE LA ACTIVIDAD ENDOCANNABINOIDE EN ESTRUCTURAS DEL SISTEMA LIMBICO

Sara González, Javier Fernández-Ruiz, Maribel Cebeira, José Antonio Ramos

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

Se ha propuesto que el sistema endocannabinoide podría ser uno de los sustratos neuroquímicos implicados en la recompensa cerebral, de forma que podría desempeñar un papel en la dependencia a cannabis y también a otras drogas de abuso. Si esta hipótesis es cierta, cabría esperar que la exposición prolongada a diferentes drogas de abuso (a dosis y tiempos de tratamiento que se sabe que producen dependencia a estas drogas) debería producir efectos similares sobre la actividad endocannabinoide en aquellas regiones cerebrales implicadas en los fenómenos de refuerzo por drogas como son las estructuras que forman parte del sistema límbico. En este trabajo, hemos analizado las concentraciones de anandamida, uno de los principales endocannabinoides a nivel cerebral, y la densidad y expresión de ARN mensajero para el receptor CB<sub>1</sub> en diversas estructuras límbicas del cerebro de ratas tratadas de forma prolongada con morfina, cocaína, alcohol o nicotina (ver procedimientos en la base de la siguiente tabla). Los resultados se recogen en la siguiente tabla:

Parámetros	Regiones	+ morfina <sup>1</sup>	+ cocaína <sup>2</sup>	+ alcohol <sup>3</sup>	+ nicotina <sup>4</sup>
[anandamida]	Area límbica anterior	=	=	↑	↑
receptor CB <sub>1</sub>	Núcleo accumbens	↑	=	=	=
	Núcleos del septo	↑	=	=	=
	Amígdala	↓	=	=	-
ARNm receptor CB <sub>1</sub>	Núcleos del septo	↑	=	=	↓
	Amígdala	=	=	=	=

<sup>1</sup> dosis crecientes (i.p., 2 veces al día) desde 10 mg/kg hasta 100 mg/kg durante 6 días

<sup>2</sup> dosis de 15 mg/kg (i.p., 2 veces al día) durante 10 días

<sup>3</sup> 7.2% de etanol en el agua de bebida durante 15 días

<sup>4</sup> dosis de 1 mg/kg (s.c. 1 vez al día) durante 7 días

Como se observa en la tabla, los cambios producidos por cada una de las drogas, tanto en las concentraciones de anandamida como a nivel de los receptores CB<sub>1</sub> en diferentes regiones del sistema límbico no resultaron ser, en todos los casos, similares, lo que apoya la hipótesis de que la implicación del sistema endocannabinoide en los fenómenos de refuerzo y dependencia a drogas sería distinta para cada tipo de droga. Sin embargo, es destacable que los niveles de anandamida incrementaron durante la dependencia a alcohol o nicotina, un hecho que también ha sido visto durante la dependencia a cannabinoides (Di Marzo et al., *J. Neurochem.* 74 : 1627-1635, 2000), y que explicaría, además, el papel que se ha atribuido a los antagonistas de los receptores CB<sub>1</sub> en la ingesta de alcohol.

Financiado por el Plan Nacional sobre Drogas y por el MCYT (PM99-0056)

## LA VARIANTE *Faah*<sup>Thr129</sup> NO ES UN FACTOR DE VULNERABILIDAD AL ALCOHOLISMO EN PACIENTES ESPAÑOLES

I Ampuero<sup>1</sup>, G.Ponce<sup>2</sup>, G.Rubio<sup>2</sup>, M.A.Jiménez<sup>2</sup>, T.Palomo<sup>2</sup>, J.Ramos<sup>1</sup>, J. Hoenicka<sup>1</sup>.

1 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

2 Servicio de Psiquiatría, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

El alcoholismo es un trastorno de la conducta de origen complejo, interviniendo en su aparición factores ambientales y genéticos (40-60% del riesgo total).

El sistema dopaminérgico, modulado por el sistema endocannabinoide, es el sustrato fundamental que media los procesos de recompensa y sobre el cual actúan directa o indirectamente las drogas de abuso.

Por ello se ha investigado la implicación de variantes alélicas en genes del sistema endocannabinoide, tales como *CNRI* (gen del receptor de cannabinoides tipo I) y *FAAH* (gen de la Hidrolasa de Amidas de Ácidos Grasos), encontrándose en algunas poblaciones una asociación entre variantes de estos genes y los trastornos adictivos.

Empleando técnicas basadas en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) hemos analizado un polimorfismo de un nucleótido ( SNP ) del gen *FAAH* en 199 pacientes alcohólicos españoles y 58 individuos control .

El SNP 385C→A produce en la proteína el cambio de la Prolina en posición 129 por una Treonina. *Faah*<sup>Thr129</sup> tiene las mismas propiedades catalíticas que *Faah*<sup>Pro129</sup> pero presenta una mayor sensibilidad a la degradación proteolítica.

El análisis estadístico de los resultados indica que este polimorfismo no es un factor de vulnerabilidad genética para la aparición del alcoholismo en población española.

## **MECANISMO DE LA INHIBICION DE LA LIBERACION DE GLUTAMATO POR AGONISTAS DE RECEPTORES DE CANNABINOIDES**

M.C. Godino y J. Sánchez-Prieto

Departamento de Bioquímica. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid 28040

La transmisión sináptica glutamatérgica está regulada por los endocannabinoides que se sintetizan en respuesta a la despolarización de la célula postsináptica. Estas sustancias lipofílicas son liberadas desde la célula postsináptica alcanzando los terminales sinápticos donde inhiben la liberación de neurotransmisor. Si bien la activación de los receptores de cannabinoides pone en marcha distintas vías de señalización se desconoce el sistema de transducción de señales presináptico responsable de la inhibición de la exocitosis de glutamato.

En preparaciones de terminales sinápticos (sinaptosomas) de corteza cerebral de rata hemos determinado los cambios producidos por los endocannabinoides en las concentraciones de segundos mensajeros y en la liberación de glutamato. Los datos obtenidos muestran que el agonista araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA) reduce la liberación de glutamato inducida por la despolarización de la membrana plasmática. Esta acción inhibitoria, es revertida por el antagonista SR-141716, tiene lugar en ausencia de cambios en los niveles de AMPc y conlleva una reducción en la entrada de calcio en el terminal sináptico, lo que sugiere la inhibición directa de la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  acoplados a la exocitosis de glutamato. La inhibición de la liberación no implica la participación de una cascada de segundos mensajeros que activen la proteína quinasa C o A. Sin embargo, la activación la PKC con ésteres de forbol suprime la acción inhibitoria de los cannabinoides sobre la liberación. La reducción de la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  se ha puesto de manifiesto en experimentos en los que se ha determinado la respuesta de  $Ca^{2+}$  a la despolarización, tanto en la población de terminales, como en botones sinápticos individuales cargados con fura-2.

Además de modular canales de  $Ca^{2+}$ , los receptores de cannabinoides inhiben la liberación de glutamato por un mecanismo adicional, como sugiere la mayor inhibición de la liberación observada en la despolarización con 4-aminopiridina en comparación con  $K^+$ . Puesto que sólo la liberación inducida por 4-aminopiridina es inhibida con el antagonista de canales de  $Na^+$  tetrodotoxina, cabe pensar que el mecanismo adicional de los cannabinoides implicado en la inhibición de la liberación involucra a un canal de  $Na^+$  o  $K^+$  que participa en los potenciales de acción. Dado que los cannabinoides reducen también más la entrada de  $Ca^{2+}$  con 4AP que con  $K^+$ , parece lógico pensar que el mecanismo adicional de inhibición de la liberación redundaría finalmente en una disminución de la entrada de  $Ca^{2+}$  en el terminal sináptico.