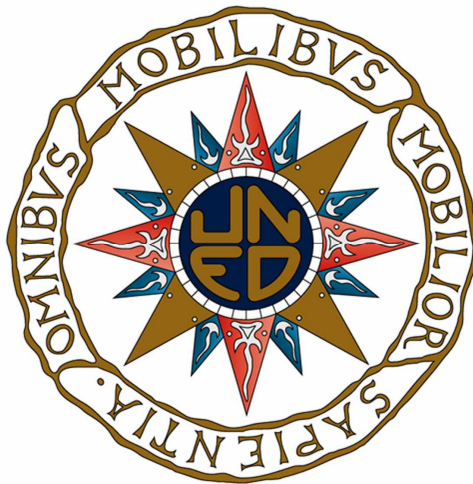


TESIS DOCTORAL



Estudio de los Efectos Psiconeuroendocrinos en la Edad
Adulta de un Tratamiento Crónico con el Agonista
Cannabinoide CP 55,940 en Ratas Adolescentes de Ambos
Sexos

Alejandro Higuera Matas, Licenciado en Psicología

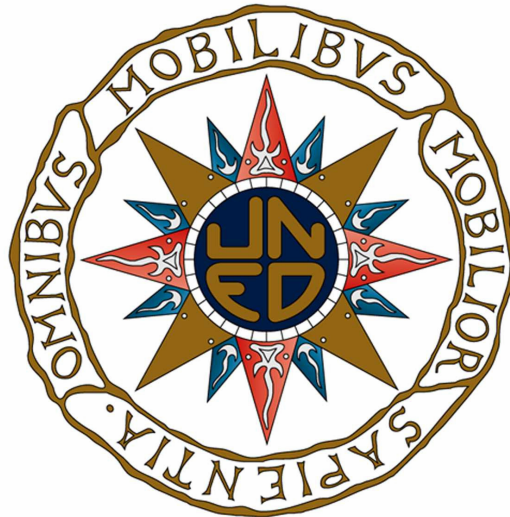
Departamento de Psicobiología

Facultad de Psicología

Universidad Nacional de Educación a Distancia

2008

Departamento de Psicobiología
Facultad de Psicología



Estudio de los Efectos Psiconeuroendocrinos en la Edad Adulta de
un Tratamiento Crónico con el Agonista Cannabinoide CP 55,940 en
Ratas Adolescentes de Ambos Sexos

Alejandro Higuera Matas

Director: Emilio Ambrosio Flores

Universidad Nacional de Educación a Distancia

2008

Agradecimientos

En primer lugar a la persona responsable de que este proyecto haya salido adelante de una excelente manera (al menos creo yo), mi director, Emilio. Él como nadie es capaz de infundirte confianza y tranquilidad. Él me ha enseñado la máxima lección que hay en Ciencia, la necesidad de la **PA**ciencia. Además, porque en todo momento se ha comportado más como un amigo que como un director de tesis, siempre se ha preocupado por mí a todos los niveles, hemos compartido risas y penas, agobios y alegrías. Porque nunca ha dudado en ponerse la bata y los guantes para ayudar en todo lo necesario (todavía me acuerdo de esos fines de semana en los que entre los dos teníamos que pinchar a cientos de ratas). Por su indudable calidad como persona, por su calidez y su buen hacer. Le tengo que agradecer que me haya dejado formar parte de un gran equipo, que es para mí como otra familia, y que siempre haya mostrado una gran confianza en mí; por todo ello gracias Emilio, muchas gracias. Siempre te estaré agradecido.

A la doctora Carmen García Lecumberri, por estar siempre con nosotros y apoyar nuestro trabajo de una manera excelente, gracias a ella, las cosas salen siempre mejor. Por su amabilidad y nobleza y por todos los ratos que hemos compartido juntos y que me han ayudado a seguir adelante. Gracias Carmen.

A mis dos grandes amigos Nuria y Miguel (o Miguel y Nuria, como se prefiera), por ser una constante fuente de inspiración y motivación. Nuria (dotooooora) muchas gracias por acompañarme en este camino (que no ha sido precisamente de rosas), por todos los ratos que hemos compartido y en los que nos hemos apoyado el uno en el otro, no ha sido fácil, pero lo vamos consiguiendo. Gracias por tu candor, por tu simpatía, por tu bondad, por tu disposición de ayuda incesante, por tu guía en la Ciencia y en la Vida, y sobre todo por tu amistad. Siempre podrás contar conmigo para lo que necesites. Te agradezco además toda tu ayuda con la electrofisiología. Miguel (Y dijo el Señor...) nunca te agradeceré lo suficiente toda tu ayuda, todo tu apoyo. Me has facilitado todo mucho (y no hablemos de la microdiálisis), y además lo hemos pasado en grande (todo sea dicho). Gracias por todos los proyectos que compartimos, gracias por hacerme partícipe de tu ilusión y contagiármela, gracias por darme tu mano cuando la necesitaba, gracias a ti también por tu amistad, que es uno de los grandes tesoros que me llevo de esta Tesis. Gracias.

A Gonzalo López Montoya, por las conversaciones agradables, los buenos ratos de juerga, las elucubraciones científicas y por todas esas charlas en las que nos hemos reído tanto. Gracias por tu ayuda con el PET y por hacer de enlace con todo el mundillo de la neuroimagen.

A Marisa Soto y la gente del Gregorio Marañón por su colaboración en los experimentos de neuroimagen funcional.

A Óscar Olías, por estar siempre dispuesto a echar una mano en todo lo que se necesite y por su ayuda.

A mis niñas Érika y Laura (Killo y Lau), por su amistad absolutamente incondicional, por su cariño, porque siempre, siempre, han estado ahí cuando las he necesitado, a todos los niveles (desde hacer un Western (Lau) o un Elisa (Eri), hasta comprarme un cookie monster cuando estaba bajo de ánimo). Muchas gracias chicas, os lo dice con cariño el algodónoso.

A Fanny Botreau, por su increíble profesionalidad, su temperamento, su carisma y por la mutua comprensión que compartimos. Además, por su ayuda con los experimentos de aprendizaje, memoria y ansiedad.

Al Departamento de Psicobiología de la UNED, a su profesorado, en especial a César Venero por su ayuda con todos los experimentos de aprendizaje y memoria.

A Miguel Biscaia, porque me acompañó en mis primeros momentos en el laboratorio y tuvimos conversaciones apasionantes. Espero que todo le vaya bien.

A Luis Troca, Alberto Marcos y Rosa Ferrado, por su inestimable ayuda técnica y por compartir tantas cosas. Gracias a ellos todo ha sido mucho más fácil.

A Elena Mesa, por su simpatía, su energía y optimismo, por animar las mañanas frías de invierno con su conversación y su calidez.

Al resto del personal de laboratorio y animalario (Luis Carrillo, Luis Gavilán, Matías, Telmo, Mariano, Gonzalo y Pilar), por su apoyo.

A Belén y Mela, por su ayuda, por su simpatía y por su calidez.

Quiero también hacer un homenaje a las casi cuatrocientas ratas que se han utilizado en mis experimentos. Nunca olvidemos que sus vidas nos han permitido crecer como sociedad. Que siempre seamos responsables con los animales, que los cuidemos, los tratemos con respeto y dignidad. Se lo merecen tanto como nosotros.

A las personas que me acompañaron en mis primeras etapas de formación como psicobiólogo: Milagros Gallo y Amadeo Puerto, por descubrirme mi vocación.

A Juan Manuel Jiménez Ramos, por su amistad, su apoyo constante, sus ideas y por abrirme su confianza.

A mi gente de la Facultad de Psicología de la Universidad de Granada: En especial a Sole y Aurora, por estar siempre conmigo, por su preocupación, y sobre todo por ser personas con un corazón inmenso a las cuales tengo la suerte de poder llamar amigas.

A mis amigos de Madrid: Ángel, Javi, Juan, Josemar, Santi y los demás, por ser buenos amigos y por todas las noches de juerga inconfesables.

A mis amigos de Granada: Rafa U., Rafa G., Migue Toledo, Antonio Jesús, Paco, Jorge, Carmen San, por ser lo que sois, grandes amigos y por vuestra amistad desde hace más de veinte años. A Rafa G. además por su ayuda con la portada de esta Tesis.

A mis tíos Roberto y Paloma y a mi primo Gonzalo, por ser como mis segundos padres y mi hermano. Por ser una familia cercana y cariñosa, siempre generosos. Por todas las conversaciones

interesantes que hemos tenido, por facilitarme infinitamente la vida y por cuidarme siempre que lo he necesitado.

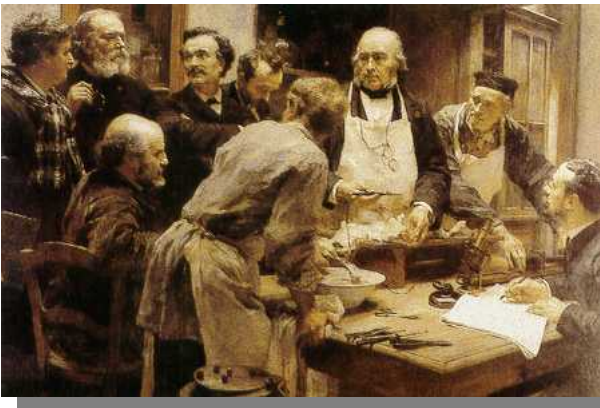
A mis hermanos porque gracias a ellos ahora soy una persona más fuerte.

A mis tres perros: Cali, Chuflo y Do, por su cariño incondicional, lealtad y nobleza.

A ti.

Y por último y por ello más importante para mí. A mis padres. Es imposible describir con palabras el agradecimiento inconmesurable que les tengo. Siempre han estado conmigo cuando les he necesitado, siempre me han guiado por el recto camino. A ti Papá, porque eres ejemplo de rectitud y valentía. Por enseñarme el valor del trabajo, por sacarnos a todos adelante, por mostrarme el valor de la familia y por tus sabios consejos. A ti Mamá, por ser una madre en el sentido más amplio de la palabra, por anteponer siempre tus hijos a tus propias necesidades, por haberme acompañado en la vida, por cuidarme, por guiarme, por compartir conmigo tus pensamientos, alegrías, y lamentos. Soy lo que soy gracias a vosotros y nunca olvidéis que conmigo habéis plantado una de esas semillas doradas que luego dan fruto en un árbol reluciente, de éstos que forman bosques brillantes que se ven en la noche, desde todas las colinas. Muchas gracias.

Gracias a todos.



"El Arte es Yo, la Ciencia es Nosotros".

Claude Bernard

(1813-1878. Padre de la Medicina Experimental)



A mis padres, siempre a mis padres

Índice

Lista de Abreviaturas	14
Lista de Figuras y Tablas	16
Resumen	19
INTRODUCCIÓN	21
1. Aspectos Generales	22
1.2. Adolescencia y Pubertad	22
1.3. Breve Historia y Antropología de la Adolescencia	22
1.3.1. El nacimiento de la juventud en la Roma antigua	22
1.3.2. La creación de la adolescencia en la época industrial	24
1.3.3. La adolescencia en las sociedades tradicionales	28
1.3.4. La adolescencia en la sociedad contemporánea	29
1.4. La Adolescencia vista como Desequilibrio Psíquico	29
1.5. La Adolescencia como Período de Consecución de Objetivos: Las Tareas de la Adolescencia.	30
2. La Pubertad	32
2.1. El Inicio de la Pubertad	32
2.2. Temporalización	35
2.3. Desarrollo de las Características Sexuales Secundarias	36
2.3.1. En la mujer	36
2.3.2. En el varón	38
3. La Adolescencia	40
3.1. Cambios Conductuales en la Adolescencia	40
3.1.1. Conductas asociadas al riesgo	40
3.1.2. Conducta social	42
3.2. El Cerebro Adolescente en Desarrollo	44
3.2.1. Maduración de los circuitos motivacionales	46
3.2.2. Desarrollo de los principales sistemas de neurotransmisión durante la adolescencia	53
4. El Sistema Cannabinoide	57
4.1. Sistema Cannabinoide Endógeno	57
4.1.1. Receptores cannabinoides	57
4.1.2. Mecanismos intracelulares de transducción	63
4.1.3. Endocannabinoides	66
4.1.4. Agonistas cannabinoides exógenos	71
4.2. Efectos Fisiológicos y Posibles Usos Terapéuticos de los Cannabinoides	76
4.2.1. Control de la actividad motora	76
4.2.2. Control de la ingesta y del balance energético corporal	79
4.2.3. Regulación de la función neuroendocrina	81
4.2.4. Efectos sobre la nocicepción	83
4.2.5. Control de la ansiedad y otras conductas emocionales	84
4.2.6. Efectos sobre el aprendizaje y la memoria	85
4.2.7. Efecto sobre la reproducción y la conducta sexual	87
4.2.8. Efectos psicológicos	88
4.3. Implicación del Sistema Cannabinoide Durante el Desarrollo	90
4.3.1. Efectos de los cannabinoides durante el desarrollo	90
4.4. Los Cannabinoides como Drogas de Abuso	95
4.4.1. Consumo de cannabinoides en humanos	95
4.4.2. Propiedades reforzantes de los cannabinoides. Fenómeno de dependencia y tolerancia	96
4.4.3. Mecanismo de recompensa y sistema cannabinoide	102
PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	105

CAPÍTULO I: Efectos de los cannabinoides en la adolescencia sobre la adicción a la cocaína y el metabolismo cerebral basal en la vida adulta.....	107
1. Resumen.....	108
2. Introducción.....	109
3. Materiales y Métodos.....	111
3.1. Animales y Tratamiento Farmacológico.....	111
3.2. Aparatos.....	112
3.3. Procedimientos Experimentales.....	112
3.4. Análisis de los Datos.....	115
4. Resultados.....	116
4.1. Peso Corporal.....	116
4.2. Autoadministración de Cocaína.....	116
4.3. Tarea Operante Reforzada con Comida.....	117
4.4. TEP: Mapas Paramétricos Estadísticos (SPM).....	117
5. Discusión.....	118
CAPÍTULO II: Efectos de los cannabinoides en la adolescencia sobre el metabolismo cerebral tras una inyección de cocaína en la etapa adulta.....	125
1. Resumen.....	126
2. Introducción.....	127
3. Materiales y Métodos.....	128
3.1. Animales, administración de fármacos y protocolo experimental.....	128
3.2. FDG-TEP.....	128
3.3. Análisis de Datos.....	129
4. Resultados.....	130
4.1. Hipocampo Dorsal.....	130
4.2. Hipocampo Ventral.....	130
4.3. Córtex Frontal.....	130
4.4. Amígdala.....	130
4.5. Tálamo.....	130
4.6. Cerebelo.....	131
4.7. Estriado Dorsal.....	131
5. Discusión.....	133
CAPÍTULO III: Efectos de los cannabinoides en la adolescencia sobre el sistema dopaminérgico adulto.....	137
1. Resumen.....	138
2. Introducción.....	139
3. Materiales y Métodos.....	141
3.1. Animales y Tratamiento Farmacológico.....	141
3.2. Aparatos.....	141
3.3. Procedimiento Experimental.....	141
3.4. Análisis de los Datos.....	144
4. Resultados.....	144
4.1. Transportador de Dopamina.....	144
4.2. Receptores D1 Dopaminérgicos.....	145
4.2. Receptores D1 Dopaminérgicos.....	146
4.3. Receptores D2 Dopaminérgicos.....	147
4.4. Expresión Génica de la Tirosina Hidroxilasa.....	149
4.4. Expresión Génica de la Tirosina Hidroxilasa.....	150
5. Discusión.....	150
CAPÍTULO IV: Efectos de los cannabinoides en la adolescencia sobre la ansiedad, el aprendizaje y la memoria en la vida adulta.....	157
1. Resumen.....	158

2. Introducción	159
3. Materiales y Métodos.....	162
3.1. Animales y Tratamiento Farmacológico.....	162
3.2. Pruebas Conductuales	162
3.3. Ensayos Bioquímicos y Determinaciones Hormonales	165
3.4. Estudio de la Plasticidad Sináptica Hipocampal: Potenciación a Largo Plazo.....	167
3.5. Análisis Estadísticos	168
4. Resultados	169
4.1. LCE	169
4.2. Prueba de Reconocimiento de Objetos	170
4.3. Laberinto Acuático de Morris	171
4.4. Hormonas y Bioquímica	174
4.5. Potenciación a Largo Plazo en el Hipocampo	176
5. Discusión.....	177
CONCLUSIONES	182
BIBLIOGRAFÍA	185
APÉNDICE DOCUMENTAL.....	221

Lista de Abreviaturas

2-AG: 2-Araquidonil-Glicerol

5-HT: 5-Hidroxitriptamina (serotonina)

a.C.: Antes de Cristo

AC: Adenilato Ciclasa

AMPc: Adenosín Monofosfato Cíclico

ATV: Área Tegmental Ventral

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ACEA: Araquidonil-2-Cloroetilamina

ACTH: Hormona Liberadora de Corticotropinas

cADN: Ácido Desoxirribonucleico complementario

CA1-STRAD: Capa *Stratum Radiatum* del campo CA1 del hipocampo

CCK: Colecistoquinina

COX: Ciclooxygenasa

CP: CP 55,940

CPu: Caudado-Putamen

CREB: Proteína de Unión al sitio sensible a AMPc

CRH: Hormona Liberada de Corticotropina

DA: Dopamina

DHT: Dihidrotestosterona

ERK: Kinasas Reguladas por Señales Extracelulares

FAAH: Enzima Amido-Hidrolasa de Ácidos Grasos

FDG: [18F]-Fluorodesoxiglucosa

FSH: Hormona Folículo-Estimulante

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GAD: Ácido Glutámico Descarboxilasa

GAT-1: Transportador de GABA

GD: Día Gestacional

GH: Hormona de Crecimiento

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropinas

H-H-A: Eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal

H-H-G: Eje Hipotalámico-Hipofisario-Gonadal

LH: Hormona Luteinizante

MAPK: Proteína Kinasa Activada por Mitógeno

NAcc: Núcleo Accumbens
NMDA: N-Metil-D-Aspartato
NFκB: Factor Nuclear κ B
NGF: Factor de Crecimiento Nervioso
NOS: Óxido Nítrico Sintasa
ON: Óxido Nítrico
PKA: Proteína Kinasa Activada por AMPc
PLP: Potenciación a Largo Plazo
PN: Postnatal
POMC: Pro-opiomelanocortina
RM: Resonancia Magnética
RMf: Resonancia Magnética Funcional
ROI: Región de Interés
SN: Sustancia Negra
TD: Transportador de Dopamina
TH: Tirosina Hidroxilasa
THC: Δ⁹-Tetrahidrocannabinol
TEP: Tomografía por Emisión de Positrones
TNFα: Factor de Necrosis Tumoral alfa
TSH: Hormona Estimulante del Tiroides
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Lista de Figuras y Tablas

Figura I: Efebo. Museo de Agrigente

Figura II: Activación hormonal durante la adolescencia

Figura III: Evolución de la sustancia gris desde la infancia a la primera madurez

Figura IV: Esquema general de los circuitos motivacionales

Figura V: Bucles córtico-estriado-tálamo-corticales dentro del circuito de motivación primaria. Obsérvese la descarga de DA que se da ante la exposición a una droga de abuso o una situación novedosa (B) con respecto a una situación basal (A). Esta descarga de DA altera los patrones de disparo de las neuronas del NAcc, para que codifiquen la situación en la que se ha producido la descarga, y activen los circuitos motores descendentes.

Figura VI: Estructura tridimensional de los receptores cannabinoides CB1 (izquierda) y CB2 (derecha)

Figura VII: Cascada intracelular tras la activación de los receptores cannabinoides. Ag (agonistas cannabinoides), AC (adenilato ciclasa), ON (óxido nítrico), Ac. Arq. (ácido araquidónico), K⁺ y Ca²⁺ (canales de potasio y calcio, respectivamente)

Figura VIII: Estructura química de los endocannabinoides más conocidos

Figura IX: Ruta metabólica de los endocannabinoides. Las flechas descendentes azules se corresponden con la biosíntesis de la anandamida y las ascendentes verdes con la inactivación de la anandamida y el 2-AG

Figura X: Principales cannabinoides vegetales

Figura XI: Principales agonistas cannabinoides

Figura XII: Principales antagonistas cannabinoides

Figura XIII: Sistema endocannabinoide y centros motores

Figura XIV. Circuito mesocorticolímbico de la recompensa: PFC: Corteza Prefrontal; CP: Caudado-Putamen; PAG: Sustancia Gris Periacueductal; LH: Hipotálamo Lateral; AMG: Amígdala, VP: Pálido Ventral; ARC; Núcleo Arqueado del Hipotálamo; LC: Locus Coeruleus; OT: Tubérculo Olfatorio; DMT: Núcleos Talámicos Dorsomediales; SC: Colículo Superior; IC: Colículo Inferior; Cer: Cerebelo.

Figura XV: Acción del sistema cannabinoide en el circuito mesocorticolímbico de la recompensa

Figura 1.1a: Autoadministración de Cocaína (Adquisición y Mantenimiento).

Figura 1.1b: Conducta Operante Reforzada con Comida (en condiciones de alta motivación –a dieta- y motivación normal –*ad libitum*)

Figura 1.2: SPM. Izquierda: Hipoactivación Entorrinal. Derecha: Hiperactivación Frontal

Figura 2.1: Comparación de los niveles de captación de FDG (como porcentaje del cerebro total) en diversas áreas encefálicas

Figura 2.2: Comparación de la activación metabólica inducida por una inyección de cocaína en una Hembra CP y una Hembra VH

Figura 3.1: Niveles del TD en fmols/mg de tejido equivalente. ## Diferencia entre basal y autoadministración; $p < 0,01$

Figura 3.2: Autoradiogramas Representativos comparando los niveles del TD en una hembra CP Basal (Izquierda) y una VH Basal (Derecha). Los colores más intensos equivalen a niveles mayores del TD

Figura 3.3: Niveles del receptor D1 en fmols/mg de tejido equivalente. ## Diferencia entre basal y autoadministración; $p < 0,01$ ** Diferencia entre Machos CP y Machos VH; $p < 0,01$

Figura 3.4: Niveles del receptor D2 en fmols/mg de tejido equivalente. ## Diferencia entre basal y autoadministración; $p < 0,01$

Figura 3.5: Expresión génica de la TH en unidades de densidad óptica

Figura 4.1: Duración en los Brazos del LCE

Figura 4.2: Frecuencia de Acicalamiento

Figura 4.3: Índice de Reconocimiento

Figura 4.4: Porcentaje de ensayos fallidos durante el entrenamiento en memoria de referencia

Figura 4.5: Prueba de Memoria en la tarea espacial de referencia. Latencia en segundos hasta el punto donde estaba la plataforma

Figura 4.6: Latencia para encontrar la plataforma en el test de plataforma señalizada. * Diferencia significativa de las Hembras CP con respecto a las VH ($p < 0,05$).

Figura 4.7: Distancia acumulada a la plataforma en el protocolo de memoria de trabajo. #,## Diferencia de los machos con respecto a las hembras ($p < 0,05$; $p < 0,01$) respectivamente

Figura 4.8: Niveles Plasmáticos de Corticoesterona y Estradiol. * Diferencia entre los machos y las hembras ($p < 0,05$)

Figura 4.9: Niveles de Expresión en unidades de densidad óptica de NCAM en hipocampo y corteza frontal

Figura 4.10: Niveles de Expresión de las diferentes isoformas de NCAM en hipocampo

Figura 4.11: Expresión de PSA-NCAM. * Diferencia significativa $p < 0,05$

Figura 4.12: Inducción y Mantenimiento de la PLP en el campo CA1 del hipocampo

Tabla I: Presencia endocannabinoide en diferentes partes del sistema nervioso

Tabla II: Efecto motor de los cannabinoides

Tabla III. Efectos neuroquímicos de los cannabinoides en el control motor

Tabla IV: Cannabinoides y liberación hormonal

Tabla V: Cannabinoides y aprendizaje

Tabla VI: Efecto del THC perinatal en ratas

Tabla VII. Efectos a largo plazo de la exposición a cannabinoides durante la adolescencia

Resumen

El consumo de marihuana durante la adolescencia representa un grave problema social. Esta droga es la sustancia ilegal consumida más ampliamente por la población adolescente y si bien hay un cierto *corpus* de conocimiento científico acerca de las consecuencias a largo plazo de este abuso, es todavía necesario abundar sobre este tipo de problemática. En los experimentos que componen esta Tesis Doctoral se ha estudiado si un consumo adolescente de marihuana (modelizado con un tratamiento crónico con el agonista no selectivo de receptores cannabinoides CP 55,940 –CP- en ratas adolescentes) puede promover una mayor susceptibilidad a la adicción a la cocaína cuando los individuos llegan a la edad adulta. Además hemos estudiado si este consumo adolescente deja secuelas a largo plazo sobre el funcionamiento cerebral, utilizando técnicas de neuroimagen funcional (Tomografía por Emisión de Positrones o TEP), así como técnicas propias de la neuroquímica y la neuropsicofarmacología (autorradiografía, hibridación *in situ*, etc...). En este aspecto hemos demostrado que los animales hembras adultos que fueron sometidos al tratamiento con el agonista en su adolescencia, mostraron una mayor tasa de respuesta cuando se les sometió a un paradigma de autoadministración de cocaína. Además hemos identificado cambios duraderos en el metabolismo cerebral basal en las ratas hembras tratadas y no en el resto de los animales. Estudiando la neuroquímica cerebral descubrimos que el tratamiento también modificaba el sistema dopaminérgico de manera dependiente del sexo.

Dadas las posibles secuelas cognitivas y emocionales que el consumo de marihuana parece tener en los seres humanos, también evaluamos si nuestro tratamiento podría inducir déficits cognitivos y emocionales a largo plazo. Encontramos que, en la línea de investigaciones previas, los animales tratados con el CP, mostraron una ansiolisis duradera al llegar a la edad adulta y sorprendentemente, experimentaron una mejora de su memoria de referencia, sin que su memoria de trabajo (espacial o de reconocimiento) se viera afectada. Nuestro tratamiento indujo un aumento en los machos tratados, de las proteínas de adhesión celular neural (NCAM), mediadoras en la

plasticidad sináptica, pero no tuvo consecuencias en otros parámetros de plasticidad como por ejemplo la potenciación a largo plazo (PLP) en el hipocampo. Asimismo, no detectamos alteraciones hormonales, ni en los niveles de corticoesterona ni en los de estradiol, como consecuencia del tratamiento.

Concluimos por tanto, que un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide CP 55,940 durante la adolescencia, aumenta la susceptibilidad a la adicción a la cocaína durante la edad adulta, específicamente en las hembras. Además, altera el funcionamiento cerebral normal y el sistema dopaminérgico a la vez que produce una ansiolisis duradera y una mejora relativa en la memoria de referencia.

Estos estudios arrojan luz en el debate científico y social existente acerca de las consecuencias a largo plazo del consumo de marihuana a la vez que abren nuevas vías de investigación sobre la interacción de los cannabinoideos con otras drogas de abuso y sobre la implicación del sistema de neurotransmisión endocannabinoide en los mecanismos que regulan los procesos cognitivos y emocionales.

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos Generales

1.2. *Adolescencia y Pubertad*

Existe, aún hoy día, cierta confusión con los términos “Adolescencia” y “Pubertad”. “Adolescencia” viene del latín *adolescere* que significa crecer, “Pubertad” viene también del latín, *pubertas* que quiere decir madurez (aunque en sus orígenes significaba “cubrirse de pelos” en referencia al crecimiento del vello púbico). En realidad el término pubertad hace referencia a la consecución de la madurez sexual (gonadarquía) mientras que adolescencia se refiere a un período mucho más amplio y que constituye la transición gradual de la infancia a la vida adulta (Spear, 2000). Así pues, la adolescencia se considera un período de transiciones y la pubertad es una de ellas.

En las páginas que siguen vamos a hacer un resumen de los hallazgos antropológico-históricos más importantes en torno a la adolescencia. Dicho resumen está basado fundamentalmente en la obra Lutte (Lutte, 1991).

1.3. *Breve Historia y Antropología de la Adolescencia*

1.3.1. El nacimiento de la juventud en la Roma antigua

En la Roma antigua, hasta el siglo II a.C., no existía un período de edad al que pudiésemos dar el nombre de adolescencia o de juventud. La pubertad fisiológica, celebrada con una ceremonia religiosa en la que el púber se quitaba la *toba pretexta* y la *bula*, símbolos de la infancia, para ponerse la toga viril, traje solemne de los ciudadanos romanos, marcaba el paso del niño a la edad adulta. El púber, *filius familias*, podía así participar en los comicios, acceder a la magistratura y alistarse en la milicia ciudadana con los mismos derechos y deberes que su padre. Se le reconocía jurídicamente capaz de actuar y cuando su padre moría adquiría la personalidad jurídica.



Figura I: Efebo.
Museo de Agrigente

En ese tiempo, la vida estaba dividida en tres fases: la infancia, la edad adulta y la vejez. Es una división que encontramos en muchas culturas y podemos pensar que era la regla general en el comienzo de las sociedades humanas. Todavía la encontramos hoy en algunas sociedades tradicionales como la de los pigmeos bambuti de África central.

¿Cómo y por qué aparece la adolescencia en un determinado momento de la historia de las sociedades humanas? En la sociedad romana surgió durante el siglo II a.C., después de profundos cambios en el sistema

económico y social que se pueden resumir de este modo: extensión de la gran propiedad rural; formación de grandes disponibilidades de capital líquido de

origen usurario y comercial; polarización de los recursos; procesos de urbanización y el desarrollo de la esclavitud como medio fundamental de producción.

En este contexto nace la juventud. Entre los años 193 y 192 a.C. el senado aprueba la *lex plaetoria*, “acta de nacimiento de un nuevo grupo social” que “instituyó una acción penal contra el que hubiese abusado de la inexperiencia de un joven de edad inferior a 25 años en un negocio jurídico”. Unos diez años más tarde, la *lex Villia annalis* limitaba la participación de los jóvenes en los cargos públicos. La madurez social, que antes se reconocía inmediatamente después de la pubertad, se traslada ahora a la edad de 25 años.

El surgimiento de la juventud, que crea la distinción-oposición entre los jóvenes y los adultos, coincide con la agravación de los contrastes sociales entre las clases y entre los sexos. Pero los jóvenes no aceptan sin protesta la exclusión social que se les ha impuesto: su rebeldía se manifiesta en las bacanales en las que se ve una confluencia voluntaria e involuntaria de diversas corrientes de protesta social: los jóvenes, las mujeres, los grupos sociales excluidos del poder.

La aparición de los jóvenes como grupo social sólo se produce en las clases privilegiadas y sólo interesa a los varones: las mujeres no salen nunca de su condición de minoría social. La adolescencia puede ser considerada como un privilegio cuando se la compara con la condición de los jóvenes o de los muchachos de las clases desfavorecidas o de los esclavos. Pero en comparación con la condición precedente de ausencia de adolescencia, la juventud se estructura como una fase de subordinación con respecto a los adultos de las clases privilegiadas, y, en ciertos aspectos, devuelve a estos jóvenes a la condición de incapacidad jurídica que caracteriza a los niños, las mujeres y los esclavos.

1.3.2. La creación de la adolescencia en la época industrial

Durante la edad media y la época preindustrial, la juventud duraba aproximadamente desde los 7 – 10 años a los 25 – 30 años y se situaba entre la dependencia de la infancia y la relativa independencia de la edad adulta caracterizada por el matrimonio y la herencia. Dentro de la fase de semidependencia de la juventud, no se podían distinguir subestadios, ya porque el trabajo y la escuela no seguían un orden temporal rígido –se podía comenzar la escuela a cualquier edad-, ya porque la pubertad fisiológica no provocaba ruptura entre las edades. Los niños, ya a partir de los siete años vestían como los adultos y asumían roles sociosexuales adultos. Además, la pubertad se manifestaba con cuatro años de retraso con respecto a la época actual y no se alcanzaba la plena fuerza física hasta los 25 y 30 años. Hacia los 7 – 8 años, las niñas y los niños dejaban su casa para ir a vivir con otras familias como sirvientes, aprendices o a veces como escolares.

No era raro que los niños de esta edad partiesen a la aventura a las ciudades para procurarse allí un medio de vida. Los jóvenes de esta época gozaban de unas libertades que nos parecen inauditas. Podían participar en todas las manifestaciones de la vida de los adultos. No era raro ver grupos de jóvenes recorrer a pie Europa mendigando para vivir y detenerse durante períodos más o menos largos en las escuelas más célebres.

La situación cambió radicalmente con la industrialización y los cambios que produjo en la familia, la escuela, la cultura. Un proceso largo y complejo, que empezó en el siglo XVI y se completó en el siglo XIX, y que tuvo como consecuencia que en el período considerado como juventud, apareciesen la infancia escolar y la adolescencia.

La adolescencia aparece en la clase burguesa en las últimas décadas del siglo XIX y deriva de un conjunto complejo de factores ligados a la industrialización y al desarrollo capitalista de la sociedad. En este período se acentúa la distancia entre las clases sociales e interviene fundamentalmente el proceso de mecanización.

La familia que, anteriormente, era de tipo patriarcal, se transforma en familia nuclear compuesta por los padres y algunos hijos que no dejan su casa a los siete años, sino que permanecen en ella hasta que se casan. Primero son las clases privilegiadas las que renuncian a la tradición de enviar a los niños como sirvientes a otras familias y las muchachas fueron las primeras en quedarse en casa en espera y deseo del matrimonio.

Muchos jóvenes comienzan a frecuentar regularmente la escuela, sobre todo los que necesitaban un título universitario para poder suceder a sus padres que ejercían profesiones liberales. La escuela, que en los siglos anteriores acogía a personas de todas las edades, a partir de ahora se especializa por grupos de edad: la escuela primaria para la infancia y la escuela secundaria para la adolescencia.

Los movimientos de juventud contribuyen también a la creación de la adolescencia moderna. De especial interés es el movimiento de los *scouts* en Inglaterra y de los *Wandervogel* en Alemania que atrajeron sobre todo a los jóvenes de las clases media y burguesa.. Se caracterizaban estos grupos por una exaltación de la naturaleza y de la fuerza física y por una visión romántica de la juventud a la que se creía capaz de regenerar a la sociedad.

En esta época se tenía una visión negativa de la adolescencia. En ello tuvieron un papel importante las ciencias médicas y psicológicas, ya que presentaban las normas particulares de la clase media como leyes naturales. Desde comienzos del siglo XIX, la medicina y la psicología sirvieron para justificar el control y las restricciones impuestas a los jóvenes.

Estas nuevas ideas sociales se expresaron en particular en muchas leyes que se promulgaron para proteger a los jóvenes, según se decía, en la institución de tribunales especiales.

La evolución industrial provocó una mayor marginación y subordinación de los jóvenes, porque muchos de ellos fueron expulsados del mundo del trabajo y ya no podían participar en la vida de los adultos como antes. En lo sucesivo, llevan una vida separada bajo el control de la familia, de la escuela, de los movimientos de juventud.

Hasta el siglo XIX, los jóvenes se resistieron a las tentativas de limitar sus libertades. Sus rebeliones se manifestaron de formas variadas: revueltas estudiantiles, participación en las revoluciones y, en el caso de los jóvenes de medios populares, participación en las luchas de clase, delincuencia, manifestaciones variadas de contraculturas y de subculturas. Veamos algunos ejemplos. Fue sobre todo durante los siglos XVI y XVII cuando estallaron las revueltas en las escuelas: su intensidad fue tal que a veces fue necesario que interviniese el ejército para reprimirlas. A fines del siglo XVIII hicieron su aparición el desempleo y la subocupación intelectual provocando en los jóvenes, sobre todo en Prusia, una conciencia de generación que hasta entonces nunca había sido tan fuerte. “Para los que ya no tenían una perspectiva de trabajar y de casarse, la juventud se convirtió en un estado existencial de pesadilla que se refleja en la literatura del movimiento *Sturm und Drang* cuyos héroes inevitablemente eran descritos como unos jóvenes “fuera de la ley”.

Todos los jóvenes, desde luego, no eran revolucionarios. En Francia, por ejemplo, después de 1874, la *Jeunesse Dorée*, procedente de la clase burguesa, célebre por sus vestidos extravagantes

y su desenfreno, utilizaba los ritos de la juventud para burlarse de la revolución. Hubo también otras reacciones, como las comunas alternativas a la familia, por ejemplo los *enfants de Saint-Simon* o las comunas de Fourier. Hacia 1830, la protesta de los estudiantes de París adoptó la forma de la bohemia caracterizada por la fascinación de los estilos, comportamientos y lenguajes extravagantes, por el desprecio hacia el trabajo, la preocupación por el presente, la resistencia al orden y a la disciplina y la atracción por las religiones orientales.

Los jóvenes de las clases populares, que no asistían a la escuela y que a menudo no encontraban trabajo, reaccionaron contra la degradación de su condición uniéndose a las luchas obreras de los adultos.

Hacia finales del siglo XIX una parte de los jóvenes, sobre todo los de los 14 a los 18 años, se resignaron a depender de la familia y de las demás instituciones de los adultos. Orientaron la agresividad hacia sí mismos, justificando con sus tormentos interiores las descripciones psicológicas de la adolescencia. Hacia 1900, la adolescencia sólo se encontraba en las clases privilegiadas, pero se empezaba ya a percibir su extensión a las familias de los obreros cualificados y semicualificados. Sólo en la primera mitad del siglo XX, la llamada “era de la adolescencia”, se extiende a todas las clases sociales. Anteriormente, en las familias más pobres, el trabajo de los jóvenes era necesario para la supervivencia de la familia y se veía la escuela como una amenaza.

La historia de la juventud en los Estados Unidos, presenta analogías sorprendentes con la de Europa. Los cambios estructurales en la condición de los jóvenes fueron facilitados por una nueva ideología de la adolescencia expresada en libros y revistas destinadas especialmente a la clase media urbana.

Las historias de la adolescencia en los países industrializados, aunque presentan algunas particularidades de un país a otro, tienen sin embargo muchos parecidos. La situación de los jóvenes se agrava todavía más a finales del siglo XIX y está en correlación con una diferenciación mayor no

sólo de las edades anteriores (la primera infancia y la infancia escolar) sino también de las clases sociales y de los sexos.

1.3.3. La adolescencia en las sociedades tradicionales.

En las sociedades sin adolescencia como la de los bambuti de África, no hay un período largo de transición entre la infancia y la edad adulta sino que se produce un paso directo, gradualmente preparado desde la primera infancia mediante la participación en las actividades del grupo. En esta sociedad, la especialización del trabajo entre el hombre y la mujer es mínima, porque todos se ocupan de todo e incluso los niños participan en la mayor parte de las actividades de los adultos. No existe ninguna jerarquía, exceptuando el Consejo de los Ancianos: los pigmeos siempre procuran compartir su autoridad y sus responsabilidades con todo el grupo social, incluso con los niños, que participan en la discusión y en la decisión de la colectividad cuando, por ejemplo, la tribu quiere trasladarse a otro lugar.

En las sociedades con adolescencia, por el contrario, la jerarquía social está más marcada y las diferencias entre los sexos son más pronunciadas. Los jóvenes están privados de los derechos y de los recursos que les pertenecerían en las sociedades sin adolescencia y asumen una función económica y social diferente de la de los adultos. Por ejemplo, se han descrito las sociedades de criadores de ganado de África central en las que, entre la infancia y la edad adulta, hay un período que se extiende desde la pubertad hasta los 25 – 28 años, durante el cual los jóvenes tienen a su cargo la defensa del ganado contra los ataques de las fieras y de las otras tribus. Estos jóvenes están separados de la sociedad, viven en una cabaña colectiva, una especie de cuartel, situada fuera de los límites del pueblo y disfrutan de menos derechos que los adultos: por ejemplo, no pueden casarse y están excluidos del poder político.

En la sociedad maronga de Mozambique, los niños hasta los 7 – 8 años viven en la cabaña de la madre y trabajan con ella en los campos y en la casa. La sociedad es poligámica y en general

las mujeres no viven con los hombres: cada mujer de una ronga posee una cabaña, alejada de las otras aproximadamente un kilómetro, de modo que tenga un terreno para cultivar. Cuando los muchachos entran en la “edad de las carreras”, es decir, de la caza, se van a vivir con el padre hasta los 28 años y le ayudan en la caza y en la cría del ganado. Las muchachas por su parte, hasta los 22 años, tienen a su cargo los trabajos más duros en los campos y está terminantemente prohibida toda relación sexual durante esta adolescencia prolongada. Además, los maronga no pueden ni casarse ni ejercer el poder político, privilegios de los adultos que viven de su trabajo.

1.3.4. La adolescencia en la sociedad contemporánea.

En los años cincuenta-sesenta la adolescencia había desaparecido en Europa, particularmente en las clases privilegiadas, porque los jóvenes habían reconquistado parte de las libertades perdidas desde finales del siglo XIX. Se advierte, en efecto, una decadencia del autoritarismo de los padres, del control de las jóvenes, una mayor confianza en los grupos espontáneos, menos vigilancia por parte de los adultos, una mayor libertad sexual facilitada por los anticonceptivos. Las organizaciones juveniles se han convertido en mixtas, están menos sometidas a los adultos, menos centradas en los problemas de la adolescencia y más abiertas a los problemas sociales. Además, los movimientos sociales y políticos del 68 han impulsado a los jóvenes a integrarse en el mundo de los adultos y a ocuparse de problemas que requieren un nivel elevado de autonomía y de madurez.

1.4. La Adolescencia vista como Desequilibrio Psíquico

Granville Stanley Hall fue el primero en describir la adolescencia como un período de “tormenta y estrés” (G. S. Hall, 1904), en la que el adolescente atraviesa por muchos conflictos y sufre etapas de confusión, letargo, alegría e ira. Por su parte, Anna Freud caracterizaba la adolescencia como un período de desequilibrio psíquico, de conflicto emocional y conducta errática (Freud, 1964). Ella sostenía que por un lado los adolescentes son egoístas y centrados en sí mismos,

creen que la atención de todos ha de estar puesta en ellos, sin embargo también son capaces de olvidarse de sí mismos mientras que se ocupan de los demás y participan en obras de caridad. Pueden verse involucrados en enamoramientos intensos, pero con la misma rapidez pueden desenamorarse. En ocasiones desean estar con otros en el grupo social, pero también buscan la soledad. Oscilan entre la rebeldía y la conformidad. No son sólo egoístas y materialistas sino también moralmente idealistas. Son ascéticos aunque hedonistas; desconsiderados y rudos aunque también cariñosos y tiernos. Fluctúan entre la confianza exuberante y la duda profunda; entre el entusiasmo infatigable y el hastío indiferente (Freud, 1964). Para Anna Freud, la razón de esta conducta conflictiva es la madurez sexual que se alcanza en la pubertad, que ocasiona el desequilibrio psíquico. Para esta autora, en la pubertad hay un marcado incremento de las pulsiones instintivas; lo que incluye un mayor interés en la genitalidad y en los impulsos sexuales. En general, las fuerzas instintivas que quedaron latentes en la niñez temprana reaparecen en la pubertad y estos impulsos (ello) son totalmente censurados por la norma social (súper yo) y para evitar un conflicto psíquico mayor, el yo debe de alcanzar un delicado equilibrio. Si este equilibrio se rompe, dará lugar a perturbaciones emocionales que pueden durar años. Así pues, Anna Freud ve la adolescencia como un período de gran pulsión retenida.

1.5. La Adolescencia como Período de Consecución de Objetivos: Las Tareas de la Adolescencia.

A parte de la consecución de la identidad propia, que quizás sea la tarea fundamental a conseguir durante la adolescencia, Havighurst, identifica ocho tareas que han de realizarse durante la adolescencia (Havighurst, 1972):

1. Aceptar el físico propio y usar el cuerpo de manera efectiva.
2. Lograr independencia emocional de los padres y otros adultos.
3. Lograr un rol social-sexual masculino o femenino.

4. Formar relaciones nuevas más maduras con compañeros de la misma edad y ambos sexos.
5. Desear y alcanzar una conducta socialmente responsable.
6. Adquirir un conjunto de valores y un sistema ético para guiar la conducta.
7. Prepararse para una “carrera” económica.
8. Prepararse para el matrimonio y la vida familiar.

2. La Pubertad

2.1. El Inicio de la Pubertad

La pubertad se considera como el período en el que un individuo adquiere la competencia reproductora (Sisk & Zehr, 2005). El hito biológico fundamental que marca el comienzo de la pubertad es la liberación pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); esta liberación por pulsos es evidente ya en la época perinatal, pero se suprime durante la

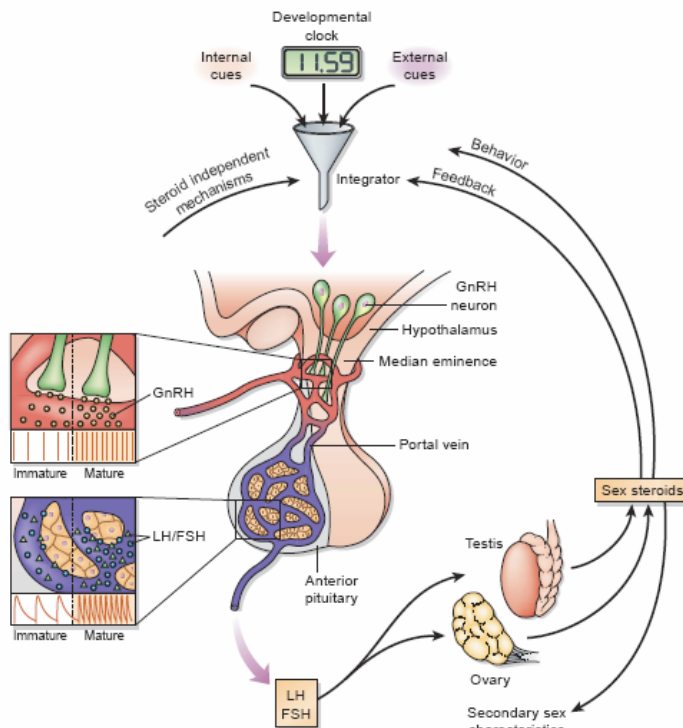


Figura II: Activación hormonal durante la adolescencia

infancia para ser reestablecida al comienzo de la pubertad (Spear, 2000). La liberación pulsátil de GnRH estimula a su vez a las hormonas gonadotropas Folículo-Estimulante (FSH) y Luteinizante (LH), que a su vez estimulan la liberación de las hormonas gonadales (estradiol en hembras y testosterona en machos) (Sisk & Foster, 2004). En la mayoría de los mamíferos, existe una activación pasajera del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (H-H-G) durante las fases prenatales tardías y los inicios de la vida post-natal; esto provoca una liberación de esteroides gonadales, que contribuyen a la diferenciación sexual y programación del sistema nervioso. La secreción de GnRH declina poco tiempo después hasta que la frecuencia de liberación de esta hormona disminuye hasta llegar a una tasa de disparo de 1 cada pocas horas. Esta situación se mantiene hasta el inicio de la pubertad. Sin embargo, la determinación de los mecanismos que rigen el inicio de la liberación pulsátil de GnRH en esta etapa, se ha erigido en un gran problema, tanto a nivel conceptual como técnico dada la neuroanatomía del sistema GnRH-érgico (Knobil & Neill, 1994): en primer lugar el número de neuronas que liberan esta hormona es muy pequeño (de 1000 a 3000 células); en segundo lugar, las neuronas de este sistema surgen de la región de la placoda nasal durante el

desarrollo embrionario temprano, migran al cerebro y allí se dispersan difusamente a través de la banda diagonal de Broca, el septum, el órgano vasculoso de la lámina terminal, el área preóptica y el hipotálamo. Esta distribución tan difusa ha hecho que sea muy difícil el describir las fuentes y los fenotipos de las aferencias a estas neuronas. En tercer lugar, la mayoría de las neuronas GnRH positivas tienen una morfología unipolar o bipolar sencilla, y la innervación de los cuerpos celulares de las mismas es muy dispersa en comparación con las neuronas vecinas. A pesar de todo esto parece que las neuronas GnRH-érgicas disparan en sincronía para producir episodios intermitentes de liberación hormonal a la eminencia media. Si bien se están haciendo avances en el entendimiento de cómo los aminoácidos transmisores y las hormonas esteroideas alteran la excitabilidad y la sincronía de las neuronas GnRH-érgicas, la base biológica del inicio de la liberación pulsátil de esta hormona sigue siendo un misterio.

En este sentido, dada la multiplicidad de factores que parecen intervenir en el resurgir de la liberación en pulsos de GnRH, los científicos tienen cada vez menos esperanzas de encontrar un único candidato al que se pueda considerar como el desencadenante de la pubertad (hasta el momento se habían propuesto varios, como la melatonina, la grasa corporal, la leptina e incluso un único gen) (Ebling & Cronin, 2000); más bien lo que se está identificando en la actualidad, son factores, que si bien no desencadenan la pubertad, sí permiten que ocurra, y por esta razón se les conoce como “señales permisivas” (Sisk & Foster, 2004). Estas señales varían en función de la especie animal estudiada así como del sexo, sin embargo la mayoría de ellas están relacionadas con el balance energético. Los patrones conductuales típicos durante la pubertad (ver más abajo) tales como el cuidado de la prole, la defensa del territorio y el cortejo, son actividades que implican un elevado coste energético, por lo tanto, la temporalización de la pubertad es crítica dado el gasto metabólico que se deriva de ella; así, los individuos deben percibir si han crecido lo suficiente (a través de claves metabólicas), cuáles son sus relaciones con otros individuos de su especie (a través de claves sociales) y si las condiciones son óptimas para comenzar el proceso reproductor (a través de claves ambientales) antes de empezar su maduración sexual. En este sentido, se ha descrito,

por ejemplo, que la disponibilidad de combustible metabólico (insulina, leptina y glucosa) en las hembras, se configura como una señal importante de que se ha alcanzado un grado de desarrollo somático suficiente para soportar el embarazo. Los sensores hipotalámicos y del tallo cerebral monitorizan constantemente los niveles de estos combustibles y permiten, si se cuenta con niveles suficientes, la liberación en pulsos de alta frecuencia de GnRH (Cheung et al., 1997; Cheung, Thornton, Nurani, Clifton, & Steiner, 2001; Mann & Plant, 2002). Sin embargo, en los machos, el inicio de la pubertad no parece estar tan relacionado con el gasto energético (en parte porque los machos no se enfrentan a los riesgos del embarazo). En otras especies en las que la crianza es más estacional, el fotoperíodo señala la época óptima del año para el inicio de la pubertad (Ebling & Foster, 1989; Foster, Ebling, & Claypool, 1988). El reloj circadiano situado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo mide la duración del día controlando la síntesis de melatonina por la glándula pineal. El tiempo durante el cual se mantiene la elevación de los niveles de melatonina por la noche codifica, de manera inversa, la duración del día, y los receptores de melatonina situados en el tálamo y el hipotálamo transducen esta señal a las neuronas GnRH-érgicas (Knobil & Neill, 1994). En otras especies sin embargo, son las claves sensoriales de los congéneres las que permiten el inicio de la secreción de GnRH en la pubertad (Bronson & Maruniak, 1975; Rissman, 1992).

En cualquier caso, como se ha mencionado, se desconoce el desencadenante (o más bien desencadenantes) de la pubertad, y tampoco queda claro cuántas señales permisivas habría y si la integración de las mismas ocurre a nivel del sistema GnRH o si existiría un “integrador maestro” externo a tal sistema. En la actualidad, se mantiene que para que ocurra la activación de las neuronas GnRH-érgicas en la pubertad es necesaria una disminución de las entradas inhibitorias y un aumento de las excitatorias (GABAérgicas y glutamatérgicas, respectivamente) a estas neuronas y últimamente se ha sugerido la importancia de la kisspeptina y su receptor (el GPR54) en el inicio de la pubertad (Sisk & Zehr, 2005), aunque incluso en este tema hay también discrepancias (Kinsey-Jones, Li, Luckman, & O'Byrne, 2007).

2.2. Temporalización

Si bien es muy difícil establecer límites temporales claros, se puede decir que la pubertad comienza alrededor de los 9-10 años en las niñas y entre 1 y 2 años más tarde en los niños (Emans, Laufer, & Goldstein, 2005). En el caso de las ratas de laboratorio, existen signos externos que se utilizan para delimitar el inicio de la pubertad, en este caso, se utiliza la apertura vaginal para las hembras y la separación balano-prepucial en machos. En las hembras, la apertura vaginal es visible alrededor del día postnatal (PN) 35, mientras que la separación balano-prepucial en machos es evidente alrededor del día PN40 (Fernandez-Fernandez et al., 2005). Se ha sugerido que en la rata macho existe un período peripuberal que se inicia en PN36 (poco antes del inicio de la pubertad en PN40) y que dura hasta PN60, momento en el que se alcanza la fertilidad, indicada por la presencia de espermatozoos maduros en el vaso deferente (Knobil & Neill, 1994). En el caso de las hembras habría un período juvenil que se iniciaría en PN22, su pubertad comenzaría alrededor de PN30 y culminaría con la primera ovulación en PN38 (Knobil & Neill, 1994).

Similares características temporales se han observado también en seres humanos y otros mamíferos en los que las hembras maduran más rápido que los machos (Spear, 2000). Aunque hay un rango amplio de variación, se suele decir que en las niñas, la pubertad comienza alrededor de uno o dos años antes que en los niños y que además ellas terminan el proceso antes que ellos.

Dado que los cambios más importantes a nivel comportamental y muchos procesos de maduración neuronal están íntimamente ligados al desarrollo puberal (Sisk & Foster, 2004), normalmente se aconseja utilizar la ventana temporal correspondiente a la pubertad (PN26-60 en machos y PN30 a PN 40 en hembras) para los estudios de psicobiología del desarrollo en ratas de laboratorio. Además, cuando se hacen estudios animales comparando ambos sexos es crucial tener en cuenta la distinta temporalización de la pubertad y la adolescencia que tiene lugar entre machos y hembras.

2.3. Desarrollo de las Características Sexuales Secundarias

2.3.1. En la mujer

La hormona dominante en el desarrollo femenino es el estradiol. A la vez que promueve el crecimiento de mamas y del útero, el estradiol es también la principal hormona conductora del crecimiento puberal y de la maduración y cierre epifiseal (MacGillivray, Morishima, Conte, Grumbach, & Smith, 1998). Los niveles de estradiol suben más temprano o se mantienen elevados durante más tiempo en mujeres que en hombres.

Los cambios físicos en niñas son:

- **Crecimiento de vello púbico.**

La aparición del vello púbico (pubarquía) es una de las manifestaciones inequívocas de la pubertad. En alrededor del 15% de las niñas el vello púbico aparece aún antes de que los senos empiecen a desarrollarse.

- **Cambios en la vagina, el útero y los ovarios.**

La membrana mucosa de la vagina también cambia en respuesta a los niveles ascendentes de estrógenos, engordando y adquiriendo un color rosáceo (Emans et al., 2005). También las características secreciones blancuzcas son un efecto normal de los estrógenos.

- **Inicio de la menstruación y la fertilidad.**

El primer sangrado menstrual, también conocido como menarquía aparece alrededor de los 9 a los 16 años (por término medio). Los períodos menstruales al inicio casi nunca son regulares ni mensuales durante los primeros años (Falkner & Tanner, 1979). La ovulación es necesaria para la fertilidad y puede o no presentarse en los primeros ciclos.

- **Cambio en la forma pélvica, redistribución de la grasa y composición corporal.**

Durante este período, también en respuesta a los niveles ascendentes de estrógenos, la mitad inferior de la pelvis se ensancha (proporcionando un canal de nacimiento más ancho). Los tejidos adiposos representan ahora un mayor porcentaje de la composición corporal que en los varones, especialmente en las zonas que serán características de las mujeres (senos, caderas y muslos). Esto confiere a la mujer por tanto, su forma corporal típica (Falkner & Tanner, 1979).

- **Crecimiento de vello facial y corporal.**

En los años y meses posteriores a la aparición del vello púbico, otras áreas de la piel desarrollan vello más denso aproximadamente en la secuencia siguiente: vello axilar, vello perianal, vello encima de los labios, patillas y vello periareolar (Tanner & Davies, 1985).

- **Aumento de estatura.**

El crecimiento somático es inducido por el estradiol y comienza aproximadamente al mismo tiempo que los primeros cambios en los senos, o incluso unos cuantos meses antes, siendo una de las primeras manifestaciones de la pubertad en las niñas. El crecimiento de las piernas y los pies se acelera primero. La tasa de crecimiento tiende a alcanzar su velocidad máxima (hasta un máximo de 7,5-10 cm anuales).

- **Olor corporal, cambios en la piel y acné.**

Niveles ascendentes de andrógenos pueden cambiar la composición de ácidos grasos de la transpiración, dando como resultado un olor corporal más "adulto". Esto a menudo ocurre uno o más años antes que la telarquía y la pubarquía. Otro efecto inducido por los andrógenos es el aumento en la secreción de grasa en la piel lo cual incrementa la susceptibilidad al acné, que es un rasgo característico de la pubertad, variando en severidad según los individuos.

2.3.2. En el varón

- **Desarrollo de la musculatura.**

En determinado momento de su desarrollo su masa muscular crece formando su cuerpo de adulto.

- **Crecimiento de los testículos.**

El desarrollo de los testículos es una de las primeras características por las cuales un niño se puede dar cuenta de que está entrando en la pubertad ya que éstos aumentan de tamaño (Falkner & Tanner, 1979; Lee & Reiter, 2002).

- **Vello púbico en los niños.**

El eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (H-H-A) es el primer eje que se ve afectado en la pubertad. Se empiezan a generar hormonas tales como la androstenediona y dihidrotestosterona (DHT) alrededor de los 7/8 años en las chicas y 9/10 en los chicos. Esta actividad elevada del eje conocida como "adrenarquía" da lugar a la aparición del vello púbico, vello axilar, vello facial (barba y bigote), vello en las piernas, una línea de vello que se extiende desde el "pubis" hasta el ombligo, en el pecho, etc...

La aparición del vello púbico suele ser uno de los primeros eventos que ocurren cuando un niño ha alcanzado la pubertad. Aparece primeramente alrededor de la base del pene brotando con una forma delgada y color claro, hasta hacerse más grueso y rizado; también su color se hace más oscuro y van brotando más y más hasta que cubren los genitales.

- **Erecciones involuntarias del pene.**

A veces suelen darse erecciones de corto tiempo en lugares ya sean públicos o solitarios en donde el púber intenta esconderlas tapándose; aunque en la mayoría de las veces las personas que están a su alrededor no las notan (K. L. Jones & Smith, 2006).

- **Emisión nocturna.**

Durante su pubertad y adolescencia, el niño puede o no experimentar su primera emisión nocturna, también conocida como *sueño húmedo* o "polución nocturna". Normalmente es una expulsión de semen por el pene, realizada cuando el niño duerme y tiene sueños frecuentemente asociados con sexo o simplemente por el rozamiento del pene con la ropa.

- **Crecimiento del pene.**

Como se mencionó anteriormente, en el púber, el primer cambio que ocurre es el crecimiento de los testículos antes que el del pene. Aunque la longitud media suele estar en torno a los 14-20 cm, hay una gran variabilidad en la población normal (Falkner & Tanner, 1979).

- **Engrosamiento de la voz.**

Durante el desarrollo, las cuerdas vocales se tornan más gruesas de manera que la voz se hace más grave.

- **Olor corporal.**

Alcanzada la pubertad, el niño comienza a expulsar olores característicos, especialmente tras el ejercicio físico. La expulsión de sudor por parte de las glándulas sudoríparas aumenta en la pubertad, lo cual se convierte, aunque no decisivamente, en un factor importante que contribuye al olor corporal. Este olor suele calificarse como desagradable y su intensidad puede variar de persona a persona y de momento en momento.

- **Crecimiento en estatura.**

El niño que ha alcanzado la pubertad entra en un nuevo proceso de crecimiento en estatura de una duración mayor al de las niñas. Este proceso de crecimiento usualmente dura hasta los 15-20 años de edad.

3. La Adolescencia

3.1. Cambios Conductuales en la Adolescencia

Durante la adolescencia, se van a suceder una serie de cambios conductuales asociados a una mayor búsqueda de sensaciones y una mayor valoración de las relaciones sociales. Se ha propuesto que aquellos cambios conductuales que acontecen en la adolescencia y que están preservados a lo largo de las especies, podrían tener algún valor adaptativo y que además podrían servir al adolescente para afrontar mejor las demandas de su nicho ecológico durante esta etapa (Spear, 2000). Aquí abundaremos sobre todo en los cambios conductuales asociados a la búsqueda de nuevas sensaciones y el riesgo, así como las que tienen que ver con las relaciones sociales.

3.1.1. Conductas asociadas al riesgo

Se puede decir sin temor a equívoco que a los adolescentes les seduce el riesgo. Como grupo, muestran una tasa desproporcionada de conductas irresponsables, búsqueda de nuevas sensaciones y comportamientos relacionados con el riesgo (Trimpop, Kerr, & Kirkcaldy, 1999). Tanto es así que, asociados a estas conductas de riesgo, hay aumentos en las tasas de mortalidad en la transición de la adolescencia temprana a la tardía (N. J. Bell & Bell, 1993), homicidios, suicidios y accidentes que entre todos explican el 85% de la mortalidad adolescente (Irwin, 1989). Otras posibles consecuencias negativas de estas conductas asociadas al riesgo son las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las encarcelaciones, embarazos no deseados y problemas de adicción a drogas. No obstante lo anterior, para la mayoría de los adolescentes estas conductas de

búsqueda de nuevas sensaciones son pasajeras y la mayoría de ellos son capaces de pasar a la vida adulta sin mayores problemas.

Es interesante señalar que estas conductas de búsqueda de nuevas sensaciones pueden tener sus contrapartidas positivas. Por ejemplo pueden ser un medio para explorar determinadas pautas del comportamiento adulto (Lipsitt & Mitnick, 1991), pueden permitir al adolescente conseguir ciertas tareas del desarrollo (Muuss & Porton, 1998) y en algunas ocasiones permiten ganar autoestima a través de la realización de estas conductas de riesgo en presencia del grupo de iguales (H. B. Kaplan, Johnson, & Bailey, 1987). En general, la realización de estos comportamientos se ha asociado a niveles disminuidos de ansiedad ante las posibles consecuencias negativas de tales conductas (M. Wilson & Daly, 1985). Los adolescentes que realizan conductas de riesgo normalmente dicen que es reforzante (“divertido”) realizar tales comportamientos (Spear, 2000). A este respecto, se ha sugerido una posible “anhedonia adolescente” es decir, una reducción en la sensibilidad al refuerzo, posiblemente debido a una insuficiente maduración del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (ver más abajo) (Spear, 2000), que es el sistema encargado de convertir la motivación en acción (Le Moal & Simon, 1991). Esta anhedonia, les llevaría a una necesidad de experimentar mayores refuerzos para obtener un nivel suficiente de satisfacción.

Sin embargo, la razón principal por la que los adolescentes emprenden conductas de riesgo parece ser la búsqueda de nuevas sensaciones (Lipsitt & Mitnick, 1991). De hecho, la razón más frecuente para el inicio del consumo de drogas, por ejemplo, suele ser la satisfacción de la curiosidad o la expectativa de encontrar algo diferente. Sin embargo, se ha sugerido que en otros individuos, estas conductas desempeñarían la función de contrarrestar la disforia o el estrés asociados a estas etapas (Lipsitt & Mitnick, 1991). En cualquier caso, parece ser que la tasa de realización de conductas asociadas al riesgo disminuye con la edad a lo largo de la adolescencia (N. J. Bell & Bell, 1993).

Las conductas de riesgo en los adolescentes podrían tener potenciales antecedentes evolutivos y de hecho los individuos adolescentes de otras especies también parecen buscar los aspectos novedosos y potencialmente peligrosos de su entorno. Así, los ratones adolescentes muestran hiperactividad cuando se encuentran en un entorno novedoso (Darmani, Shaddy, & Gerdes, 1996), y también muestran tasas más altas de búsqueda de novedad que sus controles adultos (Adriani, Chiarotti, & Laviola, 1998). Por otro lado se sabe que las ratas en edades comprendidas entre los PN28 y PN42 normalmente son más hiperactivas y muestran mayor exploración en situaciones novedosas que las ratas más adultas (Spear, Shalaby, & Brick, 1980). Desde el punto de vista evolutivo se podría decir que los aumentos en la tasa de conductas asociadas al riesgo y de búsqueda de sensaciones en la etapa adolescente podrían obedecer a una función facilitadora que tienen estas conductas sobre la emigración fuera del grupo natal, proporcionando una motivación para explorar áreas nuevas y más amplias. Además, se facilitaría la experimentación de nuevos comportamientos y reforzadores, facilitando posiblemente la extinción de patrones de comportamiento no adaptativos, propios de la edad juvenil y promoviendo la adquisición de conductas más propias de individuos adultos (Spear, 2000).

3.1.2. Conducta social

Las interacciones sociales con los pares son de particular importancia durante el desarrollo adolescente. En una semana promedio durante el año académico, los adolescentes pasan un tercio del tiempo vigilia hablando con sus iguales, mientras que sólo pasan un 8% hablando con adultos (Csikszentmihalyi, Larson, & Prescott, 1977). Parece ser que los pares son una fuente de experiencias positivas para los adolescentes quienes dicen estar más felices cuando hablan con sus iguales que con adultos. Estas relaciones con sus iguales ayudan a los adolescentes a desarrollar habilidades sociales lejos del contexto del hogar así como a favorecer un sentimiento de independencia con respecto al núcleo familiar (J. R. Harris, 1995).

Además de este cambio en la orientación de las relaciones sociales (de los padres a los iguales), la adolescencia también se caracteriza por un incremento en los conflictos percibidos con los padres, algo que también se observa en primates no humanos (Steinberg, 1989).

Al igual que los adolescentes humanos, los adolescentes de otras especies también muestran cambios en sus pautas de conducta social. Por ejemplo, los roedores adolescentes pasan más tiempo interactuando socialmente y jugando (Fassino & Campbell, 1981). No sólo la cantidad sino también la calidad de las interacciones sociales cambia en la adolescencia, quizás en parte para inhibir las conductas agresivas de los machos adultos con los que los adolescentes comienzan a entrar en contacto. Por ejemplo hacia el día PN20, aunque las crías de rata ya destetadas muestran ciertos patrones de conductas defensivas, propias de los adultos, éstas son desplazadas de manera temporal por otros repertorios conductuales, de naturaleza más juvenil, que implican juegos en los que puede haber agresiones fingidas; estas pautas de juego sin embargo, decaen a medida que se va alcanzando la madurez sexual (Pellis & Pellis, 1990, , 1997).

Las conductas de juego en los adolescentes les ayudan a practicar aquellos repertorios conductuales que les serán de utilidad durante la vida adulta (por ejemplo la conducta sexual o la agresión) (P. K. Smith, 1987).

Además de mostrar alteraciones en las relaciones sociales con los adultos y con sus iguales, los adolescentes de un gran número de especies (sobre todo las adolescentes hembras) comienzan a mostrar un particular interés por las crías de su especie (lo que se conoce como comportamiento “alomaternal”). Esto ocurre tanto en humanos (Fullard & Reiling, 1976), primates no humanos (O'Brien & Robinson, 1993) e incluso en los roedores (Mayer, Freeman, & Rosenblatt, 1979); siendo además esta pauta comportamental eminentemente sexodimórfica.

3.2. El Cerebro Adolescente en Desarrollo

La idea de que el cerebro continúa desarrollándose después de la infancia es relativamente nueva (Blakemore & Choudhury, 2006). Durante los años cincuenta del siglo XX se realizaron estudios en cerebros animales en los que se comprobó que determinadas áreas sensoriales podrían estar sujetas a las influencias ambientales sólo durante períodos tempranos del desarrollo post-natal, y se sugirió que era improbable que el cerebro continuara desarrollándose más allá de esos períodos. Sin embargo, estudios posteriores en los años 60 y 70, sugirieron que el cerebro continuaba desarrollándose durante períodos posteriores a la infancia, sobre todo el córtex prefrontal (Huttenlocher, 1979; Huttenlocher, De Courten, Garey, & Van der Loos, 1982a, , 1982b). Se puede hablar de dos grandes diferencias generalizadas en los cerebros adolescentes con respecto a los adultos y a los niños: en primer lugar el grado de mielinización, que si bien en las regiones motoras y sensoriales alcanza su máximo a los dos años de edad, los axones del córtex frontal continúan mielinizándose hasta bien entrada la adolescencia (Yakovlev & Lecours, 1967). La segunda diferencia corresponde a los cambios en la densidad sináptica en el córtex prefrontal. Si bien en la mayoría de las regiones cerebrales la sinaptogénesis y la consecuente poda sináptica ocurren en épocas tempranas del desarrollo post-natal, se ha demostrado que en el córtex frontal existe sinaptogénesis durante la pubertad y la poda sináptica en esta región ocurre tras la misma (Blakemore & Choudhury, 2006). Más recientemente, estudios realizados mediante resonancia magnética (RM) y resonancia magnética funcional (RMf) han puesto de manifiesto que el desarrollo tanto estructural como funcional del cerebro continúa hasta la edad adulta. A nivel macroestructural se han descrito dos hallazgos fundamentales, en primer lugar se observa un incremento lineal de la sustancia blanca durante la adolescencia y hasta la edad adulta, que se acompaña con un decremento no lineal de la sustancia gris.

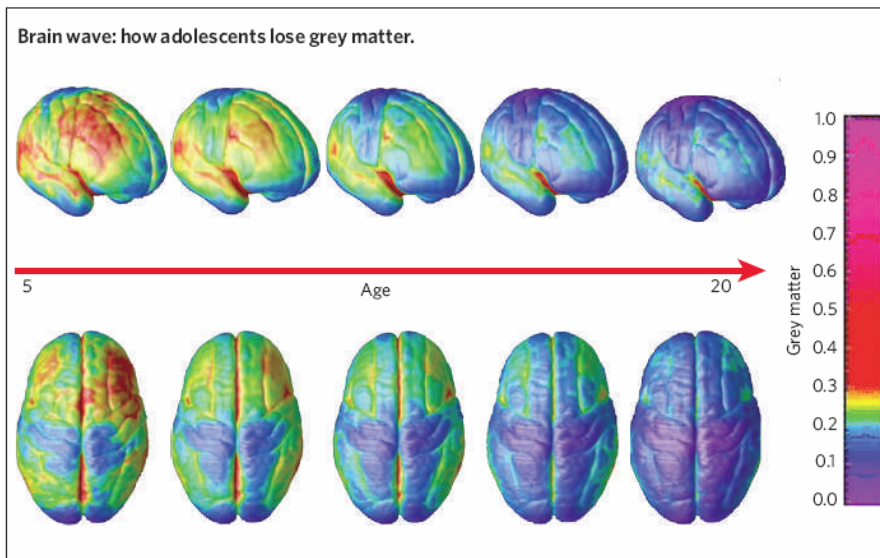


Figura III: Evolución de la sustancia gris desde la infancia a la primera madurez

Con respecto al incremento lineal de sustancia blanca, éste se ha encontrado en diferentes regiones, tales como las cortezas frontal y parietal (Blakemore & Choudhury, 2006), el cuerpo caloso (Pujol, Vendrell, Junque, Marti-Vilalta, & Capdevila,

1993) y de manera más consistente en la cápsula interna derecha y en el fascículo arqueado izquierdo (Paus et al., 1999). La contrastación de estos datos con los estudios histológicos ha permitido demostrar que estos incrementos en la sustancia blanca se deben fundamentalmente a la mielinización axonal que ocurre en el cerebro hasta la edad adulta (Blakemore & Choudhury, 2006).

Si bien la sustancia blanca aumenta de manera lineal hasta la edad adulta, algo muy diferente ocurre en relación a la sustancia gris. Se ha observado un patrón, dependiente de la región estudiada, y que en muchos casos sigue una tendencia de U invertida. Así pues, se ha observado un aumento en la materia gris del lóbulo frontal que se inicia en la pre-adolescencia y alcanza valores máximos a los 12 años en el caso de los chicos y a los 11 en el caso de las chicas; encontrándose posteriormente una disminución similar en ambos sexos durante la post-adolescencia (Giedd et al., 1999). Curiosamente en el lóbulo temporal el pico se alcanzó más tarde, a los 19 años de edad, mientras que en los lóbulos occipitales sí se observó un crecimiento lineal (Giedd et al., 1999). Estudios recientes señalan además que el desarrollo de la materia gris continúa hasta bien entrada la edad adulta (hasta los 30 años aproximadamente) (Sowell et al., 2003; Sowell, Thompson, Tessner, & Toga, 2001). La pérdida de sustancia gris a lo largo del desarrollo se ha interpretado como un

reflejo normal del proceso de poda sináptica que ocurre en estas etapas (Blakemore & Choudhury, 2006).

A continuación se describirá la maduración de algunos circuitos neurales específicos, por su relevancia en las conductas impulsivas y de riesgo, para posteriormente hablar del desarrollo de los diferentes sistemas de neurotransmisión durante la etapa adolescente.

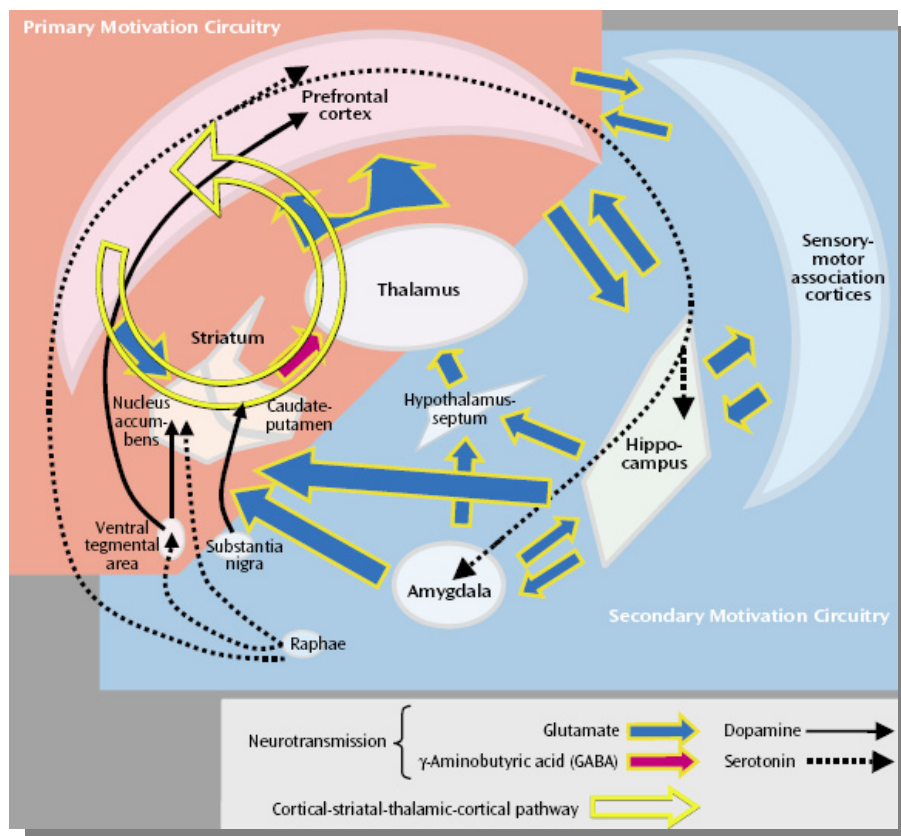
3.2.1. Maduración de los circuitos motivacionales

Es fundamental una adecuada comprensión de la anatomía y función de los circuitos motivacionales para alcanzar un conocimiento suficiente sobre los sustratos neurales implicados en la impulsividad, y en el abuso de sustancias durante la adolescencia. Para los propósitos de esta Introducción, se puede entender la motivación como una actividad cerebral que procesa una serie de entradas de información sobre el estado interno del individuo y el ambiente externo y determina, en función de dichas entradas, la conducta más apropiada a realizar (Chambers, Taylor, & Potenza, 2003). En lugar de ser un mero reflejo que produce una respuesta específica ante estímulos determinados, los procesos motivacionales requieren de cierta elaboración de la información en los estratos más superiores del pensamiento.

Siguiendo a Chambers y colaboradores, (Chambers et al., 2003) se puede dividir los circuitos motivacionales en dos módulos especializados. El primer módulo se encargaría del procesamiento más primario de la información, y estaría constituido por el córtex prefrontal y el estriado ventral, teniendo este último un acceso e influencia directa sobre los centros motores (Kalivas, Churchill, & Romanides, 1999). Este “sistema anterior” obtiene soporte de un conjunto más amplio de estructuras que le proveen de entradas sensoriales de muchas modalidades (Jentsch, Roth, & Taylor, 2000; Pennartz, Groenewegen, & Lopes da Silva, 1994). En este sentido, por ejemplo, el hipocampo y la amígdala proporcionan información tanto contextual como afectiva relevante para el procesamiento de los estímulos motivacionales (Bechara, 2001; Groenewegen,

Wright, Beijer, & Voorn, 1999; Pennartz et al., 1994) mientras que el hipotálamo y los núcleos septales proporcionan información relevante para comportamientos motivados más básicos como la ingesta de nutrientes, la agresión o las respuestas reproductoras (Swanson, 2000). Se ha sugerido que en los circuitos motivacionales primarios hay neuronas que son capaces de generar patrones de descarga que podrían codificar múltiples aspectos de los impulsos motivadores (Woodward, Chang, Janak, Azarov, & Anstrom, 1999). Estas representaciones se incardinan en asambleas neuronales interconectadas por bucles paralelos de proyecciones axonales en serie, que se originan en el córtex prefrontal y van a parar al globo pálido ventral, de ahí se dirigen al tálamo para volver posteriormente al córtex (Masterman & Cummings, 1997). Además, las neuronas estriatales están bajo control de las del córtex prefrontal, y las del estriado ventral y las del córtex prefrontal, están a su vez influenciadas por la actividad de las neuronas presentes en el hipocampo y en la amígdala, por lo que se puede observar el alto grado de interrelación entre las estructuras de este circuito (Figura IV). Se sabe asimismo que estos circuitos neurales pueden estar influenciados por determinados eventos que pueden dar prioridad a ciertos impulsos motivacionales sobre otros. Así pues, las alteraciones del repertorio motivacional “normal”, como pudieran ser la impulsividad o las adicciones, podrían en realidad estar reflejando disfunciones en los centros facilitadores o inhibitorios que influyen al circuito motivacional primario. En este sentido, diferentes estudios de neuroimagen han puesto de manifiesto la implicación de circuitos subcortico-estriatales y prefrontales en los componentes emocionales y cognitivos de la toma de decisiones así como en la acción farmacológica de las drogas de abuso (Breiter, Aharon, Kahneman, Dale, & Shizgal, 2001). A continuación pasaremos a describir estos circuitos facilitadores e inhibidores para posteriormente describir cuál es su desarrollo durante la adolescencia. Con este conocimiento, se podrá entender mejor cuál es el estado de cosas en la adolescencia por el que se podría dar la mayor tasa de impulsividad y conductas asociadas al riesgo, características de esta etapa del desarrollo.

a) Sustratos Facilitadores: La liberación de dopamina (DA) en el estriado es un acontecimiento neuromodulatorio fundamental y que está implicado en la transición de la motivación a la acción (Chambers et al., 2003). La liberación de DA en el estriado ventral (núcleo accumbens- NAcc) y en el dorsal (caudado-putamen- CPu) se origina por la estimulación que realizan las neuronas corticales y de otras áreas, sobre las neuronas dopaminérgicas del área



tegmental ventral (ATV) y la sustancia negra (SN) respectivamente. No obstante, es interesante señalar que la activación dopaminérgica estriatal tiene funciones diferentes en función de si es dorsal (CPu) o ventral (NAcc). La liberación dopaminérgica en el estriado dorsal está asociada a la iniciación y

Figura IV: Esquema general de los circuitos motivacionales

mantenimiento de conductas y hábitos motores (Sano, Marder, & Dooneief,

1996), mientras que a nivel ventral se relaciona con los estímulos de índole motivacional, la experiencia subjetiva de refuerzo y el aprendizaje de nuevos comportamientos (Ito, Dalley, Robbins, & Everitt, 2002; Masterman & Cummings, 1997). Si bien la manera exacta en que la DA contribuye a la transición de la motivación a la acción en el estriado ventral no se conoce, algunos trabajos ponen de manifiesto que la descarga dopaminérgica en el accumbens afecta directamente a los patrones de activación de grupos neuronales en esta estructura y modifica las respuestas que estas células dan ante la estimulación glutamatérgica procedente de la amígdala y el hipocampo (Figura

V) (O'Donnell, Greene, Pabello, Lewis, & Grace, 1999). Este hecho sugiere que la información relativa a los detalles sensoriales, emocionales y contextuales (dependientes de amígdala e hipocampo), que se toma en cuenta a la hora de generar representaciones de índole motivacional, está regulada por la liberación de DA en el estriado y así los centros motores inferiores, que dependen del mismo, pueden recibir toda esta información y actuar de manera acorde (Finch, 1996; Lavin & Grace, 1994; O'Donnell et al., 1999). Un hallazgo experimental que apoya esta idea es el hecho de que las lesiones del córtex frontal, la amígdala o el hipocampo, alteran los repertorios conductuales típicos que se observan ante la estimulación farmacológica de la liberación de DA en el NAcc (Burns, Robbins, & Everitt, 1993; Chambers & Self, 2002). Hay muchos estímulos que son capaces de liberar DA en el NAcc, como por ejemplo las drogas de abuso, los reforzadores naturales, estímulos asociados a reforzadores, el estrés ambiental, los estímulos aversivos e incluso los ambientes nuevos. De hecho se sabe que las drogas de abuso parece que resultan más reforzantes si se administran o consumen en ambientes novedosos (Badiani, Oates, & Robinson, 2000). Una segunda función de la DA estriatal, junto con las aferencias glutamatérgicas y las

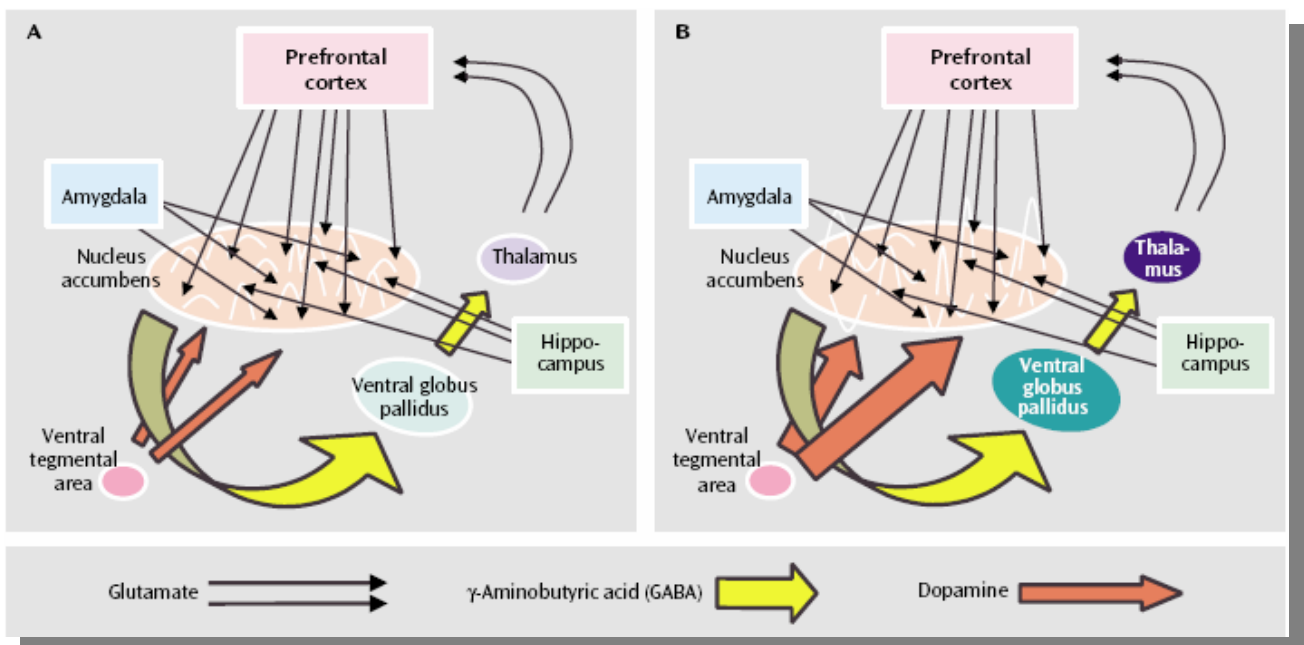


Figura V: Bucles córtico-estriado-tálamo-corticales dentro del circuito de motivación primaria. Obsérvese la descarga de DA que se da ante la exposición a una droga de abuso o una situación novedosa (B) con respecto a una situación basal (A). Esta descarga de DA altera los patrones de disparo de las neuronas del NAcc, para que codifiquen la situación en la que se ha producido la descarga, y activen los circuitos motores descendentes.

interneuronas GABAérgicas es la de determinar las acciones futuras que se realizarán ante los estímulos motivacionales. Esto se consigue a través de cambios neuroplásticos en las neuronas del NAcc. Así, por ejemplo se sabe que la liberación dopaminérgica repetida, a consecuencia de la administración intermitente de una droga, genera cambios en las proteínas celulares, en las vías de señalización intracelular, en la expresión génica y en la arquitectura celular (Hyman, Malenka, & Nestler, 2006). En este sentido la DA tendría el papel de centrar o restringir los repertorios conductuales futuros del individuo, haciéndole centrarse en aquellos que han provocado cambios neuroplásticos duraderos (Chambers et al., 2003).

b) *Sustratos Inhibidores*: Se pueden sugerir al menos dos tipos de mecanismos inhibitorios sobre el procesamiento motivacional. El primero estaría relacionado con los bucles córtico-estriato-corticales ya mencionados y el segundo sería el sistema serotoninérgico. En este último caso, se ha documentado que niveles disminuidos del neurotransmisor serotonina (5-HT) van acompañados de una tasa alta de conductas impulsivas y violentas, suicidios y juego patológico (G. L. Brown & Linnoila, 1990; Nordin & Eklundh, 1999; Virkkunen et al., 1994). Además, se ha observado que la lesión selectiva de neuronas serotoninérgicas produce pautas de comportamiento impulsivo en tareas de condicionamiento operante (Taylor & Jentsch, 2001) mientras que la administración de agentes pro-serotoninérgicos reduce la agresión social y la impulsividad tanto en animales de laboratorio como en seres humanos (Cherek, Lane, Pietras, & Steinberg, 2002; Fuller, 1996). Aunque no se conocen bien cuáles podrían ser los mecanismos que gobiernan estos efectos, se ha sugerido que las proyecciones desde los núcleos del raquí mesencefálicos hasta los circuitos motivacionales previamente descritos (incluyendo el ATV, el NAcc, el córtex prefrontal, la amígdala y el hipocampo) podrían desempeñar un papel fundamental (Chambers et al., 2003).

En cuanto al primero de los mecanismos propuestos anteriormente (el que implicaría al córtex prefrontal), se sabe desde antiguo que esta estructura está muy implicada en la regulación del comportamiento. Por ejemplo, se han observado deterioros en el control de los impulsos en

pacientes esquizofrénicos, sujetos con trastornos depresivos, trastorno antisocial de la personalidad, demencias, abusos de sustancias, o daño cerebral traumático, condiciones todas ellas asociadas a alteraciones en la función prefrontal (Chambers et al., 2003). Las investigaciones realizadas sobre las interacciones corticoestriatales han propuesto un mecanismo que explicaría las repercusiones que tendría una disfunción prefrontal sobre la regulación de los impulsos. Así, las eferencias glutamatérgicas excitatorias que surgen del córtex prefrontal y que proyectan al NAcc y el ATV, modulan la liberación de DA, la tasa de disparo y los procesos plásticos de las neuronas del NAcc. Por lo tanto, una disfunción prefrontal podría alterar cualesquiera de estos procesos, modificando la representación de los estímulos motivaciones en el NAcc, alterando los patrones basales de disparo neuronal y modificando así su respuesta ante la liberación de DA, o bien alterando los procesos de plasticidad neural en esta zona, que como ya se ha dicho pueden estar implicados en la priorización de unos estímulos motivacionales sobre otros.

Una vez descritos los circuitos neuronales implicados en la regulación de los impulsos, pasaremos a detallar su desarrollo durante la adolescencia, con el fin de entender mejor cuáles son las condiciones que llevan a los adolescentes a mostrar una mayor tasa de conductas impulsivas y relacionadas con el riesgo, que en última instancia les pueden llevar a un elevado consumo de drogas (el cannabis entre ellas).

Desarrollo de los Circuitos Facilitadores: Se ha sugerido que las alteraciones en el desarrollo del circuito motivacional primario ya descrito podrían promover las conductas de búsqueda del riesgo y existe evidencia científica de que una hiperactividad dopaminérgica, junto con una función serotoninérgica disminuida explicarían las conductas impulsivas propias de la adolescencia. Ya hemos revisado previamente los datos que muestran que los adolescentes son más reactivos a los ambientes nuevos (ver sección 3.1.1.) y parece ser que este hecho estaría relacionado con una mayor actividad dopaminérgica, por ejemplo se sabe que los peri-adolescentes muestran una mayor sensibilización conductual y mayor liberación de DA después de un tratamiento repetido

con psicoestimulantes que los adultos (Laviola, Pascucci, & Pieretti, 2001; Laviola, Wood, Kuhn, Francis, & Spear, 1995). Por otro lado, también se han descrito en seres humanos diferencias en la maduración de los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos. Por ejemplo, se ha observado que las concentraciones de metabolitos de dopamina y 5-HT en el líquido cefalorraquídeo disminuyen durante la infancia hasta alcanzar los niveles propios de los adultos alrededor de los 16 años de edad (Takeuchi et al., 2000). No obstante este hecho, la razón entre el ácido 5-hidroxiindolacético y el ácido homovanílico (principales metabolitos de la 5-HT y la DA respectivamente) está aumentada a estas edades, lo que sugiere una mayor tasa metabólica dopaminérgica que serotoninérgica (Takeuchi et al., 2000). Además, se ha observado que en monos adolescentes hay un mayor número de terminales sinápticos dopaminérgicos con respecto a los serotoninérgicos (Lambe, Krimer, & Goldman-Rakic, 2000). Otro de los procesos relacionados con el desarrollo adolescente se refiere al aumento característico de las hormonas esteroides gonadales. Los receptores para estos esteroides están altamente expresados tanto en el hipocampo como en el hipotálamo (Garcia-Segura, Chowen, Parducz, & Naftolin, 1994; Shughrue & Merchenthaler, 2000) y su activación podría modificar a los componentes del circuito motivacional primario debido a las interacciones entre los circuitos primarios y secundarios antes mencionadas (ver sección 3.2.1).

Desarrollo de los Circuitos Inhibidores: Como ya se expuso anteriormente, el córtex prefrontal no termina de madurar hasta el inicio de la edad adulta. De hecho, cuando se mide la función prefrontal a través de baterías neuropsicológicas, se observa un aumento progresivo de ésta durante la adolescencia (Chambers et al., 2003). Por lo tanto, la hiperactividad dopaminérgica podría estar compensada, al menos en parte, por un control inhibitorio progresivo del córtex prefrontal (Chambers et al., 2003).

3.2.2. Desarrollo de los principales sistemas de neurotransmisión durante la adolescencia

Sistema Glutamatérgico: A nivel general se puede decir que los niveles de unión al receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) alcanzan un pico alrededor de las 2-3 semanas de edad en ratas para decaer significativamente a partir de este momento (Guilarte, 1998). A nivel cortical, la unión del glutamato al receptor NMDA alcanza su máximo en la adolescencia temprana y desciende hasta llegar a un tercio de su nivel inicial hacia el día PN60 (Guilarte, 1998; Insel, Miller, & Gelhard, 1990). Este hecho contribuye a una pérdida de la entrada excitatoria glutamatérgica al NAcc y por tanto una reducción de los niveles del receptor NMDA en esta zona (Crews, He, & Hodge, 2007). El receptor NMDA juega un papel crucial en el establecimiento de la potenciación a largo plazo (PLP), que es un proceso neuroplástico fundamental. Así, se ha demostrado que en el NAcc se observa PLP de manera más frecuente en ratones adolescentes que en adultos (Schramm, Egli, & Winder, 2002). Esta forma de plasticidad también se ha encontrado en otras áreas relacionadas con el circuito motivador, como son el ATV (Thomas & Malenka, 2003), amígdala (Ungless, Whistler, Malenka, & Bonci, 2001) y el hipocampo (Adriani et al., 2004). Por lo tanto, se puede decir que el cerebro adolescente es particularmente plástico, en parte por la abundancia en receptores NMDA y por ende por su mayor capacidad de desplegar procesos de plasticidad sináptica (PLP).

Sistema GABAérgico: El sistema GABAérgico desempeña un papel fundamental en la remodelización de los circuitos corticales durante la adolescencia. Por ejemplo, se ha observado que en monos adolescentes hay muchas alteraciones en los marcadores pre- y post-sinápticos de GABA en el córtex prefrontal (Lewis, Cruz, Eggan, & Erickson, 2004). Además, se ha observado que los niveles basales de recaptación de cloro, dependientes del receptor GABA_A son mayores en la corteza cerebral de animales adolescentes que en la de los adultos (Kellogg, Taylor, Rodríguez-Zafra, & Pleger, 1993) y que la respuesta de la neurotransmisión GABAérgica cortical (en concreto la dependiente del receptor GABA_A) a los estresores, decrece desde la adolescencia hasta la edad

adulta (Kellogg, 1998). Si bien en el hipocampo, los niveles del transportador de GABA (GAT-1) y de la enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa (GAD) (implicada en la síntesis de GABA a partir de glutamato) alcanzan su máxima expresión durante la infancia (Hachiya & Takashima, 2001), la regulación de la transmisión sináptica hipocampal por parte del receptor GABA_B, no madura hasta la adolescencia (Nurse & Lacaille, 1999).

Sistema Serotoninérgico: Las neuronas serotoninérgicas se generan durante el período prenatal en humanos y en ratas (Lauder, 1990; Lauder & Bloom, 1974) y los niveles de 5-HT alcanzan su máximo en las etapas tempranas del desarrollo post-natal para luego disminuir hasta los niveles propios de los adultos (Hedner, Lundell, Breese, Mueller, & Hedner, 1986; Toth & Fekete, 1986). El hecho de que ocurra una reorganización post-natal de las proyecciones serotoninérgicas, aún en desarrollo, está reflejado en las fluctuaciones en el número de sinapsis serotoninérgicas durante este período. Así, estas sinapsis alcanzan sus niveles adultos en el día PN14 para luego, en el prosencéfalo basal, disminuir en número durante la adolescencia temprana (Crews et al., 2007). En cuanto a los receptores, también existe una intensa reorganización post-natal en el sistema serotoninérgico. De este modo, los niveles del receptor 5-HT_{2A} alcanzan su máxima expresión en la corteza, justo antes de la adolescencia, y después experimentan una progresiva disminución, hasta alcanzar los niveles de los adultos (Morilak & Ciaranello, 1993). Los receptores 5-HT_{1A} están altamente expresados en humanos, gatos y roedores al nacer, pero disminuyen drásticamente durante la adolescencia (Bar-Peled et al., 1991; Daval et al., 1987; E. del Olmo et al., 1998; Dillon, Gross-Isseroff, Israeli, & Biegon, 1991). La tasa de aclaración de la 5-HT en el NAcc también es cuatro veces menor en ratas adolescentes (PN30-40) que en ratas juveniles (PN10-15) o ratas adultas (PN60-80) (Teicher, 1999). Los transportadores de 5-HT sin embargo, presentan un aumento en su expresión desde el día PN7 hasta la edad adulta, sin que se observe ningún tipo de poda de los terminales que presentan estas proteínas, ni en el estriado ni en el NAcc (Tarazi, Tomasini, & Baldessarini, 1998).

Sistema Endocannabinoide: Los receptores CB1 y CB2 se expresan en la embriogénesis, durante las primeras divisiones del cigoto (Paria, Das, & Dey, 1995) y parecen ser importantes en la implantación de éste en el útero materno (Paria, Wang, & Dey, 2002). Después, siguen estando presentes a lo largo de todas las fases del desarrollo pre- y postnatal (J. J. Fernandez-Ruiz, Berrendero, Hernandez, Romero, & Ramos, 1999), lo cual se ha comprobado tanto en roedores (Buckley, Hansson, Harta, & Mezey, 1998) como en humanos (X. Wang, Dow-Edwards, Keller, & Hurd, 2003), si bien su distribución y funcionalidad estará profundamente marcada por el período de edad en el que nos encontremos, además del sexo (Rodríguez de Fonseca, Cebeira, Ramos, Martín, & Fernandez-Ruiz, 1994; Rodríguez de Fonseca, Ramos, Bonnín, & Fernandez-Ruiz, 1993). Parece que, en líneas generales, la expresión de estos receptores va aumentando hasta el día PN70 de la rata, momento a partir del cual presentarán la clásica distribución anatómica adulta (J. Romero et al., 1997). Uno de los momentos del desarrollo en el que parece que la densidad de estos receptores varía más, se corresponde con la pubertad (Rodríguez de Fonseca et al., 1993). Aparte de receptores, otros estudios han encontrado presencia de anandamida y 2-Araquidonil-Glicerol (2-AG) (Berrendero, Sepe, Ramos, Di Marzo, & Fernandez-Ruiz, 1999), así como de la Amido-Hidrolasa de Ácidos Grasos (FAAH) (Helliwell et al., 2004) en períodos fetales. Parece, por tanto, que esta temprana aparición del sistema endocannabinoide en la ontogenia podría tener una gran relevancia funcional (J. J. Fernandez-Ruiz et al., 1999; Frider, 2004). Así, por ejemplo, debido a la distribución atípica y transitoria de los receptores cannabinoides en edades tempranas con respecto al estado adulto, se piensa que podrían ser claves en procesos relacionados con el desarrollo del cerebro, tales como la proliferación y migración neuronal y glial, la elongación axonal y la sinaptogénesis (J. J. Fernandez-Ruiz et al., 1999). De hecho, han sido hallados receptores cannabinoides en zonas ricas en sustancia blanca como el cuerpo calloso, la estría terminal o el fórnix (Berrendero et al., 1999; J. Romero et al., 1997), además de en glía (astrocitos y oligodendrocitos) (Shivachar, Martín, & Ellis, 1996), entre el final del período fetal y los primeros días postnatales, lo que podría ratificar la temprana participación cannabinoide en la sinaptogénesis y migración neuronal (J. Romero et al.,

1997). Este hecho se ve apoyado por la influencia del sistema cannabinoide sobre la molécula de adhesión neural L1 (M. Gomez, Hernandez, & Fernandez-Ruiz, 2007; M. Gomez et al., 2003). Experimentos recientes ponen de manifiesto la importancia del sistema cannabinoide en fenómenos de apoptosis posiblemente a través del sistema Bcl-2/Bax durante el desarrollo cerebral (J. Fernandez-Ruiz, Gomez, Hernandez, de Miguel, & Ramos, 2004). En cuanto a la senescencia, se ha podido concluir que, en la mayoría de áreas nerviosas estudiadas, había una disminución en la expresión y actividad de receptores CB1 (Berrendero et al., 1998).

Sistema Dopaminérgico: La reorganización post-natal del sistema dopaminérgico es dependiente de la región cerebral analizada y del tipo de receptor estudiado. Así, en el córtex frontal, el entorrinal y el hipocampo, los receptores D1, D2 y D4 duplican varias veces su número entre los días PN7 y PN35 (lo cual incluye gran parte de la etapa adolescente en la rata) para luego estabilizarse hasta alcanzar la edad adulta (Tarazi & Baldessarini, 2000). En el estriado y el NAcc, los receptores dopaminérgicos experimentan una sobreproducción para luego sufrir una poda de aproximadamente un tercio de su número total durante la adolescencia, esto sugiere que durante esta etapa hay una gran remodelación de las vías del control motor y de la recompensa (Tarazi & Baldessarini, 2000; Teicher, Andersen, & Hostetter, 1995). Los receptores dopaminérgicos D3 siguen un curso temporal diferente, y no alcanzan su pico de expresión hasta la edad adulta (PN60) en el estriado, NAcc y tubérculo olfatorio (Stanwood, McElligot, Lu, & McGonigle, 1997). Por lo que respecta a los transportadores de DA (TD), éstos aumentan de manera constante, hasta alcanzar siete veces su número original, durante un período temporal comprendido entre los días PN7 y PN60, lo cual contrasta con la intensa remodelación que ocurre en los receptores dopaminérgicos durante la adolescencia (Tarazi et al., 1998).

4. El Sistema Cannabinoide

4.1. Sistema Cannabinoide Endógeno

4.1.1 Receptores cannabinoides

Descubrimiento: En los años 70 se hablaba de la existencia de un sitio de unión específico para cannabinoides que sería el responsable de los efectos mediados por el Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (THC), principal agente psicoactivo de la marihuana y el hachís. Sin embargo, debido a las propiedades lipofílicas de los cannabinoides, se hacía difícil su identificación puesto que no se obtenía la suficiente resolución mediante las técnicas de unión ligando-receptor (Basavarajappa, 2007). El primer experimento que demostró la existencia de estos sitios específicos de unión para los agonistas cannabinoides, mediante las mencionadas técnicas de unión pero usando radioligandos más potentes y menos lipofílicos (como el CP 55,940), fue llevado a cabo por Harris y colaboradores en el año 1978 (L. S. Harris, Carchman, & Martin, 1978). Durante un tiempo se siguió creyendo que el THC y demás agonistas cannabinoides interaccionaban directamente con la membrana celular debido a su naturaleza altamente lipofílica (Hillard, Harris, & Bloom, 1985), mediante un mecanismo similar al descrito para los anestésicos generales (Paton & Pertwee, 1972). No fue hasta el año 1988 cuando se caracterizó el primer receptor para cannabinoides, el CB1 (Devane, Dysarz, Johnson, Melvin, & Howlett, 1988), momento a partir del cual comenzaría la carrera en el estudio sobre la caracterización genética y bioquímica de dichos receptores.

Caracterización Bioquímica y Molecular: Tras el descubrimiento del receptor CB1 se pretendió abundar en el conocimiento de sus propiedades y estructura. En el año 1990 se consiguió su clonación a partir de una “biblioteca” de cADN de córtex de rata (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young, & Bonner, 1990). Sólo un año más tarde se caracterizaría también el receptor CB1 en humanos a partir de tronco cerebral (Gerard, Mollereau, Vassart, & Parmentier, 1991) y poco

después en ratón (Chakrabarti, Onaivi, & Chaudhuri, 1995). Han sido obtenidas dos variantes de este receptor CB1 mediante procesamiento post-transcripcional alternativo (“splicing” alternativo), el CB1a, (Shire et al., 1995) y el CB1b (Ryberg et al., 2005). En el año 1993 fue caracterizado el otro gran tipo de receptor cannabinoide, el CB2, a partir de células mieloides de bazo de rata (Munro, Thomas, & Abu-Shaar, 1993). En el año 1999 se describió un grupo de tres nuevos receptores acoplados a proteína G (Sawzdargo et al., 1999), de entre los cuales, el GPR55 parece ser que se puede considerar como un tercer receptor cannabinoide (Pertwee, 2007; Ryberg et al., 2007).

Dado que apenas se conocen datos de este último tipo de receptor, aquí revisaremos sólo las principales características moleculares de los dos primeros:

Receptor CB1: La ubicación genética del locus para este receptor en humanos está en el cromosoma 6, concretamente en la posición 6q14-6q15 (Hoehe et al., 1991). Está constituido por 472-473 aminoácidos, siendo la homología entre el hombre y la rata considerablemente elevada (93% en la secuencia nucleotídica y 98% en la secuencia polipeptídica) (Gerard et al., 1991). Todos los receptores cannabinoideos están asociados a proteínas G y presentan 7 dominios transmembrana hidrofóbicos, si bien se predice mediante métodos biofísicos y de modelización computacional que puede haber una octava hélice citoplasmática (Choi et al., 2005). En el caso que nos ocupa, el del receptor CB1, se sabe que el dominio N-terminal, situado en la cara extracitoplasmática, presenta glicosilación sobre la aspargina, y que el dominio intracelular C-terminal interacciona con las proteínas G y es importante en los procesos de adaptación y desensibilización del receptor (Song & Howlett, 1995). Ha sido descubierto también que a la altura del tercer bucle intracelular es donde el receptor cannabinoide podría interaccionar con las proteínas Gi/o (Howlett, Song, Berglund, Wilken, & Pigg, 1998).

Receptor CB2: Este receptor tiene su representación génica a nivel del cromosoma 1 (en humanos), concretamente en el área 1p35-1p36. Presenta una homología del 44% con respecto al

receptor CB1 aunque en los dominios transmembrana alcanza el 68% (Matsuda, 1997). En el caso de la homología entre el receptor CB2 humano y de rata, se encuentra una mayor divergencia que en el caso del CB1: comparten el 81% de los aminoácidos (Mukherjee et al., 2004). Su estructura tridimensional responde a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G, al igual que CB1.

Distribución Anatómica: El receptor CB1 se expresa principalmente a nivel del sistema nervioso central, mientras que el CB2 lo hace en células y tejidos relacionados con el sistema inmune. Dicha caracterización ha sido realizada tanto en la rata (Herkenham, 1991; Herkenham et al., 1991; Herkenham et al., 1990; Lynn & Herkenham, 1994; Mailleux & Vanderhaeghen, 1992; Tsou, Brown, Sanudo-Pena, Mackie, & Walker, 1998) como en el hombre (Westlake, Howlett, Bonner, Matsuda, & Herkenham, 1994). No obstante, parece ser que en el sistema nervioso también hay presencia de receptores CB2, aunque de manera mucho más restringida (Onaivi, 2006; Onaivi et al., 2006).

Los primeros estudios que permitieron mapear la distribución del receptor CB1 en el sistema nervioso central se realizaron utilizando técnicas de autorradiografía, usando el ^3H -CP 55,940 como

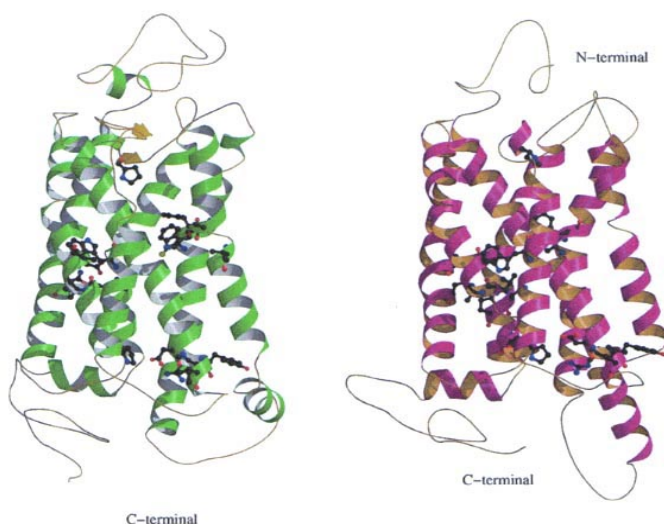


Figura VI: Estructura tridimensional de los receptores cannabinoides CB1 (izquierda) y CB2 (derecha) (Choi, Guo, & Makriyannis, 2005).

ligando radiactivo (Herkenham, 1991; Herkenham et al., 1991; Herkenham et al., 1990). Además de este ligando, posteriormente se han venido empleando otros como el SR141716A (Rinaldi-Carmona et al., 1996), obteniéndose resultados muy similares. Dichos estudios autorradiográficos indican que el receptor CB1 aparece representado en el sistema nervioso

central a tres niveles de expresión diferentes:

-Nivel de expresión alta: En los ganglios basales (CPu lateral, globo pálido, núcleo entopeduncular y SN pars reticulata), capa molecular del cerebelo, hipocampo (capa molecular del giro dentado y región CA3 del asta de amón) y capas I y IV de la corteza.

-Nivel de expresión media: En el pallidum ventral y NAcc.

-Nivel de expresión baja: En el hipotálamo (área preóptica, hipotálamo lateral y núcleos paraventricular y ventromedial), tronco cerebral y médula espinal.

Además de en tejido nervioso central, el receptor CB1 ha sido detectado en otros lugares a un nivel mucho más bajo. Así, este receptor puede hallarse en adenohipófisis (Gonzalez et al., 1999), bazo, amígdalas, hígado, corazón, útero, ovario, próstata, testículos (Christopoulos, Coles, Lay, Lew, & Angus, 2001; Pertwee, 2001b; Ross et al., 2001) y sistema inmune (en esplenocitos, linfocitos T4 y T8, células NK...) (Bouaboula et al., 1993; Daaka, Klein, & Friedman, 1995; Kaminski, Abood, Kessler, Martin, & Schatz, 1992). También han sido encontrados receptores CB1 en algunos terminales nerviosos periféricos a un nivel presináptico (Galiegue et al., 1995; Ishac et al., 1996), en la retina (Porcella, Maxia, Gessa, & Pani, 2000) e incluso en otro tipo de células nerviosas: astrocitos, oligodendrocitos y microglía (Cabral, Harmon, & Carlisle, 2001; Molina-Holgado, Molina-Holgado, Guaza, & Rothwell, 2002; Sanchez, Galve-Roperh, Rueda, & Guzman, 1998). Se sabe, además, por medio de técnicas de inmunoreactividad, que la localización neuronal del receptor CB1 puede ser tanto en somas como en dendritas y axones (Tsou et al., 1998). Estaría ubicado sobre todo a nivel presináptico (Irving et al., 2000), si bien algunos estudios electrofisiológicos sugieren una localización postsináptica (Ronesi, Gerdeman, & Lovinger, 2004).

Mediante experimentos de hibridación *in situ*, que detectaban la presencia de ARNm para el receptor CB1, se vio que había una gran correlación neuroanatómica con los lugares en los que se había detectado presencia del receptor usando técnicas autoradiográficas (Herkenham et al., 1991; Mailleux & Vanderhaeghen, 1992; Matsuda, Bonner, & Lolait, 1993). Sin embargo, algunos estudios arrojaron ciertas discrepancias a este respecto, pues en áreas como la habénula, el núcleo subtalámico medial o la SN, podían encontrarse desiguales proporciones de ARNm de CB1 y

presencia del receptor. Esto pudo justificarse al considerar que los receptores CB1 podían aparecer en los terminales axónicos mientras que la maquinaria genética para su síntesis se encontraba en el soma neural, estando ambas regiones alejadas (Herkenham et al., 1991).

Los receptores CB2 se localizan fundamentalmente en bazo, las amígdalas, nódulos linfáticos, microglía, placas de Peyer y diferentes células del sistema inmune (principalmente en linfocitos B, aunque también en monocitos y linfocitos T) (Galiegue et al., 1995; Lynn & Herkenham, 1994; Schatz, Lee, Condie, Pulaski, & Kaminski, 1997). Como ya se ha mencionado anteriormente, también hay receptores CB2 a nivel del sistema nervioso central, ya que han sido hallados en la retina de la rata (Lu, Straiker, Lu, & Maguire, 2000), cerebelo, hipocampo, tubérculo olfatorio, islas de Calleja, SN, sustancia gris periacueductal, núcleos paratroclear, paralemniscal, rojo y pontinos, colículo inferior y región parvocelular del núcleo vestibular medial (Gong et al., 2006; Onaivi, 2006; Onaivi et al., 2006).

Correlación Funcional: Existe una marcada correlación entre los lugares en los que se expresan los receptores CB1 y CB2 y los efectos farmacológicos de los cannabinoides. A continuación explicaremos esta afirmación según la región anatómica considerada:

-Hipocampo y corteza cerebral: La presencia de receptores CB1 a este nivel permite entender los efectos que los cannabinoides ejercen sobre la memoria, el aprendizaje y la cognición (Herkenham, 1991).

-Cerebelo y ganglios basales: El sistema endocannabinoide que aparece aquí explicaría los efectos sobre la actividad motora (Glass & Felder, 1997; Tsou et al., 1998). Son varios los sistemas de neurotransmisión sobre los que el sistema endocannabinoide podría ejercer dicha regulación sobre la locomoción: el GABAérgico (J. Romero, de Miguel, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1998), el dopaminérgico (J. Fernandez-Ruiz & Gonzales, 2005; J. Fernandez-Ruiz et al., 2002), etc.

-Núcleo Accumbens, ventral pallidum, amígdala y Área Tegmental Ventral: Los efectos que los cannabinoides median a este nivel tienen que ver con los mecanismos de recompensa. Se cree que la acción de los cannabinoides sobre el sistema mesocorticolímbico de la recompensa podría ser

debida a la interacción con el sistema opioide o el dopaminérgico (Gardner, 2005; Tanda, Pontieri, & Di Chiara, 1997).

-Hipotálamo e hipófisis: A pesar de la escasez de receptores CB1 a este nivel, la aparición de los mismos justificaría porqué los agonistas cannabinoides controlan la ingesta de comida, el vómito, la temperatura corporal y funciones neuroendocrinas (Rodríguez de Fonseca, Wenger, Navarro, & Murphy, 1999).

-Sustancia gris periacueductal, núcleos tálamicos, tallo cerebral y médula espinal (asta dorsal, región lumbar): A este nivel tan heterogéneo, el sistema cannabinoide mediaría su acción analgésica (Hohmann, 2002).

-Tejidos y células del sistema inmune: La presencia de receptores CB2 en el sistema inmunológico regularía los efectos inmunomoduladores de los cannabinoides (Munro et al., 1993; Schatz et al., 1997).

Otros receptores de cannabinoides: La probabilidad de que existan nuevos receptores cannabinoides es alta si consideramos que se ha observado que animales carentes de receptores CB1 (*knockout*) poseen sitios de fijación con perfil cannabinomimético que no son CB1 ni CB2 (Breivogel, Griffin, Di Marzo, & Martin, 2001). En experimentos similares con *knockout* se ha encontrado que los efectos de la anandamida sobre la vasodilatación de la arteria mesentérica eran inhibidos por el antagonista SR141716A (Jarai et al., 1999). Además, se ha visto en diferentes áreas cerebrales que los receptores cannabinoides presentan distintos niveles de actividad, lo cual podría sugerir la existencia de diferentes subtipos (Breivogel, Sim, & Childers, 1997). También se ha sugerido la presencia de un nuevo receptor sensitivo a cannabinoides a nivel de la transmisión glutamatérgica del hipocampo (Hajos, Ledent, & Freund, 2001). Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha clonado un nuevo tipo de receptor acoplado a proteína G, el GPR55 que presenta afinidad por cannabinoides (A. J. Brown, 2007; Hiley & Kaup, 2007; Johns et al., 2007; Pertwee, 2007; Petitet, Donlan, & Michel, 2006; Ryberg et al., 2007).

Ha sido descrita una acción cannabimimética para otro tipo de receptores distintos a los CB1 y CB2. Así, se descubrió que la anandamida era capaz de unirse a un tipo de canal catiónico activado por capsaicina, el receptor vanilloide VR1/TRPV1 (Smart et al., 2000; Smart & Jerman, 2000; Zygmunt et al., 1999). El mecanismo intracelular desencadenado tras la unión de la anandamida al receptor VR1 era aumentar la entrada de calcio en la célula (Olah, Karai, & Iadarola, 2001). También se sabe que la anandamida puede bloquear un subtipo de canal de potasio, el TASK-1 (Maingret, Patel, Lazdunski, & Honore, 2001).

4.1.2. Mecanismos intracelulares de transducción

Puede afirmarse de manera general que los receptores cannabinoides pueden actuar a tres niveles diferentes tras la activación por un ligando selectivo (ver Figura VII): a través de la interacción de la proteína G con diferentes elementos intracelulares, principalmente con la Adenilato Ciclasa (AC), mediante regulación de canales iónicos o por actuación sobre diferentes enzimas intracelulares, de manera independiente de la proteína G.

Modulación de la adenilato ciclasa: Los receptores cannabinoides están asociados a proteínas G, en la mayoría de los casos a los subtipos Gi/o de tipo inhibitorio (Prather, Martin, Breivogel, & Childers, 2000), aunque también se ha descrito acoplamiento con la forma excitatoria Gs (Childers et al., 1993; Slipetz et al., 1995). De esta asociación se deriva toda una inmensa reacción en cascada sobre diferentes efectores. Uno de ellos sería el efecto de la proteína G sobre la AC (Felder et al., 1995; M. A. Pacheco, Ward, & Childers, 1994). Se piensa que es la subunidad α de la proteína G la que se encarga de iniciar la señal intracelular además de mediar la acción sobre la AC (Sunahara, Dessauer, & Gilman, 1996), mientras que el dímero $\beta\gamma$ actuaría sobre otros efectores tales como los canales iónicos o la cascada que activa genes de expresión temprana (Morris & Scarlata, 1997). Los subtipos Gi/o se encargan de inhibir la AC, lo que acaba produciendo una disminución en los niveles de Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPC) intracelular. Por el contrario, el subtipo Gs estimula a la AC (Bonhaus, Chang, Kwan, & Martin, 1998; Glass & Felder, 1997), incrementándose con ello los niveles de AMPC (Glass & Felder, 1997).

Actuación sobre Canales Iónicos: Solamente el receptor cannabinoide CB1 es capaz de modificar el estado de los canales iónicos de calcio y potasio, no así el CB2 (Felder et al., 1995). La actuación sobre los canales de calcio (en los tipos N- y P/Q-) se produce en asociación con el dímero $\beta\gamma$ (de los subtipos Gi/o) a nivel presináptico, lo que perjudica la liberación de neurotransmisores desde este terminal (Felder et al., 1993; Kreitzer & Regehr, 2001; Mackie & Hille, 1992). En cuanto a los canales de potasio, se sabe que los cannabinoideos pueden aumentar su conductancia, tanto por mecanismos ligados a proteínas G como por actuación directa sobre el canal potasio tipo A (Deadwyler et al., 1993; Mackie, Lai, Westenbroek, & Mitchell, 1995).

Producción de Ácido Araquidónico: El sistema cannabinoide puede activar otras rutas de acción intracelular, como por ejemplo la movilización de ácido araquidónico, bien por mediación de las proteínas G o bien a través de la actuación de la fosfolipasa A2 o de la fosfolipasa D (Burstein, 1991; Burstein, Budrow, Debatis, Hunter, & Subramanian, 1994). Este ácido araquidónico desencadenaría toda una cascada de reacciones (Hunter & Burstein, 1997): Formación de tromboxanos, prostaglandina E2, activación de enzimas, canales iónicos, receptores, etc.

Activación de diferentes Kinasas: Tanto el receptor CB1 como el CB2 pueden actuar sobre diferentes tipos de kinasas activadas por mitógenos (MAPK, tipos p38/42/44), presumiblemente a través de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G (Bouaboula, Poinot-Chazel et al., 1995; Bouaboula et al., 1996). El receptor cannabinoide puede activar también la vía de las kinasas PKB/Akt (Gomez del Pulgar, Velasco, & Guzman, 2000; Liebmann, 2001). Se ha descrito que estas vías de transducción son muy importantes ya que ejercerían un control sobre el crecimiento, la supervivencia y la transformación maligna de las células (Vivanco & Sawyers, 2002).

Acción sobre la Ceramida: Independientemente de la influencia de las proteínas G, el receptor cannabinoide puede también acoplarse a una esfingomielinasa a través de la proteína adaptadora FAN. Esta enzima rompería la esfingomielina formando ceramida (Sanchez et al., 2001). También ha sido visto en neurogliomas humanos que la formación de ceramida puede conseguirse

por el incremento en la síntesis de ciclooxygenasa (COX-2) a través de la acción cannabinoide (Hinz, Ramer, Eichele, Weinzierl, & Brune, 2004; Ramer, Brune, Pahl, & Hinz, 2001).

Síntesis de Óxido Nítrico: Los cannabinoides pueden aumentar la expresión óxido nítrico (ON) a través de la activación de la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS) (Fimiani et al., 1999). El ON formado podría actuar como neurotransmisor retrógrado, en la relajación de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, en la plasticidad sináptica o en la morfogénesis neuronal. También se ha visto que los cannabinoides pueden atenuar la inducción de iNOS (subtipo inducible de la NOS) ejercida por estímulos inflamatorios, lo que podría atribuir un papel antiinflamatorio a estas sustancia. A este respecto se ha demostrado que la anandamida inhibe la producción de ON inducido por citoquinas (Mbvundula, Bunning, & Rainsford, 2005).

Control de la Expresión Génica y de Otros Efectores: Todas las vías descritas anteriormente pueden tener como resultado final la modulación de diferentes factores de transcripción y, consecuentemente, la expresión/inhibición de determinados genes. Así, se sabe que los agonistas cannabinoides en su unión a los receptores CB1 y CB2 pueden controlar la expresión de algunos genes como Krox-24, Krox-20 y Jun-B por una vía independiente de AC (Bouaboula, Bourrie et al.,

1995), quizá mediada por fosforilación de la ruta de las MAPK (Bouaboula, Poinot-Chazel et al., 1995). Otros factores de transcripción que pueden ser modulados por la acción de las kinasas son: CREB /ATF, Fos y NFκB (Kaminski, 1998). Ciertos estudios indican además que el THC incrementa la producción de Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) en un rango nanomolar (Velasco et al., 2001). También se ha visto que el cannabidiol es capaz de ejercer un efecto

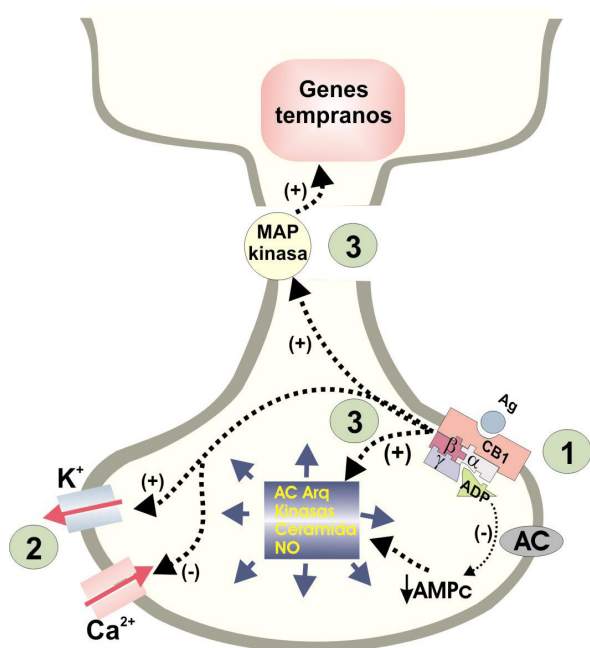


Figura VII: Cascada intracelular tras la activación de los receptores cannabinoides. Ag (agonistas cannabinoides), AC (adenilato ciclasa), ON (óxido nítrico), Ac. Arq. (ácido araquidónico), K⁺ y Ca²⁺ (canales de potasio y calcio, respectivamente)

antiapoptótico, antioxidativo y neuroprotector, inactivando a la caspasa 3 y a diferentes especies reactivas del oxígeno (ROS) (Iuvone et al., 2004).

Otras acciones intracelulares descritas hasta la fecha por el sistema endocannabinoide son la supresión de la liberación de citoquinas (IL-1 y TNF α) (B. L. Kaplan, Rockwell, & Kaminski, 2003) y quemoquinas CXCL10, CCL2 y CCL5 (en astrocitos) (Sheng et al., 2005), la inhibición de NF κ B (Sancho, Calzado, Di Marzo, Appendino, & Munoz, 2003) y la facilitación en la liberación de elementos antiinflamatorios como las citoquinas IL-4, IL-10 (Klein, Newton, Nakachi, & Friedman, 2000), IL-6 (Molina-Holgado, Molina-Holgado, & Guaza, 1998) e IL-1 (Molina-Holgado et al., 2003). Asimismo, recientemente se ha observado que el THC es capaz de modular la vía de PI3K/Akt/GSK-3 (Ozaita, Puighermanal, & Maldonado, 2007).

4.1.3. Endocannabinoides

Descubrimiento: El descubrimiento de los receptores cannabinoides sugería la existencia de sustancias químicas endógenas capaces de unirse a ellos y mediar respuestas fisiológicas. Sin embargo, no fue hasta el año 1992 cuando se pudo aislar el primer compuesto endocannabinoide a partir de un extracto lipídico de cerebro de cerdo: la anandamida (del sánscrito *ananda* que quiere decir “felicidad interior”) (Devane et al., 1992). Dicha sustancia era capaz no sólo de unirse de manera selectiva a los receptores cannabinoides sino que, además, mediaba muchos de los efectos típicos producidos por los cannabinoides (Pertwee, Fernando, Griffin, Abadji, & Makriyannis, 1995).

Una vez iniciada la búsqueda de cannabinoides endógenos, se descubrieron dos nuevos miembros de la familia: el homo- γ -linoleniletanolamida y el docosatetraeniletanolamida (Hanus, Gopher, Almog, & Mechoulam, 1993), ambos de naturaleza química idéntica a la anandamida. En 1995 se encontró el 2-AG, aislado tanto en órganos periféricos como en cerebro (Mechoulam et al., 1995; Sugiura & Waku, 2000). Otras sustancias endocannabinoides (de naturaleza similar a las anteriores) o sustancias de perfil farmacológico cannabinomimético (es decir, aunque no se unen a

receptores CB1 o CB2 presentan funcionalidad cannabinoide) descubiertas recientemente son, respectivamente: el 2-araquidonilglicerileter (noladin eter) (Hanus et al., 2001), la O-araquidonoiletanolamina (virodhamina) (Porter et al., 2002) y la N-Araquidonil-Dopamina (Di Marzo, Hill, Bisogno, Crossman, & Brotchie, 2000) por un lado, y la palmitoiletanolamina (Sugiura et al., 2000), la erucamida (Wakamatsu, Masaki, Itoh, Kondo, & Sudo, 1990) y la oleamida (Cravatt et al., 1996), por otro. Puede decirse, que desde un punto de vista estrictamente químico, los principales compuestos endocannabinoides descubiertos pertenecen a los siguientes grupos: acil-gliceroles, acil- etanolamidas, acil-dopaminas, N-acil-amidas y acil-aminoácidos.

Caracterización Bioquímica: La anandamida puede unirse tanto a receptores CB1 como CB2 (Devane et al., 1992; Munro et al., 1993), aunque presenta mayor afinidad por los primeros (Felder et al., 1993). Los mecanismos transduccionales tras esta unión comprenden la inhibición de la AC (Vogel et al., 1993), la regulación de canales de calcio (Mackie et al., 1995) y la inhibición en la síntesis de AMPc (Felder et al., 1995).

Los otros endocannabinoides descritos anteriormente pueden unirse también a receptores CB1 y CB2, si bien los mecanismos subyacentes no han sido tan estudiados. Así, por ejemplo, se sabe que el 2-AG puede inhibir la actividad de la AC casi con la misma intensidad que el THC (Mechoulam et al., 1995).

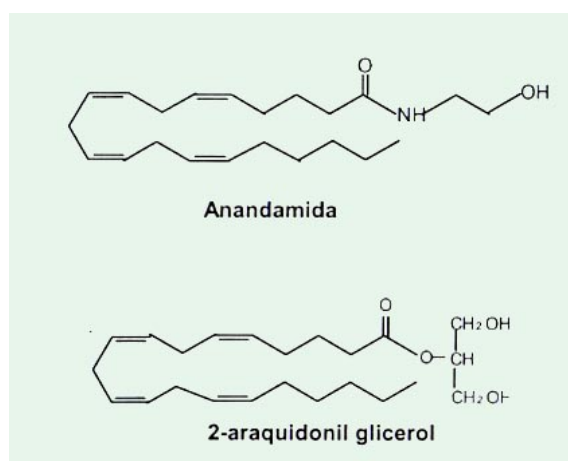


Figura VIII: Estructura química de los endocannabinoides más conocidos.

Caracterización Funcional: En general, puede afirmarse que la anandamida y el resto de cannabinoides endógenos comparten las mismas propiedades farmacológicas y funcionales que el THC: catalepsia, disminución de la actividad espontánea, antinocicepción e hipotermia, si bien puede haber diferencias en cuanto a la duración e intensidad (Crawley et al., 1993; Fride & Mechoulam, 1993; J. Romero et al., 1995)

Distribución Anatómica: Los niveles de anandamida son, en general, bastante bajos en el cerebro. La principal razón es que este endocannabinoide no se almacena en el interior celular, sino que es sintetizado a partir de lípidos de la membrana en respuesta a un determinado estímulo, lo que dificulta considerablemente su cuantificación *in vivo*. Se ha estimado que la concentración de

anandamida en cerebro de rata oscilaría entre 4 y 40 pmol/g de tejido (Felder et al., 1996).

En general puede afirmarse que existe una muy buena correlación entre los lugares donde se expresan los receptores CB1 y los lugares en los que se observa presencia de anandamida. A pesar de lo dicho, existen algunas regiones en las que no se produce tal paralelismo, como por ejemplo el tálamo o el tronco del encéfalo (Bisogno et al., 1999; Felder et al., 1996). Esto podría ser debido a la presencia de algún endocannabinoide todavía no identificado o a la diferencia en la eficacia de activación de los receptores según regiones, como por ejemplo en el hipotálamo (Breivogel et al., 1997).

Región cerebral	Anandamida	2-AG
<i>Médula espinal</i>	+++	++++
<i>Tronco encéfalo</i>	++++	+++++
<i>Mesencéfalo</i>	++	++
<i>Cerebelo</i>	+	++
<i>Diencéfalo</i>	+	+
<i>Hipocampo</i>	+++	+++++
<i>Núcleos límbicos</i>	++	++++
<i>Cuerpo estriado</i>	+++	++++
<i>Corteza cerebral</i>	+	++

Tabla I: Presencia endocannabinoide en diferentes partes del sistema nervioso (Bisogno et al., 1999)

En cuanto al 2-AG, su presencia es más elevada que la de la anandamida (tabla I) (Stella, Schweitzer, & Piomelli, 1997; Sugiura et al., 1995).

Biosíntesis y Metabolismo: La anandamida y la mayoría de los endocannabinoides citados tienen un comportamiento muy similar al de otros neurotransmisores clásicos: son sintetizados y liberados desde las neuronas, se unen a receptores de membrana para provocar sus acciones y son inactivados mediante degradación enzimática en el interior celular. Sin embargo, presentan una clara diferencia, que es, como ya se ha comentado, que se sintetizan únicamente en respuesta a un estímulo. No son, por tanto, almacenados en el interior de vesículas sinápticas, dada su naturaleza lipofílica (Piomelli, Beltramo, Giuffrida, & Stella, 1998), sino que en respuesta a un estímulo se formarían y liberarían a partir de precursores lipídicos de la membrana celular. Como en el caso de otros compuestos lipídicos, es probable que la liberación de anandamida al espacio sináptico esté mediada por transportadores de membrana del tipo P-glicoproteínas o por lipocalinas (Piomelli et al., 1998).

Han sido propuestas varias rutas metabólicas para la síntesis de la anandamida. Parece que la más razonable desde un punto de vista fisiológico es la que sugirió Di Marzo en 1994, que refleja que el citado endocanabinoide procede de un precursor fosfolipídico de la membrana celular, la N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NArPE) (Di Marzo et al., 1994). Se cree que la NArPE podría servir como reservorio para la síntesis de anandamida.

En cuanto a los mecanismos que estimulan la síntesis y liberación de anandamida, se ha observado que agentes despolarizantes de membrana como ionóforos de calcio, kainato o altas concentraciones de potasio, podrían estar detrás de tal acción (Di Marzo et al., 1994). Por tanto, tras la entrada de calcio que sigue a la despolarización neuronal se estimularía la formación del precursor NArPE (Cadas, Gaillet, Beltramo, Venance, & Piomelli, 1996) y, con ello, se formaría y liberaría la anandamida.

En el caso del 2-AG, en un estudio realizado en células de la corteza cerebral, se vio que una diacilglicerol lipasa o la fosfolipasa C eran las enzimas que actuaban sobre el precursor

diacilglicerol para provocar la síntesis del cannabinoide. Es la entrada de calcio en la célula, por despolarización, lo que activa estas enzimas (Stella et al., 1997).

Inactivación: La vida media de la anandamida es muy corta, ya que tras su liberación al espacio sináptico es rápidamente recaptada (Beltramo et al., 1997; Di Marzo et al., 1994). Los primeros estudios sobre la inactivación de la anandamida hacían pensar que ésta atravesaba la

membrana celular por difusión simple, dada su naturaleza lipofílica. Años más tarde, con la aportación de nuevos datos experimentales, se empezó a especular sobre la existencia de un transportador específico, aunque aún hoy no ha sido todavía aislado ni clonado por lo que la polémica sobre su existencia sigue en pie (Glaser, Kaczocha, & Deutsch, 2005).

Las principales hipótesis hablan de un transportador selectivo de anandamida que recapturaría dicho endocannabinoide hasta el interior celular (Beltramo et al., 1997). A pesar de que se habla de su presencia en células de la corteza de rata (Di Marzo et al., 1994; Beltramo et al., 1997), neuronas granulares de cerebelo (Hillard, Edgmond, Jarrahian, & Campbell,

1997), astrocitos (Beltramo et al., 1997) y, en general, en áreas donde también se expresa el receptor CB1 (Herkenham, 1991; Herkenham et al., 1991), existe una gran controversia sobre su existencia (Deutsch et al., 2001), proponiéndose como alternativa al transporte de

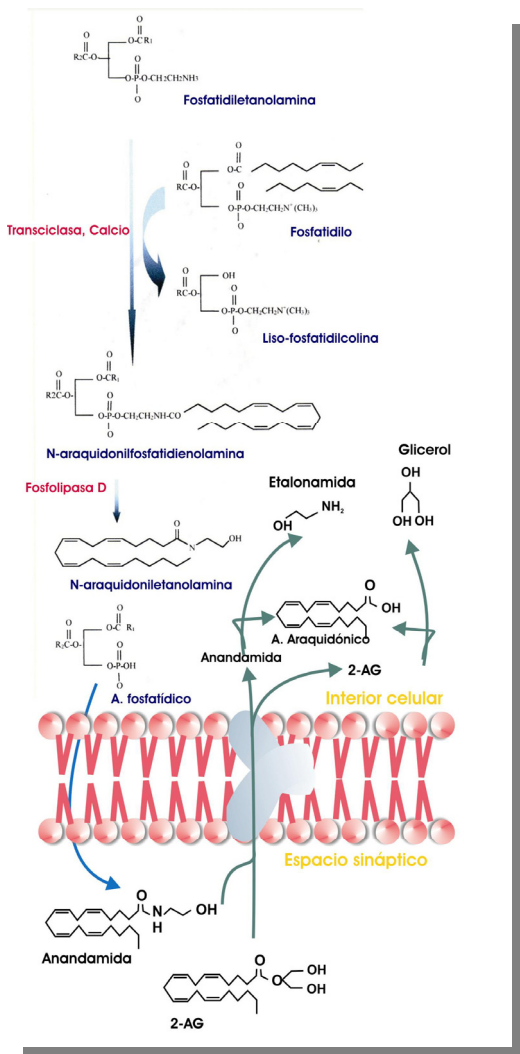


Figura IX: Ruta metabólica de los endocannabinoides. Las flechas descendentes azules se corresponden con la biosíntesis de la anandamida y las ascendentes verdes con la inactivación de la anandamida y el 2-AG. Modificado de Giuffrida y colaboradores (Giuffrida, Beltramo, & Piomelli, 2001)

anandamida una simple difusión pasiva (Hillard et al., 1997).

En el caso del 2-AG, parece que el mecanismo de recaptación también es mediado por el transportador de anandamida, aunque el proceso en el resto de cannabinoides endógenos no es tan conocido (Beltramo & Piomelli, 2000; Stella et al., 1997).

La responsable de la degradación de la anandamida, una vez en el interior celular, es la enzima FAAH (Basavarajappa, 2007; Labar & Michaux, 2007), descubierta en los años 80 (Natarajan, Schmid, Reddy, & Schmid, 1984). Esta enzima, además de metabolizar la anandamida, puede actuar también sobre el 2-AG (Goparaju, Ueda, Yamaguchi, & Yamamoto, 1998). Tras la acción de la FAAH, el endocannabinoide se transforma en ácido araquidónico y etanolamina (Deutsch & Chin, 1993).

La distribución de la FAAH en cerebro es relativamente similar a la del resto de elementos del sistema cannabinoide endógeno (Ueda, Puffenbarger, Yamamoto, & Deutsch, 2000). De este modo, los mayores niveles hallados en la rata aparecen en estriado, hipocampo, SN, tálamo, células endoteliales y sistema inmune (Bisogno et al., 1999; Di Marzo et al., 1999; Maccarrone et al., 1998).

4.1.4. Agonistas cannabinoides exógenos

Cannabinoides vegetales

Descubrimiento: A pesar de que los efectos psicológicos y terapéuticos del consumo de cáñamo (*cannabis sativa*) son conocidos desde antiguo (al menos desde hace 5000 años, en China), no fue posible determinar el principio activo que los provocaba hasta mediados del siglo XX. Fue entonces cuando los investigadores aislaron los primeros cannabinoides, el cannabinoil y el cannabidiol, si bien se observó que apenas tenían efectos psicoactivos. Pasados unos años, se consiguió aislar el Δ^9 -THC (Gaoni & Mechoulam, 1964), reconociéndolo como el principal mediador de las acciones psicoactivas de la marihuana y el hachís. Posteriormente sería aislado el Δ^8 -THC (Hively, Mosher, & Hoffmann, 1966), de estructura similar al Δ^9 -THC pero de escasa concentración en la planta. Se sabe que de los 400 elementos reconocidos en el cáñamo, 60 de ellos

están dentro del grupo de cannabinoides clásicos (Dewey, 1986) y tienen una mayor representación en las brácteas y brotes florecidos de la planta.

Caracterización Química y Funcional: Gracias a valiosos estudios basados en la relación estructura-actividad, se pudieron determinar cuáles eran los puntos clave en la química de los cannabinoides que les permitían mediar sus efectos. Algunas de las principales conclusiones obtenidas fueron: Los isómeros (-)trans eran mucho más activos que los (+)cis (Edery, Grunfeld, Ben-Zvi, & Mechoulam, 1971; B. R. Martin, Balster, Razdan, Harris, & Dewey, 1981); la longitud e hidrofobicidad de la cadena alquílica lateral del C3 era muy importante en la actividad biológica (Howlett, Johnson, Melvin, & Milne, 1988); el anillo benzopirano y el hidroxilo del fenol eran esenciales en la psicoactividad (Razdan, 1986) y efectos conductuales de los cannabinoides (Mechoulam & Edery, 1983), respectivamente; la orientación, ángulo de torsión y posición de los dobles enlaces parecían ser también importantes en la actividad cannabinoide (Razdan, 1986; Reggio, Greer, & Cox, 1989), etc.

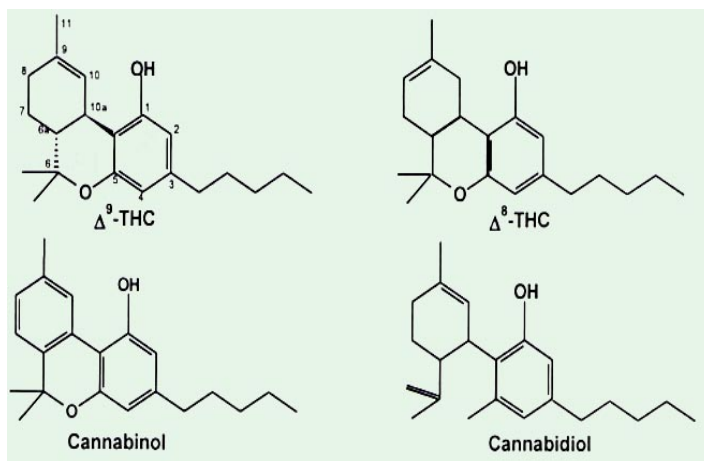


Figura X: Principales cannabinoides vegetales

El Δ^9 -THC se comporta como un agonista parcial débil. Tiene una baja afinidad por los receptores cannabinoides y un acoplamiento poco específico (Sim, Hampson, Deadwyler, &

Childers, 1996; Sim, Selley, Xiao, & Childers, 1996). Sus efectos psicológicos y fisiológicos son los clásicamente descritos tras el consumo de marihuana: catalepsia, disminución de la actividad espontánea, antinocicepción e hipotermia, entre otros.

El cannabinoide tiene una actividad psicoactiva 10 veces menor que el THC. Presenta una mayor afinidad por el receptor CB2 (Munro et al., 1993), lo que explicaría sus acciones sobre el sistema inmune. Ha sido descrito que puede inhibir a la FAAH, lo cual incrementaría los niveles de anandamida (Watanabe, Kayano, Matsunaga, Yamamoto, & Yoshimura, 1996).

El cannabidiol casi no presenta propiedades psicoactivas. Entre sus principales efectos destaca: la actividad anticonvulsión, el papel sobre el sistema inmune y el posible efecto neuroprotector al funcionar como antioxidante (Baczynsky & Zimmerman, 1983; Mechoulam, Peters, Murillo-Rodriguez, & Hanus, 2007).

Absorción y Metabolismo: Como es conocido, la principal forma de consumir preparados cannabinoides es por vía inhalatoria, fumando marihuana o hachís. Su absorción por los pulmones, llegada a la sangre y al cerebelo se produce casi de inmediato. Se estima que la cantidad de THC inhalado, necesario para producir efectos, oscila entre 2 y 22 mg (B. R. Martin, 1986), siendo la cantidad que finalmente llega al cerebro de aproximadamente 44 pg (W. Hall & Solowij, 1998; J. M. Wilson et al., 1996). Sin embargo, cuando el consumo es por vía oral, la absorción es más lenta y la presencia de los efectos de los cannabinoides es algo más débil. Una vez producida la entrada de cannabinoides en el organismo, el THC y su principal metabolito, el 11-hidroxi-THC (11-OH-THC), tienden a acumularse en tejido adiposo. Desde este depósito se van liberando ambas formas lentamente durante varios días tras el cese del consumo, lo cual puede explicar la dificultad para encontrar un síndrome de abstinencia de esta droga (Agurell, Dewey, & Willet, 1984).

La eliminación del THC se produce fundamentalmente mediante sus metabolitos en heces (68%) y orina (12%), aunque también a través del pelo, la saliva y el sudor. La maquinaria que cataboliza el THC suele estar en el hígado, siendo el sistema citocromo P450 el elemento más destacado. La primera transformación de este cannabinoide se produce a su forma hidroxilada, el

11-OH-THC (metabolito también psicoactivo, más potente que el THC). A partir de aquí pueden obtenerse muchos subproductos, aunque, de forma general, destacan las formas de ácidos libres o conjugados con ácido glucurónico (Aguirell et al., 1984).

Cannabinoides sintéticos

Gracias a los experimentos que estudiaban la relación estructura-actividad de los compuestos cannabinoides, pudo avanzarse mucho en la síntesis de nuevas sustancias. Los principales criterios de interés de estos estudios han versado en aumentar la potencia de los efectos cannabinoides de los nuevos compuestos, mejorar su afinidad y eficacia en la unión a receptores cannabinoides, potenciar determinados efectos terapéuticos eliminando las propiedades psicoactivas indeseadas y, en general, aportar nuevas herramientas que sirvan para abundar en el conocimiento del sistema cannabinoide. Los principales agonistas y antagonistas diseñados hasta la fecha son:

Análogos Sintéticos Derivados de los Cannabinoides Clásicos: Tienen una estructura de dibenzopirano. Destacan el dronabinol, el O-1057, el 11-OH-hexahidrocannabinol-dimetilheptilo (HU-243), la nabilona y el 11-OH- Δ^8 -THC-dimetilheptilo (HU-210). Este último es el agonista cannabinoide más potente, con una actividad funcional entre 100 y 500 veces mayor que el THC (Ovadia, Wohlman, Mechoulam, & Weidenfeld, 1995).

Cannabinoides No Clásicos: Este tipo de agonistas son análogos bicíclicos y tricíclicos del THC que carecen del anillo pirano. El representante más destacado es el CP 55,940 (agonista usado en nuestros experimentos), que fue utilizado por primera vez para detectar la presencia de los receptores cannabinoides en el cerebro (Devane et al., 1988). Se sabe que es un agonista parcial para la inhibición de la AC y la conductancia de calcio (Felder et al., 1993; Shen, Piser, Seybold, & Thayer, 1996) y que sus efectos fisiológicos son muy similares a los descritos para el resto de cannabinoides. Otros representantes de esta familia son: el CP 55,244, el CP 47,497, el CP 50,556 (levonantradol), el desacetilevonantradol (DALN), etc.

Aminoalquilindoles: Su estructura química deriva de la pravadolina, muy alejada de las anteriores, y el principal representante es el WIN 55,212-2. Aunque es un agonista completo, existen evidencias de que interacciona con los receptores cannabinoides de manera distinta a como lo hacen los análogos clásicos y no clásicos (Irving et al., 2000; Pertwee, 2001b). Sus efectos fisiológicos y bioquímicos son muy similares a los de otros cannabinoides (M. R. Bell et al., 1991; M. Pacheco, Childers, Arnold, Casiano, & Ward, 1991).

Eicosanoides: Este grupo se diseñó a partir del descubrimiento de los endocannabinoides. Son compuestos estructuralmente derivados del ácido araquidónico. Los principales representantes de esta familia son: La R-metanandamida, el O-585, el O-689, el araquidonilciclopropilamina (ACPA) y el araquidonil-2-cloroetilamina (ACEA). Estos dos últimos son los compuestos con mayor selectividad por CB1 (Irving et al., 2000; Pertwee, 2001b).

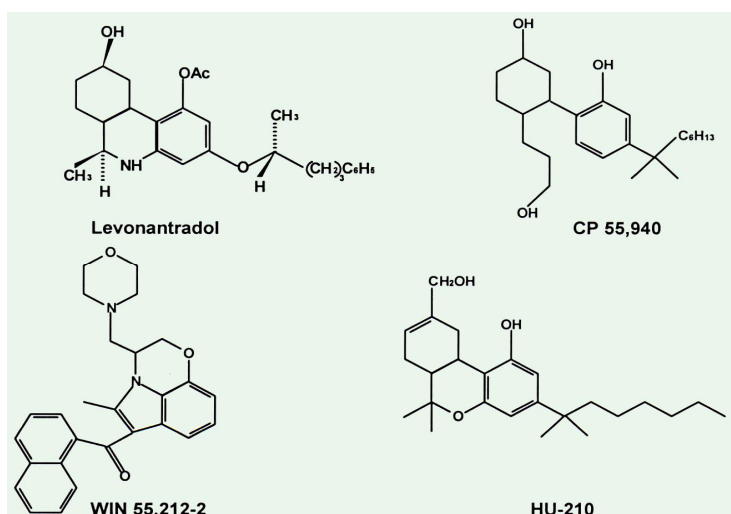


Figura XI: Principales agonistas cannabinoides

Antagonistas: El diseño de antagonistas ha sido una herramienta fundamental para avanzar en el conocimiento del sistema cannabinoide. Destaca el SR141716 (Rimonabant), un pirazol que se une a receptores CB1 y en menor medida a receptores CB2 (a dosis altas) (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Se ha descrito que puede actuar como agonista inverso (Compton, Aceto, Lowe, & Martin, 1996; Sullivan, 2000). Posteriormente se sintetizaron otros antagonistas como el AM630, el

AM251 o el LY320135 (Felder et al., 1998; Gatley, Gifford, Volkow, Lan, & Makriyannis, 1996; Pertwee et al., 1995). Existe también un antagonista selectivo para CB2, el SR144528 (Rinaldi-Carmona et al., 1998).

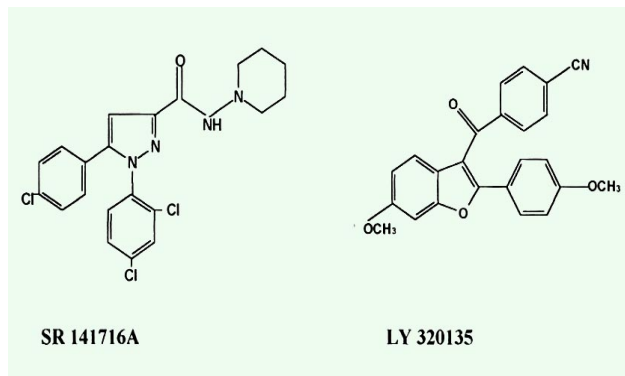


Figura XII: Principales antagonistas cannabinoides

4.2. Efectos Fisiológicos y Posibles Usos Terapéuticos de los Cannabinoides

El sistema cannabinoide endógeno aparece tan ampliamente representado en todo el sistema nervioso central, además de en otros tejidos, que son muchas las funciones biológicas que puede modular. Por ello, a continuación, haremos una descripción de los principales efectos fisiológicos producidos por los cannabinoides. Por otro lado, dado el creciente interés por la terapéutica cannabinoide en el tratamiento de diferentes patologías, aportaremos también las principales novedades a este respecto en cada una de las funciones estudiadas.

4.2.1. Control de la actividad motora

Que los cannabinoides ejercen una modulación sobre la actividad motora es ampliamente reconocido. Son tres los elementos que sostienen esta afirmación (J. Fernandez-Ruiz & Gonzales, 2005; J. Fernandez-Ruiz et al., 2002):

- 1) Se ha visto en diferentes experimentos, realizados tanto en animales como en humanos, que los cannabinoides intervienen en la función motora (tabla 2).

COMPUESTOS	EFECTOS MOTORES
THC	-Disminuye actividad espontánea y estereotipada en ratas. -Aumenta inactividad en ratas. -Aumenta hipoquinesia inducida por reserpina en ratas. -Disminuye hiperactividad inducida por anfetaminas en ratas. -Deteriora control motor fino en ratas. -Induce catalepsia en ratones. -Aumenta locomoción a dosis bajas.
CP55,940/WIN55,212-2	-Marcada inhibición motora en ratas. -Inducción de rotaciones a dosis bajas en ratones.
Anandamida	-Inmovilidad en ratas. -Disminuye estereotipias y actividad espontánea en ratas. -Aumenta catalepsia inducida por muscimol en ratas. -Induce rotaciones a dosis bajas en ratones.
Inhibidores recaptación	-Disminuye actividad espontánea en ratas. -Aumenta la inactividad en ratas.
SR141716A	-Bloquea efectos motores de los agonistas CB1. -Estereotipias e hiperlocomoción.

2) Existe una amplia distribución del sistema cannabinoide endógeno a nivel de los ganglios basales, núcleos de relevancia en el control motor (Figura XIII).

Tabla II: Efecto motor de los cannabinoides. Ver referencias en (Fernandez-Ruiz, Lastres-Becker, Cabranes, Gonzalez, & Ramos, 2002)

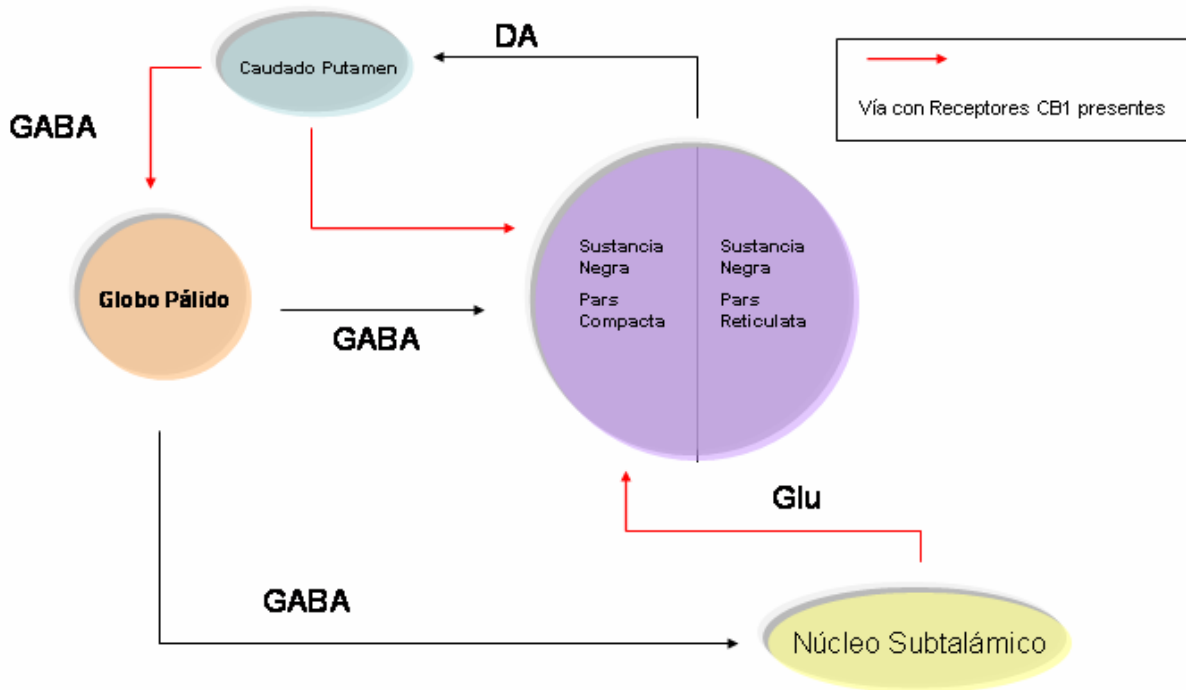


Figura XIII: Sistema endocannabinoide y centros motores

3) Los cannabinoides modulan la neurotransmisión de tres sistemas directamente relacionados con la actividad motora (DA, GABA y glutamato) a nivel de los ganglios basales. También existe una regulación cannabinoide sobre el cerebelo (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992) (tabla III).

Reconocida la relación entre la actividad motora y el sistema endocannabinoide, se piensa que los cannabinoides podrían ser usados en la terapéutica de muchas patologías motoras, como la enfermedad del Parkinson (Benarroch, 2007; Kreitzer & Regehr, 2001; Lastres-Becker & Fernandez-Ruiz, 2006; Sagredo et al., 2007), la Corea de Huntington (de Lago et al., 2006; de Lago, Urbani, Ramos, Di Marzo, & Fernandez-Ruiz, 2005; Lastres-Becker et al., 2003; Lastres-Becker et al., 2002; Maccarrone, Battista, & Centonze, 2007) o el síndrome de Tourette (Gadzicki et al., 2004; Muller-Vahl, 2003), así como en otras enfermedades que en algún momento de su desarrollo cursan con una disfunción de la actividad motora (Alzheimer, esclerosis múltiple, etc) (Baker et al., 2000; Baker et al., 2001; Croxford & Miller, 2004; Croxford et al., 2007). Es sabido,

además, que en todas estas patologías el propio sistema cannabinoide se ve afectado, aunque de manera menos intensa que otros sistemas de neurotransmisión (Glass, 2001): en el caso del Parkinson, se sabe del aumento de receptores CB1 (o ARNm para CB1) en diferentes áreas de los ganglios basales; en el corea de Huntington hay disminución de CB1 y endocannabinoides también a nivel de los ganglios basales; además, se han visto cambios en la expresión de CB1 y endocannabinoides en centros de control motor en el Alzheimer.

SISTEMA NEUROTRANSMISOR	EFFECTOS NEUROQUÍMICOS
Neuronas nigroestriatales (DA)	-Disminución receptores D1/D2 en estriado por agonistas CB1. -Disminución actividad por agonistas CB1. -Efectos en generación potenciales acción por agonistas/antagonistas CB1.
Neuronas de proyección estriatal (GABA)	-Reducción efectos hipoquinéticos causados por cannabinoides con antagonistas GABA-B. -Disminución recaptación GABA en globo pálido y SN por agonistas CB1. -No efectos en síntesis GABA por agonistas CB1. -Efectos controvertidos sobre liberación GABA. -Reducción de actividad GABAérgica por antagonistas CB1.
Aferencias corticoestriatales y neuronas subtalámiconigrales (Glutamato)	-Inhibición de liberación de glutamato en SN y estriado por agonistas CB1.
Oliva inferior y capa molecular del cerebelo	-Estimulación de las salidas del córtex cerebelar.

Tabla III. Efectos neuroquímicos de los cannabinoides en el control motor (referencias en (J. Fernandez-Ruiz et al., 2002).

4.2.2. Control de la ingesta y del balance energético corporal

Los cannabinoides pueden estimular el apetito y regular el balance energético corporal (Crespo, Gomez de Heras, Rodriguez de Fonseca, & Navarro, 2008; Fernandez, Porras, Mormede, Spampinato, & Chaouloff, 2003; Fride, Bregman, & Kirkham, 2005; Lamota et al., 2008; J. Wang & Ueda, 2008). Sin embargo, algunos trabajos (los menos) hablan de un efecto contrario, puesto que se vio, usando un tratamiento crónico con THC (Manning,

McDonough, Elsmore, Saller, & Sodetz, 1971; Miczek & Dixit, 1980) y sendos tratamientos agudos con los agonistas CP 55,940 (McGregor, Issakidis, & Prior, 1996) y HU-210 (Giuliani, Ottani, & Ferrari, 2000), que se reducía la ingesta de comida y la ganancia de peso corporal. La explicación de

estos resultados podría ser el efecto aversivo causado por la administración aguda de la droga o fenómenos de gran déficit motor (McGregor et al., 1996; E. M. Romero et al., 2002). No es de extrañar esta respuesta bifásica ya que los efectos de los cannabinoides (sobre la actividad motora, el control de las emociones, etc) son en numerosas ocasiones claramente dosis-dependientes (McGregor et al., 1996). En otro orden, se ha visto que los cannabinoides pueden ser esenciales durante el desarrollo de las conductas alimentarias, pues controlan el reflejo de succión en roedores (Fride et al., 2007; Fride et al., 2003; Mechoulam, Berry, Avraham, Di Marzo, & Fride, 2006).

Son varias las estructuras anatómicas sobre las que el sistema cannabinoide puede actuar a la hora de ejercer su mediación en la ingesta: en el sistema límbico (ejerciendo una evaluación hedónica de la comida, quizá a nivel del NAcc) (Kirkham & Williams, 2001), en el hipotálamo y cerebro medio (mediante control de los núcleos relacionados con la saciedad y la ingesta, o el núcleo del tracto solitario, rigiendo funciones de integración) (McGregor et al., 1996; E. M. Romero et al., 2002), en el sistema digestivo (R. Gomez et al., 2002) y en el tejido adiposo (Sharkey & Pittman, 2005). Experimentos autorradiográficos indican presencia tanto de ligandos como de receptores cannabinoides a esos niveles (Herkenham et al., 1991; Herkenham et al., 1990).

El control que los cannabinoides ejercen sobre la ingesta de comida y el balance energético podría ser debido a interacciones con otros sistemas de neurotransmisión (como el opioide, quizá a través de la dinorfina) (Fernandez et al., 2003; Shoham, Marcus, Abraham, & Berri, 2000) o por modulación de ciertas moléculas relacionadas con estos procesos. Así, por ejemplo, se sabe de la interacción con sustancias como la leptina (Breivogel et al., 2001), la grelina (Cani, Montoya, Neyrinck, Delzenne, & Lambert, 2004) y la melanocortina (Fride et al., 2005).

La posibilidad terapéutica de los cannabinoides sobre estos procesos fisiológicos podría llevar dos caminos diferentes: por un lado, incrementar el apetito, en enfermos con cáncer que presentan caquexia y malnutrición, en pacientes con anorexia nerviosa o en enfermos de SIDA (Watson, Benson, & Joy, 2000). Por otro lado, podría plantearse un uso contrario: reducir el exceso de apetito para combatir los problemas de obesidad. En este sentido se ha propuesto el uso de

antagonistas cannabinoides como el SR141716A (Rimonabant) (Astrup, 2005; Hirschel, 2005; Iuvone et al., 2004; H. B. Kaplan et al., 1987; Van Gaal, Rissanen, Scheen, Ziegler, & Rossner, 2005; van Oosten, Killestein, & Polman, 2005; Vickers & Kennett, 2005). También es conocido el uso antiemético de los cannabinoides, que han sido usados en enfermos con cáncer que presentaban muchas náuseas debido a la quimioterapia (Irving et al., 2000; Vincent, McQuiston, Einhorn, Nagy, & Brames, 1983).

4.2.3. Regulación de la función neuroendocrina

El sistema cannabinoide endógeno puede actuar sobre el eje H-H-A (Biscaia et al., 2007; Cota et al., 2003; W. G. Drew & Slagel, 1973; Gonzalez et al., 1999; Hill & Gorzalka, 2006; Hill, Kambo, Sun, Gorzalka, & Galea, 2006; Johnson, Dewey, Ritter, & Beckner, 1978; Marco et al., 2006; Pagotto, Marsicano, Cota, Lutz, & Pasquali, 2006; Tzavara, Wade, & Nomikos, 2003; Volkow et al., 1991; Weidenfeld, Feldman, & Mechoulam, 1994; Wenger, Ledent, & Tramu, 2003) y sobre el eje H-H-G (T. T. Brown & Dobs, 2002; Cabral et al., 2001; Craft & Leidl, 2008; S. Dalterio, Bartke, Roberson, Watson, & Burstein, 1978; S. L. Dalterio, Mayfield, & Bartke, 1983; Gonzalez et al., 1999; Ling, Thomas, Usher, & Singhal, 1973; Maccarrone & Wenger, 2005; Scorticati et al., 2004; Watanabe et al., 1996), mediando en la síntesis y liberación de muchas hormonas y, consecuentemente, en la respuesta fisiológica que éstas regulan.

Se ha detectado presencia de receptores CB1 tanto en el hipotálamo, especialmente en el núcleo paraventricular (Wenger & Moldrich, 2002), como en la hipófisis (Gonzalez et al., 1999). Dicha ubicación cannabinoide podría regular la liberación de otros neurotransmisores implicados en la liberación hormonal de los ejes H-H-A e H-H-G. Así, parece que el sistema cannabinoide, por estimulación de los sistemas GABAérgico, dopaminérgico, opioidérgico y de CRF, o a través de la inhibición del sistema noradrenérgico y glutamatérgico, podría ejercer su acción sobre los ejes H-H-A y H-H-G, posiblemente a través de hormonas como la GnRH hipotalámica (Di, Malcher-Lopes, Halmos, & Tasker, 2003; Rodriguez de Fonseca et al., 1999; Rubio et al., 1995; Weidenfeld et al., 1994). No obstante lo dicho, no se descarta que la acción cannabinoide en el control endocrino se

produzca a otros niveles distintos del hipotalámico: se ha visto una influencia desde núcleos límbicos relacionados con el estrés (Martin-Calderon et al., 1998), así como una acción directa de los cannabinoides sobre la liberación de hormonas desde los órganos sexuales –testosterona, estradiol- (Rodriguez de Fonseca et al., 1999) y la glándula tiroides –Hormona Estimulante del Tiroides; TSH- (S. L. Dalterio, Michael, Macmillan, & Bartke, 1981).

Además de la implicación cannabinoide sobre la regulación hormonal, ha sido descrito el proceso contrario, es decir, que ciertas hormonas –como las gonadales esteroideas o los glucocorticoides- pueden modular los efectos de los cannabinoides sobre la expresión de ciertos genes, como los que continen la información para expresar la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la proopiomelanocortina (POMC) en el hipotálamo, mediante un proceso de feedback negativo del eje H-H-A (Gonzalez et al., 1999). Una forma en la que parece que estas hormonas periféricas podrían ejercer esa retroalimentación negativa, sería mediante regulación en la expresión de endocannabinoides y ARNm del receptor CB1 a nivel de la hipófisis (Di et al., 2003; Gonzalez et al., 2000). A continuación, en la tabla 4, se muestra un resumen de la implicación de los cannabinoides sobre la liberación de ciertas hormonas (J. J. Fernandez-Ruiz et al., 1997; Rodriguez de Fonseca et al., 1999; Weidenfeld et al., 1994; Wenger, Fragkakis, Giannikou, & Yiannikakis, 1997):

HORMONA	ACCIÓN CANNABINOIDE
Prolactina	↓ Secreción
Corticosterona	↑ Secreción
ACTH	↑ Secreción
GH	↓ Secreción
LH	↓ Secreción
FSH	↓ Secreción
Testosterona	↓ Secreción
TSH	↓ Secreción

Tabla IV: Cannabinoides y liberación hormonal

4.2.4. Efectos sobre la nocicepción

Los cannabinoides son sustancias de gran eficacia analgésica (McCarberg, 2007). Su poder sobre el control del dolor ha sido ampliamente estudiado en diferentes modelos de dolor (visceral, neuropático, en tests como el “tail-flick” o el “hot-plate”) (Porter & Felder, 2001; P. B. Smith et al., 1994), y se ha llegado a afirmar que podrían ser muy eficientes en el alivio del dolor neuropático y tónico (F. A. Campbell et al., 2001; Pertwee, 2001a).

La acción antinociceptiva mediada por el sistema endocannabinoide puede ser a nivel supraespinal, espinal o, incluso, periférico (Ahluwalia, Urban, Capogna, Bevan, & Nagy, 2000; L. J. Drew, Harris, Millns, Kendall, & Chapman, 2000; Hohmann, 2002; Malan et al., 2001; Pertwee, 2001a; Tsou et al., 1998).

La forma en la que el sistema cannabinoide ejerce su control antinociceptivo puede ser variada. Así, se sabe que los cannabinoides inducen una inhibición GABAérgica sobre las neuronas que se proyectan desde la sustancia gris periacueductal y el bulbo ventromedial rostral (núcleos implicados en la modulación del dolor) al no permitir su liberación (Manahan-Vaughan & Kulla, 2003), además de modular la liberación de noradrenalina y 5-HT en neuronas descendentes (Ameri, 1999; Pertwee, 2001a) y la liberación y síntesis de péptidos opioides endógenos en el sistema analgésico descendente (Gonzalez et al., 1999). También se ha descubierto que los cannabinoides podrían regular los estímulos nociceptivos a nivel postsináptico, inhibiendo la excitabilidad neuronal (Beltramo et al., 2000).

Tras lo anteriormente descrito, éstas son algunas de las posibilidades terapéuticas: se piensa en los cannabinoides como sustancias aliviadoras del dolor agudo (con Levonantradol) (P. B. Smith et al., 1994), del dolor crónico (con benzopiranoperidina, THC a dosis bajas o agonistas más potentes como el WIN55,212-2), especialmente si es de tipo alodínico-neuropático (Ulugol, Karadag, Ipci, Tamer, & Dokmeci, 2004) y de la hiperalgesia (B. R. Martin & Lichtman, 1998). Está siendo desarrollado en Canadá (Universidad de McGill) un ensayo médico que analiza la seguridad del uso clínico del cannabis en pacientes con dolor crónico derivado de la esclerosis

múltiple o la artritis. También en este país se ha aprobado un medicamento anti-dolor a base de cannabis (el Sativex) (www.gwpharm.com).

4.2.5. Control de la ansiedad y otras conductas emocionales

Con respecto a la ansiedad, los agonistas cannabinoideos provocan a menudo un efecto contradictorio, ya que tienen un efecto dosis-dependiente (Viveros, Llorente, Moreno, & Marco, 2005): a dosis bajas pueden actuar como ansiolíticos mientras que a dosis altas son ansiogénicos (Arevalo, de Miguel, & Hernandez-Tristan, 2001). En el caso del antagonista SR141716 se da una bipolaridad similar, puesto que en algunos estudios se indica su carácter ansiolítico (Tzavara, Davis et al., 2003), mientras que otros reflejan una acción ansiogénica (Arevalo et al., 2001). Parece que el sustrato neuroanatómico estaría localizado en el circuito límbico, área de gran importancia en la modulación emocional, donde se ha visto que los cannabinoideos regulan la liberación de dos sustancias relacionadas con las respuestas emotivas: el GABA y el neuropéptido CRH. Otra sustancia relacionada con el control de las emociones, sobre la que el sistema cannabinoide parece tener una gran influencia, es la colecistoquinina (CCK) (Ferrer, Asbrock, Kathuria, Piomelli, & Giuffrida, 2003).

Se cree que el sistema endocannabinoide podría regular un cierto tono basal sobre diferentes respuestas fisiológicas (nocicepción, actividad motora...). Con respecto al caso que nos ocupa, se piensa que la anandamida podría controlar la ansiedad por medio de un tono ansiolítico intrínseco. Esto pudo afirmarse gracias a dos experimentos: en uno, se bloqueó a la enzima que cataboliza la anandamida (FAAH), viéndose una clara respuesta ansiolítica en diferentes test empleados (Ferrer et al., 2003). En otro experimento, ratones carentes del receptor CB1 mostraron un incremento de conductas ansiosas en el laberinto en cruz (Haller, Bakos, Szirmay, Ledent, & Freund, 2002).

Los cannabinoideos están implicados también en otras respuestas emocionales como la agresión y la interacción social: su efecto sobre estas conductas es, al igual que para la ansiedad, marcadamente bifásica (Mechoulam, 2002; Sulcova, Mechoulam, & Fride, 1998): dosis bajas se relacionan con conductas agresivas mientras que las dosis altas inhiben la conducta social. Se ha

visto que los cannabinoides pueden, en situaciones de estrés inducido, aumentar los niveles de agresividad y ansiedad en ratas (Carlini, Lindsey, & Tufik, 1976; Hill & Gorzalka, 2004; Ueki, Fujiwara, & Ogawa, 1972). El sustrato neuroquímico podría ser la neurotransmisión serotoninérgica, muy implicada en la respuesta agresiva (Mechoulam, 2002).

El uso de compuestos cannabinoides podría trasladarse al tratamiento de algunos desórdenes emocionales. Así, se están llevando a cabo investigaciones con el antagonista SR141716 por su efecto antidepresivo y ansiolítico (Griebel, Stemmelin, & Scatton, 2005).

4.2.6. Efectos sobre el aprendizaje y la memoria

Uno de los efectos de los cannabinoides más claramente descritos es el deterioro en los procesos de aprendizaje y memoria, tanto en humanos como en primates y roedores. A continuación se detalla la implicación del sistema cannabinoide en tales procesos.

Tres son las áreas cerebrales donde la expresión del sistema endocannabinoide (anandamida, 2-AG, FAAH, CB1...) podría ejercer su función en el control de la memoria y el aprendizaje: el hipocampo (Sullivan, 2000; Tsou et al., 1998), el sistema septo-hipocampal (Gessa, Mascia, Casu, & Carta, 1997; Gifford & Ashby, 1996; Kathmann, Bauer, Schlicker, & Gothert, 1999) y el córtex prefrontal (Auclair, Otani, Soubrie, & Crepel, 2000).

Son múltiples los efectos que sobre la memoria y el aprendizaje pueden provocar los cannabinoides.

En la siguiente tabla aparecen reflejados algunos de los más representativos:

COMPUESTO	EFEECTO COGNITIVO
THC	Déficit memoria a corto y largo plazo Déficit memoria espacial (test radial/ratas)
WIN55,212-2	Déficit memoria espacial (test radial/rata)
CP55,940	Déficit memoria espacial (test radial/ratas)
SR141716A	Reversión de efectos generados por agonistas cannabinoides Efectos <i>per se</i> sobre la memoria
Anandamida	Participación en la formación de la memoria Déficit memoria (inhibición PLP)
2-AG	Participación en la formación de la memoria Déficit memoria (inhibición PLP)

Tabla V: Cannabinoides y aprendizaje

Los mecanismos fisiológicos por los cuales los cannabinoides provocan toda la batería conductual presentada en la tabla anterior tienen que ver, fundamentalmente, con su interacción sobre otros sistemas de neurotransmisión: en general, los cannabinoides pueden alterar las respuestas hipocampales, como bien han dejado de manifiesto los trabajos de Campbell (K. A. Campbell, Foster, Hampson, & Deadwyler, 1986a, , 1986b) y Heyser (Heyser, Hampson, & Deadwyler, 1993). Parece que su influencia sería a nivel de la neurotransmisión glutamatérgica que genera la PLP, implicándose sobre todo en procesos de memoria espacial. Se cree que los cannabinoides inhibirían la liberación de glutamato (a nivel presináptico), no pudiéndose activar correctamente los receptores para glutamato NMDA y AMPA (Fujiwara & Egashira, 2004; Sullivan, 2000). Los cannabinoides pueden modular también la liberación glutamatérgica a nivel del córtex frontal y controlar así diferentes funciones cognitivas como las que nos ocupan (Auclair et al., 2000).

Por otro lado, a nivel del sistema septo-hipocampal (áreas encargadas de la adquisición y almacenamiento de la memoria), se ha visto que los cannabinoides pueden también regular la memoria, probablemente mediante inhibición de la liberación de acetilcolina (Gessa et al., 1997; Gifford & Ashby, 1996). Esta inhibición colinérgica también fue vista en el córtex prefrontal-medial (Gessa, Casu, Carta, & Mascia, 1998).

El déficit cognitivo provocado por los cannabinoides podría implicar también al sistema dopaminérgico, pues se vio que tanto en el deterioro de la memoria como en la inhibición colinérgica del hipocampo había una clara y doble influencia de los receptores D2 y CB1 (Beltramo et al., 2000). Otros sistemas implicados podrían ser la CCK, hormona también relacionada con la memoria (Sebret et al., 1999) ya que en un estudio el agonista WIN 55,212-2 provocó la disminución hipocampal de CCK (Beinfeld & Connolly, 2001).

Existen teorías que hablan del posible papel del tono endocannabinoide en la formación de la memoria, bien mediante consolidación de la memoria a corto plazo, bien a través de mecanismos de olvido (por ejemplo, de memorias aversivas) (Cannich et al., 2004) y eliminación de memoria asociada con la edad (Chaperon & Thiebot, 1999).

Podrían las sustancias cannabinoides ser una interesante herramienta en la lucha de enfermedades como el Alzheimer o el síndrome de Korsakoff. En este sentido, se ha visto que el SR141716A puede aumentar los niveles de acetilcolina en el hipocampo (Gessa et al., 1997; Gifford & Ashby, 1996) y facilitar la memoria a corto plazo (Terranova et al., 1996).

4.2.7. Efecto sobre la reproducción y la conducta sexual

Aparte de la ya explicada acción cannabinoide sobre la liberación hormonal en el eje H-H-G, muy importante en la regulación de las conductas sexuales, cabe mencionar también que los cannabinoides pueden modular la conducta sexual y la reproducción al actuar sobre otras dianas como pueden ser los órganos sexuales o, a nivel del sistema nervioso, la ruta mesocorticolímbica de la recompensa.

Con respecto al fenómeno de la reproducción, cabe decir que se ha detectado presencia endocannabinoide en diferentes órganos del sistema reproductor: así, tanto en testículos como en útero se vio expresión de receptores CB1 y síntesis y degradación de anandamida (Gerard et al., 1991; Schmid, Paria, Krebsbach, Schmid, & Dey, 1997; Sugiura et al., 1996). La plausible función que el sistema cannabinoide desarrolla a este nivel sería, en el caso masculino, ejercer un control sobre la espermatogénesis y la fertilidad, como se ha demostrado en diferentes trabajos (Schuel et

al., 2002; Sugiura et al., 1996), y en el caso femenino controlar la implantación del embrión en el útero (Paria et al., 2002) así como facilitar la comunicación útero-embrión, pues ya desde las primeras divisiones celulares aparecen receptores CB1 y CB2 en este último (Fride & Shohami, 2002; Paria et al., 2002). Se sabe también que el tratamiento crónico con cannabinoides puede malograr la función reproductiva (Gubellini et al., 2002; Schuel et al., 2002; Wenger & Moldrich, 2002). Así, por ejemplo, el tratamiento con THC provocaba un retraso en la abertura vaginal en ratas hembra y disminuía el número de ovocitos por ciclo (Wenger, Croix, Tramu, & Leonardelli, 1992).

Los cannabinoides pueden inhibir la conducta sexual, tanto en humanos (Georges, Stinus, Bloch, & Le Moine, 1999) como en roedores (Ferrari, Ottani, & Giuliani, 2000; Merari, Barak, & Plaves, 1973; Rodriguez de Fonseca et al., 1999). El soporte neuroanatómico podría estar en diversos núcleos de la ruta mesocorticolímbica de la recompensa (Pfaus et al., 1990) así como en núcleos hipotalámicos (el ventromedial y el área preóptica medial) (Coolen, Peters, & Veening, 1996; Hull et al., 1999). Se sabe que la región mesocorticolímbica controla la motivación sexual por medio de una acción dopaminérgica (Damsma, Pfaus, Wenkstern, Phillips, & Fibiger, 1992; M. R. Melis & Argiolas, 1995; Paredes & Agmo, 2004) y que la implicación cannabinoide sobre esta vía de neurotransmisión es bien destacada (Tanda et al., 1997). Otro sistema de neurotransmisión por el cual los cannabinoides podrían modular la respuesta sexual es el opioidérgico, muy relacionado con el endocannabinoide e implicado en la motivación sexual (van Furth & van Ree, 1994; Van Furth, Wolterink-Donselaar, & van Ree, 1994).

4.2.8. Efectos psicológicos

Los principales efectos conductuales que el consumo de cannabinoides produce en humanos son: euforia, relajación, alteraciones de la percepción del tiempo y del espacio, experiencias sensoriales aumentadas, sonrisa fácil, locuacidad e incremento de la sociabilidad, deterioro de la memoria a corto plazo, deterioro de capacidades psicomotoras, dificultad de concentración, estupor, enlentecimiento en las reacciones, disminución de la actividad mental y alteración de la visión

periférica (Heffernan, Jarvis, Rodgers, Scholey, & Ling, 2001; Menhiratta, Wig, & Verma, 1978; Ranganathan & D'Souza, 2006; Soueif, 1976; Stark-Adamec, Adamec, & Pihl, 1981; Weckowicz, Collier, & Spreng, 1977; Wert & Raulin, 1986). Con el consumo continuado enseguida se observa tolerancia para muchos de estos efectos subjetivos de los cannabinoides (R. T. Jones, 1987), de modo que la duración de los efectos conductuales no se suele prolongar más allá de 4-6 horas (Volkow et al., 1991), aunque algunos autores han descrito que los efectos cognitivos podrían prolongarse por más de un día.

Existen una serie de efectos adversos derivados del consumo de marihuana o hachís, la mayoría producidos tras consumos prolongados de cannabis (aunque también observados en ciertos consumidores noveles o inexpertos). Los principales efectos en este sentido son: ansiedad, pánico, trastornos disfóricos, depresivos, despersonalización y desrealización, conductas “bizarrras” y auto-hetero-agresivas, delirios o alucinaciones (Negrete, 1983; Volkow et al., 1991; J. M. Wilson et al., 1996). Se ha indicado asimismo, que el consumo prolongado de marihuana podría provocar ciertas alteraciones psicológicas (Manzanares, Uriguen, Rubio, & Palomo, 2004):

Síndrome amotivacional: supone apatía y pérdida de motivación. Algunos autores creen que el cannabis sólo incrementaría estos síntomas ya presentes previamente en los consumidores.

Deterioro cognitivo: se ha observado cierto deterioro en la resolución de test psicológicos que miden memoria. Existe discrepancia en cuanto a la reversibilidad de este deterioro. En este sentido, se encontró que había un deterioro sutil en determinadas capacidades cognitivas no reversible tras períodos prolongados de abstinencia.

Otros trastornos psiquiátricos: podría existir una relación entre consumo de marihuana y enfermedades mentales (manía, depresión o esquizofrenia). Ha sido descrito un estado psicótico con síntomas esquizofrénicos y maníacos llamado “psicosis cannábica”. Parece, además, que la marihuana empeora la esquizofrenia, si bien algunos autores indican que dicho consumo podría ser un desencadenante de esta patología. Además, el consumo de cannabinoides durante la adolescencia podría incrementar el riesgo a desarrollar síntomas o patologías psicóticas en la edad adulta.

4.3. Implicación del Sistema Cannabinoide Durante el Desarrollo

El gran consumo de derivados cannabinoides en la sociedad occidental ha despertado la alarma ante el posible peligro de tal actividad. Debido a que el inicio de este consumo suele darse a edades muy tempranas, se ha incrementado aún más la preocupación, pues la juventud es un período de profundos cambios tanto biológicos como psicológicos. A continuación abundaremos en algunas de estas cuestiones.

4.3.1. Efectos de los cannabinoides durante el desarrollo

La implicación del sistema cannabinoide en procesos de desarrollo y migración neuronal parece importante según lo anteriormente expuesto. Además, ciertos estudios con cannabinoides realizados sobre cultivos de células fetales y durante diferentes períodos del desarrollo parecen ratificar dicha importancia:

Estudios realizados en cultivos de células fetales: Se ha demostrado que en cultivos de neuronas mesencefálicas, la exposición crónica a THC, desde el quinto día de gestación (DG5), provocaba un incremento en la actividad y expresión de la tiroxina hidroxilasa (TH) en el DG14, enzima esencial en la síntesis de muchos neurotransmisores (Bonnin, de Miguel, Hernandez, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1995); y en la guía axonal y sinaptogénesis. Otros estudios similares demostraron la importancia del receptor CB1 sobre la expresión de la TH, pues el efecto era revertido por el antagonista SR141716A (Hernandez, Garcia-Gil, Berrendero, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1997). También fueron expuestos a THC y anandamida cultivos de células gliales (dada la aparente relevancia que tienen durante el desarrollo), viéndose una mayor movilización de ácido araquidónico y actividad de la glucosa (Sanchez et al., 1998).

Estudios realizados en la etapa perinatal: Han sido muchos los trabajos científicos que han abordado la implicación del tratamiento cannabinoide sobre el desarrollo cerebral en etapas tan tempranas y vulnerables como la perinatal. En estos experimentos se le administraba el cannabinoide a la madre, gestante o lactante, y a las crías les llegaba la droga a través de la placenta

(Belue, Howlett, Westlake, & Hutchings, 1995) o de la leche materna (Jakubovic & McGeer, 1977; Perez-Reyes & Wall, 1982). El objetivo era ver qué efectos se derivaban de esta exposición y concluir de qué modo el sistema cannabinoide intervenía en el desarrollo y qué peligros potenciales podían ser trasladados al consumo humano. A continuación representamos en la tabla VI las principales conclusiones obtenidas de estos experimentos:

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO PERINATAL CON THC EN RATAS
<i>-Incremento de la actividad exploratoria en ratas machos y de la actividad locomotora en hembras. Mayor sensibilidad a los efectos reforzantes de la morfina (Rubio et al., 1995).</i>
<i>-Alteraciones actividad motora en edad adulta (Navarro, Rubio, & de Fonseca, 1995) y durante la lactancia (Ben-Shahar et al., 2007).</i>
<i>-Disminución de aprendizaje en edad adulta y alteración conducta exploratoria en crías de rata (Navarro et al., 1995).</i>
<i>-Efecto ansiolítico medido a través del test de interacción social en ratas (Navarro, de Miguel, Rodriguez de Fonseca, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1996).</i>
<i>-Retraso de la pubertad y aparición de conductas copulatorias en púberes (J. Fernandez-Ruiz, De Miguel, Hernandez, Cebeira, & Ramos, 1992).</i>
<i>-Retraso de respuestas ante el estrés en adultos (Fernández-Ruiz et al., 1992, 1994).</i>
<i>-Menor expresión del transportador de glutamato en astroglia del cerebelo durante el período juvenil de la rata (Berrendero et al., 1998).</i>
<i>-Incremento de TH en DG14 con diferencias sexodimórficas (Bonnin, de Miguel, Castro, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1996; Bonnin et al., 1995).</i>
<i>-Estimulación actividad de DA mesolímbica en día PN 15 (hembras) y PN 30 (machos) (Rodriguez de Fonseca, Cebeira, Fernandez-Ruiz, Navarro, & Ramos, 1991) y reducción en hembras adultas (S. Martin et al., 2003).</i>
<i>-Desaparición de la mayoría de cambios neuroquímicos y conductuales producidos por la exposición perinatal en edad adulta (Navarro et al., 1996; Navarro, Rubio, & Rodriguez de Fonseca, 1994).</i>
<i>-Claro dimorfismo sexual en la mayoría de los efectos estudiados (Garcia-Gil et al., 1997).</i>
<i>-Mayor resistencia al dolor en edad adulta (Vela, Fuentes, Bonnin, Fernandez-Ruiz, & Ruiz-Gayo, 1995).</i>
<i>-Efecto negativo sobre la función ejecutiva, el control de impulsos y la atención en niños (Fried, Watkinson, & Gray, 1992; Moore, Vinsant, Nader, Porrino, & Friedman, 1998).</i>
<i>-Mayor vulnerabilidad al consumo de opiáceos en ratas adultas (Vela et al., 1998).</i>
<i>-Modificación niveles de receptores μ-opioides en edad adulta (Vela et al., 1998) y ARNm de proencefalina en período fetal (Perez-Rosado, Manzanara, Fernandez-Ruiz, & Ramos, 2000) y edad adulta (Gonzalez et al., 1999).</i>
<i>-Influencia sobre la actividad motora mediada por GABA (Garcia-Gil et al., 1999).</i>
<i>-Cambios en los niveles de 5-HT en edad adulta (Molina-Holgado, Amaro, Gonzalez, Alvarez, & Leret, 1996).</i>
<i>-Influencia sobre la molécula de adhesión neural L1 en algunas estructuras cerebrales (M. Gomez et al., 2007; M. Gomez et al., 2003).</i>
<i>-Disrupción de la retención de la memoria a corto y largo plazo en ratas macho (Mereu et al., 2003).</i>
<i>-Cambios a largo plazo en los niveles de met-enkefalina y β-endorfina (Darmani, Janoyan, Kumar, & Crim, 2003).</i>

Tabla VI: Efectos del THC perinatal.

De todos estos estudios puede concluirse que la exposición perinatal a THC tiene múltiples repercusiones sobre el desarrollo, si bien algunos de los efectos encontrados en las primeras edades juveniles y puberales pueden desaparecer en edad adulta (Navarro et al., 1996; Navarro et al., 1995; Navarro et al., 1994). No obstante, han sido bastantes los efectos que se han hallado en la edad adulta. Además, ha quedado demostrado un claro efecto sexo-dimórfico (García, de Miguel, Ramos, & Fernández-Ruiz, 1996), lo cual apunta hacia la importancia del sistema endocannabinoide en la diferenciación sexual del cerebro.

Se han descrito resultados similares al utilizar otros tratamientos con cannabinoides diferentes al THC en el período perinatal: así, tras la exposición con WIN 55,212-2, se ha visto un déficit cognitivo en animales adultos, asociado a una disrupción de la PLP y a modificaciones en los niveles de glutamato en el hipocampo (Mereu et al., 2003).

Estudios realizados en la edad postnatal temprana y durante el período peridestete:

Mediante el uso de tratamientos agudos con CP 55,940 o HU-210 durante los días inmediatos al nacimiento (día postnatal 12 y 15, respectivamente) de ratas Long-Evans y Wistar se vio una inhibición de la actividad motora (Martin-Calderon et al., 1998; McGregor et al., 1996) así como un efecto ansiolítico. Cuando fue empleado el agonista cannabinoide WIN 55,212-2, también de forma aguda durante el período peridestete, pudo observarse una reducción de la actividad motora además de un leve efecto analgésico (N. Del Olmo, Higuera-Matas et al., 2006). Sin embargo, ni la anandamida ni el THC provocaron efectos significativos sobre la actividad motora a estas edades cuando se aplicaron en ratones (Fride & Mechoulam, 1996a, , 1996b).

Estudios realizados en la etapa periadolescente: Como ya se ha mencionado, la pubertad/adolescencia es un período de significativos cambios biológicos: cambios en los receptores cerebrales, cambios en el control neuroendocrino, cambios neuroanatómicos, especialmente en córtex frontal e hipocampo y cambios en áreas relacionadas con los circuitos de recompensa, por lo que plantear cómo podría verse afectada toda esta fisiología por los

cannabinoides parece muy necesario, sobre todo considerando el alto índice del consumo de marihuana entre la población adolescente (Fergusson, Boden, & Horwood, 2006; Morral, McCaffrey, & Paddock, 2002) y el hecho de que parece que la adolescencia es un período temporal clave sobre el que las drogas pueden tener graves consecuencias (Viveros et al., 2005). Ver Tabla VII en la página siguiente.

TRATAMIENTO	EDAD EXPOSICIÓN	EFECTOS
WIN 55,212 (Ellgren, Hurd, & Franck, 2004)	Subcrónico DP 28-32 ratas	-No aumenta la vulnerabilidad para el consumo de anfetamina en adolescentes y adultos ni los niveles de DA
Marihuana (Ehrenreich et al., 1999)	Adolescencia humana (edad: 16 años)	-Déficit de atención en edad adulta
THC (Stiglick & Kalant, 1985)	Crónico adolescencia rata	-Mayores efectos conductuales irreversibles que si el tratamiento se aplicaba a animales adultos
WIN55,212 (Schneider & Koch, 2003)	Crónico DP 40-65 ratas	-Daños sensorimotores y cognitivos (memoria/aprendizaje) en edad adulta
THC (Pope et al., 2003)	Crónico Adolescencia humana (< 17 años)	-Mayor déficit cognitivo en adultos que si el tratamiento es tras los 17 años
THC (W. Wilson et al., 2000)	Crónico Adolescencia humana (< 17 años)	-Mayor flujo sanguíneo cerebral y menor tamaño en peso y altura
WIN55,212 (Schneider, Drews, & Koch, 2005)	Crónico DP 40-65 ratas	-Aumenta el déficit social y la conducta de juego en la edad adulta al aplicar el tratamiento en animales lesionados a nivel cortical durante su época fetal
Marihuana (Tzilos et al., 2005)	Adolescencia humana	-Carencia de cambios en el volumen hipocampal al comparar con no fumadores
WIN55,212 (Pistis et al., 2004)	Subcrónico (3 días) DP 35-42 ratas	-Tolerancia en la actividad DA a nivel del VTA al aplicar una dosis aguda de WIN y tolerancia cruzada en la misma actividad al emplear otras drogas de abuso en la adolescencia.
CP 55,940 (E. M. Romero et al., 2002)	Agudo DP 40 ratas	-Disminución de la actividad motora en el test del tablero con agujeros e incremento de los niveles de corticosterona en suero. No se vieron cambios en los niveles de DA ni en el estriado ni en el sistema límbico.
CP 55,940 (O'Shea, Singh, McGregor, & Mallet, 2004)	Crónico DP 30-51 ratas	-Incremento de la ansiedad y daños en la memoria en la adolescencia.
Marihuana (Gispén-de Wied, 2000)	Crónico Adolescencia humana	-Incremento del riesgo de padecer psicosis o esquizofrenia.
THC (Ellgren, Spano, & Hurd, 2007)	Crónico PN28-49	-Aumento de la autoadministración de heroína y cambios en el sistema opioide endógeno.
THC (Rubino et al., 2008)	Crónico PN 35-45	-Comportamiento depresivo y anhedonia en hembras adultas tratadas durante la adolescencia y descenso en CREB fosforilado y prodinorfina.

Tabla VII: Efectos a largo plazo del consumo de cannabinoides en la adolescencia

En el presente trabajo hemos pretendido dar un paso más en el estudio de la implicación cannabinoide durante el desarrollo. Por tal motivo nos pareció conveniente trasladar la exposición cannabinoide a otro período de edad también muy vulnerable y de importantes modificaciones, como es el periaolescente (Adriani & Laviola, 2004), para evaluar después qué repercusiones se pueden generar sobre la fisiología y la conducta en la edad adulta.

4.4. Los Cannabinoides como Drogas de Abuso

La drogadicción es un fenómeno de gran complejidad debido a la multiplicidad de variables que convergen. Para un análisis adecuado hay que contemplar el consumo de sustancias de abuso desde una perspectiva psicológica, social y biológica. Conscientes de esa interdisciplinariedad, nosotros nos centraremos fundamentalmente en los aspectos neurobiológicos de este fenómeno en estudios de laboratorio.

Los cannabinoides, tomados en forma de marihuana o hachís, se encuentran entre las drogas ilegales más consumidas en los países occidentales. Por ello son abundantes las investigaciones, tanto a nivel epidemiológico hechas en humanos como a nivel más básico realizadas en animales de laboratorio, que intentan dilucidar las propiedades adictivas de dichas sustancias. Se viene sugiriendo en los últimos años que el consumo en etapas juveniles de cannabis podría servir como “puerta de entrada” para el consumo de otras drogas de abuso en edades adultas (Lynskey, 2002). Por esto, se hace necesario conocer las propiedades reforzantes de los cannabinoides en sistemas que podrían modificar la vulnerabilidad para el consumo de otras drogas.

4.4.1. Consumo de cannabinoides en humanos

En nuestra sociedad los preparados cannabinoides se suelen ingerir fumados, bien en forma de cigarrillos, denominados popularmente “porros”, bien por medio de una pipa de agua. Los consumidores suelen inhalar profunda y mantenidamente el humo para maximizar la absorción del THC y otros componentes psicoactivos por los pulmones. Se calcula que un porro suele contener entre 0,5 y 1 gr de cannabinoides (variable según hablemos de marihuana o hachís, este último con

mayor concentración en sustancias psicoactivas). La cantidad de THC necesaria para producir efectos en los fumadores oscila entre 2 y 22 mg, lo cual varía mucho según los fumadores sean o no consumidores habituales. El THC que se libera por cada porro fumado se calcula en un rango entre un 20-70%, con una biodisponibilidad entre el 5-24%. Se han hecho estudios para averiguar la cantidad de cannabinoides que llegan finalmente al cerebro; si estos estudios se extrapolan a humanos, podríamos hablar de una cantidad mínima en torno a 44 microgramos (J. M. Wilson et al., 1996).

El momento para el inicio del consumo de cannabis suele producirse en la adolescencia, período de gran vulnerabilidad y riesgo en el que los jóvenes “coquetean” con diferentes sustancias de abuso (Fergusson et al., 2006; Laviola, Adriani, Terranova, & Gerra, 1999; Morral et al., 2002). Sin embargo, aunque muchos jóvenes de países occidentales se inician en el consumo de cannabinoides, son pocos los que se convierten en consumidores regulares: la mayoría de los jóvenes suele dejar el consumo entre los 20 y los 30 años de edad. Se cree que solamente un 10% de los que se inician en el consumo de cannabis en edades tan tempranas mantendrá después el consumo regular de esta droga.

4.4.2. Propiedades reforzantes de los cannabinoides. Fenómeno de dependencia y tolerancia

Propiedades Reforzantes: Una forma de estimar el potencial adictivo de las drogas es mediante el procedimiento de la autoadministración intravenosa de drogas. Gracias a esta metodología es posible valorar directamente el efecto reforzante de una droga manifestado como el esfuerzo desarrollado por el animal para conseguirla. Usando este paradigma, en la mayoría de las investigaciones se ha visto que los animales no se autoadministraban THC (Mansbach, Nicholson, Martin, & Balster, 1994), aunque se ha descrito algún resultado en la dirección contraria, tanto con roedores como con primates (Justinova, Tanda, Redhi, & Goldberg, 2003; Takahashi & Singer, 1979). También, cuando se han empleado potentes agonistas como el WIN 55,512-2 se ha

comprobado que los sujetos se autoadministraban esa sustancia (Fattore, Martellotta, Cossu, Mascia, & Fratta, 1999).

Con otro tipo de técnica, la de autoadministración intracerebroventricular, también se observó que los cannabinoides (concretamente el agonista CP 55,940) eran autoadministrados por los sujetos experimentales (Rubino et al., 2008).

Un modelo experimental que permite valorar indirectamente las propiedades adictivas de las drogas es el condicionamiento preferencial al sitio (Schechter & Calcagnetti, 1993), que asocia determinados ambientes con las acciones reforzantes producidas por una droga. Pues bien, mediante esta técnica pudo comprobarse que, en la mayoría de los casos, los cannabinoides tenían propiedades aversivas (Chaperon, Soubrie, Puech, & Thiebot, 1998; McGregor et al., 1996; Sanudo-Pena et al., 1997), si bien se encontraron resultados en la dirección contraria a dosis bajas (Lepore, Vorel, Lowinson, & Gardner, 1995).

Por último, mediante el procedimiento experimental de discriminación de drogas en animales, que se utiliza para la estimación de los efectos subjetivos de las drogas en humanos, se ha comprobado que diferentes especies de animales pueden discriminar el THC frente a otras sustancias (Balster & Prescott, 1992).

Dependencia Cannabinoide: No han sido encontradas manifestaciones somáticas de un síndrome de retirada espontáneo tras el cese del tratamiento crónico con THC en diferentes especies animales, ni siquiera tras la aplicación de dosis extremadamente elevadas (Aceto, Scates, & Martin, 2001; Diana, Melis, Muntoni, & Gessa, 1998; McMillan, Harris, Frankenheim, & Kennedy, 1970). Además, cuando se usaron otros agonistas cannabinoides se obtuvieron similares resultados (Young, Katz, & Woods, 1981). Existen, sin embargo, otros trabajos en los que se apreció un síndrome de retirada tras el cese de un tratamiento con WIN 55,212-2 (Aceto et al., 2001; Oliva, Ortiz, Palomo, & Manzanares, 2003). Al tener éste una vida media más corta que otros cannabinoides, se ha justificado el síndrome de abstinencia observado en base a las diferencias farmacocinéticas de este agonista.

Cuando se administraba un antagonista cannabinoide tras el consumo continuado de algún agonista cannabinoide (por ejemplo el SR-141716A), sí que se desencadenaba un síndrome de retirada (Aceto, Scates, Lowe, & Martin, 1996; Aceto et al., 2001; Cook, Lowe, & Martin, 1998; Ledent et al., 1999; Tzavara et al., 2000). Los síntomas de este síndrome en rata fueron: movimientos de sacudida de tronco y cabeza, temblor generalizado, ataxia, posturas anormales, ptosis, piloerección, disminución de la actividad locomotora, masticación, lameteo, fricción y rascado (Aceto et al., 1996; Aceto et al., 2001; Cook et al., 1998; Ledent et al., 1999; Tzavara et al., 2000). Se sabe que el receptor implicado en estos fenómenos de retirada es el CB1, ya que al utilizar el antagonista SR141716A sobre ratones *knockout* para dicho receptor, que habían recibido un tratamiento crónico con THC, no se desencadenó ningún signo de abstinencia (Ledent et al., 1999). Sin embargo, no se descarta que los síntomas observados se deban a un efecto *per se* del antagonista al actuar como agonista inverso (Pertwee, 1997).

Cuando se producía abstinencia cannabinoide se observaban cambios bioquímicos similares a los que aparecen en los síndromes de abstinencia de otras drogas, es decir, se producía una neuroadaptación que conllevaba efectos contrarios a los observados con el tratamiento agudo de la droga (Koob, 1996). De este modo, se descubrió un incremento en la liberación de CRH en el sistema mesolímbico (Caberlotto, Rimondini, Hansson, Eriksson, & Heilig, 2004) y una disminución de la actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas durante la abstinencia cannabinoide (Diana, Melis, & Gessa, 1998), así como una disminución de los niveles de DA en el NAcc y ATV (Diana, Melis, & Gessa, 1998; Tanda, Loddo, & Di Chiara, 1999). También fue observado un incremento en la vía de la AC a nivel del cerebelo, lo cual parece estar relacionado con las manifestaciones somáticas de la abstinencia cannábica (Tzavara et al., 2000), además de cambios en la ruta del AMPc (Hutcheson et al., 1998). Más recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia del ácido araquidónico (Anggadiredja et al., 2003) y el óxido nítrico (Rawls, Rodríguez, Baron, & Raffa, 2006) en los procesos de retirada cannábica así como

la posible implicación de los receptores de adenosina A2A en las propiedades adictivas de los cannabinoides (Soria et al., 2004).

Los estudios realizados en humanos revelan que los grandes consumidores de cannabis no padecen un síndrome de abstinencia con sintomatología severa tras la retirada de la droga (Kaminski et al., 1992). Los principales signos de abstinencia que pueden presentarse son irritabilidad, anorexia, dolores, ansiedad y aumento de la vigilia, diarrea, insomnio, sudoración, salivación y temblor (Budney, Hughes, Moore, & Vandrey, 2004), aunque nunca de forma tan severa como para modificar la vida del individuo (Haney, Ward, Comer, Foltin, & Fischman, 1999; R. T. Jones, Benowitz, & Herning, 1981; Kouri & Pope, 2000; Kouri, Pope, & Lukas, 1999). También se han hecho estudios de abstinencia sobre individuos sanos no habituados al consumo de cannabis. En este caso los resultados hallados fueron similares a los obtenidos con grandes consumidores de la droga (R. T. Jones et al., 1981). Puede concluirse diciendo que la severidad de esta abstinencia depende sobre todo de la dosis de marihuana o hachís, la frecuencia de consumo y la duración del uso (Haney et al., 1999; R. T. Jones et al., 1981; Volkow et al., 1991). Los medicamentos usados para prevenir el síndrome de abstinencia cannábica son varios: el bupropión, el divalproex, etc... (Haney et al., 2004).

En otros estudios hechos con humanos, se ha apuntado la importancia de los factores genéticos para el desarrollo del abuso y la dependencia del cannabis. En un estudio realizado con gemelos, 19 parejas de monocigotos mostraron concordancia para abuso o dependencia, frente a 5 parejas dentro de los que eran dicigotos. Estos resultados ponen de relieve la importancia de los factores genéticos en los problemas por el uso del cannabis (Kendler & Prescott, 1998).

Fenómenos de Tolerancia: La administración crónica de diferentes agonistas cannabinoides desarrolla un fenómeno de tolerancia (pérdida de efectos o aumento de la dosis para mantener los mismos) a la mayor parte de sus respuestas farmacológicas, tal y como se ha demostrado en diferentes especies animales (Kaminski et al., 1992).

La tolerancia a los efectos de los cannabinoides se produce sobre un amplio grupo de respuestas: la nocicepción, la actividad locomotora, la temperatura corporal, la evolución del peso corporal, las respuestas cognitivas, etc... (Dalton, Smith, Smith, & Dewey, 2005; Maldonado & Rodriguez de Fonseca, 2002). Este fenómeno puede observarse con gran rapidez en modelos animales, incluso tras la administración de una segunda dosis elevada (Kaminski et al., 1992; Maldonado & Rodriguez de Fonseca, 2002).

Los mecanismos que podrían explicar estos fenómenos de tolerancia son dos: farmacocinéticos y farmacodinámicos. En el primer caso, se explicaría la tolerancia por fenómenos de absorción, distribución, biotransformación y excreción de compuestos cannabinoides. Se piensa, sin embargo, que el papel de estos mecanismos es muy secundario (B. Martin, Agurell, Nordqvist, & Lindgren, 1976; B. Martin, M. Nordqvist et al., 1976; B. R. Martin, Harvey, & Paton, 1976). Los procesos farmacodinámicos parece que tienen un mayor peso para explicar los fenómenos de tolerancia, sobre todo los relacionados con la regulación a la baja de receptores CB1 o con procesos de desensibilización de los mismos. Así, por ejemplo, se ha visto modificada la expresión de receptores CB1, principalmente una regulación a la baja, en diversas áreas cerebrales durante la administración crónica de agonistas cannabinoides (Oviedo, Glowa, & Herkenham, 1993; Rubino et al., 2008). También los niveles de ARNm que codifican para el mencionado receptor se vieron disminuidos durante el tratamiento crónico con cannabinoides (J. Romero, Berrendero et al., 1998; Rubino et al., 2008). No obstante, existen datos contradictorios: Algunos grupos no encontraron cambios en el número de receptores CB1 ni en los niveles de su ARNm durante la administración crónica de THC (Abood, Sauss, Fan, Tilton, & Martin, 1993); incluso, se ha observado que la expresión de este ARNm aumentaba a nivel de cerebelo e hipocampo (Zhuang et al., 1998). También la administración crónica puede afectar a otros sistemas moleculares como la actividad funcional de las proteínas G acopladas a receptores cannabinoides. Se vio que la administración prolongada de cannabinoides disminuía los niveles del ARNm que codifica para ciertas subunidades de la proteína G, aunque los niveles totales de esta proteína no se vieron alterados (Rubino et al.,

2008). Además, se habla de que los cambios producidos en estas proteínas G están relacionados con fenómenos de desensibilización de los receptores CB1. En este sentido, se vio disminución de la actividad de las proteínas G tras administración de THC o anandamida en diferentes estructuras cerebrales, lo que también podría justificar la tolerancia cannabinoide (Rubino et al., 2008; Sim, Hampson et al., 1996). Por otro lado, se ha descrito que hay modificaciones en la capacidad de acoplamiento del receptor CB1 a sus agonistas tras exposiciones prolongadas a cannabinoides (Oviedo et al., 1993; J. Romero et al., 1995).

Como es de esperar, tanto la desensibilización de los receptores CB1 como su regulación a la baja redundarán en una mayor actividad de los mecanismos intracelulares que este receptor controla mediante inhibición, como el aumento en la actividad de la AC y de la vía AMPc/PKA (Rubino et al., 2008; Selley, Cassidy, Martin, & Sim-Selley, 2004). Experimentos algo más recientes han demostrado que el tratamiento crónico con THC incrementa la cascada intracelular de Kinasas Reguladas por Señales Extracelulares ERK (ERK, CREB y Fos B) (Rubino et al., 2008). Parece que todos estos mecanismos descritos serían esenciales en la adaptación neuronal que se produce tras el tratamiento crónico con cannabinoides, en procesos tales como el aprendizaje, la formación de la memoria, la plasticidad sináptica y la adicción a drogas (Hyman et al., 2006; Nestler, 2004).

Otro elemento que indicaría que los efectos farmacodinámicos podrían ser los encargados de los fenómenos de tolerancia es el hecho de que la duración temporal de los cambios bioquímicos inducidos por la administración crónica de cannabinoides es muy corta, de acuerdo con la corta duración del fenómeno de tolerancia cannabinoide (Di Chiara et al., 2004).

También ha sido descrito el fenómeno contrario al de la tolerancia, el de la sensibilización a drogas (que es un fenómeno que consiste en la mayor sensibilidad a los efectos de una droga conforme aumenta su consumo), cuando se administraban cannabinoides de manera subcrónica (Cadoni, Pisanu, Solinas, Acquas, & Di Chiara, 2001; Rubino et al., 2008). Incluso, ha sido descrita una sensibilización cruzada con otras drogas de abuso (Tanda et al., 1997).

4.4.3. Mecanismo de recompensa y sistema cannabinoide

En el año 1954, Olds y Milner pusieron en marcha una técnica experimental a la que llamaron autoestimulación eléctrica intracraneal. Con ella pudieron concluir que las áreas cerebrales que respondían más favorablemente a la estimulación eran: bulbo olfatorio, septum, amígdala, NAcc, hipocampo, corteza entorrinal y prefrontal, hipotálamo lateral y la zona comprendida entre la banda diagonal de Broca hasta el ATV. Con este inicio experimental se sentaban las bases para el estudio de uno de los circuitos funcionales y neuroanatómicos más importantes del sistema nervioso central: el mecanismo de recompensa mesocorticolímbico (ver figura XIV). Mediante una compleja circuitería neural este sistema se encarga de codificar el placer y la recompensa en procesos biológicos esenciales para la supervivencia de las especies como la ingesta de comida y bebida o la actividad sexual, de modo que la satisfacción que sigue a la consecución de estas conductas favorece que se reproduzcan en un futuro. De manera análoga, este mecanismo de recompensa cerebral satisface la dependencia a determinadas sustancias de abuso que está detrás del fenómeno de la drogadicción.

De entre todos los núcleos mencionados antes, hay dos que tienen una particular

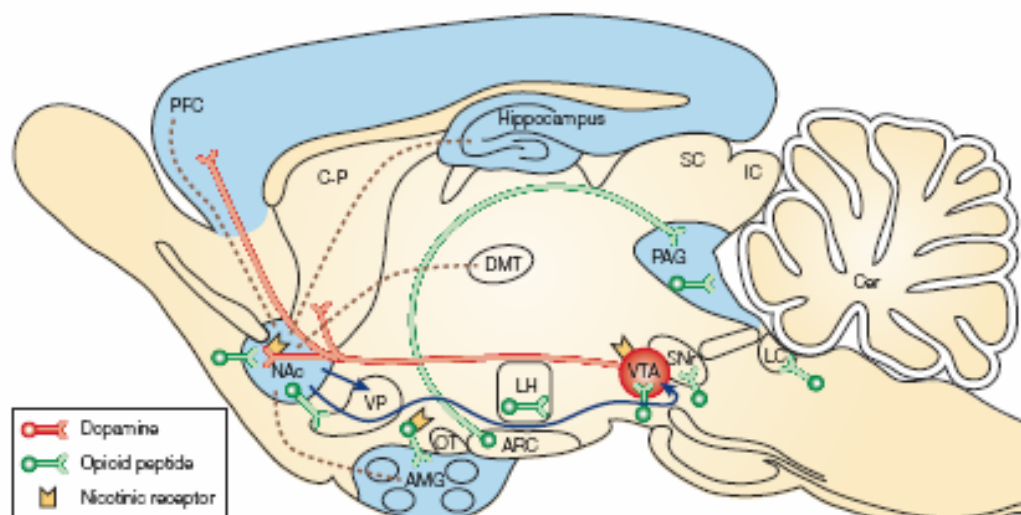


Figura XIV. Circuito mesocorticolímbico de la recompensa: PFC: Corteza Prefrontal; CP: Caudado-Putamen; PAG: Sustancia Gris Periacueductal; LH: Hipotálamo Lateral; AMG: Amígdala, VP: Pálido Ventral; ARC; Núcleo Arqueado del Hipotálamo; LC: Locus Coeruleus; OT: Tubérculo Olfatorio; DMT: Núcleos Talámicos Dorsomediales; SC: Colículo Superior; IC: Colículo Inferior; Cer: Cerebelo.

importancia en los mecanismos de recompensa, y son ATV y el NAcc. El neurotransmisor por excelencia relacionado con estos procesos es la DA (aunque otros como la 5-HT, el GABA, el glutamato, la acetilcolina o los péptidos opioides también tienen su importancia) (Koob, 1992; Lupica & Riegel, 2005). Si bien los cannabinoides tienen propiedades reforzantes (Rubino et al., 2008), no parece haber una alta densidad de receptores CB1 en estos dos núcleos mencionados. Se observa presencia de receptores CB1 en mayor abundancia en regiones como la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala, zonas desde las cuales salen eferencias hacia el NAcc y que intervienen, por tanto, en los mecanismos de recompensa. Esto podría dar cuenta, aunque fuese de forma indirecta, de cómo los cannabinoides pueden modular la ruta dopaminérgica y, por tanto, los sistemas de recompensa y motivación cerebral.

Otra evidencia que arroja luz sobre la implicación cannabinoide en la circuitería mesocorticolímbica se vio al aplicar un tratamiento agudo con diferentes cannabinoides. En tales experimentos se descubrió que este tratamiento activaba el sistema dopaminérgico a nivel del ATV, tal y como sucede con otras muchas sustancias de abuso (Gardner, 2005), además de aumentar los niveles extracelulares de DA a nivel del NAcc (sobre todo en la región de la corteza o “*shell*”) (Tanda et al., 1999; Tanda et al., 1997). Sin embargo, la aplicación local de cannabinoides a nivel del NAcc no provocó cambios en los niveles de DA extracelular (Szabo, Muller, & Koch, 1999) pero sí incrementó el disparo de las neuronas dopaminérgicas a nivel del ATV (Cheer, Marsden, Kendall, & Mason, 2000). En algunas de estas respuestas se observaba tolerancia tras aplicar un tratamiento cannabinoide crónico (Hoffman, Oz, Caulder, & Lupica, 2003).

Considerando que no abundan los receptores CB1 a estos niveles (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998), se concluyó que el aumento en la liberación de DA se debía a la unión de los agonistas cannabinoides a receptores presinápticos ubicados en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas que inervaban el ATV y el NAcc (M. Melis et al., 2004; Robbe, Alonso, Duchamp, Bockaert, & Manzoni, 2001; Schlicker & Kathmann, 2001; Szabo, Siemes, & Wallmichrath, 2002). La procedencia de estas neuronas podía ser desde sistemas de interneuronas locales en torno al

ATV hasta vías procedentes de núcleos más alejados como el pedunculopontino, el ventral pallidum o el córtex prefrontal (Lupica & Riegel, 2005). Además, algunos trabajos experimentales han podido demostrar la importancia de la liberación de endocannabinoides desde el ATV sobre la excitabilidad dopaminérgica a este nivel (Melis et al., 2004). Por último, cabe destacar un estudio que indica que las propiedades reforzantes de los cannabinoides podrían ser debidas a la activación de los receptores μ -opioides (Tanda et al., 1997) a nivel del ATV-NAcc. En este sentido, también se ha visto interacción con los receptores μ -opioides tras la administración crónica de cannabinoides, ya que se redujo la actividad inhibitoria mediada por el receptor μ -opioide a nivel del NAcc (Hoffman et al., 2003).

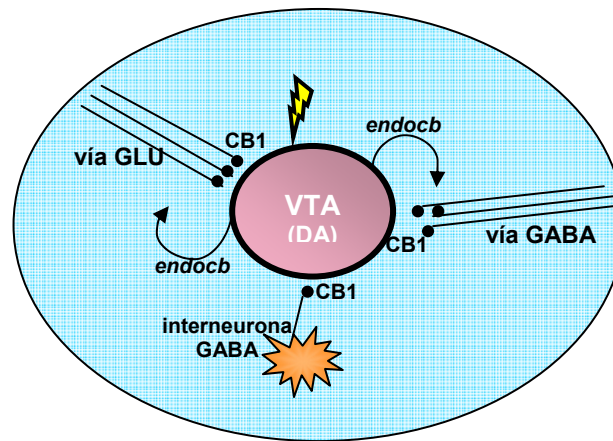


Figura XV. Acción del sistema cannabinoide en el circuito mesocorticolímbico de la recompensa (Basado en Lupica (Lupica & Riegel, 2005). GLU (glutamato), endocb (endocannabinoides liberados desde VTA).

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

Como se ha expuesto en los apartados anteriores, la adolescencia es un período de particular vulnerabilidad a los efectos de las sustancias psicoactivas, y además, los estudios epidemiológicos muestran que la marihuana es la droga ilegal más consumida durante esta etapa. Dado el estado de los conocimientos en este campo, parece interesante tratar de conocer cuáles pueden ser las consecuencias a largo plazo de este consumo en la etapa adolescente.

En investigaciones previas de nuestro grupo y de otros autores, ya se había demostrado que el consumo de marihuana durante la adolescencia induce un aumento de la autoadministración de morfina o heroína y este hecho estaba asociado a cambios alostáticos en el sistema opioide endógeno. No obstante, hasta la fecha se desconocía si este hecho se replicaría en el caso de la adicción a la cocaína. Dado que existen múltiples interacciones entre el sistema endocannabinoide y el dopaminérgico y que este último es clave en la adicción a la cocaína, nuestra primera hipótesis fue que el tratamiento crónico cannabinoide empleado en nuestros experimentos provocaría alteraciones en la homeostasis dopaminérgica que conducirían a cambios en la autoadministración de cocaína en la edad adulta. Además, pensamos que los cambios provocados por nuestro tratamiento podrían ser más globales y no circunscribirse únicamente al sistema dopaminérgico; para comprobar esta hipótesis decidimos estudiar el metabolismo cerebral global mediante TEP, tanto a nivel basal, como en respuesta a una inyección de cocaína.

También consideramos conveniente analizar las consecuencias cognitivas y emocionales a largo plazo, de nuestro tratamiento. Ya había datos que demostraban la existencia de ansiolisis duraderas tras tratamientos crónicos con cannabinoides durante la adolescencia. Sin embargo, dado que el período de edad en el que se administra el tratamiento es clave, debido al diferente estado de maduración del sistema cannabinoide durante el desarrollo, nos planteamos que iniciar nuestro tratamiento en una ventana temporal diferente a la de otros estudios podría tener otro tipo de consecuencias sobre la ansiedad y sobre los ejes hormonales que guardan estrecha relación con la misma. Asimismo, dadas las estrechas relaciones entre los mecanismos de plasticidad sináptica y el

sistema cannabinoide, nos pareció de interés determinar las consecuencias de nuestro tratamiento a este nivel (PLP y moléculas de adhesión celular estrechamente relacionadas con la misma) y sobre los correlatos conductuales de esta neuroplasticidad (aprendizaje espacial y memoria de reconocimiento). Nuestra hipótesis fue que el tratamiento cannabinoide podría producir alteraciones a largo plazo a nivel de los sistemas de neurotransmisión (como el dopaminérgico) y en marcadores bioquímicos (como las moléculas de adhesión celular) relacionados con la plasticidad sináptica. Estas alteraciones se podrían traducir en cambios en los dominios cognitivos más directamente relacionados con este tipo de plasticidad.

Todas estas hipótesis se someterán a prueba en los capítulos I, II, III y IV, tal y como se detalla a continuación.

**CAPÍTULO I: Efectos de los cannabinoides
en la adolescencia sobre la adicción a la
cocaína y el metabolismo cerebral basal en la
vida adulta**

1. Resumen

Se ha sugerido que el consumo de marihuana durante la adolescencia podría ser un factor de predisposición al consumo de otras drogas en la edad adulta. Sin embargo, la evidencia experimental que sustenta esta hipótesis es escasa. En este primer trabajo, hemos administrado un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide CP 55,940 (CP) (0,4 mg/kg) o su vehículo (VH) correspondiente a ratas Wistar adolescentes (P28-P38) de ambos sexos. Durante la edad adulta, se evaluaron tanto la adquisición (con una sesión diaria de media hora de duración, durante siete días) como el mantenimiento (14 sesiones, 1 por día, de 2 horas cada una) de la conducta de autoadministración de cocaína (1 mg/kg); adicionalmente también se estudió una conducta operante reforzada por bolitas de comida, en condiciones tanto de motivación normal (comida estándar *ad libitum*) como de motivación elevada (estando los animales a dieta). Además se analizó la actividad metabólica basal del cerebro mediante tomografía por emisión de positrones (TEP), usando [¹⁸F]-Fluorodesoxiglucosa como trazador. Durante la fase de adquisición, las hembras tratadas con CP se autoadministraron un mayor número de inyecciones de cocaína que sus controles hembras tratadas con vehículo, mientras que los machos en general no mostraron diferencias debidas al tratamiento. El efecto del CP sobre las hembras desapareció durante la fase de mantenimiento. Además, no obtuvimos ningún efecto en la conducta operante reforzada con comida, por lo que se podría hablar de un efecto específico del tratamiento sobre las propiedades adictivas de la cocaína y no de un cambio global en el procesamiento de los reforzadores. La actividad metabólica cerebral basal también se vio alterada en las hembras adultas tratadas con el agonista durante la adolescencia al compararse con sus controles VH, mientras que no obtuvimos ningún efecto en los machos; más concretamente nuestros resultados apuntan a una hiperactivación en el córtex frontal y a una hipoactivación en la corteza amígdalo-entorrinal. Nuestros resultados sugieren que una exposición crónica a cannabinoides durante la adolescencia altera la vulnerabilidad de los sujetos a la adicción a la cocaína específicamente en las hembras. Esta mayor susceptibilidad podría estar relacionada

con las alteraciones en el metabolismo cerebral halladas en las hembras adultas expuestas a los cannabinoides durante su adolescencia.

2. Introducción

Los estudios epidemiológicos demuestran que la etapa adolescente es una fase de especial vulnerabilidad a los efectos de las drogas de abuso (Fried, James, & Watkinson, 2001; C. A. Martin et al., 2002; Patton et al., 2004; Trad, 1994). La marihuana es una droga ampliamente consumida en esta edad (Gruber & Pope, 2002) y hay evidencias que sugieren que su consumo durante la adolescencia podría aumentar la proclividad a la adicción a otras drogas más duras durante la edad adulta (Kandel, Yamaguchi, & Klein, 2006). Sin embargo en los estudios epidemiológicos con seres humanos siempre hay una gran variabilidad debida a las diferencias culturales, sociales y económicas entre los sujetos de estudio, por lo que resulta difícil establecer vínculos causales sobre las relaciones entre el consumo de marihuana en la adolescencia y la adicción a otras drogas durante la etapa adulta. Es por esta razón que se necesitan estudios de índole experimental para poder clarificar esta cuestión (Kandel, 2003) y ya se están obteniendo algunos resultados prometedores (Ellgren et al., 2007). En este sentido, se sabe que el período peripuberal es una fase crítica con una especial plasticidad neurocomportamental y una mayor vulnerabilidad a las consecuencias deletéreas de las sustancias psicoactivas (Adriani & Laviola, 2004). Es más, hay cierta evidencia que sugiere que existe una ventana de vulnerabilidad durante la adolescencia, especialmente durante el período peripuberal, en la que una administración crónica de cannabinoides podría ejercer efectos duraderos sobre el cerebro y la conducta (Schneider & Koch, 2003); consultar también la revisión de Viveros y colaboradores (Viveros et al., 2005). Además, en un trabajo previo, ya habíamos observado alteraciones duraderas (y dependientes del sexo de los animales) sobre la actividad locomotora y las respuestas de ansiedad, como consecuencia de un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide CP 55,940 (CP)(Biscaia et al., 2003). Otros autores también han informado de efectos duraderos a largo plazo después de un tratamiento crónico con cannabinoides durante la adolescencia; así, Schneider y Koch encontraron déficits en las funciones senso-motrices, en la

memoria de reconocimiento y en la ejecución de una tarea operante cuando el tratamiento cannabinoide ocurría específicamente durante la adolescencia, y no durante la edad adulta (Schneider & Koch, 2003).

Se han realizado varios estudios sobre las posibles interacciones funcionales entre el sistema endocannabinoide y las propiedades reforzantes de las sustancias psicoestimulantes, y no se ha llegado a conclusiones esclarecedoras (Arnold, 2005). Sin embargo, muchos de estos experimentos se han realizado en animales adultos, en los que el sistema endocannabinoide ya está plenamente maduro. Se puede argumentar que si la estimulación del sistema cannabinoide (a través de tratamientos con agonistas) hubiera ocurrido en un momento del desarrollo anterior (por ejemplo durante la adolescencia), cuando el sistema cannabinoide todavía está en proceso de maduración, se hubieran encontrado alteraciones mucho más evidentes tanto en los sistemas de neurotransmisión como en la conducta.

Uno de los sistemas neuroquímicos que pudieran verse más afectado por el tratamiento crónico con cannabinoides es el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, que está claramente relacionado en el procesamiento de reforzadores y la adicción a drogas, tanto en seres humanos (Franken, Booij, & van den Brink, 2005) como en animales (Di Chiara et al., 2004). Así, se ha demostrado que una exposición a sustancias cannabinoides durante la adolescencia produce cambios duraderos en la respuesta de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ante ciertas drogas de abuso (Pistis et al., 2004). Esta sensibilización del sistema dopaminérgico podría proporcionar una explicación a nivel de mecanismos, para la mayor vulnerabilidad a la adicción a la cocaína en sujetos que han consumido cannabis en su adolescencia. No obstante, la contribución de otros sistemas de neurotransmisión, aparte del dopaminérgico, tales como el colinérgico, glutamatérgico, GABAérgico, u opioidérgico entre otros, no debe de ser minusvalorada (Adewale, Platt, & Spealman, 2006; Negus & Mello, 2002; J. E. Smith et al., 2004; Walsh & Cunningham, 1997).

En los experimentos detallados en este primer capítulo hemos utilizado la tecnología TEP, usando [¹⁸F]-Fluorodesoxiglucosa (FDG) como trazador, para evaluar los cambios a largo plazo en el metabolismo cerebral inducidos por nuestro tratamiento. Ésta es claramente la mejor aproximación para estudiar el metabolismo cerebral global y tiene una gran relevancia por su aplicabilidad y poder de comparación con los estudios realizados en seres humanos.

Es interesante señalar asimismo, que la mayoría del trabajo experimental realizado en el campo de la adicción a drogas se ha hecho con animales macho; sin embargo, se han observado de manera reiterada, durante todas las fases del ciclo adictivo, patrones diferenciales en función del sexo en cuanto al consumo de drogas (W. J. Lynch, 2006; Roth, Cosgrove, & Carroll, 2004). De esta forma, cuando diseñamos los experimentos, consideramos crucial examinar potenciales diferencias sexuales en los efectos de nuestro tratamiento crónico.

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales y Tratamiento Farmacológico

Se usaron ratas Wistar de ambos sexos. En concreto, nuestros sujetos experimentales fueron la progenie de ratas adquiridas en Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona) que se aparearon (1 macho x 1 hembra) en las instalaciones de nuestro animalario, 2 semanas después de su llegada al mismo. Todos los animales estuvieron a temperatura constante (20° C) y en un ciclo de luz invertido (12 horas de luz/12 horas de oscuridad; las luces se encendían a las 20:00 horas), con comida (A04/A03; Panlab, Barcelona) y agua *ad libitum* a no ser que se especifique lo contrario. En el día de su nacimiento (día PN0), las camadas se equilibraron en número y sexo teniendo cada una 10±2 crías por madre. El destete se produjo a los 22 días de edad.

El tratamiento crónico consistió en inyecciones de CP 55,940 (Tocris) (0,4 mg/kg) o del vehículo (VH) correspondiente [etanol:cremofor: salino (1:1:18) (cremofor, Fluka BioChemiKa)] por vía intraperitoneal, una vez al día, desde el día PN28 al día PN38 (11 inyecciones en total) en un volumen de inyección de 2 ml/kg. Esta dosis se eligió sobre la base de estudios previos (Biscaia

et al., 2003). Los animales fueron individualizados en el día PN75. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo entre las 10:00 horas y las 17:00 horas. Los animales usados en este estudio se estabularon en instalaciones que cumplieran con la directiva europea: European Union Laboratory Animal Care Rules (86/609/EEC Directive).

3.2. Aparatos

Para los estudios de conducta operante reforzada con comida y los de autoadministración de cocaína, se utilizaron cajas de Skinner (Coulbourn Instruments, EE.UU.) en las que había una palanca diseñada para registrar una respuesta cuando una fuerza de 3 gramos se ejerciera sobre ella. Esta palanca estaba situada en la parte frontal de la caja. También había una luz verde sobre la palanca, que se utilizó para señalar bien la disponibilidad del reforzador o la administración de la droga. La adquisición y el almacenamiento de los datos se realizaron en un ordenador PC.

Los estudios de imagen se realizaron con un escáner TEP para pequeños animales (piPET), (Siegel *et al*, 1999). Las imágenes tomográficas se reconstruyeron usando un algoritmo 3D-OSEM (3D subset expectation maximization) (20 iteraciones, 5 subconjuntos) que tiene una resolución espacial final de 1,65 mm FWHM (Full-Wide Half Maximum) isotrópica. Las características de este dispositivo ya han sido detalladas previamente (Jagoda, Vaquero, Seidel, Green, & Eckelman, 2004).

3.3. Procedimientos Experimentales

Se realizaron tres series experimentales distintas con grupos de animales diferentes cada vez.

Estudio de conducta operante reforzada con comida: En el primer grupo de animales se realizó un estudio de conducta operante usando bolitas de comida (pellets) como reforzadores. Los procedimientos experimentales comenzaron cuando los animales alcanzaron los 90 días de edad. Antes de comenzar con el entrenamiento, se redujo el peso de los animales (VH: machos (n=7), hembras (n=9); CP: machos (n=6) y hembras (n=12)) a un 95%-90% del original. Esta restricción

dietaria se mantuvo salvo que se indique lo contrario. La primera serie experimental consistió en tres fases consecutivas: automoldeamiento, tarea operante con razón fija 1 (RF1) con restricción de comida, y tarea operante RF1 con acceso *ad libitum* a la comida.

La fase de automoldeamiento consistió en una tarea de 30 minutos en la que se administraban aleatoriamente, en intervalos de 60 segundos de duración promedio, bolitas de comida de 45 mg (Noyes Pellets, EE.UU.) o bien éstas eran obtenidas si el sujeto presionaba la palanca (es decir emitía una respuesta operante), cuando cualquiera de las dos posibilidades ocurría, se encendía la luz verde sobre la palanca, señalando la presentación del reforzador. Aquellos animales que realizaran al menos 5 respuestas operantes pasaron a la segunda fase de esta serie experimental, que consistía en sesiones de 30 minutos de duración durante siete días consecutivos en las que el animal obtenía una bolita de comida después de cada presión de palanca. En esta segunda fase, la luz verde situada encima de la palanca indicaba la disponibilidad del reforzador.

Después de completar esta fase, se permitió a los animales tener acceso *ad libitum* a la comida hasta que recuperaron su peso inicial, momento en el que se les sometió a la tercera fase de la serie, que consistió en una tarea idéntica a la de la fase anterior durante 5 días consecutivos.

Estudio de Autoadministración de Cocaína: Cuando los animales del segundo lote (VH: machos n=11; hembras n=8; CP: machos n=10; hembras n=7) alcanzaron los 75 días de edad, se les sometió a una restricción dietaria hasta que alcanzaran el 95% - 90% de su peso inicial y pasaron por una tarea de condicionamiento operante similar a la descrita en el apartado anterior. Cuando las ratas alcanzaron una tasa de respuesta suficiente (más de 50 respuestas por sesión) y estable (menos del 10% de variación entre sesiones en las respuestas) se les sometió a una intervención quirúrgica para implantarles un catéter yugular. Esta intervención se hizo bajo anestesia con ketamina (40 mg/kg i.p.) y diazepam (10 mg/kg i.p.). Se implantó un tubo de polivinilo (0,064 diámetro interno) en la vena yugular derecha, cerca de la aurícula. El catéter se condujo subcutáneamente hasta la región mesoescapular, por donde salía al exterior; adicionalmente se implantó un sistema de sujeción en la cabeza del animal que se ancló al cráneo con tornillos y se fijó con cemento dental.

Se permitió que los animales se recuperaran de la cirugía durante al menos 5 días, antes de empezar otras tantas sesiones de la tarea operante previamente descrita. Los catéteres se infundieron diariamente con 0,5 ml de una disolución de antibiótico (Gentamicina 40 mg/ml) disuelta en suero salino heparinizado (100 unidades internacionales de heparina por cada 50 ml de suero) para prevenir infecciones y asegurar el buen funcionamiento del catéter.

El estudio propiamente dicho comenzó cuando los animales alcanzaron el día PN100 y consistió en dos fases: la primera de ellas duró 7 días consecutivos y constaba de 1 sesión diaria de 30 minutos de duración (Fase de Adquisición), justo después de terminar esta primera fase, los animales pasaron por una segunda etapa experimental en la que tuvieron 1 sesión diaria de autoadministración de cocaína durante catorce días; a este nivel, cada sesión duraba dos horas (Fase de Mantenimiento). En todas las sesiones se siguió un programa de reforzamiento RF1 en el que cada presión de palanca estaba seguida de una inyección de 1 mg/kg de cocaína a través del catéter, administrada por una bomba automática de infusión. En este caso la luz verde encima de la palanca indicaba la disponibilidad del reforzador.

Estudio de Tomografía por Emisión de Positrones (TEP): En esta última serie experimental medimos el metabolismo cerebral basal, de nuevo en un lote independiente de animales que habían recibido el tratamiento crónico. Para obtener los índices metabólicos en condiciones lo más similares posibles a las de las ratas de las series anteriores, los animales de este experimento fueron sometidos a un protocolo de restricción dietaria y conducta operante idéntico al de la serie anterior. Cuando los animales alcanzaron los 100 días de edad se les implantó un catéter femoral bajo anestesia por isoflurano. Se usaron ratas hembras (CP n=5 VH n=5), y machos (CP n=6 VH n=5) a las que se les inyectó [¹⁸F]-FDG (1,83-1,95 mCi). Tras 35 minutos de asimilación de la FDG, se realizó el escáner durante 90 minutos y las imágenes se reconstruyeron mediante el algoritmo 3D-OSEM.

3.4. Análisis de los Datos

Perso Corporal: Los pesos corporales en el día de la individualización se analizaron mediante un ANOVA bifactorial con los factores SEXO y TRATAMIENTO.

Conducta Operante Reforzada con Comida y Autoadministración de Cocaína: Se realizaron ANOVAs mixtos por separado para el estudio de la conducta operante, para el de la fase de adquisición y para la de mantenimiento en el experimento de autoadministración. Los ANOVAs incluían dos factores entre grupos [SEXO (macho o hembra) y TRATAMIENTO (CP o VH)] y un factor intrasujeto (SESIONES). La variable dependiente fue el número de reforzadores por sesión. Además, y para tener una idea más aproximada de la ejecución de los animales intra-sesión, se realizaron análisis por separado del total de reforzadores por grupo, acumulados a los 30, 60 y 90 minutos de sesión durante la fase de mantenimiento.

Realizamos una transformación de los datos a su raíz cuadrada cuando fue necesario para corregir la falta de normalidad y de homogeneidad de varianzas. El nivel de significación se fijó en $\alpha=0,05$ y todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 12.0.

TEP: Análisis de Mapas Estadísticos Paramétricos (SPM)

Para realizar el estudio SPM, los conjuntos de imágenes reconstruidas se realinearon con respecto a un patrón, a través de un algoritmo de registro rígido basado en la maximización de información mutua. Este patrón o molde se generó co-registrando y promediando imágenes tomadas del grupo VH. Se segmentó manualmente una máscara del cerebro sobre el molde y se aplicó a todas las imágenes adquiridas antes de la normalización de la intensidad. Las imágenes resultantes se suavizaron con un núcleo gaussiano (1,5 x 1,5 x 3,0 mm FWHM), y se analizaron con el programa SPM5, usando un diseño tipo ANOVA para detectar las diferencias entre los grupos. El umbral de significación estadística se fijó en una $p < 0,05$ (sin corregir) y $K=10$.

4. Resultados

4.1. Peso Corporal

No se observaron efectos significativos del factor TRATAMIENTO o de la interacción SEXO x TRATAMIENTO sobre el peso corporal de los animales el día de la individualización. Tal y como se esperaba, se obtuvo un efecto significativo del SEXO ($F_{1,87}=202,389$ $p<0,05$) pesando los machos más que las hembras (Promedio_{Machos}=289,360 gramos $DT_{Machos}=39,01$ gramos; Promedio_{Hembras}=197,464 gramos $DT_{Hembras}=19,45$ gramos)

4.2. Autoadministración de Cocaína

Adquisición: Los resultados del ANOVA mostraron un efecto principal significativo de los factores SEXO ($F_{1,32}=13.630$, $p<0,01$), TRATAMIENTO ($F_{1,32}=6,686$ $p<0,05$) y de su interacción ($F_{1,32}=5,124$ $p<0,05$). El análisis de esta interacción reveló un efecto significativo del TRATAMIENTO en las hembras ($F_{1,13}=12,449$ $p<0,01$), pero no en los machos. Las hembras tratadas con CP se autoadministraron un mayor número de inyecciones por sesión que las VH (Promedio_{Hembras-CP} = 4,667 $DT=1,45$ Promedio_{Hembras-Vh} = 2,446 $DT=1,15$). No se encontró efecto

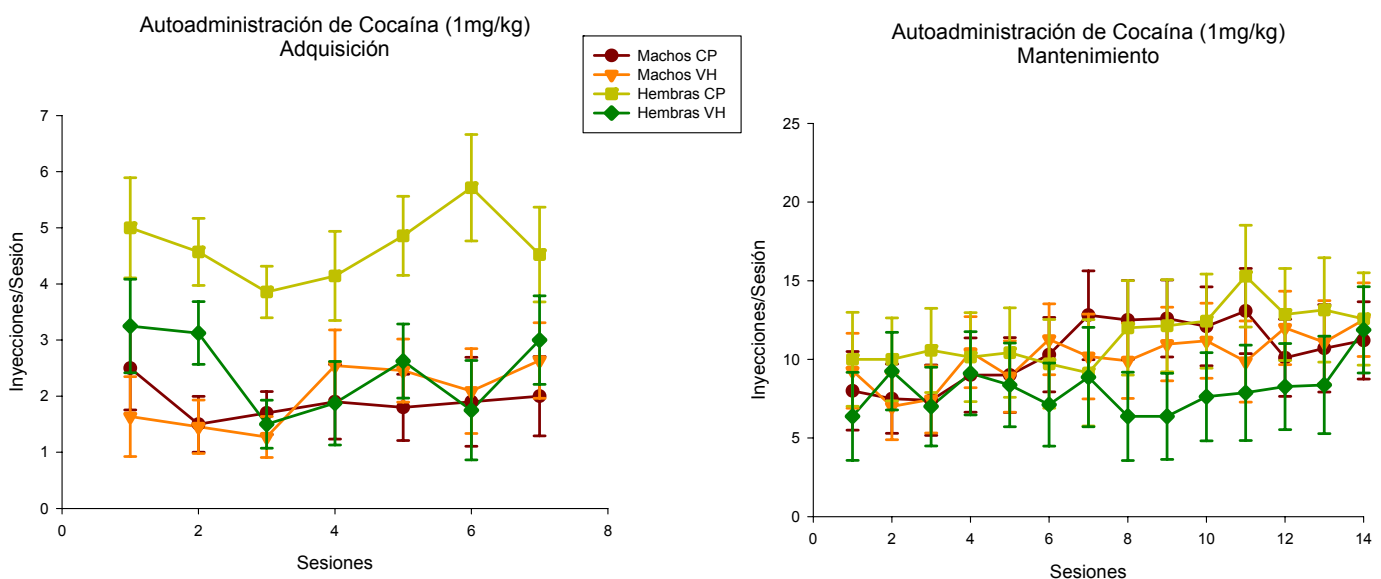


Figura 1.1a: Autoadministración de Cocaína (Adquisición y Mantenimiento)

del factor SESIONES indicando este hecho una conducta estable en todos los grupos (Figura 1.1a).

Mantenimiento: No se encontraron efectos ni del factor SEXO, ni del TRATAMIENTO ni de su interacción en esta fase, en ninguno de los períodos de tiempo analizados (30, 60, 90 ó 120 minutos). Obtuvimos un efecto significativo del factor SESIONES ($F_{13,416}=2,373$ $p<0,05$) indicando un aumento progresivo de las presiones de palanca a lo largo de las sesiones, seguramente debido al incremento en la duración de las mismas durante esta fase experimental (Figura 1.1a).

4.3. Tarea Operante Reforzada con Comida

Para determinar la especificidad del efecto encontrado en la serie experimental previa, realizamos un estudio en paralelo con una tarea operante reforzada con comida usando un programa de RF1. En este caso no observamos ningún efecto de los factores estudiados, ni en la fase de motivación alta (cuando los animales estaban a dieta) ni en la fase *ad libitum* (Figura 1.1b).

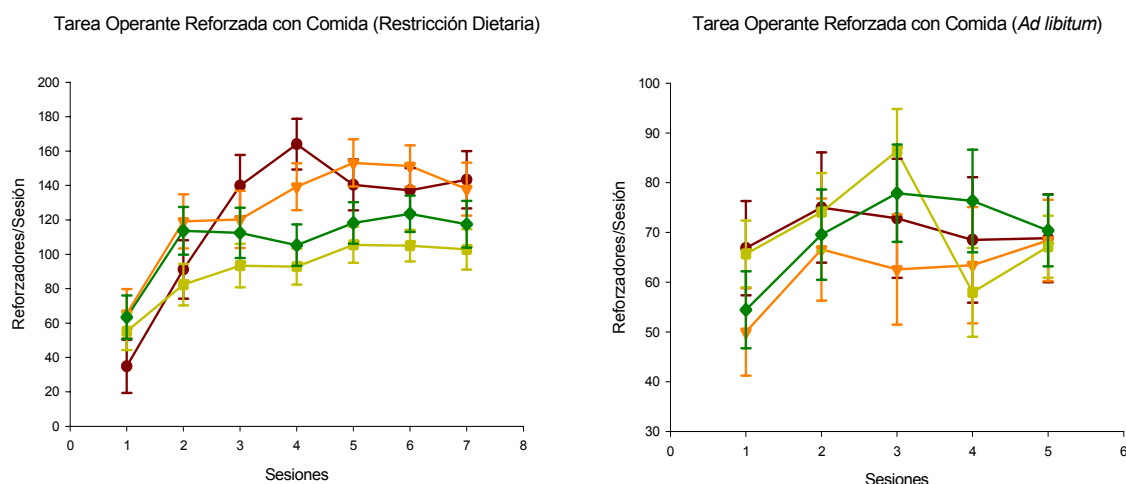


Figura 1.1b: Conducta Operante Reforzada con Comida (en condiciones de alta motivación –a dieta- y motivación normal –*ad libitum*)

4.4. TEP: Mapas Paramétricos Estadísticos (SPM)

El SPM mostró una hipoactivación significativa del área amígdalo-entorrinal ($t=1,86$ $p<0,05$; $K=10$) y una hiperactivación de la corteza frontal ($t=1,86$ $p<0,05$; $K=80$) en las hembras tratadas con CP en comparación con sus vehículos. No se encontraron efectos significativos del tratamiento en los machos (Ver Figura 1.2).

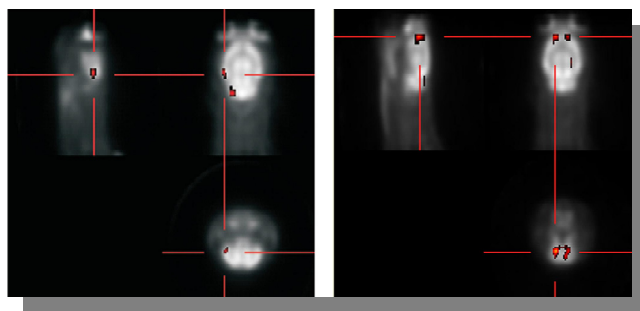


Figura 1.2: SPM. Izquierda: Hipoactivación Entorrinal. Derecha: Hiperactivación Frontal

5. *Discusión*

En este trabajo hemos evaluado los efectos a largo plazo de un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide CP durante la adolescencia (PN28-PN38), en la adquisición y mantenimiento de la autoadministración de cocaína, en una tarea operante reforzada por comida y en el metabolismo cerebral basal, todo ello medido durante la edad adulta en estos animales. Durante la fase de adquisición, las hembras tratadas con CP mostraron tasas de autoadministración más altas que el resto de los grupos. Este efecto no estuvo presente durante la fase de mantenimiento, donde sólo se observó un efecto de las sesiones, a lo largo de las cuales, los animales fueron aumentando su tasa de respuesta. Además, no encontramos diferencias en las tareas operantes reforzadas con comida, por lo que concluimos que el efecto que encontramos era específico de la cocaína y no un cambio más general en el procesamiento de los reforzadores. En cuanto al metabolismo cerebral basal, el tratamiento crónico con CP ejerció efectos duraderos en las hembras, observándose una hipoactivación del córtex amígdalo-entorrinal y una hiperactivación del córtex frontal en estos animales.

Tal y como se comentó en la introducción de este capítulo, hasta hacía no mucho, la Teoría de la Puerta de Entrada, adolecía de una falta de validación experimental. Algunos estudios sí habían examinado los vínculos causales entre una exposición previa a THC y una conducta aumentada de autoadministración de drogas; sin embargo en estos trabajos la preexposición al THC se hacía durante la edad adulta (Panlilio, Solinas, Matthews, & Goldberg, 2006; Solinas, Panlilio, &

Goldberg, 2004) y por tanto estos diseños no incorporaban el componente de desarrollo que es crucial en la Teoría de la Puerta de Entrada, por lo tanto una validación completa de esta teoría estaba aún por llegar. El primer trabajo (hasta donde nosotros sabemos) que evaluó de manera más rigurosa la Teoría fue el de Maria Ellgren y colaboradores, bajo la dirección de la profesora Yasmin Hurd, en el Instituto Karolinska de Estocolmo (Ellgren, Spano, & Hurd, 2006) que demostraron que ratas macho que habían sido preexpuestas a THC durante su adolescencia, mostraban tasas más altas de presión de palanca en un paradigma de autoadministración de heroína. En nuestro laboratorio hemos replicado estos estudios, descubriendo además, que en este caso hay un dimorfismo sexual dado que los efectos se observan sobre todo en las ratas macho, y cuando las exigencias del programa de reforzamiento son bajas (Biscaia et al., 2007)

En el contexto específico de los psicoestimulantes, Ellgren y colaboradores examinaron en diferentes períodos del desarrollo el efecto de la anfetamina sobre los niveles extracelulares de DA y la actividad psicomotora, tras un tratamiento cannabinoide durante la adolescencia (Ellgren et al., 2004). No se halló ningún apoyo en favor de la Teoría de la Puerta de Entrada usando este diseño experimental.

Aunque los cannabinoides y la DA interaccionan a varios niveles (Andersson et al., 2005; Borgkvist, Marcellino, Fuxe, Greengard, & Fisone, 2008; Fadda et al., 2006; Ferrer et al., 2007; Gardner, 2005; Hermann, Marsicano, & Lutz, 2002; T. Melis et al., 2007; Sidlo, Reggio, & Rice, 2008), la relación entre los cannabinoides y las drogas psicoestimulantes es todavía objeto de controversia (Arnold, 2005). Por ejemplo, Fattore y colaboradores, mostraron que una administración aguda del agonista cannabinoide WIN 55,512-2 disminuía la tasa de respuesta en un tarea de autoadministración de cocaína (Fattore et al., 1999), mientras que Soria y colaboradores demostraron que en ratones *knock out* para el receptor CB1, las propiedades reforzantes de la cocaína se encontraban disminuidas (Soria et al., 2005). Por el contrario, Goldberg y su equipo demostraron que la administración del antagonista CB1 Rimonabant no afectaba a la conducta de autoadministración de cocaína en monos ardilla (Tanda, Munzar, & Goldberg, 2000). En este

sentido tampoco se han observado diferencias entre ratones CB1-KO y sus controles en el condicionamiento de preferencia a un lugar inducida por cocaína ni en la autoadministración de esta droga (Cossu et al., 2001; M. Martin, Ledent, Parmentier, Maldonado, & Valverde, 2000).

Se sabe que la cocaína ejerce acciones tanto reforzantes como ansiogénicas (Ettenberg, 2004), por lo que se podría argumentar que las mayores tasas de autoadministración observadas en las hembras tratadas podrían deberse bien a un aumento en la susceptibilidad de los animales a las capacidades reforzantes de la droga o a una mayor sensibilidad a sus efectos ansiogénicos (Panlilio et al., 2006). La primera opción no parece estar apoyada por la literatura previa. En primer lugar, el tratamiento crónico con CP no parece afectar a las capacidades reforzantes de los reforzadores naturales como la comida (dados los resultados en la tarea operante), en segundo lugar, los trabajos de Ellgren y colaboradores en 2004 citados previamente, no muestran cambios en la liberación de DA en respuesta a la anfetamina tras una preexposición a THC durante la adolescencia (Ellgren et al., 2004), por lo que tampoco parecen apoyar un cambio en las capacidades reforzantes de la cocaína en los animales preexpuestos a cannabinoides en su adolescencia.

Por lo que respecta a cambios en las capacidades ansiogénicas de la cocaína, ya hay datos previos que muestran una ansiolisis durante la edad adulta en animales tratados con CP durante su adolescencia (Biscaia et al., 2003). Además, y como podrá verse en el capítulo IV de la presente tesis doctoral, nuestro tratamiento también produjo una reducción de la ansiedad (medida en el laberinto en cruz elevado) en animales tratados con CP en su adolescencia (PN28-PN38). Quizás estos datos podrían explicar los resultados del presente experimento; así podría aducirse que las hembras tratadas podrían experimentar la cocaína como menos ansiogénica y por eso se autoadministrarían más inyecciones de esta droga, además, esto sólo sería relevante en los primeros contactos con la cocaína, antes de que se estableciera un estado adictivo más permanente, lo cual cuadraría con la selectividad del efecto (sólo se da durante la fase de adquisición). Sin embargo, y dado que la ansiolisis también ocurre en los machos, aún quedaría por dilucidar por qué el efecto ansiolítico del tratamiento sólo afectaría a la autoadministración en las hembras tratadas con CP.

Una explicación alternativa apuntaría a cambios en la actividad locomotora general inducidos por el tratamiento en las hembras. Estos cambios en la actividad locomotora resultarían en tasas de actividad exploratoria mayores y por ende una mayor presión de palanca durante la fase de adquisición. En este sentido, se ha observado que ratas hembras expuestas perinatalmente a THC, muestran cambios persistentes en la actividad locomotora espontánea (Navarro et al., 1994; Rubio et al., 1995). Además, también se ha observado que ratas adultas tratadas con el agonista CB1 WIN 55,512-2 mostraban un actividad locomotora aumentada en el campo abierto, pero sólo con la dosis más baja que se probó (0,6 mg/kg) (Drews, Schneider, & Koch, 2005). Aunque esta hipótesis es atractiva, tampoco parece estar apoyada por la literatura; por ejemplo hemos encontrado descensos en vez de aumentos en la actividad locomotora adulta de animales tratados con CP en su adolescencia (Biscaia et al., 2003). Además, Schneider y colaboradores no encontraron cambios a este respecto en animales adultos tratados con WIN en su adolescencia (Schneider et al., 2005).

Soprendentemente, entre nuestros grupos VH no hemos encontrado el típico patrón de diferencias sexuales que se suele observar en los estudios de autoadministración de drogas (W. J. Lynch, 2006), algo que podría obedecer al particular régimen de autoadministración empleado en este experimento y a la dosis utilizada. En este sentido, recientemente Kantak y colaboradores informan de que las diferencias sexuales en la autoadministración de cocaína desaparecen cuando se usan programas con razones fijas bajas y cuando las dosis son menores de 3 mg/kg (Kantak, Goodrich, & Uribe, 2007).

Nuestro tratamiento crónico también indujo cambios en los niveles basales de metabolismo cerebral. Si bien no sabemos cuándo comenzaron a ser evidentes estos cambios, un hecho notable es que se mantuvieron hasta la edad adulta. Nuestros datos revelan una hiperactivación del córtex frontal y una hipoactivación del córtex amígdalo-entorrinal, de manera específica en el grupo de las hembras tratadas con CP, un hecho que además va en paralelo con nuestros hallazgos conductuales.

Los resultados del presente estudio difieren de los encontrados usando otro tipo de técnicas como por ejemplo la 2-DG. En esa clase de estudios, se ha observado de manera consistente una

disminución del metabolismo cerebral tras la administración de THC (Freedland, Whitlow, Smith, & Porrino, 2003; Whitlow, Freedland, & Porrino, 2002, , 2003). Sin embargo, en estos estudios el cannabinoide se administró en la edad adulta, y además se usó THC y no CP. Curiosamente, en humanos, se ha observado un incremento metabólico en el córtex frontal, sobre todo en el hemisferio derecho, tras una inyección intravenosa de THC (Volkow et al., 1991). La actividad aumentada encontrada en esta región podría derivarse de la activación persistente del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico ocasionada por el tratamiento. En apoyo de esta hipótesis, se ha encontrado que la activación de los receptores de cannabinoides incrementa la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas meso-prefrontales (Diana, Melis, & Gessa, 1998). Quizás, una activación repetida del receptor, en un período de particular plasticidad podría incrementar la actividad cortical de una manera más o menos permanente. A este respecto, sólo un estudio ha explorado la importancia de la edad de inicio del consumo de cannabis en su influencia sobre el metabolismo cerebral (W. Wilson et al., 2000). Los autores encontraron que iniciar el consumo de marihuana en la adolescencia parece aumentar las perturbaciones en el metabolismo cerebral tras una inyección de THC. Sin embargo este estudio fue realizado con seres humanos. A nivel conductual, la hiperactivación frontal encontrada en las Hembras CP podría parcialmente explicar (además de otras posibles alteraciones conductuales –ver capítulo IV) la mayor vulnerabilidad al consumo de psicoestimulantes, dada la importancia de este área frontal en el circuito neural de la recompensa y de la drogadicción (Tzschentke & Schmidt, 2000).

Otro hallazgo interesante del presente trabajo es la hipoactivación encontrada en el área amígdalo-entorrinal, en las Hembras CP. Se piensa que este área podría estar implicada en el almacenamiento intermedio de la memoria a largo plazo, justo antes de su entrada en el córtex perirrinal, donde se almacenaría de manera más permanente hasta que se produzca su recuperación (Izquierdo & Medina, 1997). Así pues, la hipoactivación de esta zona podría indicar un déficit en el almacenamiento de la información a largo plazo. Como posible explicación a la hipoactivación de esta región, podemos citar un trabajo de Sim y colaboradores en el que se informa de una

disminución de la unión $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ estimulada por WIN 55,512-2 tras un tratamiento crónico con THC (Sim, Hampson et al., 1996).

En conclusión, hemos demostrado que un tratamiento crónico con un agonista cannabinoide durante la adolescencia induce cambios conductuales y neurales que podrían explicar la mayor proclividad de las hembras tratadas con el agonista a la adicción inicial a la cocaína. La naturaleza de este dimorfismo sexual en el efecto del tratamiento no se conoce bien y en capítulos posteriores exploraremos la posible implicación de los estrógenos en el mismo.

**CAPÍTULO II: Efectos de los cannabinoides
en la adolescencia sobre el metabolismo
cerebral tras una inyección de cocaína en la
etapa adulta**

1. Resumen

Se ha sugerido que el consumo de marihuana durante la adolescencia podría repercutir en un mayor riesgo de adicción a la cocaína durante la vida adulta. Sin embargo, las bases neurales de tal predisposición se desconocen. El presente estudio pretende determinar si una inyección aguda de cocaína en animales adultos de ambos sexos puede generar una respuesta metabólica cerebral diferencial en función de un tratamiento crónico adolescente con el agonista cannabinoide CP 55,940 en estos animales. Así, tratamos los animales de manera idéntica a la descrita en el capítulo anterior y cuando se hicieron adultos, se les realizó un escáner TEP en dos sesiones separadas dos días entre sí. En la primera sesión, se estudió el metabolismo cerebral ante una inyección de suero salino para poder así determinar los niveles metabólicos basales. En la segunda sesión, se administró una inyección intravenosa de cocaína (1 mg/kg) y se estudió el metabolismo cerebral en respuesta al desafío farmacológico. Se analizaron nueve Regiones de Interés (ROIs), que se dibujaron manualmente sobre cortes coronales. El ANOVA de medidas repetidas mostró que los efectos de la inyección de cocaína dependían del género y del tratamiento adolescente al que hubiera sido sometido el animal. Así, en el hipocampo dorsal, se obtuvo un patrón de resultados en el que la cocaína produjo un descenso metabólico, pero sólo en las Hembras CP. También observamos un descenso metabólico global como consecuencia de la inyección de cocaína en el CPu. Nuestros resultados también señalan la existencia de un interesante dimorfismo sexual en cuanto al metabolismo global entre machos y hembras. En general las hembras tuvieron un metabolismo menor que los machos en la amígdala, el tálamo y el estriado dorsal (CPu). Discutiremos estos resultados en el contexto de su posible relevancia para delinear los mecanismos neurales subyacentes, por un lado a las acciones farmacológicas de la cocaína, y por otro a la mayor vulnerabilidad a la adicción a la misma de las hembras tratadas con el agonista cannabinoide durante su adolescencia.

2. Introducción

Diversos estudios indican que la marihuana es la droga ilegal más consumida durante la adolescencia; ver la excelente revisión de Gruber y Pope para más detalles (Gruber & Pope, 2002). Se ha sugerido que el consumo de esta droga durante la etapa adolescente podría ser un factor de predisposición para un mayor consumo de cocaína en etapas posteriores (Kandel, 2003; Kandel et al., 2006), si bien el número de estudios animales que demuestran esta asociación es escaso. La relación entre las sustancias cannabinoides (tanto exógenas como endógenas) y la adicción a la cocaína es discutida, no obstante, algunos vínculos han sido ya establecidos (Arnold, 2005). Por ejemplo, tal y como hemos visto en el capítulo anterior, se ha observado que un tratamiento crónico en la adolescencia con un agonista cannabinoide aumenta las tasas de respuesta en un paradigma de autoadministración de cocaína en hembras adultas tratadas, pero no en los machos (Higuera-Matas et al., 2007). Sin embargo, las bases neurales de esta predisposición (sexualmente específica) se desconocen hasta el momento.

Los cambios metabólicos inducidos por una inyección aguda de cocaína ya se han descrito en ratas y parece ser que hay un aumento del metabolismo local en estructuras tales como el CPu, el globo pálido, la SN *pars reticulata*, el núcleo subtalámico y la vermis cerebelosa, así como un descenso metabólico en la habénula (London, Wilkerson, Goldberg, & Risner, 1986). Hay también algunos estudios en seres humanos que muestran que una inyección aguda de cocaína provoca un descenso en el metabolismo cerebral global, y de manera más específica en áreas neocorticales, en los ganglios de la base, ciertas partes de la formación del hipocampo, el tálamo y el mesencéfalo (London et al., 1990). Otro estudio realizado en cocainómanos, demostró que había descensos en el metabolismo cortical duraderos (incluso tras un período de entre 3 y 4 meses de abstinencia de droga) (Volkow et al., 1992).

En estudios previos, también se ha visto que tras un tratamiento crónico con un agonista cannabinoide había cambios duraderos en el metabolismo de dos estructuras cerebrales, el córtex frontal (hiperactivación) y el córtex amígdalo-entorrinal (hipoactivación), seguramente debidos,

entre otros, a cambios en la funcionalidad de los receptores CB1 (Higuera-Matas et al., 2007; Sim, Hampson et al., 1996).

Dados los cambios metabólicos y el patrón de autoadministración de cocaína alterados en las ratas tratadas durante la adolescencia con el agonista cannabinoide (Higuera-Matas et al., 2007), decidimos investigar si una inyección intravenosa de cocaína tendría consecuencias metabólicas (quizás sexualmente dimórficas) diferentes en función del tratamiento adolescente con el agonista cannabinoide.

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales, administración de fármacos y protocolo experimental

Los animales utilizados y el tratamiento crónico administrado son de características idénticas a los del capítulo anterior. En este caso el tamaño de cada grupo es el siguiente: Machos VH (n=7), Hembras VH (n=9), Machos CP (n=8) y Hembras CP (n=9).

Los animales fueron individualizados en el día PN75 y en el PN93 se les implantó un catéter yugular mediante un protocolo quirúrgico idéntico al usado en los estudios de autoadministración descritos en el capítulo I.

Tras siete días de recuperación, en el PN100 los animales fueron sometidos a su primera sesión de TEP. En la primera sesión se les inyectó por el catéter una solución de suero salino (0,9% NaCl) en un volumen de 1 ml/kg, para así poder determinar su metabolismo en condiciones “basales”. A los dos días se realizó una segunda sesión TEP en los mismos animales (diseño intrasujeto) a los que se les administró una inyección de cocaína (1 mg/kg; 1 ml/kg). El trazador ([2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucosa (FDG)] se administró a los 10 minutos de la inyección (salino en la primera sesión o cocaína en la segunda).

3.2. FDG-TEP

La FDG ($1,99 \pm 0,24$ mCi) fue inyectada por el catéter yugular diez minutos después de la inyección de salino o cocaína. Dejamos 35 minutos para que la FDG fuera asimilada por los tejidos

y posteriormente se anestesió al animal con isoflurano (5% para inducción y 1-1,5% para el mantenimiento sobre un 100% de O₂) el escáner se realizó durante 60 minutos en un tomógrafo TEP especial para pequeños animales (rPET, SUINSA) (Vaquero et al., 2005). Las imágenes tomográficas se reconstruyeron usando un algoritmo 3D-FBP, que dio como resultado 55 imágenes de 55x55 vóxeles. El tamaño del vóxel fue de 0,81x0,81x0,81 mm³ y la resolución espacial de estas imágenes fue de 1,65 mm FWHM. La ventana de energía fue de 400-700 KeV y se aplicaron las correcciones correspondientes al decaimiento y al “*deadtime*”.

3.3. Análisis de Datos

Las ROIs se dibujaron manualmente en cortes coronales, usando el atlas de Kruger como plantilla (Kruger, Saporta, & Swanson, 1995). Las nueve ROIs escogidas fueron: Amígdala, Cerebelo, Córtex Frontal, Hipocampo Dorsal, Hipocampo Ventral, Tálamo, Estriado Dorsal, Cerebro Total (con propósitos de normalización) y Fondo. Para la normalización de los datos de asimilación de FDG, la actividad del tejido se corrigió restando el fondo y dividiendo por la actividad del cerebro total. Los resultados están expresados como porcentaje (%) ([Asimilación de FDG=(Valor de la ROI/Valor Cerebro Total)*100].

Los resultados se analizaron mediante un ANOVA mixto que incluía un factor intrasujeto “Cocaína” (salino o cocaína), y dos factores entre-grupos, “Sexo” (macho o hembra) y “Tratamiento” (CP o VH). Las interacciones de primer y segundo orden se analizaron con ANOVAs bifactoriales y unifactoriales respectivamente. Los resultados se aceptaron como estadísticamente significativos con un nivel de significación de $\alpha=0,05$. Todos los cálculos se realizaron con el programa SPSS v.14.0.

4. Resultados

4.1. Hipocampo Dorsal

La cocaína indujo un descenso metabólico en el hipocampo dorsal, tal y como se desprende del efecto del factor “Cocaína” ($F_{1,29}=6,115$ $p<0,05$). Además, también encontramos un efecto significativo de la interacción entre los factores “Cocaína” “Sexo” y “Tratamiento” ($F_{1,29}=6,398$ $p<0,05$). El análisis de esta interacción reveló una disminución en la asimilación de FDG tras la inyección de cocaína, específicamente en las Hembras CP ($F_{1,8}=10,223$ $p<0,01$) lo que podría explicar el efecto generalizado de la cocaína mencionado anteriormente.

4.2. Hipocampo Ventral

No se encontraron efectos significativos de ninguna de las variables independientes estudiadas en esta región.

4.3. Córtex Frontal

No se encontraron efectos significativos de ninguna de las variables independientes estudiadas en esta región.

4.4. Amígdala

En este área encontramos una tendencia hipometabólica tras la inyección de cocaína pero que no llegó a la significación estadística ($F_{1,29}=3,645$ $p=0,06$). Además, encontramos un efecto significativo del factor SEXO, a nivel global ($F_{1,29}=7,413$ $p<0,01$), presentando la hembras un menor metabolismo amigdalino que los machos.

4.5. Tálamo

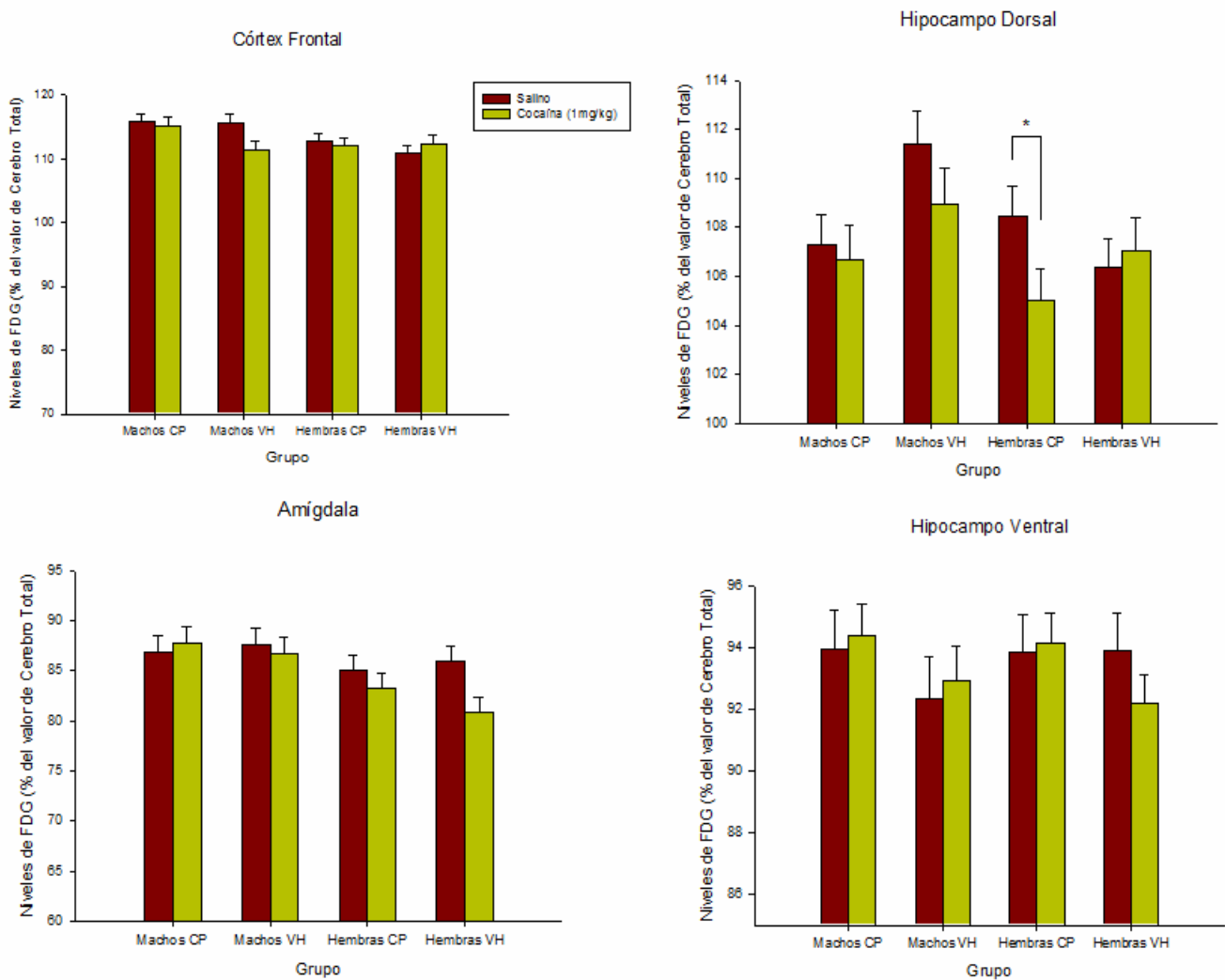
En este área, las hembras mostraron un metabolismo global disminuído con respecto a los machos ($F_{1,29}=10,012$ $p<0,01$).

4.6. Cerebelo

No se encontraron efectos significativos en esta región encefálica.

4.7. Estriado Dorsal

Aquí obtuvimos un efecto significativo del factor “Cocaína” ($F_{1,29}=16,691$ $p<0,01$), que se tradujo en un descenso significativo del metabolismo estriatal tras la inyección de cocaína. Además, obtuvimos un efecto significativo del factor SEXO tomado como factor entregupos ($F_{1,29}=15,269$ $p<0,01$), mostrando las hembras de nuevo un metabolismo menor que los machos.



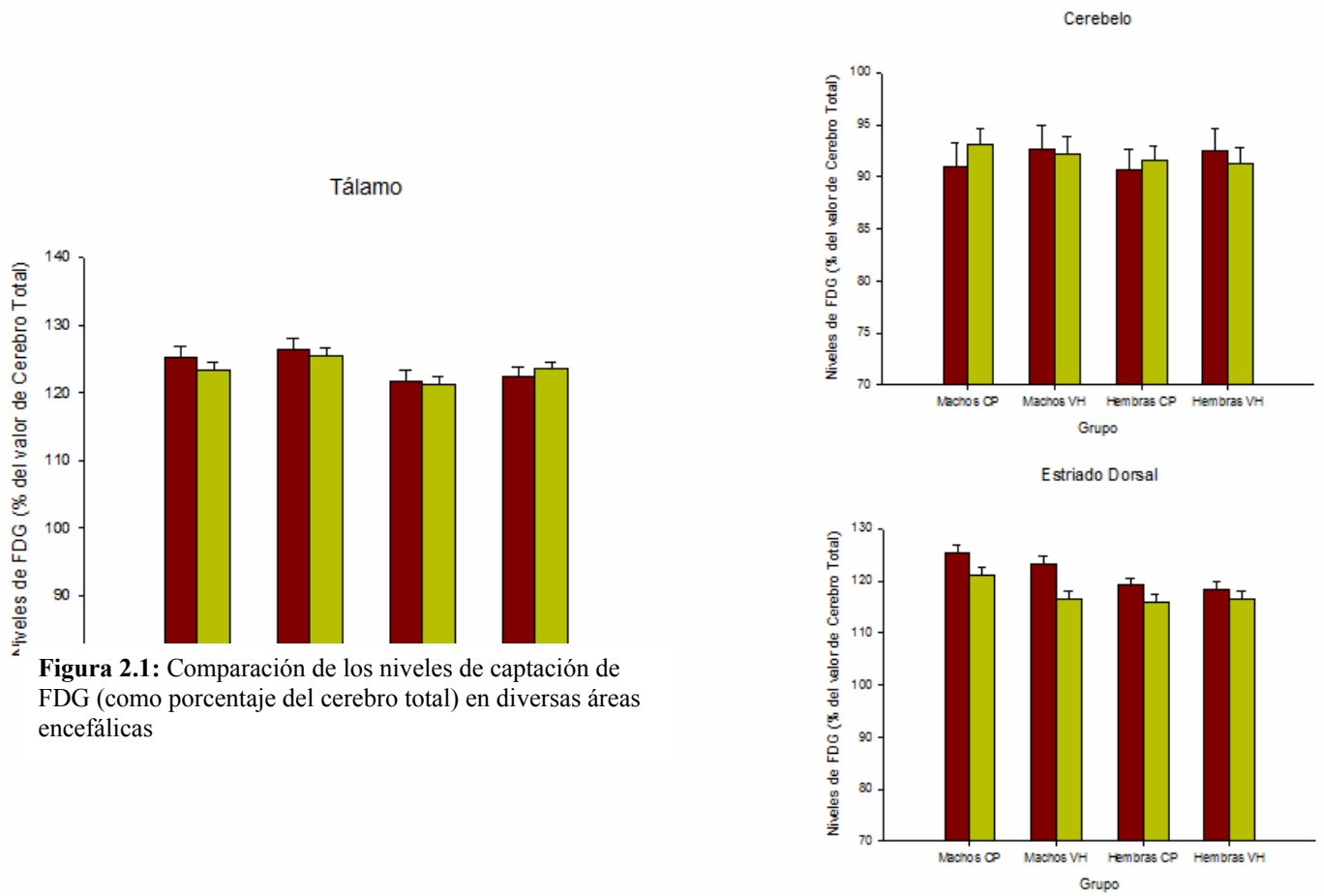
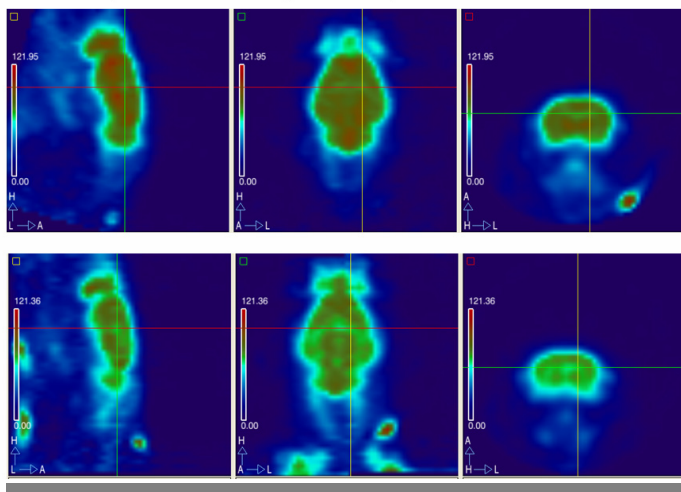


Figura 2.1: Comparación de los niveles de captación de FDG (como porcentaje del cerebro total) en diversas áreas encefálicas

Hembra VH (Arriba: Salino; Abajo: Cocaína)



Hembra CP (Arriba: Salino; Abajo: Cocaína)

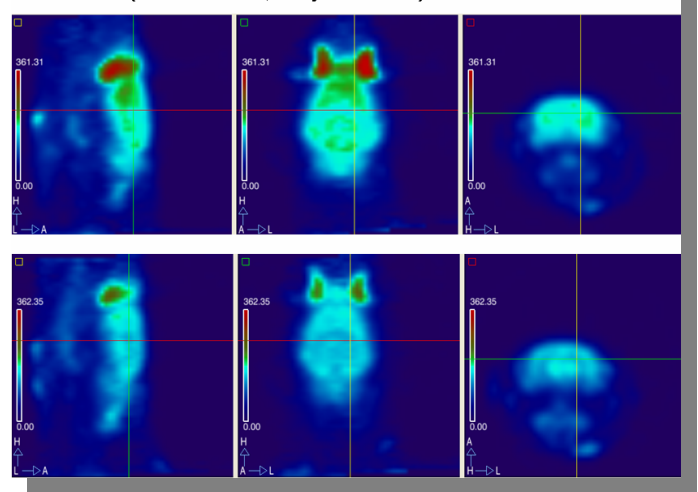


Figura 2.2: Comparación de la activación metabólica inducida por una inyección de cocaína en una Hembra CP y una Hembra VH

5. *Discusión*

Hasta donde nosotros sabemos, éste es el primer estudio que ha analizado los efectos metabólicos de una inyección aguda de cocaína en animales adultos tratados en su adolescencia con un agonista cannabinoide.

Quizás, nuestro resultado más interesante sea el referente al hipocampo dorsal. Diversos estudios demuestran que los tratamientos crónicos cannabinoides pueden alterar la estructura y función de las neuronas hipocampales. En este contexto, se ha observado que un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN 55,512-2 altera la distribución dendrítica hipocampal, así como la morfología de esta estructura (Lawston, Borella, Robinson, & Whitaker-Azmitia, 2000), si bien algunos estudios hechos en pacientes consumidores de marihuana no encontraron alteraciones morfológicas en esta región límbica (Tzilos et al., 2005). A nivel funcional, se sabe que la exposición a agonistas cannabinoides reduce el disparo de las neuronas hipocampales (Robinson, Goonawardena, Pertwee, Hampson, & Riedel, 2007) y mediante resonancia magnética funcional, se han observado descensos en la activación del hipocampo durante una tarea de memoria asociativa en consumidores habituales de marihuana con respecto a los controles (Jager et al., 2007). La formación del hipocampo está implicada en aprendizajes relacionados con el refuerzo; así, el subículum (uno de los componentes de la formación del hipocampo) manda proyecciones al NAcc (French & Totterdell, 2002, , 2003) y las lesiones del complejo subicular interrumpen la autoadministración de cocaína (Black, Green-Jordan, Eichenbaum, & Kantak, 2004). En nuestro grupo de Hembras CP, la cocaína indujo reducciones en el metabolismo cerebral en el hipocampo dorsal, probablemente a través de un descenso en el número (Villares, 2007) o la actividad de los receptores CB1 (Sim, Hampson et al., 1996). Se podría sugerir que este cambio reflejaría una funcionalidad disminuída de esta estructura y que por tanto la cocaína no sería tan reforzante en condiciones iniciales. Esto se traduciría pues en un aumento en el consumo de la droga para obtener niveles similares de refuerzo. Por otro lado, la cocaína también parece empeorar (Melnick, Kubie, Laungani, & Dow-Edwards, 2001), no afectar (N. Del Olmo, Higuera-Matas et al., 2006; Kantak et

al., 2005) o mejorar incluso (N. Del Olmo, Higuera-Matas, Miguens, Garcia-Lecumberri, & Ambrosio, 2007) el aprendizaje espacial, quizás alterando la potenciación a largo plazo en esta estructura (N. Del Olmo, Higuera-Matas et al., 2006; N. del Olmo, Miguens et al., 2006). A la vista del hipometabolismo producido por la cocaína en las hembras tratadas con CP, y dada la importancia de esta estructura en los procesos mnésicos, se podría decir que el tratamiento crónico cannabinoide, podría aumentar en las hembras la distorsión de los procesos de aprendizaje y memoria que causa la cocaína. Otra opción interpretativa estaría relacionada con los procesos de recaída en el consumo de cocaína. Quizás la respuesta funcional disminuída del hipocampo ante la inyección de cocaína pueda tener como correlato una menor asociación de la droga con su contexto y en este caso, las recaídas inducidas por claves contextuales estarían alteradas (Fuchs et al., 2005), en este sentido se sabe que la estimulación eléctrica del hipocampo puede inducir recaídas en el consumo de cocaína (Vorel, Liu, Hayes, Spector, & Gardner, 2001).

La falta de efecto de la cocaína en la amígdala es consistente con estudios previos con 2-DG y no encontraban cambios en esta estructura límbica tras el desafío con cocaína (Lyons, Friedman, Nader, & Porrino, 1996; Porrino, Domer, Crane, & Sokoloff, 1988). Sin embargo la falta de efecto en el tálamo está en desacuerdo con los estudios de neuroimagen funcional en seres humanos, aunque esta discrepancia bien podría deberse a las diferencias inter-especies (London et al., 1990)

También hemos descrito un descenso general en el metabolismo dorsoestriatal tras la inyección de cocaína, tal y como han visto previamente otros autores (London et al., 1990; Volkow et al., 1997), y que podría explicar las alteraciones en la actividad locomotora que induce esta droga.

Hemos descrito, asimismo, interesantes diferencias en el metabolismo global entre machos y hembras, en la amígdala, el tálamo y el CPu. Es destacable que estas diferencias no parecen ir acordes con lo que ocurre en seres humanos (ver la excelente revisión de Cosgrove al respecto: (Cosgrove, Mazure, & Staley, 2007)); dado que en éstos no suelen encontrarse diferencias en estas áreas. En el caso de las ratas de laboratorio, sólo hemos encontrado un estudio que determine diferencias sexuales en el metabolismo cerebral (usando el método de la 2-Desoxi-D-Glucosa), y en

él se detalla que son las hembras las que presentan un mayor metabolismo en una gran variedad de regiones estudiadas (L. L. Brown, Siegel, & Etgen, 1996). No obstante, es posible que estas diferencias se deban a los métodos de neuroimagen empleados. La implicación funcional de este hipometabolismo en las hembras no parece claro, aunque podría estar relacionada con las diferencias en emocionalidad, y actividad locomotora que existen entre ambos sexos.

En conclusión, nuestros resultados parecen indicar que la respuesta metabólica a la cocaína en el hipocampo dorsal es diferente en ratas hembras tratadas crónicamente con un agonista cannabinoide durante su adolescencia. Así pues, proponemos que estos resultados, podrían ayudar a explicar, al menos parcialmente, la mayor vulnerabilidad a la adicción a la cocaína observada en estos animales.

CAPÍTULO III: Efectos de los cannabinoides en la adolescencia sobre el sistema dopaminérgico adulto

1. Resumen

Como se ha visto en el capítulo I, un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide CP 55,940 en animales adolescentes induce un aumento durante la edad adulta en la autoadministración de cocaína (sólo en la fase de adquisición), específicamente en las hembras. Además hemos visto que el tratamiento produce cambios metabólicos en el cerebro tanto a nivel basal (Capítulo I y II) como tras un desafío con una inyección de cocaína (Capítulo II). Para determinar los mecanismos dopaminérgicos que pudieran estar mediando en esta mayor susceptibilidad, realizamos experimentos en los que medimos los niveles del transportador de dopamina (TD), los receptores de la familia D1 y D2 dopaminérgicos, así como la expresión génica de la enzima limitante de la síntesis de DA, la tirosina hidroxilasa (TH). Estas mediciones se realizaron en cortes de cerebro de los animales que se autoadministraron cocaína, descritos en el capítulo I, y también en animales de ambos sexos tratados con CP o VH, pero que no sufrieron otra manipulación, con el fin de poder establecer niveles “basales” de estas proteínas. Nuestros resultados indican que las Hembras CP mostraron mayores niveles del TD en el caudado-putamen (CPu). Los machos tratados con CP tuvieron niveles mayores de receptores de la familia D1 en condiciones basales, en el núcleo accumbens “Shell” (NAcc-Shell). Las hembras en su conjunto tuvieron mayores niveles de receptores del tipo D2 en el NAcc-Core. Por su parte, la autoadministración de cocaína provocó una regulación al alza del TD en el CPu, NAcc-Shell, NAcc-Core y el tubérculo olfatorio (Tu). En cuanto a los receptores del tipo D1, las ratas que se autoadministraron cocaína mostraron un aumento en los niveles de esta proteína en la sustancia negra (SN) cuando fueron comparados con los valores basales. Tras la autoadministración, detectamos una disminución en los niveles de los receptores de la familia D2 en el giro dentado del hipocampo (GD) y en el *stratum radiatum* de la zona CA1 del hipocampo (CA1-STRAD), así como un aumento en el Tu y en la SN. En lo que respecta a la expresión génica de la TH no obtuvimos diferencias entre los grupos ni en la SN ni en el área tegmental ventral (ATV). Los cambios observados en el sistema dopaminérgico podrían

estar implicados en la mayor vulnerabilidad observada durante las fases iniciales de la adicción a la cocaína en ratas hembras adultas tratadas en su adolescencia con cannabinoides.

2. Introducción

Como ya se ha dicho en capítulos anteriores, la investigación epidemiológica ha puesto de manifiesto que el consumo de marihuana durante la adolescencia puede inducir vulnerabilidad al consumo de otras drogas al llegar a la edad adulta, un hecho que se conoce con el nombre de la Hipótesis de la Puerta de Entrada (Anthony, 2002; Fergusson et al., 2006; W. D. Hall & Lynskey, 2005; Kandel et al., 2006; Lynskey, 2002; Wada, 1999). Sin embargo, como ya se ha mencionado previamente, este modelo tiene limitaciones, sobre todo a la hora de establecer inferencias causales en cuanto a la relación entre el consumo de marihuana en la adolescencia y el de otras drogas en la edad adulta. En los capítulos anteriores ya hemos proporcionado evidencias que sustentan, al menos parcialmente, a nivel experimental esta hipótesis en relación a la cocaína (Higuera-Matas et al., 2007) y otros autores lo han hecho en el caso de los opiáceos (Ellgren et al., 2007). Si bien Ellgren y colaboradores delimitan los posibles mecanismos opioidérgicos y cannabinérgicos de sus hallazgos, en el caso de la cocaína no se conocen las bases moleculares de la mayor vulnerabilidad al consumo de esta droga inducida por la exposición crónica a cannabinoides durante la adolescencia.

Pensamos que el sistema dopaminérgico podría ser un buen punto de partida dado que las acciones farmacológicas de la cocaína están mediadas en su mayor parte por este sistema. En este sentido, se sabe que las inyecciones de esta droga aumentan los niveles de DA en el NAcc (Di Chiara & Imperato, 1988) presumiblemente debido a la habilidad de la cocaína para bloquear el TD (F. S. Hall et al., 2004), esta propiedad además parece mediar la autoadministración de la droga (Ritz, Lamb, Goldberg, & Kuhar, 1988). Adicionalmente, la autoadministración de cocaína parece alterar el número de moléculas TD (Ben-Shahar, Moscarello, & Ettenberg, 2006; Letchworth, Nader, Smith, Friedman, & Porrino, 2001), así como el de los receptores de tipo D1 y D2 (Ben-Shahar et al., 2007; Moore et al., 1998; Nader et al., 2002).

Por otro lado, las interacciones entre el sistema endocannabinoide y el dopaminérgico son numerosas (Rodríguez De Fonseca et al., 2001); por ejemplo se ha demostrado recientemente que la liberación de DA que se produce tras la infusión de cocaína, depende críticamente de la activación de receptores cannabinoides (Cheer et al., 2007), mientras que el antagonismo del receptor CB1 incrementa de manera notable las estereotipias mediadas por el agonismo dopaminérgico (Ferrer et al., 2007). Estas interacciones podrían sugerir un papel para el sistema endocannabinoide en la adicción a la cocaína, si bien esto es un tema sujeto a debate en la actualidad (Arnold, 2005; Maldonado, Valverde, & Berrendero, 2006). En este sentido, en un principio parecía que los endocannabinoides estaban implicados mayormente en las recaídas en el consumo (medidas por la reinstauración de la conducta de búsqueda de droga) dado que el agonista cannabinoide HU-210 reinstaura esta conducta de búsqueda, mientras que los antagonistas CB1 SR 141716A y AM 251 inhiben la reinstauración de la conducta de búsqueda de droga previamente extinguida que producen la cocaína o las claves asociadas a la misma (De Vries et al., 2001; Xi et al., 2006). No obstante, otros estudios también demostraron que el agonista cannabinoide WIN 55,512-2 disminuía la autoadministración intravenosa de cocaína en ratas (Fattore et al., 1999), algo que también se consiguió con la ablación por medio de técnicas genéticas del receptor CB1 (Soria et al., 2005).

Dado que el número de los receptores CB1 alcanza su máximo nivel durante la adolescencia (Rodríguez de Fonseca et al., 1993), se podría hipotetizar que un tratamiento crónico cannabinoide durante esta etapa provocaría una gran liberación de DA, de manera sostenida y esto tendría como consecuencia un cambio, que podría ser duradero, en el número y la función de los receptores dopaminérgicos y del TD. Estas alteraciones neuroquímicas podrían explicar, al menos en parte, la diferente autoadministración de cocaína que se observa en ratas adultas tratadas con cannabinoides durante la adolescencia.

Por lo tanto, habida cuenta de todo lo dicho hasta ahora, en este estudio, siguiendo un régimen farmacológico idéntico a los anteriores, examinamos los niveles basales del TD, receptores

D1, D2 y expresión génica de la enzima TH en animales adultos, que habían seguido el tratamiento cannabinoide ya descrito, durante la adolescencia. Estos mismos parámetros se midieron también tras la autoadministración de cocaína (animales del capítulo I).

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales y Tratamiento Farmacológico

Los animales usados para el estudio neuroquímico tras la autoadministración fueron los mismos que los del capítulo I, mientras que los animales usados para establecer las condiciones basales, siguieron el mismo tratamiento crónico con CP y cuando llegaron a la edad adulta fueron sometidos al mismo protocolo de entrenamiento operante con comida que siguieron los animales de autoadministración, para que sus características fueran las mismas, salvo por el acceso a la cocaína.

3.2. Aparatos

Las mismas cajas de autoadministración ya descritas en el capítulo I.

3.3. Procedimiento Experimental

Autoadministración de Cocaína: Ver capítulo I.

Procesamiento del Tejido Cerebral: 1 hora después de la última sesión de autoadministración, se sacrificó a los animales por decapitación y se extrajeron rápidamente sus cerebros que fueron sumergidos en isopentano enfriado con hielo seco: Hembras CP (n=9), Hembras VH (n=7), Machos CP (n=10) y Machos VH (n=10). Posteriormente, se almacenaron los cerebros a -80°C hasta que fueron procesados para los ensayos neuroquímicos.

Además, para la determinación de los niveles basales se tomaron animales tratados pero que no se autoadministraron, Hembras CP (n=9), Hembras VH (n=8), Machos CP (n=6) y Machos VH (n=6). Como ya se ha mencionado, estos animales fueron sometidos al mismo protocolo de condicionamiento operante con comida que los de autoadministración. Igualmente, fueron sacrificados por decapitación y se extrajeron sus cerebros para sumergirlos rápidamente en

isopentano enfriado con hielo seco y se almacenaron a -80°C . Se realizaron cortes coronales de 20 micras, en un criostato, a -20°C , siguiendo el atlas de Paxinos (Paxinos & Watson, 2005). Los cortes fueron montados en portaobjetos estériles gelatinizados y guardados a -80°C hasta el día de los ensayos.

Autorradiografía cuantitativa del Transportador de Dopamina: Usamos un protocolo descrito previamente (Canfield, Spealman, Kaufman, & Madras, 1990) con pequeñas modificaciones. Los portaobjetos, por triplicado para cada animal, con las secciones de cerebro (2 por portaobjetos), se preincubaron 20 min en tampón fosfato salino (PBS) 50 mM a $0-4^{\circ}\text{C}$ (pH 7,4) con una concentración 50mM de NaCl para eliminar cualquier cocaína residual que pudiera estar presente. Acto seguido fueron incubados 2 horas en el mismo tampón al que se le había añadido [N-metil- ^3H]-WIN 35,428 (87 Ci/mmol; Perkin Elmer, España). La incubación se realizó en presencia o ausencia de cocaína fría a $100\ \mu\text{M}$ para poder así determinar la unión total y la unión no específica. Tras la incubación, los portaobjetos se lavaron dos veces (1 minuto cada vez) en PBS frío y se enjuagaron dos veces en agua destilada. Posteriormente, se secaron bajo una columna de aire seco enfriado con nieve carbónica. En estos estudios, las regiones analizadas fueron el CPu, el NAcc-Shell, el NAcc-Core, y el Tu.

Autorradiografía cuantitativa de receptores D1 y D2 de Dopamina: Los portaobjetos (por triplicado y dos secciones por cada uno) se incubaron con ^3H -SCH-23390 a 1nM (para los receptores D1; 85Ci/mmol) o ^3H -YM09151-2 1 nM (para los D2; 71,4Ci/mmol) (Perkin Elmer, Madrid, España) en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) con NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 1.5 mM y MgCl_2 4 mM a temperatura ambiente durante 60 min. La unión no específica se detectó con SCH-23390 $10\ \mu\text{M}$ (D1) o (+)Butaclamol $10\ \mu\text{M}$ (D2) (Sigma, España) (D2). Tras la incubación, las secciones se sumergieron brevemente en tampón Tris frío ($0-4\ ^{\circ}\text{C}$), y se lavaron rápidamente en agua bidestilada, para posteriormente secarse bajo una columna de aire frío y seco.

En los estudios de receptores D1 se analizó el CPu, NAcc-Shell, NAcc-Core, Tu y SN mientras que para los D2 se analizaron las mismas regiones así como el GD y CA1-STRAD.

Análisis de la Expresión Génica de la Enzima Tirosina Hidroxilasa mediante Hibridación In

Situ: En este caso, el tejido se fijó mediante inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS durante 5 min. Posteriormente, se lavó el tejido dos veces, durante dos minutos cada vez en PBS, para posteriormente ser acetilado durante 10 min con una solución de anhídrido acético al 0,25% preparada en un tampón salino (NaCl, 0,15 M; pH=8) que contenía trietanolamina 0,1M. Posteriormente, las secciones se lavaron dos veces durante 2 min cada vez en SSC 2X (tampón de salino y citrato sódico; NaCl 0,3M; Citrato sódico 0,03 M a pH=7), después se deshidrató el tejido y se extrajeron los lípidos con baños en etanol a diferentes concentraciones y en cloroformo. La sonda utilizada (complementaria a las bases 1223-1252 del cADN de TH de rata; Sigma-Genosys, España) se marcó en su extremo 3' con [³⁵S] dATP (General Electric Health Care, Spain), usando una desoxinucleotidil terminal transferasa (Promega). Se hibridó el tejido con la sonda (2,5x 10⁵ dpm) durante 18 horas. El tejido se lavó en condiciones de alta estringencia (especificidad) con cuatro baños de 15 minutos a 55°C con SSC 1X y dos baños de 30 minutos a temperatura ambiente con SSC 1X.

Exposición, Revelado y Cuantificación de los Autorradiogramas: En el caso de la autorradiografía del TD y de los receptores D1 y D2, se expusieron los portaobjetos a películas ³H-Hyperfilm (GE Healthcare, España) durante nueve semanas y se revelaron por métodos convencionales. El tejido de la hibridación *in situ* se expuso a películas Kodak Biomax (Sigma, España) durante cinco días y se siguieron los mismos métodos de revelado. Se analizaron los autorradiogramas con un ordenador PC compatible y se utilizó el programa de libre distribución Scion Image (NIH, EE.UU). En el caso del TD y de los receptores se usaron patrones de tritio para calibrar la respuesta no lineal de la película a la radioactividad. En el caso de la TH se utilizó el modo “sin calibrar” del programa y se midieron directamente los niveles de gris. Las medidas se promediaron entre ambos hemisferios y entre los diferentes cortes y portaobjetos. En el caso del TD y de los receptores dopaminérgicos las medidas se expresaron en fentomoles por miligramo de tejido equivalente y para la TH se usaron unidades de densidad óptica.

3.4. Análisis de los Datos

Se usaron ANOVAs trifactoriales para estudiar los efectos del SEXO (macho/hembra), TRATAMIENTO (CP/VH) o CONDICIÓN (basal/autoadministración) así como sus posibles interacciones. Las interacciones de primer y segundo orden se analizaron con ANOVAs bi y unifactoriales respectivamente. Se usó estadística no paramétrica (H de Kruskal-Wallis) si no se cumplían los supuestos básicos del ANOVA. La significación estadística se fijó en $\alpha=0.05$ y todos los cálculos se hicieron con SPSS 14.00.

4. Resultados

Los resultados conductuales pueden consultarse en el capítulo I.

4.1. Transportador de Dopamina

En el CPu hemos encontrado un efecto significativo de la CONDICIÓN ($F_{1,57}=14,403$ $p<0,01$). En este caso se observa que tras la autoadministración de cocaína, las ratas mostraron mayores niveles de TD en esta estructura. Además encontramos un efecto significativo de la interacción SEXO X TRATAMIENTO ($F_{1,57}=8,403$ $p<0,01$). El análisis de la interacción mostró un efecto significativo del TRATAMIENTO en las hembras ($F_{1,63}=3,95$ $p<0,05$) pero no en los machos. Las Hembras CP tuvieron niveles superiores del TD en el CPu que sus controles VH (Figura 3.2).

En el NAcc sólo se observó un efecto significativo de la CONDICIÓN ($F_{1,56}=6,237$, $p<0,01$ para la región "Shell" y $F_{1,56}=7,899$, $p<0,01$ para el Core) presentando las ratas que se autoadministraron cocaína, mayores niveles del TD en este núcleo.

Un patrón similar se halló en el Tu, en el que las ratas que se autoadministraron cocaína, tuvieron niveles mayores del TD que las que no se autoadministraron ($F_{1,57}=5,420$, $p<0,05$) (Fig. 3.1).

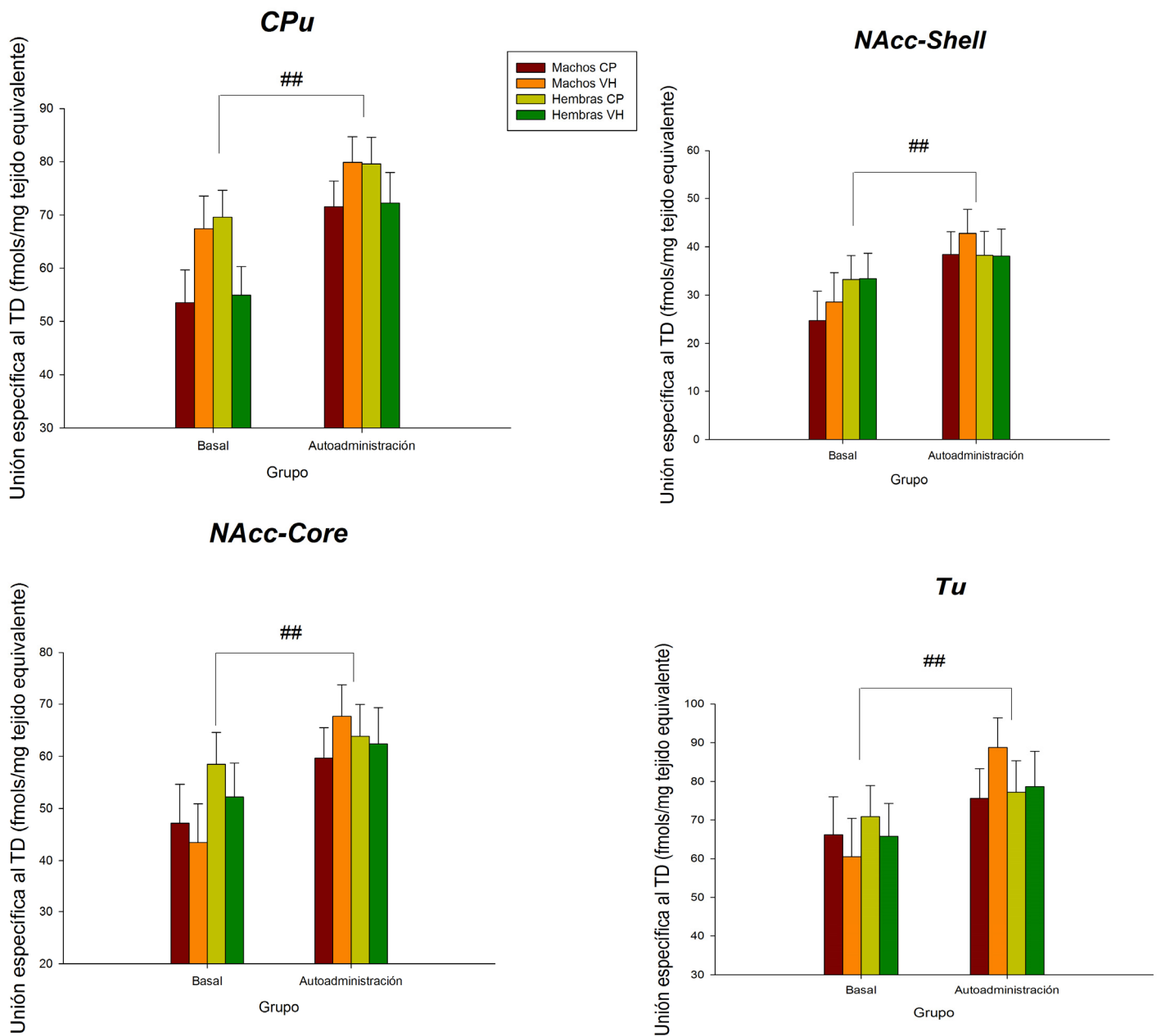


Figura 3.1.: Niveles del TD en fmols/mg de tejido equivalente. ## Diferencia entre basal y autoadministración; $p < 0,01$

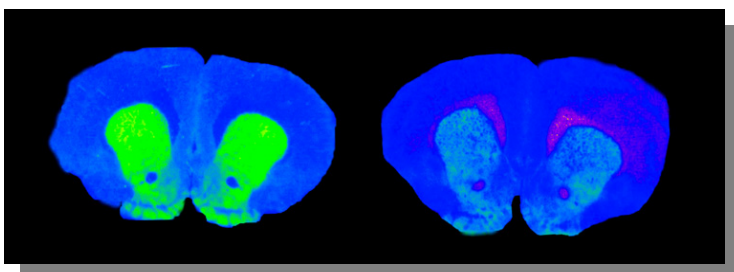


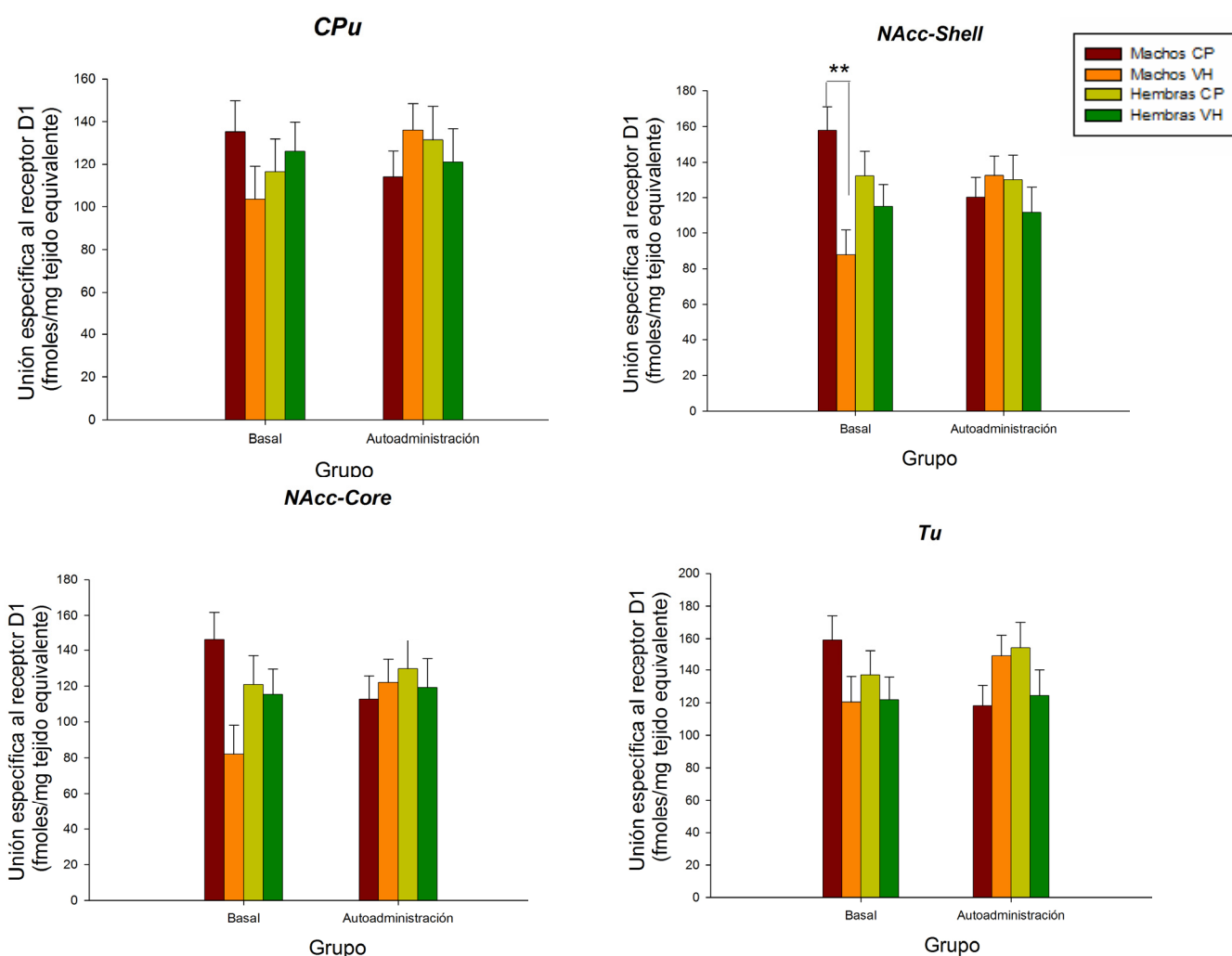
Figura 3.2: Autorradiogramas representativos comparando los niveles del TD en una hembra CP Basal (Izquierda) y una VH Basal (Derecha). Los colores más intensos equivalen a niveles mayores del TD

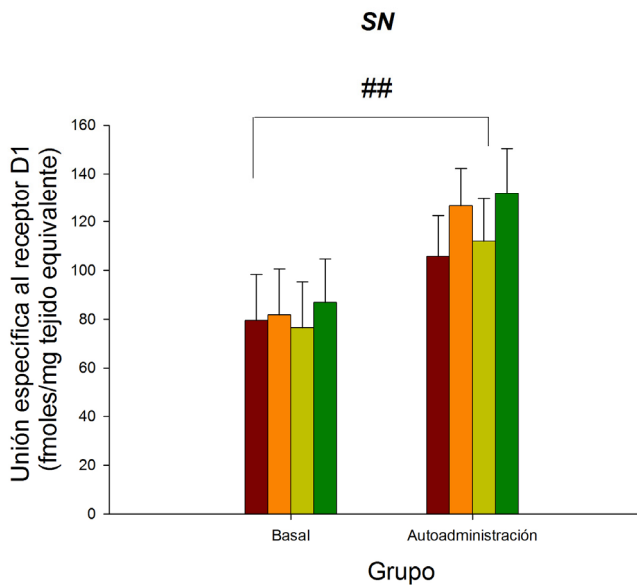
4.2. Receptores D1 Dopaminérgicos

En el NAcc-Shell encontramos un efecto significativo del TRATAMIENTO ($F_{1,59}=6,467$ $p<0,01$), los animales CP tuvieron mayores niveles del receptor D1 que los VH. También observamos un efecto significativo de la interacción SEXO X TRATAMIENTO X CONDICIÓN ($F_{1,59}=5,120$ $p<0,05$) que se tradujo en que los Machos CP tuvieron mayores niveles basales de receptores de la familia D1 que el resto de los grupos ($F_{1,65}= 14,17$ $p<0,01$). Este efecto desapareció tras la autoadministración de cocaína y no se observó en las hembras (Figura 3.3).

En el Tu, se encontró una interacción significativa SEXO X TRATAMIENTO X CONDICIÓN ($F_{1,59}=4,262$ $p<0,05$), sin embargo al analizar los efectos simples, ninguno de ellos alcanzó la significación estadística.

En la SN, la autoadministración provocó un aumento del número de receptores D1 ($F_{1,55}=8,827$ $p<0,01$) independientemente del SEXO o el TRATAMIENTO de los animales





(Fig. 3.3). No se encontraron más diferencias significativas en el resto de las áreas estudiadas.

Figura 3.3: Niveles del receptor D1 en fmols/mg de tejido equivalente. ## Diferencia entre basal y autoadministración; $p < 0,01$ ** Diferencia entre Machos CP y Machos VH; $p < 0,01$

4.3. Receptores D2 Dopaminérgicos

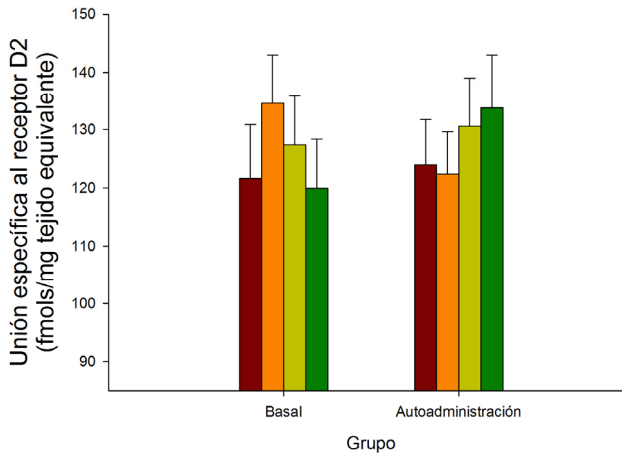
En el NAcc-Core, las hembras mostraron mayores niveles de receptores de tipo D2 que los machos ($F_{1,40}=6,413$ $p < 0,01$).

En el Tu, se observó un aumento en el nivel de estos receptores tras la autoadministración de cocaína, al compararse con los niveles basales ($H_1=7,250$ $p < 0,01$).

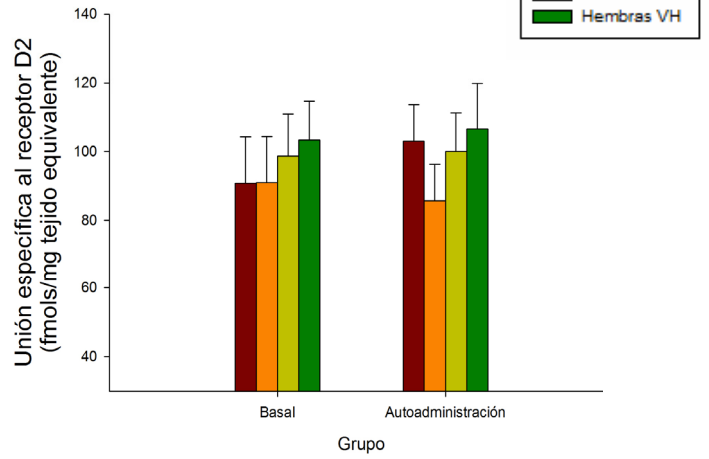
También hemos encontrado que las ratas que se autoadministraron cocaína, mostraron un mayor número de receptores de la familia D2 en la SN ($F_{1,41}=8,727$ $p < 0,01$) y se observó una interacción significativa SEXO X TRATAMIENTO ($F_{1,41}=6,029$ $p < 0,05$) y TRATAMIENTO X CONDICIÓN ($F_{1,41}=5,039$ $p < 0,05$). No obstante, no detectamos efectos simples significativos cuando analizamos más en profundidad estas interacciones.

Tras la autoadministración se observó una regulación a la baja en el número de receptores D2 en el GD ($F_{1,38}=17,760$ $p < 0,01$) y en el CA1-STRAD ($H_1=7,365$ $p < 0,01$). En esta última capa del hipocampo, también observamos que los animales CP mostraban menos receptores D2 que los VH ($H_1=4,543$ $p < 0,05$) (Fig. 3.3).

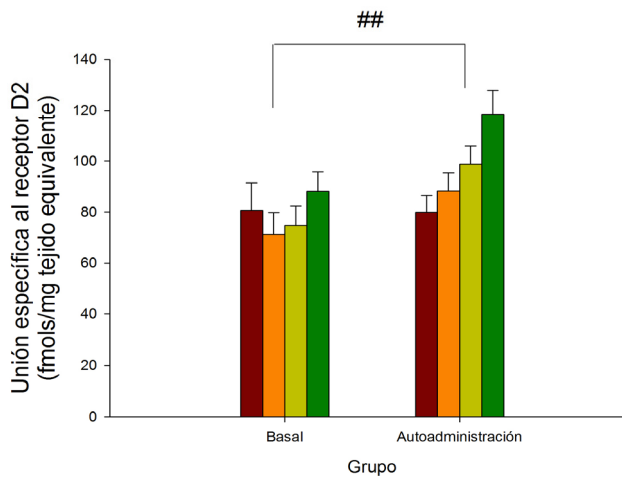
CPu



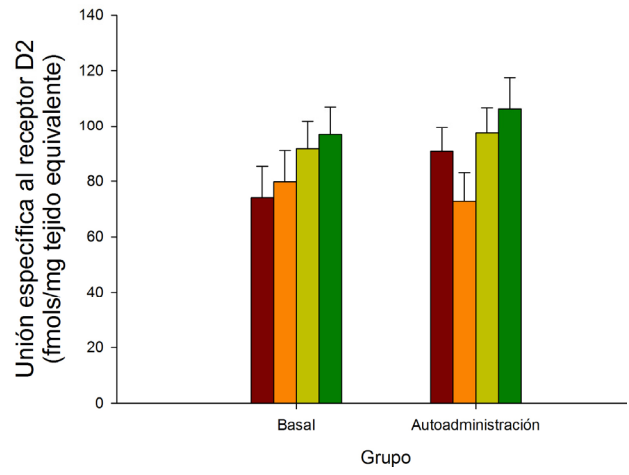
NAcc-Shell



Tu



NAcc-Core



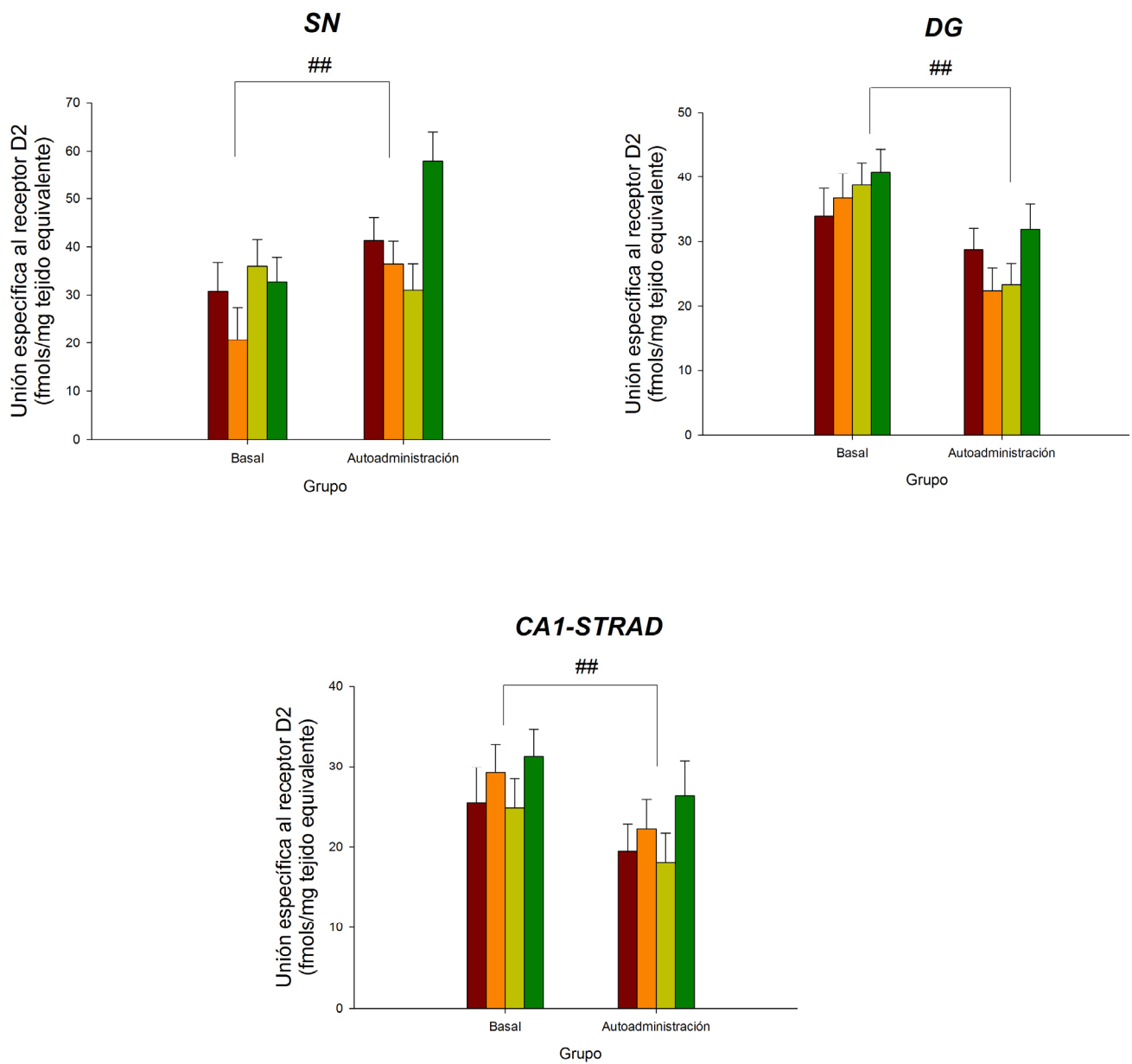


Figura 3.4: Niveles del receptor D2 en fmols/mg de tejido equivalente. ## Diferencia entre basal y autoadministración; $p < 0,01$

4.4. Expresión Génica de la Tirosina Hidroxilasa

No encontramos efecto alguno de los factores analizados en la expresión génica de la TH, ni en la SN ni en el ATV (Fig. 3.4).

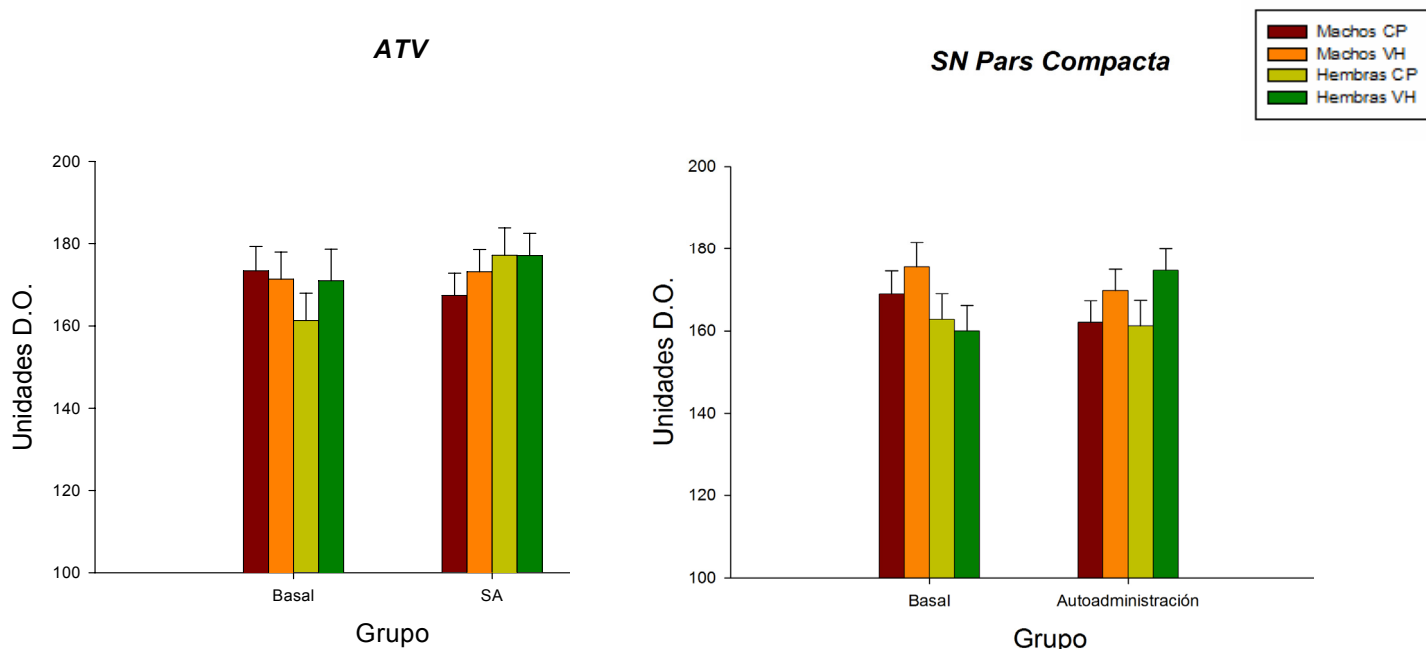


Figura 3.5: Expresión génica de la TH en unidades de densidad óptica

5. Discusión

En este capítulo hemos descrito experimentos en los que se demuestra que existe una alteración duradera en el sistema dopaminérgico como consecuencia del tratamiento crónico. Además, hemos descrito cambios en este sistema tras la autoadministración de cocaína y algunas diferencias sexuales en el mismo. Más específicamente, cuando hemos comparado a las Hembras CP con sus correspondientes VH, hemos encontrado que muestran mayores niveles del TD en el CPu. Estos cambios además no desaparecieron tras la autoadministración de cocaína. Por otro lado, los Machos CP mostraron mayores niveles basales del receptor D1 en el NAcc-Shell, que sus correspondientes VH, sin embargo, este efecto sí desapareció tras la autoadministración; estos animales también mostraron una tendencia a mostrar mayores niveles del receptor D1 en el NAcc-Core cuando de nuevo, fueron comparados con sus controles VH. Los animales CP en su conjunto

mostraron menores niveles del receptor D2 que los VH en el CA1-STRAD. Además, la autoadministración de cocaína, *per se*, indujo una regulación al alza en el TD en diferentes regiones (el CPu, NAcc-Shell y NAcc-Core), así como un aumento en el número de receptores D1 en la SN y un aumento de los receptores del tipo D2 en el Tu y SN, y un descenso en los mismos en GD y CA1-STRAD. En cuanto a la expresión génica de la TH, no se observaron efectos significativos de ninguna de las variables manipuladas.

Diversos estudios han examinado las consecuencias a largo plazo de un tratamiento perinatal con cannabinoides sobre el desarrollo postnatal del sistema dopaminérgico (Bonnin et al., 1996; Bonnin et al., 1995; Rodriguez de Fonseca et al., 1991; Rodriguez de Fonseca, Cebeira, Hernandez, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1990). Curiosamente, los patrones de resultados en estos estudios parecen ser opuestos a los que nosotros hemos encontrado con el tratamiento adolescente. Así, en los estudios realizados por otros autores parece ser que los machos son los más afectados por el tratamiento en cuanto a los receptores D2. Nosotros por el contrario, no hemos observado esta diferencia sexual en los efectos del tratamiento sobre este receptor, sino que las modulaciones ocurrían a nivel global en los animales tratados con el agonista. Por otro lado, en los estudios previos las hembras mostraban alteraciones en los receptores D1 tras el tratamiento perinatal con THC mientras que nosotros hemos encontrado estos cambios en los machos tratados. Por lo tanto, parece que el efecto del tratamiento con cannabinoides sobre el sistema dopaminérgico depende de manera crítica del período de desarrollo en el que acontece.

En los experimentos que ya hemos detallado en el capítulo 1 se observó que las Hembras CP mostraban mayores niveles de autoadministración de cocaína durante la fase de adquisición de la misma (Higuera-Matas et al., 2007) y curiosamente este grupo muestra mayores niveles de TD en el CPu que las hembras tratadas con VH mientras que no se observan alteraciones en los niveles de receptores D1 o D2 en esta estructura. Este incremento en los niveles del TD podría ser debido a un tono dopaminérgico elevado en esta parte del estriado, así que para compensar este incremento en la DA sináptica, sería necesario un mayor transporte, para asegurar así una recaptación adecuada de

este neurotransmisor y por tanto mantener la homeostasis del mismo. Éste además, parece ser el caso, dado que no hemos encontrado alteraciones en los receptores D1 o D2 en las Hembras CP, por lo que parece que el incremento del transporte es lo suficientemente eficaz a la hora de asegurar que los niveles extracelulares de DA no se desplazarán fuera del rango de normalidad (y por tanto no se producirán neuroadaptaciones en el número de receptores dopaminérgicos como sería esperable si hubiera un cambio sostenido en los niveles de DA extracelular). Este incremento temporal en el tono dopaminérgico (que por otro lado se autorregula gracias al mayor transporte) en el CPu, podría estar relacionado con una plasticidad sináptica alterada en esta estructura (pero por mecanismos independientes de los niveles de receptores D1 o D2 dado que éstos no cambian). En este sentido, se ha propuesto que el estriado dorsal podría ser una estructura clave a la hora de explicar la transición del uso inicial (experimental si acaso) de la droga a un abuso, de índole más compulsiva e independiente del control del sujeto (Ito et al., 2002), por lo que no se puede descartar la posibilidad de que el CPu estuviera actuando antes de lo habitual en las Hembras CP y que por tanto el comportamiento inicial de las mismas ante la droga se pareciera más al de un animal que ya tiene una adicción establecida, es decir, un comportamiento de autoadministración más establecido, con mayor automatismo y más parecido por tanto a un hábito. Esta hipótesis queda apoyada en parte por el patrón conductual de autoadministración de cocaína que muestran las Hembras CP, con niveles más elevados de presión de palanca que sus controles VH y que los machos en las fases tempranas de contacto con la droga (Higuera-Matas et al., 2007).

Por otro lado, la importancia de los receptores D2 en la adicción a la cocaína está bien establecida (Bari & Pierce, 2005; Britton et al., 1991; Caine & Koob, 1994; Caine, Negus, & Mello, 2000; Corrigall & Coen, 1991; Edwards, Whisler, Fuller, Orsulak, & Self, 2007; Haile & Kosten, 2001; Hubner & Moreton, 1991; Khroyan, Barrett-Larimore, Rowlett, & Spealman, 2000; Rowlett, Platt, Yao, & Spealman, 2007; Sun & Rebec, 2005; Woolverton & Virus, 1989) y nosotros hemos observado que el tratamiento con CP disminuye los niveles de los mismos en el CA1-STRAD. Estos cambios en los receptores D2 podrían en parte explicar, o contribuir a explicar el

comportamiento de las Hembras CP, dada la importancia del hipocampo y el complejo subicular en la autoadministración de cocaína (Black et al., 2004).

En lo que respecta a los receptores de la familia D1, hemos encontrado una regulación al alza en sus niveles en el NAcc-Shell de los animales tratados con CP, en concreto en los machos. Estas diferencias desaparecían tras la autoadministración. No obstante, a nivel conductual, no se observan diferencias en este grupo de machos con respecto a sus controles, por lo que parece que los cambios a nivel de este receptor no son capaces de afectar a la conducta de autoadministración de estos animales. Esto podría ser porque, como se ha dicho antes, los receptores D2 y no los D1 juegan un papel más crucial en la autoadministración de cocaína o bien porque sólo las disminuciones (efecto “tipo antagonista”) y no los aumentos (efecto “tipo agonista”) en los niveles de este receptor dopaminérgico serían capaces de alterar la conducta de autoadministración de cocaína.

En los experimentos descritos en este capítulo hemos encontrado también que tras tres semanas de autoadministración, se produce un aumento de los niveles del TD en el CPu, NAcc y Tu. Estos resultados están de acuerdo con datos previos bien conocidos, procedentes de experimentos realizados en ratas y en monos (Ben-Shahar et al., 2006; Letchworth et al., 2001; J. M. Wilson & Kish, 1996; J. M. Wilson, Nobrega, Carroll et al., 1994; J. M. Wilson, Nobrega, Corrigall et al., 1994). En cuanto a los estudios con seres humanos, se ha observado que la función del TD está aumentada en los pacientes cocainómanos y que los niveles de ocupación del TD correlacionan bastante bien con los síntomas de euforia tras una infusión de cocaína que relatan estos pacientes (Witkin et al., 1999).

Es interesante señalar que en nuestros experimentos, no parece que la autoadministración de cocaína afectara a los niveles de los receptores dopaminérgicos en aquellas regiones donde sí se afectaba el TD. Una excepción a esta regla es el Tu, donde sí se producen aumentos, tanto en el TD como en el número de receptores D2 dopaminérgicos. Este resultado no está de acuerdo con datos de otros autores que muestran aumentos en el TD y descensos en los receptores D2

(presumiblemente debido al incremento en el tono dopaminérgico que ocurre tras la autoadministración de cocaína) (Porrino, Daunais, Smith, & Nader, 2004). Estas divergencias en los resultados se pueden explicar por las distintas especies animales utilizadas y por el diferente régimen de acceso a la droga entre los experimentos de Porrino y colaboradores y los nuestros.

La autoadministración de cocaína también produjo una regulación al alza en los niveles de receptores D1 y D2 dopaminérgicos en la SN, lo cual está en desacuerdo con los datos que hay en seres humanos (Meador-Woodruff, Little, Damask, Mansour, & Watson, 1993) y en monos (Farfel, Kleven, Woolverton, Seiden, & Perry, 1992) que no muestran cambios en estos receptores tras una exposición intermitente a la cocaína. Sin embargo, hasta donde nosotros sabemos no se han hecho estudios en los que se hayan medido los niveles de los receptores D1 o D2 en la SN tras la autoadministración de cocaína por lo que se hace imposible comparar nuestros datos con estudios previos.

Finalmente, los receptores D2 sufrieron una disminución en sus niveles tras la autoadministración en el GD y el CA1-STRAD. Estos cambios pudieran tener alguna relevancia funcional dado el incremento de plasticidad sináptica que tienen las neuronas del CA1-STRAD tras la autoadministración de cocaína (N. del Olmo, Miguens et al., 2006; Thompson, Swant, Gosnell, & Wagner, 2004) y por la relevancia de los receptores D2 en la potenciación a largo plazo (PLP) (Frey, Hartmann, & Matthies, 1989; Manahan-Vaughan & Kulla, 2003). De hecho, hemos observado que tras la autoadministración de cocaína se produce una mejora en el aprendizaje espacial que podría estar explicada por estos cambios neuroplásticos en esta zona del hipocampo (N. Del Olmo et al., 2007).

Por lo que respecta a la expresión génica de la TH, ésta no se vio afectada por ninguna de nuestras manipulaciones. En un estudio en el que se analizaron los efectos a largo plazo de un tratamiento perinatal con THC sobre el sistema dopaminérgico, se obtuvieron similares resultados (es decir la expresión del ARNm para la TH no se vio afectada por el tratamiento) (Garcia-Gil, Ramos, Rubino, Parolaro, & Fernandez-Ruiz, 1998). Por lo tanto parece que los cannabinoides

administrados crónicamente no son capaces de alterar la síntesis dopaminérgica. Por lo que respecta a los efectos de la autoadministración de cocaína sobre la expresión génica de esta enzima, nosotros no hemos encontrado cambio alguno en nuestros animales; hecho que contrasta con datos previos (Vrana, Vrana, Koves, Smith, & Dworkin, 1993), no obstante parece ser que estas diferencias podrían deberse al régimen de acceso a la droga, ya que los cambios en la TH sólo ocurren cuando se da a las ratas acceso *ad libitum* a la droga

En conclusión, se ha demostrado que el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide CP 95,940 durante la adolescencia modifica los sistemas dopaminérgicos centrales y esta modificación sigue patrones diferentes en función del sexo. Se puede postular que estos cambios neuroadaptativos podrían explicar, al menos en parte, la mayor vulnerabilidad a la adicción a la cocaína que se observa en las ratas hembras tratadas (ver capítulo I). Por tanto, estos resultados podrían proporcionar indicios para una posible base biológica de la Teoría de la Puerta de Entrada a la adicción a la cocaína.

**CAPÍTULO IV: Efectos de los
cannabinoides en la adolescencia sobre la
ansiedad, el aprendizaje y la memoria en la
vida adulta**

1. Resumen

La exposición en edad adolescente a sustancias de naturaleza cannabinoide se ha asociado tradicionalmente con alteraciones duraderas en respuestas relacionadas con la ansiedad así como en el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, las bases neurales que subyacen a estos cambios se desconocen. En este último capítulo describiremos experimentos en los que se estudiaron las alteraciones en las respuestas relacionadas con la ansiedad (medidas en el laberinto en cruz elevado –LCE-), en sujetos adultos expuestos crónicamente durante su adolescencia al cannabinoide sintético CP 55,940. Además, medimos la ejecución en tareas que implican memoria de reconocimiento así como en paradigmas de aprendizaje espacial (laberinto acuático de Morris). En otro grupo de animales tratados, medimos los niveles de la Molécula de Adhesión Celular Neural (NCAM) y de su forma polisializada (PSA-NCAM), tanto en hipocampo como en corteza frontal, mediante ELISA y también estudiamos las isoformas de NCAM (180,140 y 120) en hipocampo mediante Western Blot. Asimismo, tomamos muestras de sangre de estos animales y determinamos los niveles plasmáticos de corticosterona y estradiol. Adicionalmente y en un tercer lote de animales tratados, estudiamos la plasticidad sináptica hipocampal (potenciación a largo plazo), mediante electrofisiología extracelular de campo. Nuestros resultados apuntan a que el tratamiento crónico indujo una ansiolisis duradera, sin embargo, este hallazgo no estuvo acompañado por alteraciones en los niveles de corticoesterona entre animales tratados con CP y sus controles. No encontramos efectos del tratamiento en la memoria de reconocimiento ni en los niveles de NCAM (ni en proteína total ni en sus isoformas) ni en el hipocampo ni en la corteza frontal. Obtuvimos sin embargo una modulación en los niveles de PSA-NCAM hipocampal, que estaban elevados en los Machos CP con respecto a los VH. Paralelamente, hallamos una mejor ejecución en la tarea de aprendizaje de referencia en el laberinto de Morris en los animales tratados con el agonista. Cuando examinamos la memoria de esta tarea, obtuvimos una tendencia a un mejor recuerdo por parte de las hembras tratadas. Sin embargo, el tratamiento cannabinoide no parece afectar a los niveles de estradiol de las hembras. La ejecución en la memoria de trabajo no pareció verse afectada. En cualquier caso parece

ser además que los animales machos realizan la tarea mejor que las hembras. Cuando estudiamos la potenciación a largo plazo, no encontramos efecto alguno del tratamiento descartando efectos del mismo sobre la plasticidad sináptica hipocampal.

2. Introducción

Como ya se ha mencionado en los capítulos anteriores, durante la adolescencia, que es un período de particular vulnerabilidad a los efectos de las drogas de abuso (Viveros et al., 2005), la marihuana es la droga ilegal más ampliamente consumida (Gruber & Pope, 2002). Durante este período del desarrollo se producen cambios morfológicos y funcionales que subyacen al desarrollo cognitivo adulto (Chambers et al., 2003). Por ejemplo, se sabe que los receptores CB1 alcanzan su pico de expresión en la etapa adolescente en la rata (ver Introducción General) (Rodríguez de Fonseca et al., 1993). Estos receptores son muy abundantes en el hipocampo (Herkenham et al., 1990), que es una estructura nerviosa implicada en los procesos de aprendizaje y memoria (Squire, 2004). Se sabe además que los cannabinoides alteran el funcionamiento sináptico normal en el hipocampo, lo cual se traduce en un déficit mnésico (Mato et al., 2004; Robbe et al., 2006). En este sentido, se podría hipotetizar que la exposición a sustancias cannabinoides durante la etapa adolescente podría provocar cambios en el funcionamiento hipocampal normal que alterarían los dominios cognitivos adultos. Hay datos conflictivos en la literatura a este respecto: por ejemplo, los estudios iniciales en humanos mostraban que el uso crónico de marihuana antes de los 16 años de edad producía un déficit en una tarea de inspección visual (Ehrenreich et al., 1999). Además, se ha observado que la exposición a la marihuana durante la adolescencia está asociada con déficits a largo plazo en la memoria de trabajo (Schwartz, Gruenewald, Klitzner, & Fedio, 1989). Los estudios con animales han mostrado que la exposición crónica a cannabinoides durante la adolescencia deteriora la memoria de trabajo (medida en un paradigma de reconocimiento de objetos) en ratas hembras adultas. Sin embargo, este déficit no era evidente cuando el tratamiento con el cannabinoide se producía durante la edad adulta (O'Shea et al., 2004). No obstante, otro

grupo de investigación ha informado de resultados similares en animales macho (Schneider & Koch, 2003).

En este contexto, es también importante entender cómo las respuestas de ansiedad se desarrollan ontogenéticamente y cómo estarían afectadas por la exposición a cannabinoides durante la adolescencia, dado que se sabe que la ansiedad puede afectar de manera muy importante al aprendizaje y la memoria (Herrero, Sandi, & Venero, 2006). Se ha observado que un tratamiento crónico con el agonista CP 55,940 durante la adolescencia, produce un efecto ansiolítico duradero que no va acompañado de cambios en los niveles séricos de corticoesterona (Biscaia et al., 2003). Además parece que existe un cierto grado de dimorfismo sexual en cuanto a los efectos residuales del THC sobre la ansiedad en animales adultos expuestos a la droga durante la adolescencia. Así, parece que en las hembras el tratamiento produce su efecto cuando la exposición ocurre durante la adolescencia, mientras que en los machos se ve una afectación independientemente de la edad en la que se produzca el tratamiento (O'Shea, McGregor, & Mallet, 2006; O'Shea et al., 2004).

A pesar de que la literatura sobre el tema va aumentando, poco se sabe sobre las bases neurales subyacentes a los cambios cognitivos y emocionales provocados por la exposición crónica a cannabinoides. La potenciación a largo plazo (PLP) es la forma de plasticidad sináptica mejor estudiada (Malenka, 2003; Malenka & Bear, 2004) y se piensa que podría ser la base biológica del aprendizaje y la memoria (M. A. Lynch, 2004). Por su parte, los cannabinoides ejercen acciones complejas sobre la inducción y el mantenimiento de la PLP y por ejemplo, se sabe que normalmente los cannabinoides exógenos la dificultan (Misner & Sullivan, 1999; Nowicky, Teyler, & Vardaris, 1987), mientras que los endocannabinoides tienen una acción más compleja, por un lado facilitando (Carlson, Wang, & Alger, 2002) o impidiendo (Slanina, Roberto, & Schweitzer, 2005; Terranova, Michaud, Le Fur, & Soubrie, 1995) la PLP en el hipocampo. La administración crónica de THC provoca déficit en la PLP que son evidentes incluso tres días después de la retirada de la droga (Hoffman, Oz, Yang, Lichtman, & Lupica, 2007). En un contexto más de desarrollo, cuando se analizaron los efectos a largo plazo de la exposición prenatal al THC, se pudo observar que la PLP

estaba disminuída, así como los niveles de glutamato (Mereu et al., 2003). Sin embargo, y hasta donde llega nuestro conocimiento, los efectos a largo plazo de una exposición crónica en edad adolescente a un cannabinoide sobre la PLP no se han estudiado todavía.

El fenómeno de la PLP depende, al menos en parte, de las NCAM (Luthl, Laurent, Figuero, Muller, & Schachner, 1994; Ronn, Bock, Linnemann, & Jahnsen, 1995) y de su forma polisializada (PSA-NCAM: (Muller et al., 2000; Muller et al., 1996). El papel de PSA-NCAM en el aprendizaje y la memoria queda puesto de manifiesto en los experimentos en los que se demostró que ratones mutantes que carecían de la enzima polisialiltransferasa-1 (que une moléculas de ácido polisialílico a las NCAM) muestran un aprendizaje espacial deficiente (Markram, Gerardy-Schahn, & Sandi, 2007) y que la administración de PSA-NCAM a rodajas de hipocampo de ratones deficientes para NCAM (que muestran déficits en la plasticidad sináptica), restaura la PLP (Senkov et al., 2006). Además, se ha demostrado que la expresión de NCAM y PSA-NCAM aumenta a las 24 horas después del entrenamiento en una tarea de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (Venero et al., 2006). La interrelación de estas moléculas con el sistema cannabinoide está comenzando a ser estudiada; y por ejemplo recientemente se ha descubierto que la activación de los receptores CB1 disminuye de manera pasajera la expresión de PSA-NCAM en el GD del hipocampo (Mackowiak, Chocyk, Markowicz-Kula, & Wedzony, 2007). Por lo tanto, consideramos que era interesante estudiar cualquier posible alteración en la expresión de estas moléculas de adhesión tras el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide.

Los efectos de la edad en la que se produce el tratamiento sobre su efectividad, así como las consecuencias del mismo sobre la memoria siguen un patrón sexodimorfo (O'Shea et al., 2006; O'Shea et al., 2004). Además, dada la influencia de los estrógenos sobre el aprendizaje y la memoria (Daniel, 2006; Daniel, Hulst, & Berbling, 2006; Daniel, Hulst, & Lee, 2005; Daniel, Sulzer, & Hulst, 2006), y dada la relación del sistema endocannabinoide con el eje H-H-G en las hembras (Scorticati et al., 2004; Scorticati et al., 2003), decidimos medir los niveles plasmáticos de

estradiol en nuestros animales, esperando encontrar niveles alterados en las ratas tratadas con el agonista.

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales y Tratamiento Farmacológico

Los sujetos experimentales son de características idénticas a los utilizados en los experimentos ya descritos, así como también lo es el tratamiento farmacológico. En este capítulo hemos utilizado tres lotes de animales diferentes. El primero se destinó a las pruebas conductuales, el segundo a las determinaciones hormonales y bioquímicas y el tercero al estudio de la PLP hipocampal.

3.2. Pruebas Conductuales

Los procedimientos conductuales comenzaron cuando los animales del primer lote alcanzaron los 97 días de edad [Hembras CP (n=11), Machos CP (n=9), Hembras VH (n=10), Machos VH (n=8)], momento en que inició un procedimiento de manipulación del animal (handling) durante dos minutos al día por rata, tres días consecutivos. En el día PN100 empezó la prueba de ansiedad en el LCE (que es una cruceta con dos abiertos (45 × 10 cm) y dos brazos cerrados (45 × 10 × 50 cm) que surgen de una plataforma central (10 × 10 cm), elevada 65 cm del suelo). Al inicio de la prueba se coloca al animal en la plataforma central mirando a uno de los brazos cerrados y se le deja explorar libremente durante 5 minutos. La conducta de cada animal es registrada con una videocámara y los movimientos de la rata se siguen con un sistema automatizado de análisis comportamental (Ethovision 3.0, Noldus IT, Netherlands). Se considera que un animal ha entrado a un brazo cuando ha colocado las cuatro patas en el mismo. Se registró el número de veces que un animal entraba a un determinado brazo, el tiempo que pasaba en el mismo y la latencia de entrada a un brazo abierto. A nivel conductual, se analizaron los siguientes parámetros: (1) “hendidamientos de cabeza” cuando el animal miraba por el borde del brazo abierto o por la plataforma central; (2)

erguimientos, cuando el animal se erguía sobre las patas traseras estando o no apoyado con las delanteras en la pared; (3) acicalamiento; e (4) inmovilidad.

Al día siguiente al LCE, se estudió la memoria de reconocimiento mediante un paradigma de reconocimiento de objetos. Se habituó a las ratas al recinto, (100 x 100 x 40 cm) durante 3 minutos, 2 días consecutivos. El protocolo consta de dos fases, en la primera fase (de adquisición), se deja a las ratas en un recinto en el que previamente se habían colocado dos objetos idénticos, con los que las ratas nunca habían tenido contacto, y se permitió que exploraran la arena durante un máximo de 5 minutos o hasta que exploraran los objetos 30 segundos (se consideraba que el animal estaba explorando los objetos cuando el animal olía el objeto o trepaba sobre él). Se registró el tiempo que cada animal pasó explorando cada objeto. El test de memoria de reconocimiento se realizó a los 30 minutos, en la segunda fase del protocolo y consistió en un ensayo de 5 minutos de duración. En el mismo, uno de los objetos utilizados durante la primera fase se sustituyó por un objeto nuevo. Los objetos se limpiaron cuidadosamente entre las dos fases para eliminar posibles claves olfativas. Además, estos objetos habían sido previamente probados en ratas naïve para demostrar que no había ningún sesgo preferencial por ninguno de ellos. El “índice de reconocimiento” se tomó como el tiempo invertido en explorar el objeto nuevo, menos el tiempo de exploración del objeto no nuevo, dividido por el tiempo de exploración total.

A los cuatro días después de la prueba de reconocimiento de objetos, los animales pasaron por el laberinto acuático de Morris, siguiendo un protocolo descrito por Cassel y colaboradores con pequeñas modificaciones (Cassel, Lazaris, Birthelmer, & Jackisch, 2007). El laberinto consistía en un tanque de agua circular, de color negro (2 m de diámetro, 45 cm de altura) relleno con agua (30 cm de profundidad a 25 °C) y que estaba dividido en cuatro cuadrantes. El tanque estaba situado en una habitación con numerosas claves espaciales, y el comportamiento de los animales se registró con una videocámara y un sistema informático (Ethovision 3.0, Noldus IT). Se analizaron diferentes parámetros de la conducta de la rata: la latencia para encontrar la plataforma (seg), la distancia total nadada hasta encontrar la plataforma (cm), la velocidad de natación (cm/seg) y el porcentaje de

ensayos fallidos por día. En el caso en que se detectaran diferencias en la velocidad de natación, utilizamos el parámetro de distancia en lugar del de latencia. En primer lugar sometimos a las ratas a un protocolo para estudiar la memoria de referencia, después a una prueba para medir su ejecución cuando había claves espaciales señalando el objetivo y por último los animales pasaron por una prueba de memoria de trabajo.

La prueba de aprendizaje y memoria de referencia consistió en un protocolo de entrenamiento durante cuatro días, con cuatro ensayos cada día, en los que los animales tenían que encontrar una plataforma sumergida en el agua. La plataforma (11 cm de diámetro) se colocaba en el medio de un cuadrante (2,5 cm bajo la superficie del agua), equidistante de la pared del tanque y el centro del mismo; la localización fue siempre la misma durante los días que duró el entrenamiento. Cada ensayo duraba un máximo de 60 segundos o hasta que el animal encontrara la plataforma, momento en el que se le dejaba descansar sobre la misma durante 20 segundos. Si tras los 60 segundos del ensayo el animal no había encontrado la plataforma, era guiado por la mano del experimentador hasta la misma y se le dejaba estar sobre ella 20 segundos. Tras este tiempo el animal era colocado en otro cuadrante y el siguiente ensayo comenzaba. Los cuadrantes de inicio fueron aleatorizados a lo largo de los ensayos. Tras 24 horas se sometió a los animales a una prueba de memoria en la que se quitaba la plataforma del tanque permitiendo que las ratas la buscaran durante 60 segundos. Esto es lo que se conoce como “probe test”.

Pasados dos días de este “probe test”, las ratas fueron sometidas a una prueba similar a la descrita anteriormente pero en este caso la localización de la plataforma estaba señalizada por una pequeña bandera. El protocolo duró dos días consecutivos, con cuatro ensayos por día y sin “probe test”. Todos los otros parámetros del protocolo fueron idénticos al utilizado en la tarea de memoria de referencia.

Al día siguiente, los animales pasaron por una prueba de memoria de trabajo. La fase de entrenamiento duró cuatro días consecutivos, con cuatro ensayos por día, cada ensayo duró 60 segundos o hasta que el animal encontrara la plataforma, cuya posición cambiaba cada día, pero

permanecía constante a lo largo de los ensayos de ese día. El punto de partida de la rata también se aleatorizó cada día. El resto de los parámetros fueron similares a los usados en el protocolo de memoria de referencia.

3.3. Ensayos Bioquímicos y Determinaciones Hormonales

Disección del Tejido y Extracción de Plasma Sanguíneo: En el segundo lote de animales procedimos a realizar la extracción del tejido. Se sacrificó a los animales en su PN100 (en el caso de los machos) o al primer día de proestro tras el PN100 en el caso de las (Hembras CP n=7; Machos CP n=8; Hembras VH n=7; Machos VH n=7). Se realizaron frotis vaginales en las hembras para determinar el ciclo estral y si daban positivo para la fase de proestro, se procedía al sacrificio de la hembra, si no, se devolvía al animal a su jaula hasta el día siguiente, en el que se repetía el frotis. Para el sacrificio, se anestesiaba ligeramente al animal con isofluorano y se procedía posteriormente a su rápida decapitación. Los hipocampos y cortezas frontales se diseccionaron rápidamente en hielo y también se recogió sangre del tronco del animal. El tejido se almacenó a -80 °C hasta que fuese utilizado y la sangre se centrifugó (3000 rpm durante 20 minutos, a 4 °C) para extraer el plasma que fue almacenado a -80°C hasta que se utilizara para las determinaciones hormonales.

Preparación de Sinaptosomas: Los sinaptosomas fueron obtenidos según el protocolo de Lynch y colaboradores (M. A. Lynch & Voss, 1991). Brevemente, se homogeneizó el tejido con un homogeneizador tipo mortero, con 20 batidas en 10 volúmenes de un tampón de sucrosa y (0,32 M) y HEPES (5 mM) frío al que se le había añadido un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, Spain), el resultante fue centrifugado a 1000 g durante 5 minutos y el sobrenadante fue centrifugado de nuevo a 15 000 g durante 15 minutos. El “pellet” resultante se resuspendió en solución de Krebs con inhibidores de proteasas. Sobre este material, determinamos la concentración de proteínas con el método de Bradford (Bradford, 1976).

Determinaciones Hormonales: Corticoesterona y Estradiol: Los niveles plasmáticos de corticoesterona y estradiol se determinaron mediante kits comerciales de radioinmunoensayo. El kit

de estradiol (DSL Diagnostics, USA) tenía una variabilidad intra-ensayo de entre 2,01 % a 5,17%. Su sensibilidad (mínima dosis detectable) fue de 11pg/ml. El kit de corticoesterona (Coat-A-Count, Diagnostics Products Corporation; CA, EE.UU.) tuvo una variabilidad intra-ensayo de entre el 3,1% al 4,5% y su sensibilidad era de 5,7 ng/ml.

Ensayo Inmunoabsorbente con Enzima Ligado (ELISA): Los niveles de NCAM total y PSA-NCAM en hipocampo y corteza se determinaron mediante ELISA, siguiendo un protocolo de Merino y colaboradores (Merino, Cordero, & Sandi, 2000). Se usaron microplacas de 96 pocillos, en los que se vertió una solución de recubrimiento (Na_2CO_3 0,1 M, NaHCO_3 0,1 M) y se dejó que la solución se absorbiera por las paredes de los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente la solución se desechó y se añadieron 50 μl del pellet sinaptosomal con una concentración de proteína de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a cada uno de los pocillos. Se incubaron las placas con el pellet toda la noche 4° C y después se lavaron tres veces con tampón fosfato-salino (PBS) 1M al que se había añadido Tween 20 al 0,05% pH 7,4. La unión no específica se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA) (3%) durante 2 horas a temperatura ambiente, para posteriormente aclarar los pocillos tres veces antes de incubarlos con alícuotas de 50 μl del anticuerpo primario correspondiente 20–24 h a 4 °C. Después de lavar los pocillos nuevamente, se añadieron alícuotas de 50 μl de un anticuerpo secundario conjugado con una peroxidasa y se dejaron incubar 2 horas. Posteriormente, se añadieron 50 μl de tampón citrato (50 mM Na_2HPO_4 , 25 mM ácido cítrico, pH 4,5) con o-fenileno diamina (1 mg/ml) y H_2O_2 (0,06%, añadida justo antes de ser usada), y se dejó que reaccionara con la peroxidasa entre 5 y 10 minutos. Posteriormente, la reacción se detuvo añadiendo 50 μl de 10 M H_2SO_4 a cada pocillo. La densidad óptica del producto de la reacción se determinó midiendo la absorbancia a 492 nm con un lector de microplacas (DigiScan Reader V3.0 y DigiWIN software Program; ASYS Hitech GmbH, Austria). Los anticuerpos utilizados fueron: Para PSA-NCAM, como primario, un anticuerpo monoclonal IgM (clon 2-2B AbCys, Francia) (diluído 1:2000) y como secundario un anticuerpo IgM anti-ratón (1 cadena) conjugado con peroxidasa a una dilución 1:1000 (Sigma-Aldrich, España). Para NCAM usamos un anticuerpo primario

policlonal anti-NCAM hecho en conejo (Millipore-Chemicon, EE.UU.) diluido 1:3000. Como secundario usamos un anticuerpo anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (Sigma, España), diluido 1:2000.

Análisis de las Isoformas de NCAM mediante electroforesis en gel de proteínas y Western

Blot: En primer lugar incubamos muestras sinaptosomales del hipocampo con EndoN (AbCys, Francia) a una dilución 1:120, toda la noche, para eliminar el residuo PSA de las moléculas NCAM. La reacción se paró desnaturalizando las muestras, hirviéndolas a 100°C durante 2 minutos en un tampón Tris-HCl 3 mM (pH 7,4) al que se había añadido 0,05% de SDS y 2% de mercaptoetanol. Posteriormente, se añadieron 15 µg de proteína en cada calle de un gel Tris-HCl al 7,5% y se procedió a la electroforesis; posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana Immobilon-P (Amersham) (usando 1 mA/cm²). Las uniones no específicas en la membrana fueron bloqueadas con una solución al 5% de leche desnatada en polvo disuelta en tampón Tris 50mM, pH 8, 138mM NaCl y Tween 20 al 5% (TBST). Posteriormente, la membrana se incubó 1,5 horas con el anticuerpo primario contra NCAM antes descrito, a una dilución 1:1000 durante una hora y media y después se lavó con TBST e se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo antes descrito, a una dilución 1:20000. La membrana se reveló con un sistema de quimioluminiscencia aumentada. Los autorradiogramas se digitalizaron con un escáner convencional y se analizaron corrigiendo los valores de densidad óptica con el área de la banda expresa en píxeles y substrayendo el valor del fondo, todo ello mediante el programa ImageJ.

3.4. Estudio de la Plasticidad Sináptica Hipocampal: Potenciación a Largo Plazo

Cuando las ratas del tercer lote alcanzaron una edad comprendida entre los 100 y 110 días de edad, (Hembras CP n=7; Machos CP n=4; Hembras VH n=6; Machos VH n=6), se sacrificaron mediante decapitación y se extrajeron sus hipocampos rápidamente; acto seguido se sumergieron en una solución de Krebs bicarbonatada (KRB) (en mM): 109 NaCl, 2,5 KCl, 1 KH₂PO₄, 1,3 MgSO₄, 2,5 CaCl₂, 26,2 NaHCO₃ y 11 glucosa; enfriada con hielo y oxigenada con gas carbógeno (95% O₂ and 5% CO₂). Se cortaron rodajas transversales (400 µm) con un cortador manual, de la parte dorsal

del hipocampo y se colocaron en una cámara de mantenimiento humedecida y mantenida a temperatura ambiente (N. Del Olmo, Higuera-Matas et al., 2006; N. del Olmo, Miguens et al., 2006). Tras dos horas de incubación las rodajas fueron transferidas a una cámara de registro en inmersión que estaba continuamente perfundida con KRB normal con un flujo de 1,8-2 ml/min. Los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSPs) se registraron en el *stratum radiatum* de CA1 con electrodos de tungsteno (1 M Ω) y se evocaron estimulando las colaterales de Schaffer con pulsos eléctricos bifásicos (30–70 μ A; 100 μ s; 0,033 o 0,066 Hz) mediante electrodos bipolares de tungsteno (0,5 M Ω). El electrodo de registro estaba conectado a un amplificador AI-402 (Axon Instruments, EE.UU.) unido a un condicionador de señal CyberAmp 380 (Axon Instruments, EE.UU.), los pulsos eléctricos fueron generados por un generador de impulsos, Master 8 (AMPI, Israel). Las respuestas fueron digitalizadas a una tasa de 25–50 Hz con una tarjeta Digidata 1322A (Axon Instruments, EE.UU.) y se almacenaron en un ordenador PC, con el programa pCLAMP 9.0 (Axon Instruments, EE.UU.). La fuerza sináptica fue medida tomando la pendiente inicial del fEPSP y los datos se normalizaron con respecto a la media de los valores obtenidos en cada animal durante 20 minutos de línea base. Después de obtener una respuesta robusta y estable durante al menos 20 minutos (línea de base) la rodaja de hipocampo se tetanizó con tres trenes que consistieron cada uno en un pulso de estimulación de 100 Hz durante 1 segundo con cada impulso durando 100 μ s, cada tren estaba separado del siguiente por un intervalo de 20 segundos. Nunca se incluyeron diferentes rodajas del mismo animal como elementos muestrales diferentes así que cada rodaja de cada animal representa n=1. Los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 31-32 °C.

3.5. Análisis Estadísticos

Para el estudio de LCE, reconocimiento de objetos, electrofisiología, ELISAs y Western Blots, se utilizaron ANOVAs para analizar las diferencias entre los distintos grupos. Manipulamos dos variables independientes: el SEXO (macho o hembra) y TRATAMIENTO (CP o Vehículo). Utilizamos ANOVAs unifactoriales para examinar las interacciones y el método de Bonferroni o t

de Student para analizar los efectos simples. Para el análisis de los datos del estudio del laberinto acuático de Morris, utilizamos un ANOVA mixto con SEXO y TRATAMIENTO como factores entre grupos y DÍAS (cada día representando la media de los cuatro ensayos de ese día) como factor intrasujetos.

Se utilizaron pruebas no paramétricas (H de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney) siempre que no se cumplieran los supuestos básicos del ANOVA. Usamos la corrección de Greenhouse-Geisser para los grados de libertad cuando no se cumpliera el supuesto de esfericidad en el ANOVA mixto.

4. Resultados

4.1. LCE

Al estudiar la conducta en el LCE encontramos que los animales tratados con CP mostraron menos respuestas de índole ansiosa que los VH. Así, el ANOVA reveló un efecto significativo del TRATAMIENTO en el tiempo que los animales pasaban en los brazos cerrados ($H_1=4,011$ $p<0,05$), en este caso los animales tratados con CP pasaban significativamente más tiempo en este tipo de brazos que sus controles VH (Fig. 4.1). Por el contrario, no se encontraron otro tipo de diferencias en el tiempo pasado en el resto de las áreas del LCE. También detectamos un efecto significativo del TRATAMIENTO en la frecuencia del comportamiento de acicalamiento ($F_{1,34}=6,816$ $p<0,01$), en concreto los animales CP desplegaban este tipo de comportamiento menos frecuentemente (Figura 4.2). Sin embargo es de notar que la frecuencia total de este comportamiento fue relativamente baja. ($Media_{CP}=0,348$ $ETM_{CP}=0,195$; $Media_{VH}=1,088$ $ETM_{VH}=0,205$). No se encontraron diferencias en los demás comportamientos estudiados.

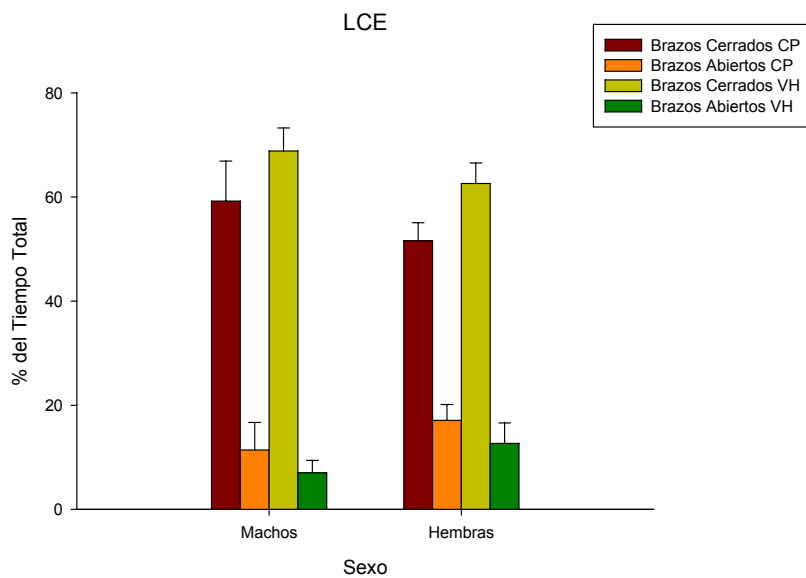


Figura 4.1: Duración en los Brazos del LCE

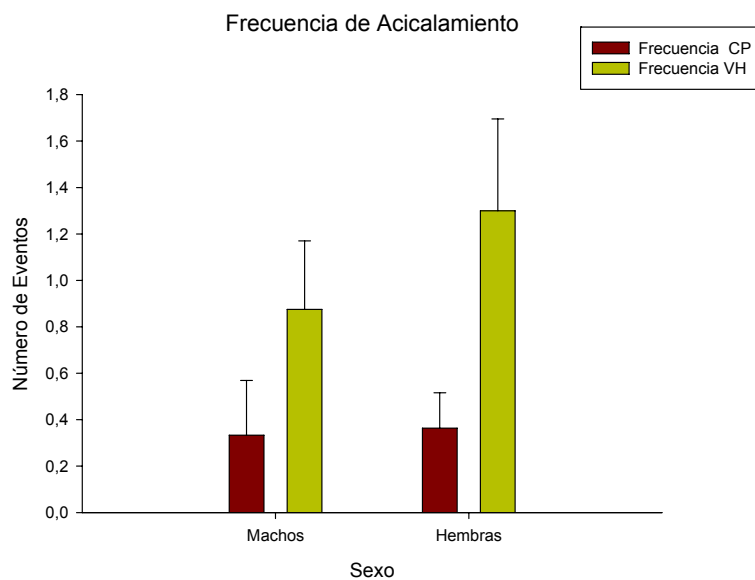


Figura 4.2: Frecuencia de Acicalamiento

4.2. Prueba de Reconocimiento de Objetos

Cuando analizamos la memoria de trabajo mediante el paradigma de reconocimiento de objetos, no encontramos efecto alguno de nuestras variables independientes sobre el índice de reconocimiento ($Media_{Machos\ CP}=0,59$ $ETM_{Machos\ CP}=0,06$; $Media_{Machos\ VH}=0,57$ $ETM_{Machos\ VH}=0,04$; $Media_{Hembras\ CP}=0,59$ $ETM_{Hembras\ CP}=0,03$; $Media_{Hembras\ VH}=0,54$ $ETM_{Hembras\ VH}=0,04$). Todos los animales parecían recordar bien los objetos ya que su índice de reconocimiento fue superior a 0,3 (Fig. 4.3) (Vannucchi, Scali, Kopf, Pepeu, & Casamenti, 1997).

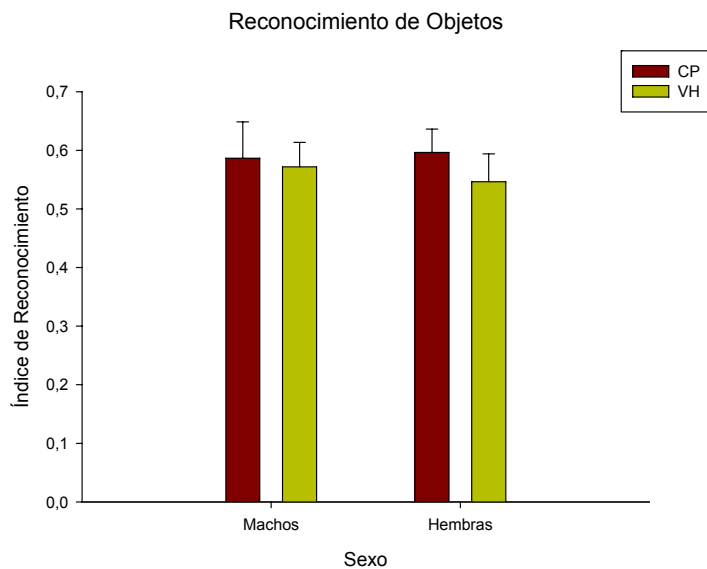


Figura 4.3: Índice de Reconocimiento

4.3. Laberinto Acuático de Morris

Memoria de Referencia: En esta prueba encontramos que los machos tuvieron una ejecución superior a las hembras, en las fases finales del protocolo, tal y como se demuestra por el efecto significativo del factor SEXO en los días 3 ($F_{1,34}=5,089$, $p<0,05$) y 4 ($F_{1,34}=5,570$ $p<0,05$) del entrenamiento sobre la distancia acumulada hasta la plataforma.

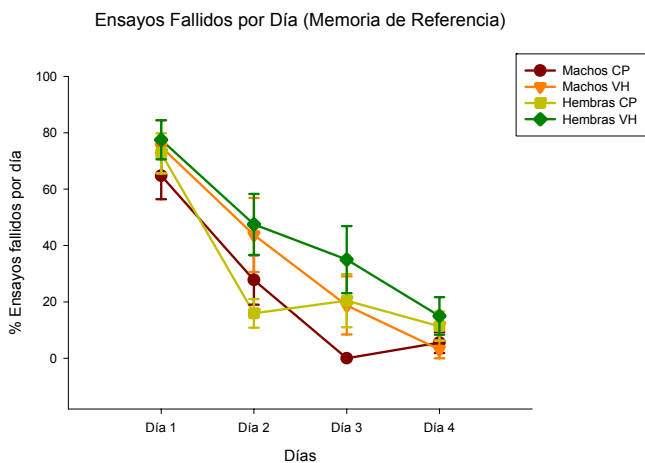


Figura 4.4: Porcentaje de ensayos fallidos durante el entrenamiento en memoria de referencia

No hubo otros efectos en las medidas principales del comportamiento en esta prueba, sin embargo, cuando analizamos el porcentaje de ensayos fallidos por día, los animales CP mostraron significativamente menos ensayos de este tipo que los VH tal y como se demuestra por el efecto significativo del TRATAMIENTO ($F_{1,34}=5,577$ $p<0.05$; $Media_{EnsayosFallidosCP}=27,321$ $ETM=3,534$; $Media_{EnsayosFallidosVH}=39,453$ $SEM=3,729$: Fig 4.4).

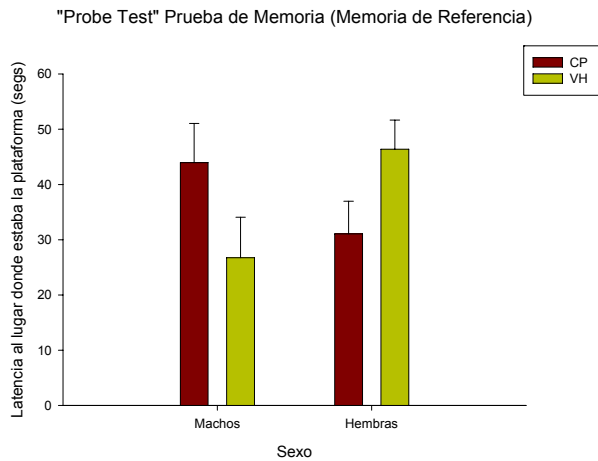


Figura 4.5: Prueba de Memoria en la tarea espacial de referencia. Latencia en segundos hasta el punto donde estaba la plataforma

Durante el “probe test”, la prueba de memoria de la localización de la plataforma, encontramos un efecto significativo de la interacción SEXO x TRATAMIENTO ($F_{1,34}=6,487$ $p<0,05$), y al analizar tal interacción descubrimos una tendencia de las Hembras CP a recordar mejor la localización de la plataforma que el resto de los grupos ($F_{1,19}=3,676$

$p=0,07$; Fig. 4.5).

Prueba con Plataforma Señalizada: El ANOVA no mostró ningún efecto interactivo del SEXO o del TRATAMIENTO con el DÍA. Sin embargo, sí hubo efectos principales significativos del SEXO y del TRATAMIENTO, ($F_{1,34}=9,534$ $p<0,01$ para el SEXO y $F_{1,34}=4,544$ $p<0,05$ para el TRATAMIENTO). No obstante, cuando analizamos más cuidadosamente este hecho, observamos que posiblemente estos efectos se debieran a la gran diferencia existente en el primer día en el grupo de las Hembras VH, cuya latencia fue significativamente mayor que las CP ($t_{19}=2,304$ $p<0,05$), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en el segundo día del protocolo (Fig. 4.6).

Prueba con la Plataforma Señalizada

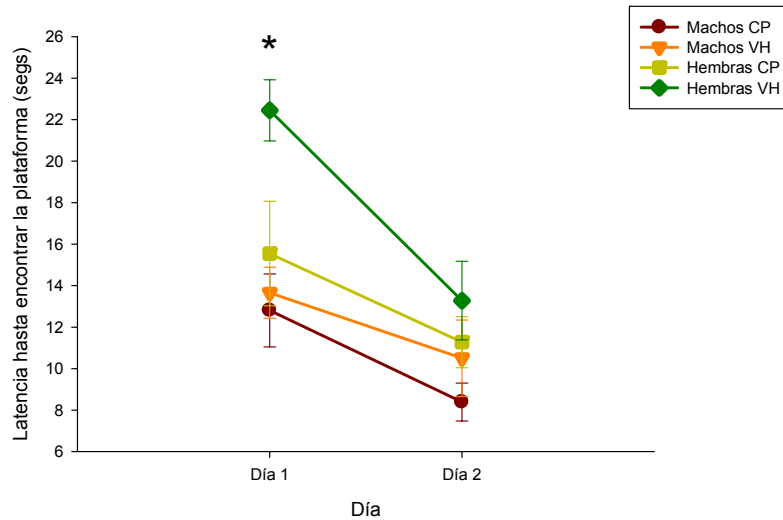


Figura 4.6: Latencia para encontrar la plataforma en el test de plataforma señalizada. * Diferencia significativa de las hembras CP con respecto a las VH ($p < 0,05$).

Memoria de Trabajo

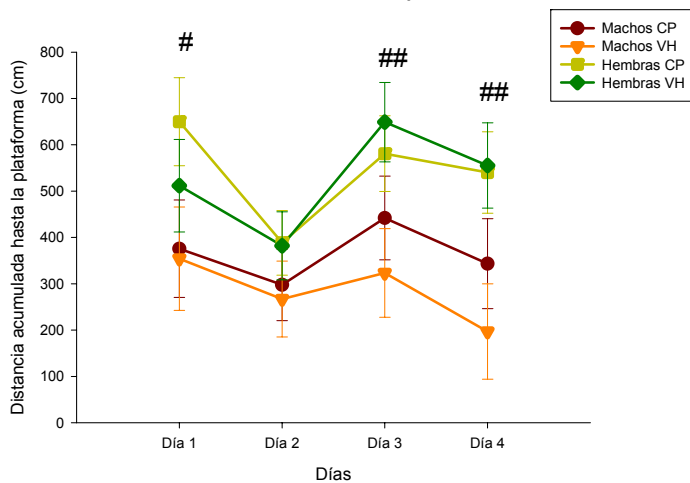


Figura 4.7: Distancia acumulada a la plataforma en el protocolo de memoria de trabajo. #,## Diferencia de los machos con respecto a las hembras ($p < 0,05$; $p < 0,01$ respectivamente)

Memoria de Trabajo: Las ratas

macho tuvieron una ejecución superior a las hembras en esta tarea tal y como se demuestra por la distancia media nadada hasta la plataforma, que fue menor en los machos que en las hembras (efecto significativo del SEXO en los días 1 ($F_{1,34}=4,390$ $p < 0,05$), 3 ($F_{1,34}=6,875$ $p < 0,01$) y 4 ($F_{1,34}=8,521$ $p < 0,01$: Fig. 4.7). No se encontraron

efectos de ningún otro factor ni en la distancia nadada ni en el porcentaje de ensayos fallidos.

4.4. Hormonas y Bioquímica

Niveles Plasmáticos de Corticoesterona y Estradiol: Cuando analizamos los niveles de corticoesterona en plasma, sólo encontramos un efecto significativo del SEXO ($H_1=14,750$ $p<0,01$), mostrando las hembras niveles superiores de esta hormona (Fig. 4.8). En cuanto a los niveles de estradiol, encontramos un patrón similar, obteniendo sólo la esperada diferencia sexual a favor de las hembras ($F_{1,25}=12,706$ $p<0,01$), sin embargo tanto las hembras tratadas con VH como con CP, mostraron niveles similares de la hormona ($Media_{Hembras\ CP}=18,65$ pg/ml $ETM_{Hembras\ CP}=2,34$; $Media_{Hembras\ VH}=21,29$ pg/ml $ETM_{Hembras\ VH}=4,31$: Fig 4.8).

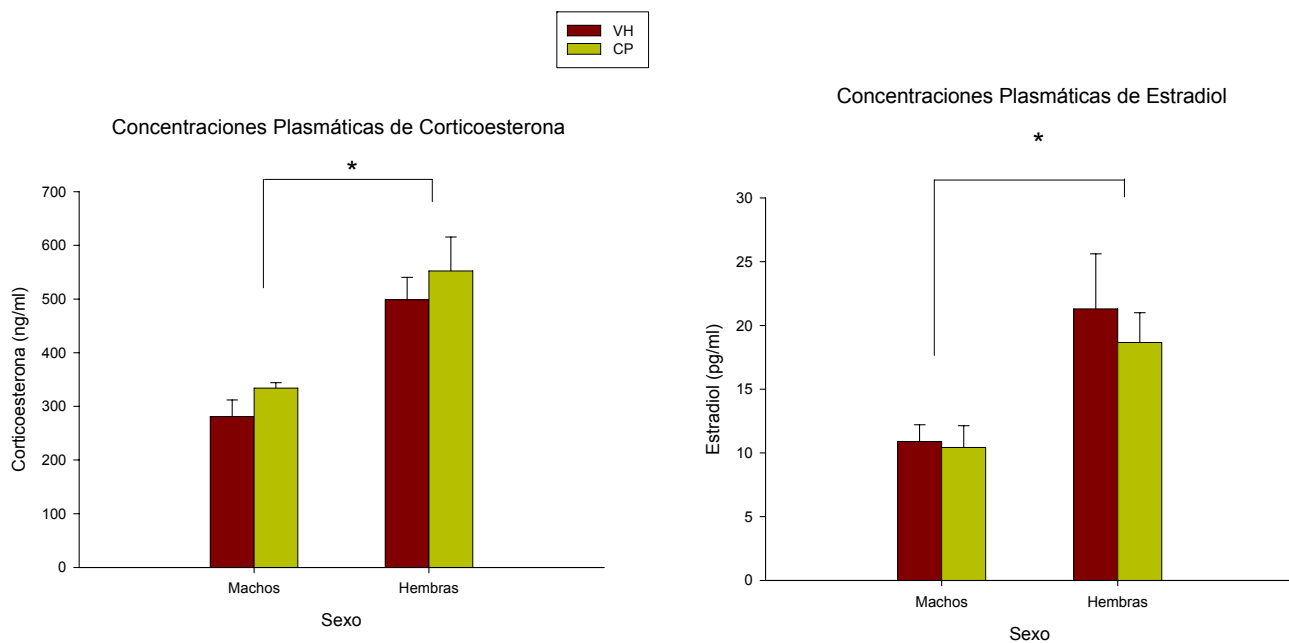


Figura 4.8: Niveles Plasmáticos de Corticoesterona y Estradiol. * Diferencia entre los machos y las hembras ($p<0,05$)

NCAM y PSA-NCAM: No obtuvimos ningún efecto en los niveles totales de NCAM (ver Fig 4.9), ni en hipocampo ni en corteza frontal, así como tampoco pudimos detectar diferencias en los niveles de las isoformas de esta molécula, medidas por Western Blot, entre los grupos (Fig. 4.10). Al analizar los niveles de PSA-NCAM, no se detectaron alteraciones en corteza, pero sí encontramos que los Machos CP tenían mayores niveles de esta molécula polisializada que los VH en el hipocampo ($t_{12}=-2.735$ $p<0.05$: Fig. 4.11).

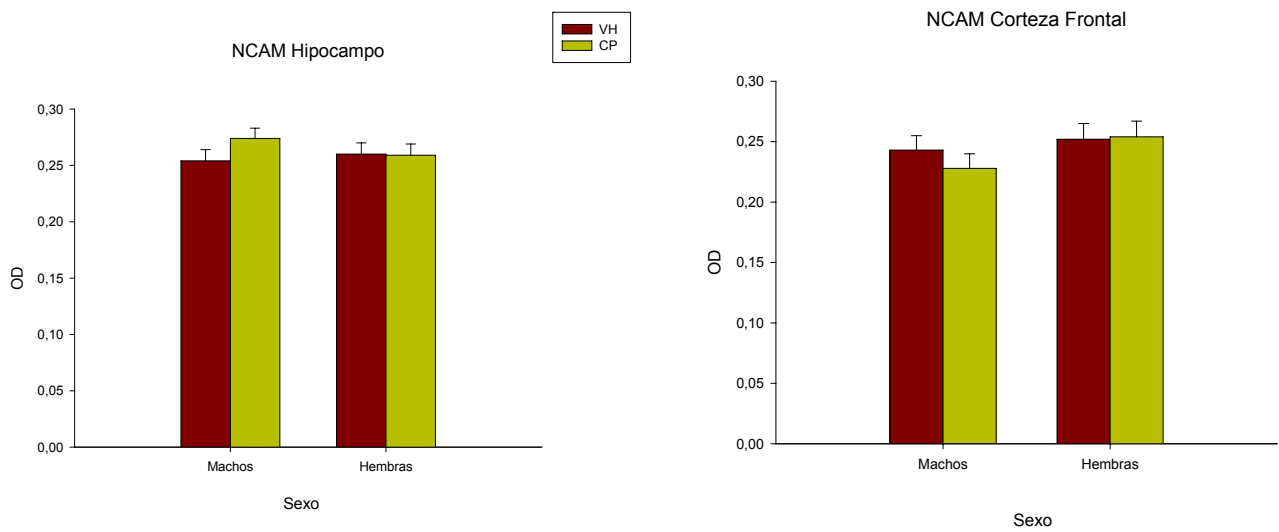
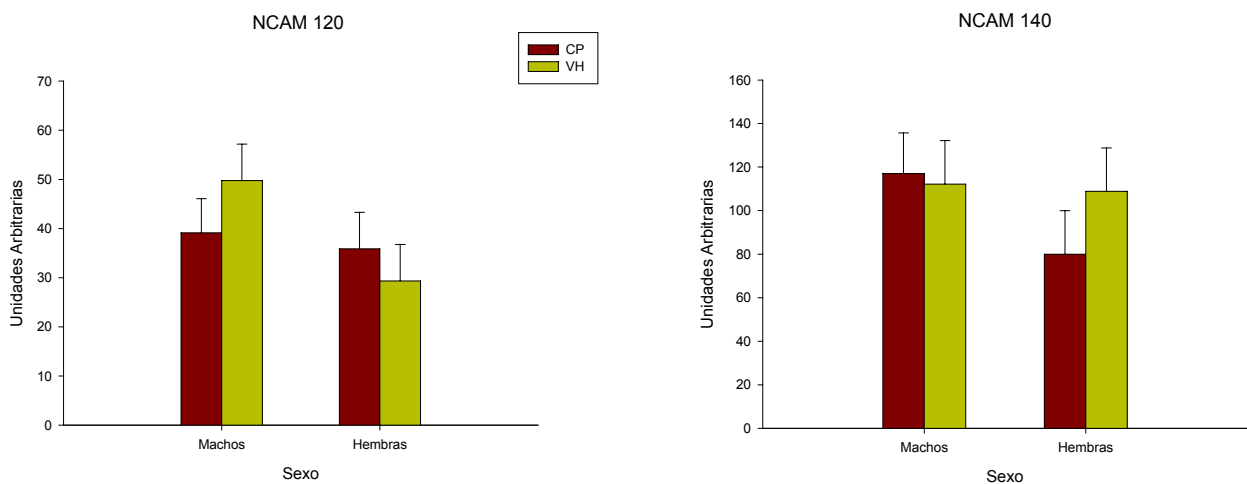


Figura 4.9: Niveles de Expresión en unidades de densidad óptica de NCAM en hipocampo y corteza frontal



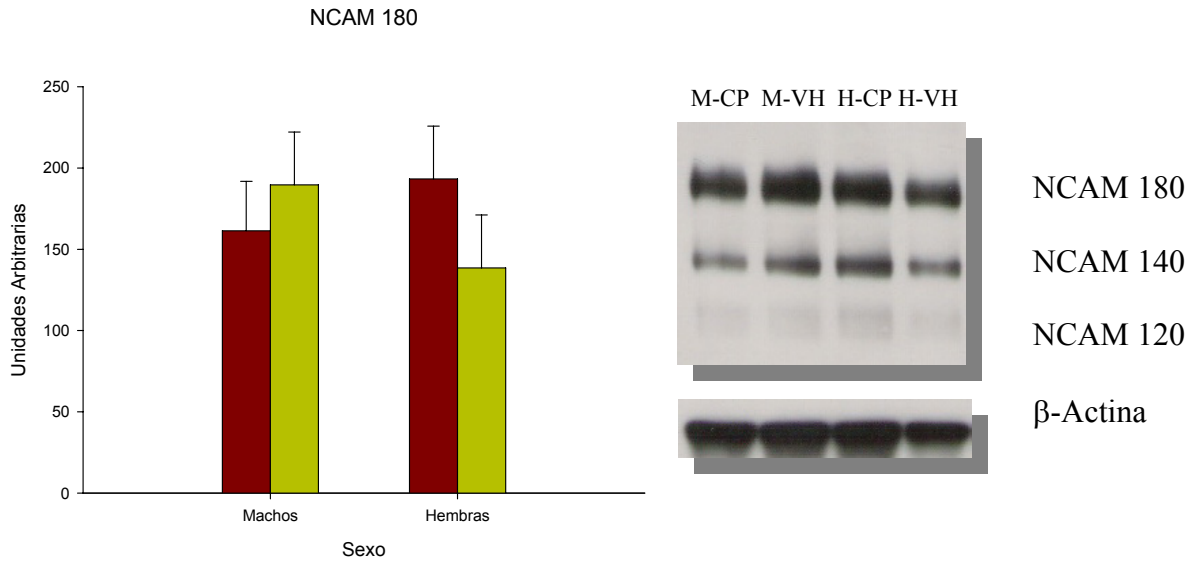


Figura 4.10: Niveles de Expresión de las diferentes isoformas de NCAM en hipocampo

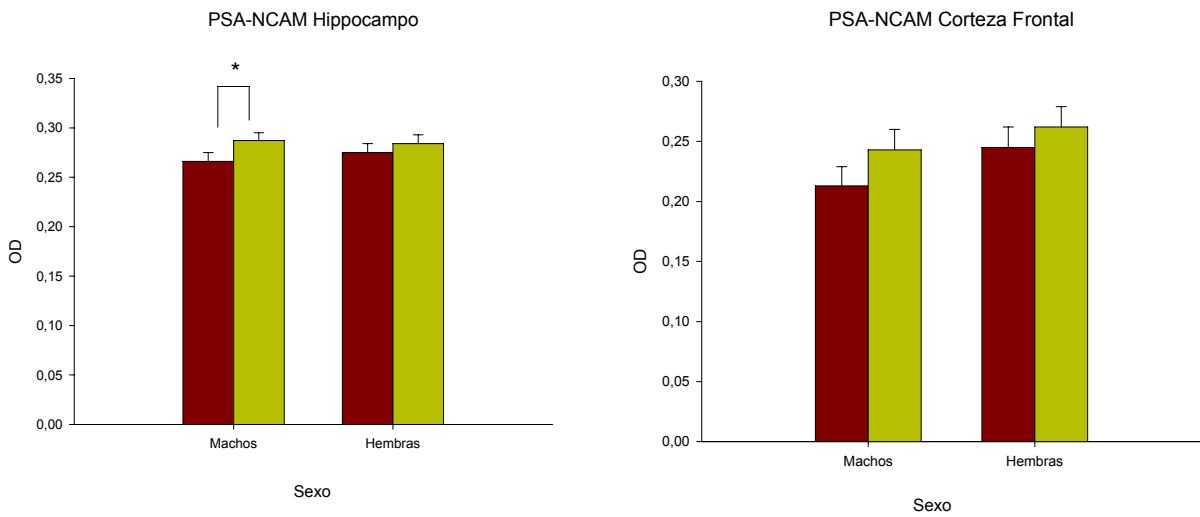


Figura 4.11: Expresión de PSA-NCAM. * Diferencia significativa $p < 0,05$

4.5. Potenciación a Largo Plazo en el Hipocampo

La PLP inducida por los trenes de estimulación de alta frecuencia tuvo una magnitud y un curso temporal similares en todos los grupos, no detectándose efectos del SEXO, TRATAMIENTO o de su interacción (Fig. 4.12).

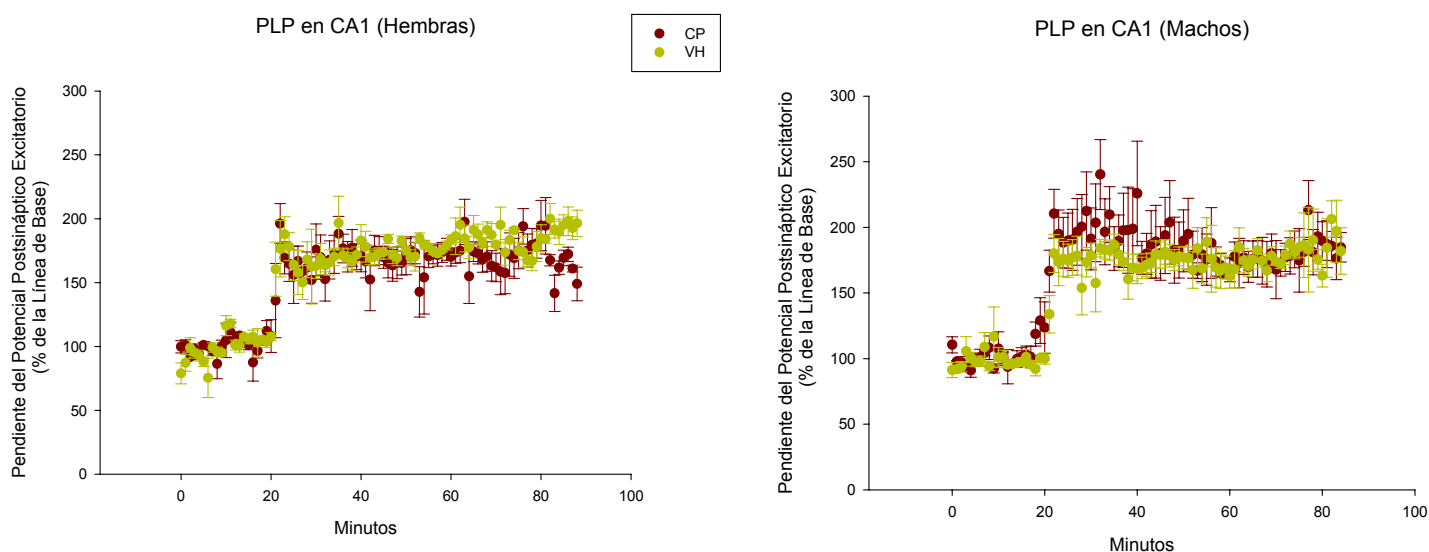


Figura 4.12: Inducción y Mantenimiento de la PLP en el campo CA1 del hipocampo

5. *Discusión*

En este capítulo hemos demostrado que un tratamiento crónico adolescente con el agonista cannabinoide CP es capaz de inducir una ansiolisis duradera; también hemos mostrado que este tratamiento mejora el aprendizaje de una tarea espacial de referencia, y hay una tendencia en las hembras tratadas con CP a recordar mejor lo aprendido en la tarea; además el tratamiento parece no afectar a la memoria de trabajo, ni en sus componentes espaciales ni en los de reconocimiento. También hemos encontrado patrones de diferencias sexuales en la ejecución de la tarea espacial, tendiendo los machos a mostrar una mejor ejecución que las hembras. En la tarea con la plataforma visible, las hembras tratadas lo hicieron mejor que las VH en el primer día de la tarea, pero, como se discutirá más adelante, este efecto podría atribuirse a una mejor atención a estímulos novedosos más que a cambios en el procesamiento visual. A nivel hormonal, las hembras en general presentaban niveles plasmáticos de corticosterona y estradiol superiores a los machos, sin embargo no encontramos efecto alguno debido al sexo o al tratamiento. En cuanto a las NCAM, no encontramos modulaciones ni en hipocampo ni en corteza, ni siquiera cuando analizamos las diferentes isoformas de la molécula presentes en el hipocampo. El análisis de la expresión de PSA-

NCAM sí mostró mayores niveles de esta forma polisializada de NCAM en el hipocampo de las ratas macho CP con respecto a las VH, pero no se encontró diferencia alguna en las hembras. Este cambio bioquímico no tuvo sin embargo un correlato electrofisiológico puesto que la inducción y el mantenimiento de la PLP fueron similares en todos los grupos.

Los resultados de los experimentos que aquí se detallan son novedosos en varios aspectos. Aunque los efectos de un tratamiento cannabinoide adolescente sobre la ansiedad y la cognición hayan sido previamente estudiados a nivel conductual (Ehrenreich et al., 1999; O'Shea et al., 2006; O'Shea et al., 2004; Quinn et al., 2007; Schneider & Koch, 2003), se sabe muy poco acerca de las bases neurales subyacentes a tales alteraciones. Con respecto a la ansiedad, nuestros resultados están parcialmente de acuerdo con estudios anteriores de Biscaia y colaboradores (Biscaia et al., 2003) donde se observó una reducción en los niveles de ansiedad en los animales tratados con CP durante su adolescencia (P35-P45). No obstante, nuestros datos contrastan con los del grupo de Daniela Parolaro que no encontraron cambios en los comportamientos de ansiedad en animales adultos tratados en la adolescencia con THC (Rubino et al., 2008), aunque esta diferencia podría bien deberse a la diferente potencia de los agonistas usados en sus experimentos y en los nuestros. Al igual que en los experimentos de Biscaia y colaboradores nosotros tampoco obtuvimos ninguna diferencia debida al tratamiento en los niveles de corticoesterona (Biscaia et al., 2003). No obstante, una influencia, directa o indirecta del tratamiento en otros puntos del eje H-H-A no puede descartarse (por ejemplo cambios en los niveles de ACTH, CRH o sus receptores).

En la literatura se ha informado repetidamente de déficit en la memoria de trabajo (en su componente espacial sobre todo) tras un tratamiento adolescente con THC, mientras que la memoria de referencia no quedaría tan alterada (Cha, White, Kuhn, Wilson, & Swartzwelder, 2006). Por el contrario, nosotros mostramos que es la memoria de referencia la que queda alterada tras el tratamiento adolescente y en este caso se observa una mejoría. Además, al probar la recuperación de la información aprendida durante la tarea mediante el "probe test", obtuvimos una tendencia en las hembras a recordar mejor la posición de la plataforma. Una explicación basada en cambios en los

niveles de estrógenos en las hembras queda descartada por nuestros datos hormonales, aunque se deberían evaluar posibles alteraciones en los receptores hipocampales de estrógenos, ya que éstos podrían estar alterados y podrían explicar las diferencias conductuales encontradas.

Resulta curioso sin embargo que nosotros no encontráramos cambios en la memoria de trabajo, ni en su componente de reconocimiento ni en su componente espacial, esto es bastante sorprendente dada la consistencia en la literatura a este respecto (O'Shea et al., 2006; O'Shea et al., 2004; Quinn et al., 2007). Pensamos que las discrepancias podrían explicarse al menos en parte por cuestiones metodológicas, especialmente en el paradigma de reconocimiento de objetos (ya que nosotros hemos usado un intervalo corto, 30 minutos, entre la adquisición y la prueba mientras que en los otros estudios se suelen usar intervalos variables entre 1 y 48 horas). Parece que el efecto de los cannabinoides sólo se manifiesta cuando hay una mayor demanda de memoria (con los intervalos largos) y que no aparece en intervalos cortos. Es interesante señalar además, que la falta de efecto en la memoria de trabajo también se da en el componente espacial de la misma. En el laberinto acuático, hemos encontrado que en la tarea señalizada, las Hembras CP lo hicieron mejor que las VH, no obstante, esta diferencia desapareció en el segundo día y podría ser interpretada como un cambio en la atención a estímulos novedosos, como lo es la bandera que señala la plataforma, (ya que si hubiera cambios sensoriales o motores deberían preservarse también en el segundo día dado que la localización de la plataforma siempre cambia), si bien esta novedad ya habría desaparecido en el segundo día, y por tanto ya no habría que prestarle atención (por ello las diferencias ya no estarían presentes en el segundo día).

Es de señalar además que el único marcador bioquímico de los que hemos analizado en el que se ha podido observar algún efecto del tratamiento es en el grado de expresión de PSA-NCAM en el hipocampo de las ratas macho tratadas. Los Machos CP presentaron niveles mayores de PSA-NCAM que los VH; esto lo atribuimos a una mayor tasa de polisialización, ya que no hemos observado cambios en los niveles de NCAM en ninguna de las estructuras, ni en los valores totales de proteína ni en sus diferentes isoformas. Este resultado con PSA-NCAM es bastante interesante

puesto que se ha observado que la activación del receptor CB1 provoca un descenso pasajero de los niveles de PSA-NCAM en el GD del hipocampo (Mackowiak et al., 2007). Por lo tanto, parecería que la influencia que tiene el sistema cannabinoide sobre la expresión de PSA-NCAM dependería de la edad y el régimen de exposición a los cannabinoides.

Para ofrecer una explicación plausible a los resultados conductuales, en la tarea de memoria de referencia, se podría argumentar que la atención a nuevos estímulos que queda aumentada en las Hembras CP, junto con la ansiolisis generalizada en los animales tratados con el agonista, y el aumento de la expresión de PSA-NCAM en el hipocampo de los Machos CP, podrían explicar las mejoras en la ejecución, tanto durante el entrenamiento como en la tendencia a una mejora en la memoria en el probe test en las Hembras CP. Esta hipótesis queda parcialmente sustentada por la implicación que tienen por un lado los mecanismos atencionales en el aprendizaje espacial, tal y como ha quedado puesto de manifiesto por los estudios usando un modelo de desorden de atención e impulsividad, la rata espontáneamente hipertensa (Clements & Wainwright, 2006). Con respecto a la implicación de la ansiedad, se sabe que los animales que tienen una menor ansiedad-rasgo, muestran un mejor rendimiento en tareas espaciales, con respecto a los animales con un nivel alto de ansiedad-rasgo (Herrero et al., 2006). En cuanto a PSA-NCAM parece ser que los niveles de esta molécula parecen estar aumentados a las 24 horas después de un entrenamiento en una tarea espacial y la administración de endoneuroaminidasa, la enzima que separa el ácido polisiálico de la NCAM, interfiere con el aprendizaje espacial normal (Venero et al., 2006), por lo que se abogaría por una implicación de esta inmunoglobulina en el aprendizaje espacial. Estos tres mecanismos por tanto podrían explicar, al menos en parte, nuestros resultados en la memoria de referencia espacial.

Soprendentemente no hemos encontrado diferencias en la PLP en el campo CA1, entre nuestros grupos. Nuestra hipótesis iba en la dirección de que si había cambios en el aprendizaje espacial, estos cambios deberían de ir acompañados por alteraciones de algún tipo en la PLP. Hasta donde nosotros sabemos, el único estudio que ha analizado los efectos a largo plazo de una exposición previa a THC fue el de Mereu y colaboradores, y usaron un tratamiento perinatal para

luego analizar la PLP adulta (Mereu et al., 2003), en este caso parece que el tratamiento induce déficit en la PLP hipocampal que además van acompañados por cambios en la liberación de glutamato en esta zona. Parece ser por tanto que el momento en que se produce la exposición al cannabinoide es clave para que éste tenga o no algún efecto en la PLP.

Por lo que respecta al dimorfismo sexual en nuestros resultados en el laberinto acuático de Morris, cabe decir que siguen la línea de lo establecido por la literatura, que demuestra de manera más o menos consistente que los machos tienden a realizar mejor las tareas espaciales. No obstante, la influencia de la raza de rata y de los protocolos de entrenamiento son determinantes muy importantes de la ejecución de un animal en este tipo de tareas (Jonasson, 2005). Nuestros datos en su conjunto muestran una mejoría en el aprendizaje espacial en una tarea de memoria de referencia en los animales tratados con CP, sobre todo en las hembras. Nosotros proponemos que los efectos anteriormente mencionados podrían deberse a cambios en las respuestas de ansiedad, en la atención o en algunos mediadores de la plasticidad sináptica como es el caso de PSA-NCAM, así como a alguna combinación de los tres. Se necesitan aún más experimentos que estudien por un lado los factores atencionales que podrían mediar en la ejecución espacial y cómo éstos estarían influenciados por el tratamiento, y también que se evalúen otros marcadores bioquímicos relacionados con la ansiedad (como la forma fosforilada de CREB).

CONCLUSIONES

1. El tratamiento crónico con el agonista cannabinoide CP 55,940 aumenta la tasa de respuesta durante la fase de adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína, únicamente en las hembras y no en los machos. Además en este grupo de hembras tratadas, al hacer un estudio metabólico con TEP, se observa a nivel basal un hipermetabolismo cerebral en la corteza frontal y un descenso de la actividad metabólica en la corteza amígdalo-entorrinal. La conducta operante reforzada con comida no parece quedar afectada en ninguno de los grupos, ni en condiciones de alta motivación ni en condiciones normales.
2. Al realizar un estudio sobre las consecuencias metabólicas a nivel cerebral de una inyección de cocaína en la edad adulta, se observa que en el hipocampo dorsal la cocaína produce cambios metabólicos únicamente en el grupo de hembras tratadas, mientras que en el estriado dorsal, la droga afectaría por igual a todos los animales. El resto de estructuras analizadas no se vieron afectadas por la misma. Se observan además diferencias sexuales en cuanto al metabolismo global en estructuras como la amígdala, el tálamo o el estriado dorsal, donde las hembras presentan una menor captación de ^{18}F -FDG que los machos.
3. El tratamiento crónico con el agonista cannabinoide durante la adolescencia, produce cambios en el sistema dopaminérgico adulto. Más concretamente observamos un aumento en el TD en las Hembras CP que se mantiene tras la autoadministración. Los Machos CP presentarían niveles alterados del receptor D1 en el NAcc-Shell, si bien los niveles del mismo se normalizarían tras la autoadministración. En cuanto a los niveles del receptor D2 hemos encontrado que los animales tratados con CP muestran menores niveles de esta proteína en el CA1-STRAD. Se identifican además interesantes efectos de la autoadministración de cocaína sobre los receptores dopaminérgicos, sobre todo en la SN, que no habían sido documentados hasta la fecha.

4. El tratamiento crónico produce asimismo una ansiolisis duradera y una mejora en la memoria de referencia, sin que se vea afectada la memoria de trabajo (tanto de reconocimiento como espacial). Se identifica un aumento en los niveles de PSA-NCAM en el hipocampo de los machos tratados, pero no se alteran el resto de las proteínas analizadas, ni los niveles de corticoesterona o estradiol. La PLP en el hipocampo es comparable entre los cuatro grupos, no existiendo diferencias significativas debidas a ninguno de las variables manipuladas.

Como *conclusión general* podemos decir que el consumo de cannabinoides durante la adolescencia tiene múltiples y duraderas consecuencias, que se observan incluso durante la etapa adulta. No obstante, es muy difícil realizar una aseveración tajante sobre la naturaleza de estos cambios psicobiológicos, pues, como se ha podido comprobar en esta Tesis Doctoral, su naturaleza beneficiosa o perjudicial, depende del proceso psicológico analizado. Sugerimos por tanto gran cautela a la hora de emitir juicios tajantes y recomendamos una reflexión crítica y siempre basada en la evidencia científica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abood, M. E., Sauss, C., Fan, F., Tilton, C. L., & Martin, B. R. (1993). Development of behavioral tolerance to delta 9-THC without alteration of cannabinoid receptor binding or mRNA levels in whole brain. *Pharmacol Biochem Behav*, *46*(3), 575-579.
- Aceto, M. D., Scates, S. M., Lowe, J. A., & Martin, B. R. (1996). Dependence on delta 9-tetrahydrocannabinol: studies on precipitated and abrupt withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther*, *278*(3), 1290-1295.
- Aceto, M. D., Scates, S. M., & Martin, B. B. (2001). Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55212-2. *Eur J Pharmacol*, *416*(1-2), 75-81.
- Adewale, A. S., Platt, D. M., & Spealman, R. D. (2006). Pharmacological stimulation of group ii metabotropic glutamate receptors reduces cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of drug seeking in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, *318*(2), 922-931.
- Adriani, W., Chiarotti, F., & Laviola, G. (1998). Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behav Neurosci*, *112*(5), 1152-1166.
- Adriani, W., Granstrem, O., Macri, S., Izykenova, G., Dambinova, S., & Laviola, G. (2004). Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology*, *29*(5), 869-878.
- Adriani, W., & Laviola, G. (2004). Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol*, *15*(5-6), 341-352.
- Agurell, A., Dewey, W. L., & Willet, R. E. (1984). *The Cannabinoids: Chemical, Pharmacologic and Therapeutic Aspects*. New York: Academic Press.
- Ahluwalia, J., Urban, L., Capogna, M., Bevan, S., & Nagy, I. (2000). Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*, *100*(4), 685-688.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*, *58*(4), 315-348.
- Andersson, M., Usiello, A., Borgkvist, A., Pozzi, L., Dominguez, C., Fienberg, A. A., et al. (2005). Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase A site in striatal projection neurons. *J Neurosci*, *25*(37), 8432-8438.
- Anggadiredja, K., Yamaguchi, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., Watanabe, S., & Yamamoto, T. (2003). Prostaglandin E2 attenuates SR141716A-precipitated withdrawal in tetrahydrocannabinol-dependent mice. *Brain Res*, *966*(1), 47-53.
- Anthony, J. C. (2002). Death of the 'stepping-stone' hypothesis and the 'gateway' model? Comments on Morral et al. *Addiction*, *97*(12), 1505-1507.
- Arevalo, C., de Miguel, R., & Hernandez-Tristan, R. (2001). Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav*, *70*(1), 123-131.
- Arnold, J. C. (2005). The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, *81*(2), 396-406.
- Astrup, A. (2005). Effect of rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk. *Lancet*, *366*(9483), 368; author reply 369-370.
- Auclair, N., Otani, S., Soubrie, P., & Crepel, F. (2000). Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, *83*(6), 3287-3293.
- Baczynsky, W. O. T., & Zimmerman, A. M. (1983). Effects of THC, cannabinol and cannabidiol on the immune system in mice. In vitro investigation using cultured mouse splenocytes. *Pharmacology*, *26*, 12-19.
- Badiani, A., Oates, M. M., & Robinson, T. E. (2000). Modulation of morphine sensitization in the rat by contextual stimuli. *Psychopharmacology (Berl)*, *151*(2-3), 273-282.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J. L., Brown, P., Pertwee, R. G., Huffman, J. W., et al. (2000). Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*, *404*(6773), 84-87.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J. L., Brown, P., Pertwee, R. G., Makriyannis, A., et al. (2001). Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *Faseb J*, *15*(2), 300-302.

- Balster, R. L., & Prescott, W. R. (1992). Delta 9-tetrahydrocannabinol discrimination in rats as a model for cannabis intoxication. *Neurosci Biobehav Rev*, *16*(1), 55-62.
- Bar-Peled, O., Gross-Isseroff, R., Ben-Hur, H., Hoskins, I., Groner, Y., & Biegon, A. (1991). Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Neurosci Lett*, *127*(2), 173-176.
- Bari, A. A., & Pierce, R. C. (2005). D1-like and D2 dopamine receptor antagonists administered into the shell subregion of the rat nucleus accumbens decrease cocaine, but not food, reinforcement. *Neuroscience*, *135*(3), 959-968.
- Basavarajappa, B. S. (2007). Neuropharmacology of the Endocannabinoid Signaling System-Molecular Mechanisms, Biological Actions and Synaptic Plasticity. *Curr Neuropharmacol*, *5*(2), 81-97.
- Bechara, A. (2001). Neurobiology of decision-making: risk and reward. *Semin Clin Neuropsychiatry*, *6*(3), 205-216.
- Beinfeld, M. C., & Connolly, K. (2001). Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystikinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids. *Neurosci Lett*, *301*(1), 69-71.
- Beltramo, M., de Fonseca, F. R., Navarro, M., Calignano, A., Gorriti, M. A., Grammatikopoulos, G., et al. (2000). Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J Neurosci*, *20*(9), 3401-3407.
- Beltramo, M., & Piomelli, D. (2000). Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Neuroreport*, *11*(6), 1231-1235.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, *277*(5329), 1094-1097.
- Belue, R. C., Howlett, A. C., Westlake, T. M., & Hutchings, D. E. (1995). The ontogeny of cannabinoid receptors in the brain of postnatal and aging rats. *Neurotoxicol Teratol*, *17*(1), 25-30.
- Bell, M. R., D'Ambra, T. E., Kumar, V., Eissenstat, M. A., Herrmann, J. L., Jr., Wetzel, J. R., et al. (1991). Antinociceptive (aminoalkyl)indoles. *J Med Chem*, *34*(3), 1099-1110.
- Bell, N. J., & Bell, R. W. (1993). *Adolescent risk taking*. Newbury Park, Calif.: Sage Publications.
- Ben-Shahar, O., Keeley, P., Cook, M., Brake, W., Joyce, M., Nyffeler, M., et al. (2007). Changes in levels of D1, D2, or NMDA receptors during withdrawal from brief or extended daily access to IV cocaine. *Brain Res*, *1131*(1), 220-228.
- Ben-Shahar, O., Moscarello, J. M., & Ettenberg, A. (2006). One hour, but not six hours, of daily access to self-administered cocaine results in elevated levels of the dopamine transporter. *Brain Res*, *1095*(1), 148-153.
- Benarroch, E. (2007). Endocannabinoids in basal ganglia circuits: implications for Parkinson disease. *Neurology*, *69*(3), 306-309.
- Berrendero, F., Romero, J., Garcia-Gil, L., Suarez, I., De la Cruz, P., Ramos, J. A., et al. (1998). Changes in cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several brain regions of aged rats. *Biochim Biophys Acta*, *1407*(3), 205-214.
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J. A., Di Marzo, V., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse*, *33*(3), 181-191.
- Biscaia, M., Fernández, B., Higuera-Matas, A., Miguens, M., Viveros, M. P., García-Lecumberri, C., et al. (2007). Sex-dependent effects of periadolescent exposure to the cannabinoid agonist CP-55,940 on morphine self-administration behavior and the endogenous opioid system. Unpublished manuscript under review.
- Biscaia, M., Marin, S., Fernandez, B., Marco, E. M., Rubio, M., Guaza, C., et al. (2003). Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the

- behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*, *170*(3), 301-308.
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J. A., Fernandez-Ruiz, J. J., et al. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun*, *256*(2), 377-380.
- Black, Y. D., Green-Jordan, K., Eichenbaum, H. B., & Kantak, K. M. (2004). Hippocampal memory system function and the regulation of cocaine self-administration behavior in rats. *Behav Brain Res*, *151*(1-2), 225-238.
- Blakemore, S. J., & Choudhury, S. (2006). Development of the adolescent brain: implications for executive function and social cognition. *J Child Psychol Psychiatry*, *47*(3-4), 296-312.
- Bonhaus, D. W., Chang, L. K., Kwan, J., & Martin, G. R. (1998). Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther*, *287*(3), 884-888.
- Bonnin, A., de Miguel, R., Castro, J. G., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1996). Effects of perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol on the fetal and early postnatal development of tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat brain. *J Mol Neurosci*, *7*(4), 291-308.
- Bonnin, A., de Miguel, R., Hernandez, M. L., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1995). The prenatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol affects the gene expression and the activity of tyrosine hydroxylase during early brain development. *Life Sci*, *56*(23-24), 2177-2184.
- Borgkvist, A., Marcellino, D., Fuxe, K., Greengard, P., & Fisone, G. (2008). Regulation of DARPP-32 phosphorylation by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology*, *54*(1), 31-35.
- Bouaboula, M., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Shire, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem*, *270*(23), 13973-13980.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., et al. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*, *312* (Pt 2), 637-641.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., et al. (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem*, *237*(3), 704-711.
- Bouaboula, M., Rinaldi, M., Carayon, P., Carillon, C., Delpuch, B., Shire, D., et al. (1993). Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem*, *214*(1), 173-180.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254.
- Breiter, H. C., Aharon, I., Kahneman, D., Dale, A., & Shizgal, P. (2001). Functional imaging of neural responses to expectancy and experience of monetary gains and losses. *Neuron*, *30*(2), 619-639.
- Breivogel, C. S., Griffin, G., Di Marzo, V., & Martin, B. R. (2001). Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol*, *60*(1), 155-163.
- Breivogel, C. S., Sim, L. J., & Childers, S. R. (1997). Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, *282*(3), 1632-1642.
- Britton, D. R., Curzon, P., Mackenzie, R. G., Keabian, J. W., Williams, J. E., & Kerkman, D. (1991). Evidence for involvement of both D1 and D2 receptors in maintaining cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav*, *39*(4), 911-915.
- Bronson, F. H., & Maruniak, J. A. (1975). Male-induced puberty in female mice: evidence for a synergistic action of social cues. *Biol Reprod*, *13*(1), 94-98.
- Brown, A. J. (2007). Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, *152*(5), 567-575.
- Brown, G. L., & Linnoila, M. I. (1990). CSF serotonin metabolite (5-HIAA) studies in depression, impulsivity, and violence. *J Clin Psychiatry*, *51* Suppl, 31-41; discussion 42-33.

- Brown, L. L., Siegel, H., & Etgen, A. M. (1996). Global sex differences in stress-induced activation of cerebral metabolism revealed by 2-deoxyglucose autoradiography. *Horm Behav*, 30(4), 611-617.
- Brown, T. T., & Dobs, A. S. (2002). Endocrine effects of marijuana. *J Clin Pharmacol*, 42(11 Suppl), 90S-96S.
- Buckley, N. E., Hansson, S., Harta, G., & Mezey, E. (1998). Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience*, 82(4), 1131-1149.
- Budney, A. J., Hughes, J. R., Moore, B. A., & Vandrey, R. (2004). Review of the validity and significance of cannabis withdrawal syndrome. *Am J Psychiatry*, 161(11), 1967-1977.
- Burns, L. H., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (1993). Differential effects of excitotoxic lesions of the basolateral amygdala, ventral subiculum and medial prefrontal cortex on responding with conditioned reinforcement and locomotor activity potentiated by intra-accumbens infusions of D-amphetamine. *Behav Brain Res*, 55(2), 167-183.
- Burstein, S. (1991). Cannabinoid induced changes in eicosanoid synthesis by mouse peritoneal cells. *Adv Exp Med Biol*, 288, 107-112.
- Burstein, S., Budrow, J., Debatis, M., Hunter, S. A., & Subramanian, A. (1994). Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid. *Biochem Pharmacol*, 48(6), 1253-1264.
- Caberlotto, L., Rimondini, R., Hansson, A., Eriksson, S., & Heilig, M. (2004). Corticotropin-releasing hormone (CRH) mRNA expression in rat central amygdala in cannabinoid tolerance and withdrawal: evidence for an allostatic shift? *Neuropsychopharmacology*, 29(1), 15-22.
- Cabral, G. A., Harmon, K. N., & Carlisle, S. J. (2001). Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB1 receptor participation. *Adv Exp Med Biol*, 493, 207-214.
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., & Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci*, 16(12), 3934-3942.
- Cadoni, C., Pisanu, A., Solinas, M., Acquas, E., & Di Chiara, G. (2001). Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl)*, 158(3), 259-266.
- Caine, S. B., & Koob, G. F. (1994). Effects of dopamine D-1 and D-2 antagonists on cocaine self-administration under different schedules of reinforcement in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 270(1), 209-218.
- Caine, S. B., Negus, S. S., & Mello, N. K. (2000). Effects of dopamine D(1-like) and D(2-like) agonists on cocaine self-administration in rhesus monkeys: rapid assessment of cocaine dose-effect functions. *Psychopharmacology (Berl)*, 148(1), 41-51.
- Campbell, F. A., Tramer, M. R., Carroll, D., Reynolds, D. J., Moore, R. A., & McQuay, H. J. (2001). Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *Bmj*, 323(7303), 13-16.
- Campbell, K. A., Foster, T. C., Hampson, R. E., & Deadwyler, S. A. (1986a). delta 9-Tetrahydrocannabinol differentially affects sensory-evoked potentials in the rat dentate gyrus. *J Pharmacol Exp Ther*, 239(3), 936-940.
- Campbell, K. A., Foster, T. C., Hampson, R. E., & Deadwyler, S. A. (1986b). Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on sensory-evoked discharges of granule cells in the dentate gyrus of behaving rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 239(3), 941-945.
- Canfield, D. R., Spealman, R. D., Kaufman, M. J., & Madras, B. K. (1990). Autoradiographic localization of cocaine binding sites by [³H]CFT ([³H]WIN 35,428) in the monkey brain. *Synapse*, 6(2), 189-195.
- Cani, P. D., Montoya, M. L., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Lambert, D. M. (2004). Potential modulation of plasma ghrelin and glucagon-like peptide-1 by anorexigenic

- cannabinoid compounds, SR141716A (rimonabant) and oleoylethanolamide. *Br J Nutr*, 92(5), 757-761.
- Cannich, A., Wotjak, C. T., Kamprath, K., Hermann, H., Lutz, B., & Marsicano, G. (2004). CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem*, 11(5), 625-632.
- Carlini, E. A., Lindsey, C. J., & Tufik, S. (1976). Environmental and drug interference with effects of marihuana. *Ann NY Acad Sci*, 281, 229-243.
- Carlson, G., Wang, Y., & Alger, B. E. (2002). Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci*, 5(8), 723-724.
- Cassel, J. C., Lazaris, A., Birthelmer, A., & Jackisch, R. (2007). Spatial reference- (not working- or procedural-) memory performance of aged rats in the water maze predicts the magnitude of sulpiride-induced facilitation of acetylcholine release by striatal slices. *Neurobiol Aging*, 28(8), 1270-1285.
- Clements, K. M., & Wainwright, P. E. (2006). Spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats differ in performance on a win-shift task in the water radial arm maze. *Behav Brain Res*, 167(2), 295-304.
- Compton, D. R., Aceto, M. D., Lowe, J., & Martin, B. R. (1996). In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 277(2), 586-594.
- Cook, S. A., Lowe, J. A., & Martin, B. R. (1998). CB1 receptor antagonist precipitates withdrawal in mice exposed to Delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther*, 285(3), 1150-1156.
- Coolen, L. M., Peters, H. J., & Veening, J. G. (1996). Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res*, 738(1), 67-82.
- Corrigall, W. A., & Coen, K. M. (1991). Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists. *Pharmacol Biochem Behav*, 39(3), 799-802.
- Cosgrove, K. P., Mazure, C. M., & Staley, J. K. (2007). Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biol Psychiatry*, 62(8), 847-855.
- Cossu, G., Ledent, C., Fattore, L., Imperato, A., Bohme, G. A., Parmentier, M., et al. (2001). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. *Behav Brain Res*, 118(1), 61-65.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., et al. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, 112(3), 423-431.
- Craft, R. M., & Leidl, M. D. (2008). Gonadal hormone modulation of the behavioral effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in male and female rats. *Eur J Pharmacol*, 578(1), 37-42.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., & Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384(6604), 83-87.
- Crawley, J. N., Corwin, R. L., Robinson, J. K., Felder, C. C., Devane, W. A., & Axelrod, J. (1993). Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacol Biochem Behav*, 46(4), 967-972.
- Crespo, I., Gomez de Heras, R., Rodriguez de Fonseca, F., & Navarro, M. (2008). Pretreatment with subeffective doses of Rimonabant attenuates orexigenic actions of orexin A-hypocretin 1. *Neuropharmacology*, 54(1), 219-225.
- Crews, F., He, J., & Hodge, C. (2007). Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, 86(2), 189-199.
- Croxford, J. L., & Miller, S. D. (2004). Towards cannabis and cannabinoid treatment of multiple sclerosis. *Drugs Today (Barc)*, 40(8), 663-676.

- Croxford, J. L., Pryce, G., Jackson, S. J., Ledent, C., Giovannoni, G., Pertwee, R. G., et al. (2007). Cannabinoid-mediated neuroprotection, not immunosuppression, may be more relevant to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*.
- Csikszentmihalyi, M., Larson, R., & Prescott, S. (1977). The ecology of adolescent activity and experience. *Journal of Youth and Adolescence*, 6, 281-294.
- Cha, Y. M., White, A. M., Kuhn, C. M., Wilson, W. A., & Swartzwelder, H. S. (2006). Differential effects of delta9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 83(3), 448-455.
- Chakrabarti, A., Onaivi, E. S., & Chaudhuri, G. (1995). Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq*, 5(6), 385-388.
- Chambers, R. A., & Self, D. W. (2002). Motivational responses to natural and drug rewards in rats with neonatal ventral hippocampal lesions: an animal model of dual diagnosis schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 27(6), 889-905.
- Chambers, R. A., Taylor, J. R., & Potenza, M. N. (2003). Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am J Psychiatry*, 160(6), 1041-1052.
- Chaperon, F., Soubrie, P., Puech, A. J., & Thiebot, M. H. (1998). Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 135(4), 324-332.
- Chaperon, F., & Thiebot, M. H. (1999). Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Crit Rev Neurobiol*, 13(3), 243-281.
- Cheer, J. F., Marsden, C. A., Kendall, D. A., & Mason, R. (2000). Lack of response suppression follows repeated ventral tegmental cannabinoid administration: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience*, 99(4), 661-667.
- Cheer, J. F., Wassum, K. M., Sombers, L. A., Heien, M. L., Ariansen, J. L., Aragona, B. J., et al. (2007). Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. *J Neurosci*, 27(4), 791-795.
- Cherek, D. R., Lane, S. D., Pietras, C. J., & Steinberg, J. L. (2002). Effects of chronic paroxetine administration on measures of aggressive and impulsive responses of adult males with a history of conduct disorder. *Psychopharmacology (Berl)*, 159(3), 266-274.
- Cheung, C. C., Thornton, J. E., Kuijper, J. L., Weigle, D. S., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (1997). Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*, 138(2), 855-858.
- Cheung, C. C., Thornton, J. E., Nurani, S. D., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2001). A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinology*, 74(1), 12-21.
- Childers, S. R., Pacheco, M. A., Bennett, B. A., Edwards, T. A., Hampson, R. E., Mu, J., et al. (1993). Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms. *Biochem Soc Symp*, 59, 27-50.
- Choi, G., Guo, J., & Makriyannis, A. (2005). The conformation of the cytoplasmic helix 8 of the CB1 cannabinoid receptor using NMR and circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, 1668(1), 1-9.
- Christopoulos, A., Coles, P., Lay, L., Lew, M. J., & Angus, J. A. (2001). Pharmacological analysis of cannabinoid receptor activity in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol*, 132(6), 1281-1291.
- Daaka, Y., Klein, T. W., & Friedman, H. (1995). Expression of cannabinoid receptor mRNA in murine and human leukocytes. *Adv Exp Med Biol*, 373, 91-96.
- Dalterio, S., Bartke, A., Roberson, C., Watson, D., & Burstein, S. (1978). Direct and pituitary-mediated effects of delta9-THC and cannabinol on the testis. *Pharmacol Biochem Behav*, 8(6), 673-678.
- Dalterio, S. L., Mayfield, D. L., & Bartke, A. (1983). Effects of delta 9-THC on plasma hormone levels in female mice. *Subst Alcohol Actions Misuse*, 4(5), 339-345.

- Dalterio, S. L., Michael, S. D., Macmillan, B. T., & Bartke, A. (1981). Differential effects of cannabinoid exposure and stress on plasma prolactin, growth hormone and corticosterone levels in male mice. *Life Sci*, 28(7), 761-766.
- Dalton, G. D., Smith, F. L., Smith, P. A., & Dewey, W. L. (2005). Chronic Delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces antinociceptive tolerance in mice without altering protein kinase A activity in mouse brain and spinal cord. *Biochem Pharmacol*, 70(1), 152-160.
- Damsma, G., Pfau, J. G., Wenkstern, D., Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1992). Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behav Neurosci*, 106(1), 181-191.
- Daniel, J. M. (2006). Effects of oestrogen on cognition: what have we learned from basic research? *J Neuroendocrinol*, 18(10), 787-795.
- Daniel, J. M., Hulst, J. L., & Berbling, J. L. (2006). Estradiol replacement enhances working memory in middle-aged rats when initiated immediately after ovariectomy but not after a long-term period of ovarian hormone deprivation. *Endocrinology*, 147(1), 607-614.
- Daniel, J. M., Hulst, J. L., & Lee, C. D. (2005). Role of hippocampal M2 muscarinic receptors in the estrogen-induced enhancement of working memory. *Neuroscience*, 132(1), 57-64.
- Daniel, J. M., Sulzer, J. K., & Hulst, J. L. (2006). Estrogen increases the sensitivity of ovariectomized rats to the disruptive effects produced by antagonism of D2 but not D1 dopamine receptors during performance of a response learning task. *Horm Behav*, 49(1), 38-44.
- Darmani, N. A., Janoyan, J. J., Kumar, N., & Crim, J. L. (2003). Behaviorally active doses of the CB1 receptor antagonist SR 141716A increase brain serotonin and dopamine levels and turnover. *Pharmacol Biochem Behav*, 75(4), 777-787.
- Darmani, N. A., Shaddy, J., & Gerdes, C. F. (1996). Differential ontogenesis of three DOI-induced behaviors in mice. *Physiol Behav*, 60(6), 1495-1500.
- Daval, G., Verge, D., Becerril, A., Gozlan, H., Spampinato, U., & Hamon, M. (1987). Transient expression of 5-HT1A receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. *Int J Dev Neurosci*, 5(3), 171-180.
- de Lago, E., Fernandez-Ruiz, J., Ortega-Gutierrez, S., Cabranes, A., Pryce, G., Baker, D., et al. (2006). UCM707, an inhibitor of the anandamide uptake, behaves as a symptom control agent in models of Huntington's disease and multiple sclerosis, but fails to delay/arrest the progression of different motor-related disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*, 16(1), 7-18.
- de Lago, E., Urbani, P., Ramos, J. A., Di Marzo, V., & Fernandez-Ruiz, J. (2005). Arvanil, a hybrid endocannabinoid and vanilloid compound, behaves as an antihyperkinetic agent in a rat model of Huntington's disease. *Brain Res*, 1050(1-2), 210-216.
- De Vries, T. J., Shaham, Y., Homberg, J. R., Crombag, H., Schuurman, K., Dieben, J., et al. (2001). A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med*, 7(10), 1151-1154.
- Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., Bennett, B. A., Edwards, T. A., Mu, J., Pacheco, M. A., et al. (1993). Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Receptors Channels*, 1(2), 121-134.
- del Olmo, E., Lopez-Gimenez, J. F., Vilaro, M. T., Mengod, G., Palacios, J. M., & Pazos, A. (1998). Early localization of mRNA coding for 5-HT1A receptors in human brain during development. *Brain Res Mol Brain Res*, 60(1), 123-126.
- Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Miguens, M., Garcia-Lecumberri, C., & Ambrosio, E. (2007). Cocaine self-administration improves performance in a highly demanding water maze task. *Psychopharmacology (Berl)*, 195(1), 19-25.
- Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Miguens, M., Garcia-Lecumberri, C., Borcel, E., Solis, J. M., et al. (2006). Hippocampal synaptic plasticity and water maze learning in cocaine self-administered rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1074, 427-437.
- del Olmo, N., Miguens, M., Higuera-Matas, A., Torres, I., Garcia-Lecumberri, C., Solis, J. M., et al. (2006). Enhancement of hippocampal long-term potentiation induced by cocaine self-

- administration is maintained during the extinction of this behavior. *Brain Res*, 1116(1), 120-126.
- Deutsch, D. G., & Chin, S. A. (1993). Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol*, 46(5), 791-796.
- Deutsch, D. G., Glaser, S. T., Howell, J. M., Kunz, J. S., Puffenbarger, R. A., Hillard, C. J., et al. (2001). The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J Biol Chem*, 276(10), 6967-6973.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, 34(5), 605-613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., et al. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949.
- Dewey, W. L. (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev*, 38(2), 151-178.
- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M. A., Spina, L., Cadoni, C., et al. (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 227-241.
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(14), 5274-5278.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Melck, D., Orlando, P., Wagner, J. A., et al. (1999). Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem*, 264(1), 258-267.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., et al. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372(6507), 686-691.
- Di Marzo, V., Hill, M. P., Bisogno, T., Crossman, A. R., & Brotchie, J. M. (2000). Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *Faseb J*, 14(10), 1432-1438.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C., & Tasker, J. G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci*, 23(12), 4850-4857.
- Diana, M., Melis, M., & Gessa, G. L. (1998). Increase in meso-prefrontal dopaminergic activity after stimulation of CB1 receptors by cannabinoids. *Eur J Neurosci*, 10(9), 2825-2830.
- Diana, M., Melis, M., Muntoni, A. L., & Gessa, G. L. (1998). Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(17), 10269-10273.
- Dillon, K. A., Gross-Isseroff, R., Israeli, M., & Biegon, A. (1991). Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT1A receptor binding in the human brain postmortem: effects of age and alcohol. *Brain Res*, 554(1-2), 56-64.
- Drew, L. J., Harris, J., Millns, P. J., Kendall, D. A., & Chapman, V. (2000). Activation of spinal cannabinoid 1 receptors inhibits C-fibre driven hyperexcitable neuronal responses and increases [35S]GTPgammaS binding in the dorsal horn of the spinal cord of noninflamed and inflamed rats. *Eur J Neurosci*, 12(6), 2079-2086.
- Drew, W. G., & Slagel, D. E. (1973). Delta 9-THC: selective impairment of corticosterone uptake by limbic structures of the rat. *Neuropharmacology*, 12(9), 909-914.
- Drewe, E., Schneider, M., & Koch, M. (2005). Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 80(1), 145-150.
- Ebling, F. J., & Cronin, A. S. (2000). The neurobiology of reproductive development. *Neuroreport*, 11(16), R23-33.
- Ebling, F. J., & Foster, D. L. (1989). Pineal melatonin rhythms and the timing of puberty in mammals. *Experientia*, 45(10), 946-954.

- Ederly, H., Grunfeld, Y., Ben-Zvi, Z., & Mechoulam, R. (1971). Structural requirements for cannabinoid activity. *Ann N Y Acad Sci*, 191, 40-53.
- Edwards, S., Whisler, K. N., Fuller, D. C., Orsulak, P. J., & Self, D. W. (2007). Addiction-related alterations in D1 and D2 dopamine receptor behavioral responses following chronic cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, 32(2), 354-366.
- Ehrenreich, H., Rinn, T., Kunert, H. J., Moeller, M. R., Poser, W., Schilling, L., et al. (1999). Specific attentional dysfunction in adults following early start of cannabis use. *Psychopharmacology (Berl)*, 142(3), 295-301.
- Ellgren, M., Hurd, Y. L., & Franck, J. (2004). Amphetamine effects on dopamine levels and behavior following cannabinoid exposure during adolescence. *Eur J Pharmacol*, 497(2), 205-213.
- Ellgren, M., Spano, S. M., & Hurd, Y. L. (2006). Adolescent Cannabis Exposure Alters Opiate Intake and Opioid Limbic Neuronal Populations in Adult Rats. *Neuropsychopharmacology*.
- Ellgren, M., Spano, S. M., & Hurd, Y. L. (2007). Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, 32(3), 607-615.
- Emans, S. J. H., Laufer, M. R., & Goldstein, D. P. (2005). *Pediatric and adolescent gynecology* (5th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Ettenberg, A. (2004). Opponent process properties of self-administered cocaine. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(8), 721-728.
- Fadda, P., Scherma, M., Spano, M. S., Salis, P., Melis, V., Fattore, L., et al. (2006). Cannabinoid self-administration increases dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroreport*, 17(15), 1629-1632.
- Falkner, F., & Tanner, J. M. (1979). *Human growth vol.3, Neurobiology and nutrition*. London: Baillière Tindall.
- Farfel, G. M., Kleven, M. S., Woolverton, W. L., Seiden, L. S., & Perry, B. D. (1992). Effects of repeated injections of cocaine on catecholamine receptor binding sites, dopamine transporter binding sites and behavior in rhesus monkey. *Brain Res*, 578(1-2), 235-243.
- Fassino, M. J., & Campbell, B. A. (1981). *The ontogeny of play in rats*. Paper presented at the Meeting of the Eastern Psychological Association.
- Fattore, L., Martellotta, M. C., Cossu, G., Mascia, M. S., & Fratta, W. (1999). CB1 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Behav Brain Res*, 104(1-2), 141-146.
- Felder, C. C., Briley, E. M., Axelrod, J., Simpson, J. T., Mackie, K., & Devane, W. A. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(16), 7656-7660.
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Glass, M., Mackie, K. P., Fahey, K. J., et al. (1998). LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther*, 284(1), 291-297.
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., et al. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*, 48(3), 443-450.
- Felder, C. C., Nielsen, A., Briley, E. M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., et al. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*, 393(2-3), 231-235.
- Fergusson, D. M., Boden, J. M., & Horwood, L. J. (2006). Cannabis use and other illicit drug use: testing the cannabis gateway hypothesis. *Addiction*, 101(4), 556-569.
- Fernandez-Fernandez, R., Navarro, V. M., Barreiro, M. L., Vigo, E. M., Tovar, S., Sirotkin, A. V., et al. (2005). Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology*, 146(7), 3018-3025.

- Fernandez-Ruiz, J., De Miguel, R., Hernandez, M. L., Cebeira, M., & Ramos, J. A. (1992). Comparisons between brain dopaminergic neurons of juvenile and aged rats: sex-related differences. *Mech Ageing Dev*, 63(1), 45-55.
- Fernandez-Ruiz, J., Gomez, M., Hernandez, M., de Miguel, R., & Ramos, J. A. (2004). Cannabinoids and gene expression during brain development. *Neurotox Res*, 6(5), 389-401.
- Fernandez-Ruiz, J., & Gonzales, S. (2005). Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb Exp Pharmacol*(168), 479-507.
- Fernandez-Ruiz, J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., Gonzalez, S., & Ramos, J. A. (2002). Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66(2-3), 257-267.
- Fernandez-Ruiz, J. J., Berrendero, F., Hernandez, M. L., Romero, J., & Ramos, J. A. (1999). Role of endocannabinoids in brain development. *Life Sci*, 65(6-7), 725-736.
- Fernandez-Ruiz, J. J., Munoz, R. M., Romero, J., Villanua, M. A., Makriyannis, A., & Ramos, J. A. (1997). Time course of the effects of different cannabimimetics on prolactin and gonadotrophin secretion: evidence for the presence of CB1 receptors in hypothalamic structures and their involvement in the effects of cannabimimetics. *Biochem Pharmacol*, 53(12), 1919-1927.
- Fernandez, F., Porrás, G., Mormede, P., Spampinato, U., & Chaouloff, F. (2003). Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on locomotor activity and extracellular dopamine in the nucleus accumbens of Fischer 344 and Lewis rats. *Neurosci Lett*, 335(3), 212-216.
- Ferrari, F., Ottani, A., & Giuliani, D. (2000). Inhibitory effects of the cannabinoid agonist HU 210 on rat sexual behaviour. *Physiol Behav*, 69(4-5), 547-554.
- Ferrer, B., Asbrock, N., Kathuria, S., Piomelli, D., & Giuffrida, A. (2003). Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci*, 18(6), 1607-1614.
- Ferrer, B., Gorriti, M. A., Palomino, A., Gornemann, I., de Diego, Y., Bermudez-Silva, F. J., et al. (2007). Cannabinoid CB1 receptor antagonism markedly increases dopamine receptor-mediated stereotypies. *Eur J Pharmacol*, 559(2-3), 180-183.
- Fimiani, C., Liberty, T., Aquirre, A. J., Amin, I., Ali, N., & Stefano, G. B. (1999). Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 57(1), 23-34.
- Finch, D. M. (1996). Neurophysiology of converging synaptic inputs from the rat prefrontal cortex, amygdala, midline thalamus, and hippocampal formation onto single neurons of the caudate/putamen and nucleus accumbens. *Hippocampus*, 6(5), 495-512.
- Foster, D. L., Ebling, F. J., & Claypool, L. E. (1988). Timing of puberty by photoperiod. *Reprod Nutr Dev*, 28(2B), 349-364.
- Franken, I. H., Booij, J., & van den Brink, W. (2005). The role of dopamine in human addiction: from reward to motivated attention. *Eur J Pharmacol*, 526(1-3), 199-206.
- Freedland, C. S., Whitlow, C. T., Smith, H. R., & Porrino, L. J. (2003). Functional consequences of the acute administration of the cannabinoid receptor antagonist, SR141716A, in cannabinoid-naive and -tolerant animals: a quantitative 2-[14C]deoxyglucose study. *Brain Res*, 962(1-2), 169-179.
- French, S. J., & Totterdell, S. (2002). Hippocampal and prefrontal cortical inputs monosynaptically converge with individual projection neurons of the nucleus accumbens. *J Comp Neurol*, 446(2), 151-165.
- French, S. J., & Totterdell, S. (2003). Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience*, 119(1), 19-31.
- Freud, A. (1964). *The ego and the mechanism of defense*. New York: International Universities Press.

- Frey, U., Hartmann, S., & Matthies, H. (1989). Domperidone, an inhibitor of the D2-receptor, blocks a late phase of an electrically induced long-term potentiation in the CA1-region in rats. *Biomed Biochim Acta*, 48(7), 473-476.
- Fride, E. (2004). The endocannabinoid-CB receptor system: Importance for development and in pediatric disease. *Neuro Endocrinol Lett*, 25(1-2), 24-30.
- Fride, E., Braun, H., Matan, H., Steinberg, S., Reggio, P. H., & Seltzman, H. H. (2007). Inhibition of milk ingestion and growth after administration of a neutral cannabinoid CB1 receptor antagonist on the first postnatal day in the mouse. *Pediatr Res*, 62(5), 533-536.
- Fride, E., Bregman, T., & Kirkham, T. C. (2005). Endocannabinoids and food intake: newborn suckling and appetite regulation in adulthood. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230(4), 225-234.
- Fride, E., Foon, A., Rosenberg, E., Faigenboim, M., Cohen, V., Barda, L., et al. (2003). Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: evidence for a "CB3" receptor. *Eur J Pharmacol*, 461(1), 27-34.
- Fride, E., & Mechoulam, R. (1993). Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol*, 231(2), 313-314.
- Fride, E., & Mechoulam, R. (1996a). Developmental aspects of anandamide: ontogeny of response and prenatal exposure. *Psychoneuroendocrinology*, 21(2), 157-172.
- Fride, E., & Mechoulam, R. (1996b). Ontogenetic development of the response to anandamide and delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Brain Res Dev Brain Res*, 95(1), 131-134.
- Fride, E., & Shohami, E. (2002). The endocannabinoid system: function in survival of the embryo, the newborn and the neuron. *Neuroreport*, 13(15), 1833-1841.
- Fried, P. A., James, D. S., & Watkinson, B. (2001). Growth and pubertal milestones during adolescence in offspring prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol*, 23(5), 431-436.
- Fried, P. A., Watkinson, B., & Gray, R. (1992). A follow-up study of attentional behavior in 6-year-old children exposed prenatally to marijuana, cigarettes, and alcohol. *Neurotoxicol Teratol*, 14(5), 299-311.
- Fuchs, R. A., Evans, K. A., Ledford, C. C., Parker, M. P., Case, J. M., Mehta, R. H., et al. (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*, 30(2), 296-309.
- Fujiwara, M., & Egashira, N. (2004). New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: abnormal behaviors associate with CB1 cannabinoid receptor and development of therapeutic application. *J Pharmacol Sci*, 96(4), 362-366.
- Fullard, W., & Reiling, A. M. (1976). An investigation of Lorenz's babyness. *Child Development*, 47, 1191-1193.
- Fuller, R. W. (1996). Fluoxetine effects on serotonin function and aggressive behavior. *Ann N Y Acad Sci*, 794, 90-97.
- Gadzicki, D., Muller-Vahl, K. R., Heller, D., Ossege, S., Nothen, M. M., Hebebrand, J., et al. (2004). Tourette syndrome is not caused by mutations in the central cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 127(1), 97-103.
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., et al. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232(1), 54-61.
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 1646-1647.
- Garcia-Gil, L., De Miguel, R., Munoz, R. M., Cebeira, M., Villanua, M. A., Ramos, J. A., et al. (1997). Perinatal delta(9)-tetrahydrocannabinol exposure alters the responsiveness of hypothalamic dopaminergic neurons to dopamine-acting drugs in adult rats. *Neurotoxicol Teratol*, 19(6), 477-487.
- Garcia-Gil, L., de Miguel, R., Romero, J., Perez, A., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1999). Perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure augmented the magnitude of motor

- inhibition caused by GABA(B), but not GABA(A), receptor agonists in adult rats. *Neurotoxicol Teratol*, 21(3), 277-283.
- Garcia-Gil, L., Ramos, J. A., Rubino, T., Parolaro, D., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1998). Perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure did not alter dopamine transporter and tyrosine hydroxylase mRNA levels in midbrain dopaminergic neurons of adult male and female rats. *Neurotoxicol Teratol*, 20(5), 549-553.
- Garcia-Segura, L. M., Chowen, J. A., Parducz, A., & Naftolin, F. (1994). Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol*, 44(3), 279-307.
- Garcia, L., de Miguel, R., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1996). Perinatal delta 9-tetrahydrocannabinol exposure in rats modifies the responsiveness of midbrain dopaminergic neurons in adulthood to a variety of challenges with dopaminergic drugs. *Drug Alcohol Depend*, 42(3), 155-166.
- Gardner, E. L. (2005). Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav*, 81(2), 263-284.
- Gatley, S. J., Gifford, A. N., Volkow, N. D., Lan, R., & Makriyannis, A. (1996). 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol*, 307(3), 331-338.
- Georges, F., Stinus, L., Bloch, B., & Le Moine, C. (1999). Chronic morphine exposure and spontaneous withdrawal are associated with modifications of dopamine receptor and neuropeptide gene expression in the rat striatum. *Eur J Neurosci*, 11(2), 481-490.
- Gerard, C. M., Mollereau, C., Vassart, G., & Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J*, 279 (Pt 1), 129-134.
- Gessa, G. L., Casu, M. A., Carta, G., & Mascia, M. S. (1998). Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol*, 355(2-3), 119-124.
- Gessa, G. L., Mascia, M. S., Casu, M. A., & Carta, G. (1997). Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol*, 327(1), R1-2.
- Giedd, J. N., Blumenthal, J., Jeffries, N. O., Castellanos, F. X., Liu, H., Zijdenbos, A., et al. (1999). Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci*, 2(10), 861-863.
- Gifford, A. N., & Ashby, C. R., Jr. (1996). Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. *J Pharmacol Exp Ther*, 277(3), 1431-1436.
- Gispén-de Wied, C. C. (2000). Stress in schizophrenia: an integrative view. *Eur J Pharmacol*, 405(1-3), 375-384.
- Giuffrida, A., Beltramo, M., & Piomelli, D. (2001). Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(1), 7-14.
- Giuliani, D., Ottani, A., & Ferrari, F. (2000). Effects of the cannabinoid receptor agonist, HU 210, on ingestive behaviour and body weight of rats. *Eur J Pharmacol*, 391(3), 275-279.
- Glaser, S. T., Kaczocha, M., & Deutsch, D. G. (2005). Anandamide transport: a critical review. *Life Sci*, 77(14), 1584-1604.
- Glass, M. (2001). The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 25(4), 743-765.
- Glass, M., & Felder, C. C. (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci*, 17(14), 5327-5333.
- Gomez del Pulgar, T., Velasco, G., & Guzman, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J*, 347(Pt 2), 369-373.

- Gomez, M., Hernandez, M., & Fernandez-Ruiz, J. (2007). The activation of cannabinoid receptors during early postnatal development reduces the expression of cell adhesion molecule L1 in the rat brain. *Brain Res*, *1145*, 48-55.
- Gomez, M., Hernandez, M., Johansson, B., de Miguel, R., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. (2003). Prenatal cannabinoid and gene expression for neural adhesion molecule L1 in the fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, *147*(1-2), 201-207.
- Gomez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J. M., Bilbao, A., Del Arco, I., et al. (2002). A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci*, *22*(21), 9612-9617.
- Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., et al. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*, *1071*(1), 10-23.
- Gonzalez, S., Bisogno, T., Wenger, T., Manzanares, J., Milone, A., Berrendero, F., et al. (2000). Sex steroid influence on cannabinoid CB(1) receptor mRNA and endocannabinoid levels in the anterior pituitary gland. *Biochem Biophys Res Commun*, *270*(1), 260-266.
- Gonzalez, S., Manzanares, J., Berrendero, F., Wenger, T., Corchero, J., Bisogno, T., et al. (1999). Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB(1) receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology*, *70*(2), 137-145.
- Goparaju, S. K., Ueda, N., Yamaguchi, H., & Yamamoto, S. (1998). Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett*, *422*(1), 69-73.
- Griebel, G., Stemmelin, J., & Scatton, B. (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry*, *57*(3), 261-267.
- Groenewegen, H. J., Wright, C. I., Beijer, A. V., & Voorn, P. (1999). Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci*, *877*, 49-63.
- Gruber, A. J., & Pope, H. G., Jr. (2002). Marijuana use among adolescents. *Pediatr Clin North Am*, *49*(2), 389-413.
- Gubellini, P., Picconi, B., Bari, M., Battista, N., Calabresi, P., Centonze, D., et al. (2002). Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci*, *22*(16), 6900-6907.
- Guilarte, T. (1998). The N-methyl-D-aspartate receptor: physiology and neurotoxicology in the developing brain. In W. Slikker Jr & L. W. Chang (Eds.), *Handbook of developmental neurotoxicology* (pp. 285-304). San Diego, CA: Academic Press.
- Hachiya, Y., & Takashima, S. (2001). Development of GABAergic neurons and their transporter in human temporal cortex. *Pediatr Neurol*, *25*(5), 390-396.
- Haile, C. N., & Kosten, T. A. (2001). Differential effects of D1- and D2-like compounds on cocaine self-administration in Lewis and Fischer 344 inbred rats. *J Pharmacol Exp Ther*, *299*(2), 509-518.
- Hajos, N., Ledent, C., & Freund, T. F. (2001). Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience*, *106*(1), 1-4.
- Hall, F. S., Sora, I., Drgonova, J., Li, X. F., Goeb, M., & Uhl, G. R. (2004). Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. *Ann N Y Acad Sci*, *1025*, 47-56.
- Hall, G. S. (1904). *Adolescence: Its psychology and its relation to physiology, anthropology, sociology, sex, crime, religion and education*. New York: Appleton.
- Hall, W., & Solowij, N. (1998). Adverse effects of cannabis. *Lancet*, *352*(9140), 1611-1616.
- Hall, W. D., & Lynskey, M. (2005). Is cannabis a gateway drug? Testing hypotheses about the relationship between cannabis use and the use of other illicit drugs. *Drug Alcohol Rev*, *24*(1), 39-48.

- Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C., & Freund, T. F. (2002). The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci*, *16*(7), 1395-1398.
- Haney, M., Hart, C. L., Vosburg, S. K., Nasser, J., Bennett, A., Zubarán, C., et al. (2004). Marijuana withdrawal in humans: effects of oral THC or divalproex. *Neuropsychopharmacology*, *29*(1), 158-170.
- Haney, M., Ward, A. S., Comer, S. D., Foltin, R. W., & Fischman, M. W. (1999). Abstinence symptoms following oral THC administration to humans. *Psychopharmacology (Berl)*, *141*(4), 385-394.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., et al. (2001). 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(7), 3662-3665.
- Hanus, L., Gopher, A., Almog, S., & Mechoulam, R. (1993). Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J Med Chem*, *36*(20), 3032-3034.
- Harris, J. R. (1995). Where is the child's environment? A group socialization theory of development. *Psychological Review*, *102*, 458-489.
- Harris, L. S., Carchman, R. A., & Martin, B. R. (1978). Evidence for the existence of specific cannabinoid binding sites. *Life Sci*, *22*(13-15), 1131-1137.
- Havighurst, R. J. (1972). *Developmental tasks and education* (3rd ed.). New York: David McKay.
- Hedner, J., Lundell, K. H., Breese, G. R., Mueller, R. A., & Hedner, T. (1986). Developmental variations in CSF monoamine metabolites during childhood. *Biol Neonate*, *49*(4), 190-197.
- Heffernan, T. M., Jarvis, H., Rodgers, J., Scholey, A. B., & Ling, J. (2001). Prospective memory, everyday cognitive failure and central executive function in recreational users of Ecstasy. *Hum Psychopharmacol*, *16*(8), 607-612.
- Helliwell, R. J., Chamley, L. W., Blake-Palmer, K., Mitchell, M. D., Wu, J., Kearns, C. S., et al. (2004). Characterization of the endocannabinoid system in early human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, *89*(10), 5168-5174.
- Herkenham, M. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections. *NIDA Res Monogr*, *112*, 129-145.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, *11*(2), 563-583.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., et al. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(5), 1932-1936.
- Hermann, H., Marsicano, G., & Lutz, B. (2002). Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience*, *109*(3), 451-460.
- Hernandez, M. L., Garcia-Gil, L., Berrendero, F., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1997). delta 9-Tetrahydrocannabinol increases activity of tyrosine hydroxylase in cultured fetal mesencephalic neurons. *J Mol Neurosci*, *8*(2), 83-91.
- Herrero, A. I., Sandi, C., & Venero, C. (2006). Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiol Learn Mem*, *86*(2), 150-159.
- Heyser, C. J., Hampson, R. E., & Deadwyler, S. A. (1993). Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. *J Pharmacol Exp Ther*, *264*(1), 294-307.
- Higuera-Matas, A., Luisa Soto-Montenegro, M., Del Olmo, N., Miguens, M., Torres, I., Jose Vaquero, J., et al. (2007). Augmented Acquisition of Cocaine Self-Administration and

- Altered Brain Glucose Metabolism in Adult Female but not Male Rats Exposed to a Cannabinoid Agonist during Adolescence. *Neuropsychopharmacology*.
- Hiley, C. R., & Kaup, S. S. (2007). GPR55 and the vascular receptors for cannabinoids. *Br J Pharmacol*, *152*(5), 559-561.
- Hill, M. N., & Gorzalka, B. B. (2004). Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Eur J Pharmacol*, *499*(3), 291-295.
- Hill, M. N., & Gorzalka, B. B. (2006). Increased sensitivity to restraint stress and novelty-induced emotionality following long-term, high dose cannabinoid exposure. *Psychoneuroendocrinology*, *31*(4), 526-536.
- Hill, M. N., Kambo, J. S., Sun, J. C., Gorzalka, B. B., & Galea, L. A. (2006). Endocannabinoids modulate stress-induced suppression of hippocampal cell proliferation and activation of defensive behaviours. *Eur J Neurosci*, *24*(7), 1845-1849.
- Hillard, C. J., Edgemon, W. S., Jarrachian, A., & Campbell, W. B. (1997). Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem*, *69*(2), 631-638.
- Hillard, C. J., Harris, R. A., & Bloom, A. S. (1985). Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. *J Pharmacol Exp Ther*, *232*(3), 579-588.
- Hinz, B., Ramer, R., Eichele, K., Weinzierl, U., & Brune, K. (2004). R(+)-methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in H4 human neuroglioma cells: possible involvement of membrane lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun*, *324*(2), 621-626.
- Hirschel, B. (2005). Effect of rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk. *Lancet*, *366*(9483), 369; author reply 369-370.
- Hively, R. L., Mosher, W. A., & Hoffmann, F. W. (1966). Isolation of trans-delta-tetrahydrocannabinol from marijuana. *J Am Chem Soc*, *88*(8), 1832-1833.
- Hoehe, M. R., Caenazzo, L., Martinez, M. M., Hsieh, W. T., Modi, W. S., Gershon, E. S., et al. (1991). Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol*, *3*(9), 880-885.
- Hoffman, A. F., Oz, M., Caulder, T., & Lupica, C. R. (2003). Functional tolerance and blockade of long-term depression at synapses in the nucleus accumbens after chronic cannabinoid exposure. *J Neurosci*, *23*(12), 4815-4820.
- Hoffman, A. F., Oz, M., Yang, R., Lichtman, A. H., & Lupica, C. R. (2007). Opposing actions of chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinoid antagonists on hippocampal long-term potentiation. *Learn Mem*, *14*(1-2), 63-74.
- Hohmann, A. G. (2002). Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids*, *121*(1-2), 173-190.
- Howlett, A. C., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Milne, G. M. (1988). Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol Pharmacol*, *33*(3), 297-302.
- Howlett, A. C., Song, C., Berglund, B. A., Wilken, G. H., & Pigg, J. J. (1998). Characterization of CB1 cannabinoid receptors using receptor peptide fragments and site-directed antibodies. *Mol Pharmacol*, *53*(3), 504-510.
- Hubner, C. B., & Moreton, J. E. (1991). Effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists on cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, *105*(2), 151-156.
- Hull, E. M., Lorrain, D. S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L. A., Putnam, S. K., et al. (1999). Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav Brain Res*, *105*(1), 105-116.
- Hunter, S. A., & Burstein, S. H. (1997). Receptor mediation in cannabinoid stimulated arachidonic acid mobilization and anandamide synthesis. *Life Sci*, *60*(18), 1563-1573.

- Hutcheson, D. M., Tzavara, E. T., Smadja, C., Valjent, E., Roques, B. P., Hanoune, J., et al. (1998). Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol*, *125*(7), 1567-1577.
- Huttenlocher, P. R. (1979). Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res*, *163*(2), 195-205.
- Huttenlocher, P. R., De Courten, C., Garey, L. J., & Van der Loos, H. (1982a). Synaptic development in human cerebral cortex. *Int J Neurol*, *16-17*, 144-154.
- Huttenlocher, P. R., de Courten, C., Garey, L. J., & Van der Loos, H. (1982b). Synaptogenesis in human visual cortex--evidence for synapse elimination during normal development. *Neurosci Lett*, *33*(3), 247-252.
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*, *29*, 565-598.
- Insel, T. R., Miller, L. P., & Gelhard, R. E. (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain--I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*, *35*(1), 31-43.
- Irving, A. J., Coutts, A. A., Harvey, J., Rae, M. G., Mackie, K., Bewick, G. S., et al. (2000). Functional expression of cell surface cannabinoid CB(1) receptors on presynaptic inhibitory terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, *98*(2), 253-262.
- Irwin, C. E., Jr. (1989). Risk taking behaviors in the adolescent patient: are they impulsive? *Pediatr Ann*, *18*(2), 122, 124, 125 passim.
- Ishac, E. J., Jiang, L., Lake, K. D., Varga, K., Abood, M. E., & Kunos, G. (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol*, *118*(8), 2023-2028.
- Ito, R., Dalley, J. W., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2002). Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J Neurosci*, *22*(14), 6247-6253.
- Iuvone, T., Esposito, G., Esposito, R., Santamaria, R., Di Rosa, M., & Izzo, A. A. (2004). Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem*, *89*(1), 134-141.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, *68*(3), 285-316.
- Jager, G., Van Hell, H. H., De Win, M. M., Kahn, R. S., Van Den Brink, W., Van Ree, J. M., et al. (2007). Effects of frequent cannabis use on hippocampal activity during an associative memory task. *Eur Neuropsychopharmacol*, *17*(4), 289-297.
- Jagoda, E. M., Vaquero, J. J., Seidel, J., Green, M. V., & Eckelman, W. C. (2004). Experiment assessment of mass effects in the rat: implications for small animal PET imaging. *Nucl Med Biol*, *31*(6), 771-779.
- Jakubovic, A., & McGeer, P. L. (1977). Biochemical changes in rat testicular cells in vitro produced by cannabinoids and alcohol: metabolism and incorporation of labeled glucose, amino acids, and nucleic acid precursors. *Toxicol Appl Pharmacol*, *41*(3), 473-486.
- Jarai, Z., Wagner, J. A., Varga, K., Lake, K. D., Compton, D. R., Martin, B. R., et al. (1999). Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(24), 14136-14141.
- Jentsch, J. D., Roth, R. H., & Taylor, J. R. (2000). Role for dopamine in the behavioral functions of the prefrontal corticostriatal system: implications for mental disorders and psychotropic drug action. *Prog Brain Res*, *126*, 433-453.
- Johns, D. G., Behm, D. J., Walker, D. J., Ao, Z., Shapland, E. M., Daniels, D. A., et al. (2007). The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol*, *152*(5), 825-831.

- Johnson, K. M., Dewey, W. L., Ritter, K. S., & Beckner, J. S. (1978). Cannabinoid effects on plasma corticosterone and uptake of 3H-corticosterone by mouse brain. *Eur J Pharmacol*, 47(3), 303-310.
- Jonasson, Z. (2005). Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(8), 811-825.
- Jones, K. L., & Smith, D. W. (2006). *Smith's recognizable patterns of human malformation* (6th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Jones, R. T. (1987). Drug of abuse profile: cannabis. *Clin Chem*, 33(11 Suppl), 72B-81B.
- Jones, R. T., Benowitz, N. L., & Herning, R. I. (1981). Clinical relevance of cannabis tolerance and dependence. *J Clin Pharmacol*, 21(8-9 Suppl), 143S-152S.
- Justinova, Z., Tanda, G., Redhi, G. H., & Goldberg, S. R. (2003). Self-administration of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, 169(2), 135-140.
- Kalivas, P. W., Churchill, L., & Romanides, A. (1999). Involvement of the pallidal-thalamocortical circuit in adaptive behavior. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 64-70.
- Kaminski, N. E. (1998). Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J Neuroimmunol*, 83(1-2), 124-132.
- Kaminski, N. E., Abood, M. E., Kessler, F. K., Martin, B. R., & Schatz, A. R. (1992). Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation. *Mol Pharmacol*, 42(5), 736-742.
- Kandel, D. B. (2003). Does marijuana use cause the use of other drugs? *Jama*, 289(4), 482-483.
- Kandel, D. B., Yamaguchi, K., & Klein, L. C. (2006). Testing the Gateway Hypothesis. *Addiction*, 101(4), 470-472; discussion 474-476.
- Kantak, K. M., Goodrich, C. M., & Uribe, V. (2007). Influence of sex, estrous cycle, and drug-onset age on cocaine self-administration in rats (*Rattus norvegicus*). *Exp Clin Psychopharmacol*, 15(1), 37-47.
- Kantak, K. M., Udo, T., Ugalde, F., Luzzo, C., Di Pietro, N., & Eichenbaum, H. B. (2005). Influence of cocaine self-administration on learning related to prefrontal cortex or hippocampus functioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 181(2), 227-236.
- Kaplan, B. L., Rockwell, C. E., & Kaminski, N. E. (2003). Evidence for cannabinoid receptor-dependent and -independent mechanisms of action in leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 306(3), 1077-1085.
- Kaplan, H. B., Johnson, J. R., & Bailey, C. A. (1987). Deviant peers and deviant behavior: further elaboration of a model. *Social Psychology Quarterly*, 50, 277-284.
- Kathmann, M., Bauer, U., Schlicker, E., & Gothert, M. (1999). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 359(6), 466-470.
- Kellogg, C. K. (1998). Early developmental modulation of GABAA receptor function. Influence on adaptive responses. *Perspect Dev Neurobiol*, 5(2-3), 219-234.
- Kellogg, C. K., Taylor, M. K., Rodriguez-Zafra, M., & Pleger, G. L. (1993). Altered stressor-induced changes in GABAA receptor function in the cerebral cortex of adult rats exposed in utero to diazepam. *Pharmacol Biochem Behav*, 44(2), 267-273.
- Kendler, K. S., & Prescott, C. A. (1998). Cannabis use, abuse, and dependence in a population-based sample of female twins. *Am J Psychiatry*, 155(8), 1016-1022.
- Khroyan, T. V., Barrett-Larimore, R. L., Rowlett, J. K., & Spealman, R. D. (2000). Dopamine D1- and D2-like receptor mechanisms in relapse to cocaine-seeking behavior: effects of selective antagonists and agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(2), 680-687.
- Kinsey-Jones, J. S., Li, X. F., Luckman, S. M., & O'Byrne, K. T. (2007). Effects of kisspeptin-10 on the electrophysiological manifestation of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the female rat. *Endocrinology*.
- Kirkham, T. C., & Williams, C. M. (2001). Synergistic effects of opioid and cannabinoid antagonists on food intake. *Psychopharmacology (Berl)*, 153(2), 267-270.

- Klein, T. W., Newton, C. A., Nakachi, N., & Friedman, H. (2000). Delta 9-tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to *Legionella pneumophila* infection. *J Immunol*, *164*(12), 6461-6466.
- Knobil, E., & Neill, J. D. (1994). *The Physiology of reproduction* (2nd ed.). New York: Raven Press.
- Koob, G. F. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci*, *13*(5), 177-184.
- Koob, G. F. (1996). Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron*, *16*(5), 893-896.
- Kouri, E. M., & Pope, H. G., Jr. (2000). Abstinence symptoms during withdrawal from chronic marijuana use. *Exp Clin Psychopharmacol*, *8*(4), 483-492.
- Kouri, E. M., Pope, H. G., Jr., & Lukas, S. E. (1999). Changes in aggressive behavior during withdrawal from long-term marijuana use. *Psychopharmacology (Berl)*, *143*(3), 302-308.
- Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, *29*(3), 717-727.
- Kruger, L., Saporta, S., & Swanson, L. W. (1995). *Photographic atlas of the rat brain : the cell and fiber architecture illustrated in three planes with stereotaxic coordinates*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press.
- Labar, G., & Michaux, C. (2007). Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem Biodivers*, *4*(8), 1882-1902.
- Lambe, E. K., Krimer, L. S., & Goldman-Rakic, P. S. (2000). Differential postnatal development of catecholamine and serotonin inputs to identified neurons in prefrontal cortex of rhesus monkey. *J Neurosci*, *20*(23), 8780-8787.
- Lamota, L., Bermudez-Silva, F. J., Marco, E. M., Llorente, R., Gallego, A., Rodriguez de Fonseca, F., et al. (2008). Effects of adolescent nicotine and SR 147778 (Surinabant) administration on food intake, somatic growth and metabolic parameters in rats. *Neuropharmacology*, *54*(1), 194-205.
- Lastres-Becker, I., de Miguel, R., De Petrocellis, L., Makriyannis, A., Di Marzo, V., & Fernandez-Ruiz, J. (2003). Compounds acting at the endocannabinoid and/or endovanilloid systems reduce hyperkinesia in a rat model of Huntington's disease. *J Neurochem*, *84*(5), 1097-1109.
- Lastres-Becker, I., & Fernandez-Ruiz, J. (2006). An overview of Parkinson's disease and the cannabinoid system and possible benefits of cannabinoid-based treatments. *Curr Med Chem*, *13*(30), 3705-3718.
- Lastres-Becker, I., Hansen, H. H., Berrendero, F., De Miguel, R., Perez-Rosado, A., Manzanares, J., et al. (2002). Alleviation of motor hyperactivity and neurochemical deficits by endocannabinoid uptake inhibition in a rat model of Huntington's disease. *Synapse*, *44*(1), 23-35.
- Lauder, J. M. (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci*, *600*, 297-313; discussion 314.
- Lauder, J. M., & Bloom, F. E. (1974). Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol*, *155*(4), 469-481.
- Lavin, A., & Grace, A. A. (1994). Modulation of dorsal thalamic cell activity by the ventral pallidum: its role in the regulation of thalamocortical activity by the basal ganglia. *Synapse*, *18*(2), 104-127.
- Laviola, G., Adriani, W., Terranova, M. L., & Gerra, G. (1999). Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, *23*(7), 993-1010.
- Laviola, G., Pascucci, T., & Pieretti, S. (2001). Striatal dopamine sensitization to D-amphetamine in periadolescent but not in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *68*(1), 115-124.
- Laviola, G., Wood, R. D., Kuhn, C., Francis, R., & Spear, L. P. (1995). Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *J Pharmacol Exp Ther*, *275*(1), 345-357.

- Lawston, J., Borella, A., Robinson, J. K., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2000). Changes in hippocampal morphology following chronic treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. *Brain Res*, 877(2), 407-410.
- Le Moal, M., & Simon, H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev*, 71(1), 155-234.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J. F., Beslot, F., et al. (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, 283(5400), 401-404.
- Lee, P. A., & Reiter, E. O. (2002). Genital size: a common adolescent male concern. *Adolesc Med*, 13(1), 171-180, viii.
- Lepore, M., Vorel, S. R., Lowinson, J., & Gardner, E. L. (1995). Conditioned place preference induced by delta 9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. *Life Sci*, 56(23-24), 2073-2080.
- Letchworth, S. R., Nader, M. A., Smith, H. R., Friedman, D. P., & Porrino, L. J. (2001). Progression of changes in dopamine transporter binding site density as a result of cocaine self-administration in rhesus monkeys. *J Neurosci*, 21(8), 2799-2807.
- Lewis, D. A., Cruz, D., Eggan, S., & Erickson, S. (2004). Postnatal development of prefrontal inhibitory circuits and the pathophysiology of cognitive dysfunction in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*, 1021, 64-76.
- Liebmann, C. (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*, 13(11), 777-785.
- Ling, G. M., Thomas, J. A., Usher, D. R., & Singhal, R. L. (1973). Effects of chronically administered 1 -tetrahydro-cannabinol on adrenal and gonadal activity of male rats. *Int J Clin Pharmacol*, 7(1), 1-5.
- Lipsitt, L. P., & Mitnick, L. L. (1991). *Self-regulatory behavior and risk taking : causes and consequences*. Norwood, N.J.: Ablex Pub. Corp.
- London, E. D., Cascella, N. G., Wong, D. F., Phillips, R. L., Dannals, R. F., Links, J. M., et al. (1990). Cocaine-induced reduction of glucose utilization in human brain. A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluorodeoxyglucose. *Arch Gen Psychiatry*, 47(6), 567-574.
- London, E. D., Wilkerson, G., Goldberg, S. R., & Risner, M. E. (1986). Effects of L-cocaine on local cerebral glucose utilization in the rat. *Neurosci Lett*, 68(1), 73-78.
- Lu, Q., Straiker, A., Lu, Q., & Maguire, G. (2000). Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci*, 17(1), 91-95.
- Lupica, C. R., & Riegel, A. C. (2005). Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology*, 48(8), 1105-1116.
- Luthi, A., Laurent, J. P., Figurov, A., Muller, D., & Schachner, M. (1994). Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature*, 372(6508), 777-779.
- Lutte, G. (1991). *Liberar la adolescencia. La Psicología de los jóvenes hoy*. Barcelona: Herder.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*, 84(1), 87-136.
- Lynch, M. A., & Voss, K. L. (1991). Presynaptic changes in long-term potentiation: elevated synaptosomal calcium concentration and basal phosphoinositide turnover in dentate gyrus. *J Neurochem*, 56(1), 113-118.
- Lynch, W. J. (2006). Sex differences in vulnerability to drug self-administration. *Exp Clin Psychopharmacol*, 14(1), 34-41.
- Lynn, A. B., & Herkenham, M. (1994). Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*, 268(3), 1612-1623.
- Lynskey, M. (2002). An alternative model is feasible, but the gateway hypothesis has not been invalidated: comments on Morral et al. *Addiction*, 97(12), 1505-1507.

- Lyons, D., Friedman, D. P., Nader, M. A., & Porrino, L. J. (1996). Cocaine alters cerebral metabolism within the ventral striatum and limbic cortex of monkeys. *J Neurosci*, *16*(3), 1230-1238.
- Maccarrone, M., Battista, N., & Centonze, D. (2007). The endocannabinoid pathway in Huntington's disease: a comparison with other neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol*, *81*(5-6), 349-379.
- Maccarrone, M., van der Stelt, M., Rossi, A., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F., & Agro, A. F. (1998). Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem*, *273*(48), 32332-32339.
- Maccarrone, M., & Wenger, T. (2005). Effects of cannabinoids on hypothalamic and reproductive function. *Handb Exp Pharmacol*(168), 555-571.
- MacGillivray, M. H., Morishima, A., Conte, F., Grumbach, M., & Smith, E. P. (1998). Pediatric endocrinology update: an overview. The essential roles of estrogens in pubertal growth, epiphyseal fusion and bone turnover: lessons from mutations in the genes for aromatase and the estrogen receptor. *Horm Res*, *49 Suppl 1*, 2-8.
- Mackie, K., & Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(9), 3825-3829.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., & Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, *15*(10), 6552-6561.
- Mackowiak, M., Chocyk, A., Markowicz-Kula, K., & Wedzony, K. (2007). Acute activation of CB1 cannabinoid receptors transiently decreases PSA-NCAM expression in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Brain Res*, *1148*, 43-52.
- Mailleux, P., & Vanderhaeghen, J. J. (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, *48*(3), 655-668.
- Mainret, F., Patel, A. J., Lazdunski, M., & Honore, E. (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *Embo J*, *20*(1-2), 47-54.
- Malan, T. P., Jr., Ibrahim, M. M., Deng, H., Liu, Q., Mata, H. P., Vanderah, T., et al. (2001). CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain*, *93*(3), 239-245.
- Maldonado, R., & Rodriguez de Fonseca, F. (2002). Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J Neurosci*, *22*(9), 3326-3331.
- Maldonado, R., Valverde, O., & Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*, *29*(4), 225-232.
- Malenka, R. C. (2003). The long-term potential of LTP. *Nat Rev Neurosci*, *4*(11), 923-926.
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, *44*(1), 5-21.
- Manahan-Vaughan, D., & Kulla, A. (2003). Regulation of depotentiation and long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by dopamine D2-like receptors. *Cereb Cortex*, *13*(2), 123-135.
- Mann, D. R., & Plant, T. M. (2002). Leptin and pubertal development. *Semin Reprod Med*, *20*(2), 93-102.
- Manning, F. J., McDonough, J. H., Jr., Elsmore, T. F., Saller, C., & Sodetz, F. J. (1971). Inhibition of normal growth by chronic administration of delta-9-tetrahydrocannabinol. *Science*, *174*(7), 424-426.
- Mansbach, R. S., Nicholson, K. L., Martin, B. R., & Balster, R. L. (1994). Failure of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and CP 55,940 to maintain intravenous self-administration under a fixed-interval schedule in rhesus monkeys. *Behav Pharmacol*, *5*(2), 219-225.
- Manzanas, J., Uriguen, L., Rubio, G., & Palomo, T. (2004). Role of endocannabinoid system in mental diseases. *Neurotox Res*, *6*(3), 213-224.

- Marco, E. M., Llorente, R., Moreno, E., Biscaia, J. M., Guaza, C., & Viveros, M. P. (2006). Adolescent exposure to nicotine modifies acute functional responses to cannabinoid agonists in rats. *Behav Brain Res, 172*(1), 46-53.
- Markram, K., Gerardy-Schahn, R., & Sandi, C. (2007). Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience, 144*(3), 788-796.
- Martin-Calderon, J. L., Munoz, R. M., Villanua, M. A., del Arco, I., Moreno, J. L., de Fonseca, F. R., et al. (1998). Characterization of the acute endocrine actions of (-)-11-hydroxy-delta8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl (HU-210), a potent synthetic cannabinoid in rats. *Eur J Pharmacol, 344*(1), 77-86.
- Martin, B., Agurell, S., Nordqvist, M., & Lindgren, J. E. (1976). Dioxygenated metabolites of cannabidiol formed by rat liver. *J Pharm Pharmacol, 28*(8), 603-608.
- Martin, B., Nordqvist, M., Agurell, S., Lindgren, J. E., Leander, K., & Binder, M. (1976). Identification of monohydroxylated metabolites of cannabidiol formed by rat liver. *J Pharm Pharmacol, 28*(4), 275-279.
- Martin, B. R. (1986). Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacol Rev, 38*(1), 45-74.
- Martin, B. R., Balster, R. L., Razdan, R. K., Harris, L. S., & Dewey, W. L. (1981). Behavioral comparisons of the stereoisomers of tetrahydrocannabinol. *Life Sci, 29*, 565-574.
- Martin, B. R., Harvey, D. J., & Paton, W. D. (1976). Identification of new in vivo side-chain acid metabolites of delta1-tetrahydrocannabinol. *J Pharm Pharmacol, 28*(10), 773-774.
- Martin, B. R., & Lichtman, A. H. (1998). Cannabinoid transmission and pain perception. *Neurobiol Dis, 5*(6 Pt B), 447-461.
- Martin, C. A., Kelly, T. H., Rayens, M. K., Brogli, B. R., Brenzel, A., Smith, W. J., et al. (2002). Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 41*(12), 1495-1502.
- Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., & Valverde, O. (2000). Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur J Neurosci, 12*(11), 4038-4046.
- Martin, S., Lyupina, Y., Crespo, J. A., Gonzalez, B., Garcia-Lecumberri, C., & Ambrosio, E. (2003). Genetic differences in NMDA and D1 receptor levels, and operant responding for food and morphine in Lewis and Fischer 344 rats. *Brain Res, 973*(2), 205-213.
- Masterman, D. L., & Cummings, J. L. (1997). Frontal-subcortical circuits: the anatomic basis of executive, social and motivated behaviors. *J Psychopharmacol, 11*(2), 107-114.
- Mato, S., Chevaleyre, V., Robbe, D., Pazos, A., Castillo, P. E., & Manzoni, O. J. (2004). A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nat Neurosci, 7*(6), 585-586.
- Matsuda, L. A. (1997). Molecular aspects of cannabinoid receptors. *Crit Rev Neurobiol, 11*(2-3), 143-166.
- Matsuda, L. A., Bonner, T. I., & Lolait, S. J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol, 327*(4), 535-550.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature, 346*(6284), 561-564.
- Mayer, A. D., Freeman, N. C., & Rosenblatt, J. S. (1979). Ontogeny of maternal behavior in the laboratory rat: factors underlying changes in responsiveness from 30 to 90 days. *Dev Psychobiol, 12*(5), 425-439.
- Mbvundula, E. C., Bunning, R. A., & Rainsford, K. D. (2005). Effects of cannabinoids on nitric oxide production by chondrocytes and proteoglycan degradation in cartilage. *Biochem Pharmacol, 69*(4), 635-640.
- McCarberg, B. H. (2007). Cannabinoids: their role in pain and palliation. *J Pain Palliat Care Pharmacother, 21*(3), 19-28.
- McGregor, I. S., Issakidis, C. N., & Prior, G. (1996). Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacol Biochem Behav, 53*(3), 657-664.

- McMillan, D. E., Harris, L. S., Frankenheim, J. M., & Kennedy, J. S. (1970). 1-Dgr9-trans-Tetrahydrocannabinol in Pigeons: Tolerance to the Behavioral Effects. *Science*, *169*(3944), 501-503.
- Meador-Woodruff, J. H., Little, K. Y., Damask, S. P., Mansour, A., & Watson, S. J. (1993). Effects of cocaine on dopamine receptor gene expression: a study in the postmortem human brain. *Biol Psychiatry*, *34*(6), 348-355.
- Mechoulam, R. (2002). Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, *66*(2-3), 93-99.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, *50*(1), 83-90.
- Mechoulam, R., Berry, E. M., Avraham, Y., Di Marzo, V., & Fride, E. (2006). Endocannabinoids, feeding and suckling--from our perspective. *Int J Obes (Lond)*, *30 Suppl 1*, S24-28.
- Mechoulam, R., & Edery, H. (1983). Structure-activity relationship in the cannabinoid series. In S. Agurell (Ed.), *The cannabinoids: chemical, pharmacological and therateupic aspects* (pp. 101-136). Orlando: Academic Press.
- Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., & Hanus, L. O. (2007). Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers*, *4*(8), 1678-1692.
- Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G., & Gessa, G. L. (2004). Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J Neurosci*, *24*(1), 53-62.
- Melis, M. R., & Argiolas, A. (1995). Dopamine and sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, *19*(1), 19-38.
- Melis, T., Succu, S., Sanna, F., Boi, A., Argiolas, A., & Melis, M. R. (2007). The cannabinoid antagonist SR 141716A (Rimonabant) reduces the increase of extra-cellular dopamine release in the rat nucleus accumbens induced by a novel high palatable food. *Neurosci Lett*, *419*(3), 231-235.
- Melnick, S. M., Kubie, J. L., Laungani, R., & Dow-Edwards, D. L. (2001). Impairment of spatial learning following preweaning cocaine exposure in the adult rat. *Neurotoxicol Teratol*, *23*(5), 445-451.
- Menhiratta, S. S., Wig, N. N., & Verma, S. K. (1978). Some psychological correlates of long-term heavy cannabis users. *Br J Psychiatry*, *132*, 482-486.
- Merari, A., Barak, A., & Plaves, M. (1973). Effects of 1(2) -tetrahydrocannabinol on copulation in the male rat. *Psychopharmacologia*, *28*(3), 243-246.
- Mereu, G., Fa, M., Ferraro, L., Cagianò, R., Antonelli, T., Tattoli, M., et al. (2003). Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(8), 4915-4920.
- Merino, J. J., Cordero, M. I., & Sandi, C. (2000). Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. *Eur J Neurosci*, *12*(9), 3283-3290.
- Miczek, K. A., & Dixit, B. N. (1980). Behavioral and biochemical effects of chronic delta 9-tetrahydrocannabinol in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *67*(2), 195-202.
- Misner, D. L., & Sullivan, J. M. (1999). Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci*, *19*(16), 6795-6805.
- Molina-Holgado, F., Amaro, A., Gonzalez, M. I., Alvarez, F. J., & Leret, M. L. (1996). Effect of maternal delta 9-tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. *Eur J Pharmacol*, *316*(1), 39-42.
- Molina-Holgado, F., Molina-Holgado, E., & Guaza, C. (1998). The endogenous cannabinoid anandamide potentiates interleukin-6 production by astrocytes infected with Theiler's

- murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway. *FEBS Lett*, 433(1-2), 139-142.
- Molina-Holgado, F., Molina-Holgado, E., Guaza, C., & Rothwell, N. J. (2002). Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *J Neurosci Res*, 67(6), 829-836.
- Molina-Holgado, F., Pinteaux, E., Moore, J. D., Molina-Holgado, E., Guaza, C., Gibson, R. M., et al. (2003). Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci*, 23(16), 6470-6474.
- Moore, R. J., Vinsant, S. L., Nader, M. A., Porrino, L. J., & Friedman, D. P. (1998). Effect of cocaine self-administration on dopamine D2 receptors in rhesus monkeys. *Synapse*, 30(1), 88-96.
- Morilak, D. A., & Ciaranello, R. D. (1993). Ontogeny of 5-hydroxytryptamine₂ receptor immunoreactivity in the developing rat brain. *Neuroscience*, 55(3), 869-880.
- Morrall, A. R., McCaffrey, D. F., & Paddock, S. M. (2002). Reassessing the marijuana gateway effect. *Addiction*, 97(12), 1493-1504.
- Morris, A. J., & Scarlata, S. (1997). Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes. *Biochem Pharmacol*, 54(4), 429-435.
- Mukherjee, S., Adams, M., Whiteaker, K., Daza, A., Kage, K., Cassar, S., et al. (2004). Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB2 cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol*, 505(1-3), 1-9.
- Muller-Vahl, K. R. (2003). Cannabinoids reduce symptoms of Tourette's syndrome. *Expert Opin Pharmacother*, 4(10), 1717-1725.
- Muller, D., Djebbara-Hannas, Z., Jourdain, P., Vutskits, L., Durbec, P., Rougon, G., et al. (2000). Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8), 4315-4320.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., et al. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*, 17(3), 413-422.
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61-65.
- Muuss, R. E. H., & Porton, H. (1998). *Adolescent behavior and society : a book of readings* (5th ed.). Boston: McGraw-Hill.
- Nader, M. A., Daunais, J. B., Moore, T., Nader, S. H., Moore, R. J., Smith, H. R., et al. (2002). Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure. *Neuropsychopharmacology*, 27(1), 35-46.
- Natarajan, V., Schmid, P. C., Reddy, P. V., & Schmid, H. H. (1984). Catabolism of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *J Neurochem*, 42(6), 1613-1619.
- Navarro, M., de Miguel, R., Rodriguez de Fonseca, F., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1996). Perinatal cannabinoid exposure modifies the sociosexual approach behavior and the mesolimbic dopaminergic activity of adult male rats. *Behav Brain Res*, 75(1-2), 91-98.
- Navarro, M., Rubio, P., & de Fonseca, F. R. (1995). Behavioural consequences of maternal exposure to natural cannabinoids in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 122(1), 1-14.
- Navarro, M., Rubio, P., & Rodriguez de Fonseca, F. (1994). Sex-dimorphic psychomotor activation after perinatal exposure to (-)-delta 9-tetrahydrocannabinol. An ontogenic study in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 116(4), 414-422.
- Negrete, J. C. (1983). [Effect of cannabis use on health]. *Acta Psiquiatr Psicol Am Lat*, 29(4), 267-276.
- Negus, S. S., & Mello, N. K. (2002). Effects of mu-opioid agonists on cocaine- and food-maintained responding and cocaine discrimination in rhesus monkeys: role of mu-agonist efficacy. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3), 1111-1121.
- Nestler, E. J. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 24-32.

- Nordin, C., & Eklundh, T. (1999). Altered CSF 5-HIAA disposition in pathological male gamblers. *CNS Spectrums*, 4, 25-33.
- Nowicky, A. V., Teyler, T. J., & Vardaris, R. M. (1987). The modulation of long-term potentiation by delta-9-tetrahydrocannabinol in the rat hippocampus, in vitro. *Brain Res Bull*, 19(6), 663-672.
- Nurse, S., & Lacaille, J. C. (1999). Late maturation of GABA(B) synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 38(11), 1733-1742.
- O'Brien, T. G., & Robinson, J. G. (1993). Stability of social relationships in female wedge-capped capuchin monkeys. In M. E. Pereira & L. A. Fairbanks (Eds.), *Juvenile Primates* (pp. 197-210, 367-415). New York: Oxford University Press.
- O'Donnell, P., Greene, J., Pabello, N., Lewis, B. L., & Grace, A. A. (1999). Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 157-175.
- O'Shea, M., McGregor, I. S., & Mallet, P. E. (2006). Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol*, 20(5), 611-621.
- O'Shea, M., Singh, M. E., McGregor, I. S., & Mallet, P. E. (2004). Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol*, 18(4), 502-508.
- Olah, Z., Karai, L., & Iadarola, M. J. (2001). Anandamide activates vanilloid receptor 1 (VR1) at acidic pH in dorsal root ganglia neurons and cells ectopically expressing VR1. *J Biol Chem*, 276(33), 31163-31170.
- Oliva, J. M., Ortiz, S., Palomo, T., & Manzanares, J. (2003). Behavioural and gene transcription alterations induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *J Neurochem*, 85(1), 94-104.
- Onaivi, E. S. (2006). Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology*, 54(4), 231-246.
- Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A., et al. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1074, 514-536.
- Ovadia, H., Wohlman, A., Mechoulam, R., & Weidenfeld, J. (1995). Characterization of the hypothermic effect of the synthetic cannabinoid HU-210 in the rat. Relation to the adrenergic system and endogenous pyrogens. *Neuropharmacology*, 34(2), 175-180.
- Oviedo, A., Glowa, J., & Herkenham, M. (1993). Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res*, 616(1-2), 293-302.
- Ozaita, A., Puighermanal, E., & Maldonado, R. (2007). Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem*, 102(4), 1105-1114.
- Pacheco, M., Childers, S. R., Arnold, R., Casiano, F., & Ward, S. J. (1991). Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 257(1), 170-183.
- Pacheco, M. A., Ward, S. J., & Childers, S. R. (1994). Differential requirements of sodium for coupling of cannabinoid receptors to adenylyl cyclase in rat brain membranes. *J Neurochem*, 62(5), 1773-1782.
- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., & Pasquali, R. (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*, 27(1), 73-100.
- Panlilio, L. V., Solinas, M., Matthews, S. A., & Goldberg, S. R. (2006). Previous Exposure to THC Alters the Reinforcing Efficacy and Anxiety-Related Effects of Cocaine in Rats. *Neuropsychopharmacology*.
- Paredes, R. G., & Agmo, A. (2004). Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Prog Neurobiol*, 73(3), 179-226.
- Paria, B. C., Das, S. K., & Dey, S. K. (1995). The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21), 9460-9464.

- Paria, B. C., Wang, H., & Dey, S. K. (2002). Endocannabinoid signaling in synchronizing embryo development and uterine receptivity for implantation. *Chem Phys Lipids*, *121*(1-2), 201-210.
- Paton, W. D., & Pertwee, R. G. (1972). Effect of cannabis and certain of its constituents on pentobarbitone sleeping time and phenazone metabolism. *Br J Pharmacol*, *44*(2), 250-261.
- Patton, G. C., McMorris, B. J., Toumbourou, J. W., Hemphill, S. A., Donath, S., & Catalano, R. F. (2004). Puberty and the onset of substance use and abuse. *Pediatrics*, *114*(3), e300-306.
- Paus, T., Zijdenbos, A., Worsley, K., Collins, D. L., Blumenthal, J., Giedd, J. N., et al. (1999). Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science*, *283*(5409), 1908-1911.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (5. ed.). Burlington, Ma.: Elsevier Academic Press.
- Pellis, S. M., & Pellis, V. C. (1990). Differential rates of attack, defense, and counterattack during the developmental decrease in play fighting by male and female rats. *Dev Psychobiol*, *23*(3), 215-231.
- Pellis, S. M., & Pellis, V. C. (1997). The prejuvenile onset of play fighting in laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Dev Psychobiol*, *31*(3), 193-205.
- Pennartz, C. M., Groenewegen, H. J., & Lopes da Silva, F. H. (1994). The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog Neurobiol*, *42*(6), 719-761.
- Perez-Reyes, M., & Wall, M. E. (1982). Presence of delta9-tetrahydrocannabinol in human milk. *N Engl J Med*, *307*(13), 819-820.
- Perez-Rosado, A., Manzanares, J., Fernandez-Ruiz, J., & Ramos, J. A. (2000). Prenatal Delta(9)-tetrahydrocannabinol exposure modifies proenkephalin gene expression in the fetal rat brain: sex-dependent differences. *Brain Res Dev Brain Res*, *120*(1), 77-81.
- Pertwee, R. G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*, *74*(2), 129-180.
- Pertwee, R. G. (2001a). Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol*, *63*(5), 569-611.
- Pertwee, R. G. (2001b). Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut*, *48*(6), 859-867.
- Pertwee, R. G. (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol*, *152*(7), 984-986.
- Pertwee, R. G., Fernando, S. R., Griffin, G., Abadji, V., & Makriyannis, A. (1995). Effect of phenylmethylsulphonyl fluoride on the potency of anandamide as an inhibitor of electrically evoked contractions in two isolated tissue preparations. *Eur J Pharmacol*, *272*(1), 73-78.
- Petitot, F., Donlan, M., & Michel, A. (2006). GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Des*, *67*(3), 252-253.
- Pfaus, J. G., Damsma, G., Nomikos, G. G., Wenkstern, D. G., Blaha, C. D., Phillips, A. G., et al. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Res*, *530*(2), 345-348.
- Piomelli, D., Beltramo, M., Giuffrida, A., & Stella, N. (1998). Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol Dis*, *5*(6 Pt B), 462-473.
- Pistis, M., Perra, S., Pillolla, G., Melis, M., Muntoni, A. L., & Gessa, G. L. (2004). Adolescent exposure to cannabinoids induces long-lasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry*, *56*(2), 86-94.
- Porcella, A., Maxia, C., Gessa, G. L., & Pani, L. (2000). The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *Eur J Neurosci*, *12*(3), 1123-1127.
- Porrino, L. J., Daunais, J. B., Smith, H. R., & Nader, M. A. (2004). The expanding effects of cocaine: studies in a nonhuman primate model of cocaine self-administration. *Neurosci Biobehav Rev*, *27*(8), 813-820.
- Porrino, L. J., Domer, F. R., Crane, A. M., & Sokoloff, L. (1988). Selective alterations in cerebral metabolism within the mesocorticolimbic dopaminergic system produced by acute cocaine administration in rats. *Neuropsychopharmacology*, *1*(2), 109-118.

- Porter, A. C., & Felder, C. C. (2001). The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther*, 90(1), 45-60.
- Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Borna, M. J., Bao, J., et al. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(3), 1020-1024.
- Prather, P. L., Martin, N. A., Breivogel, C. S., & Childers, S. R. (2000). Activation of cannabinoid receptors in rat brain by WIN 55212-2 produces coupling to multiple G protein alpha-subunits with different potencies. *Mol Pharmacol*, 57(5), 1000-1010.
- Pujol, J., Vendrell, P., Junque, C., Marti-Vilalta, J. L., & Capdevila, A. (1993). When does human brain development end? Evidence of corpus callosum growth up to adulthood. *Ann Neurol*, 34(1), 71-75.
- Quinn, H. R., Matsumoto, I., Callaghan, P. D., Long, L. E., Arnold, J. C., Gunasekaran, N., et al. (2007). Adolescent Rats Find Repeated Delta(9)-THC Less Aversive Than Adult Rats but Display Greater Residual Cognitive Deficits and Changes in Hippocampal Protein Expression Following Exposure. *Neuropsychopharmacology*.
- Ramer, R., Brune, K., Pahl, A., & Hinz, B. (2001). R(+)-methanandamide induces cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells via a non-cannabinoid receptor-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(5), 1144-1152.
- Ranganathan, M., & D'Souza, D. C. (2006). The acute effects of cannabinoids on memory in humans: a review. *Psychopharmacology (Berl)*, 188(4), 425-444.
- Rawls, S. M., Rodriguez, T., Baron, D. A., & Raffa, R. B. (2006). A nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) attenuates abstinence-induced withdrawal from both cocaine and a cannabinoid agonist (WIN 55212-2) in Planaria. *Brain Res*, 1099(1), 82-87.
- Razdan, R. K. (1986). Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacol Rev*, 38(2), 75-149.
- Reggio, P. H., Greer, K. V., & Cox, S. M. (1989). The importance of the orientation of the C9 substituent to cannabinoid activity. *J Med Chem*, 32(7), 1630-1635.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., et al. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*, 350(2-3), 240-244.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J. M., Casellas, P., Congy, C., et al. (1998). SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 284(2), 644-650.
- Rinaldi-Carmona, M., Pialot, F., Congy, C., Redon, E., Barth, F., Bachy, A., et al. (1996). Characterization and distribution of binding sites for [3H]-SR 141716A, a selective brain (CB1) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sci*, 58(15), 1239-1247.
- Rissman, E. F. (1992). Mating induces puberty in the female musk shrew. *Biol Reprod*, 47(3), 473-477.
- Ritz, M. C., Lamb, R. J., Goldberg, S. R., & Kuhar, M. J. (1988). Cocaine self-administration appears to be mediated by dopamine uptake inhibition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 12(2-3), 233-239.
- Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J., & Manzoni, O. J. (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci*, 21(1), 109-116.
- Robbe, D., Montgomery, S. M., Thome, A., Rueda-Orozco, P. E., McNaughton, B. L., & Buzsaki, G. (2006). Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci*, 9(12), 1526-1533.
- Robinson, L., Goonawardena, A. V., Pertwee, R. G., Hampson, R. E., & Riedel, G. (2007). The synthetic cannabinoid HU210 induces spatial memory deficits and suppresses hippocampal firing rate in rats. *Br J Pharmacol*, 151(5), 688-700.

- Rodriguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Fernandez-Ruiz, J. J., Navarro, M., & Ramos, J. A. (1991). Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience*, *43*(2-3), 713-723.
- Rodriguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Hernandez, M. L., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1990). Changes in brain dopaminergic indices induced by perinatal exposure to cannabinoids in rats. *Brain Res Dev Brain Res*, *51*(2), 237-240.
- Rodriguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Ramos, J. A., Martin, M., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1994). Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Sci*, *54*(3), 159-170.
- Rodriguez De Fonseca, F., Gorriti, M. A., Bilbao, A., Escuredo, L., Garcia-Segura, L. M., Piomelli, D., et al. (2001). Role of the endogenous cannabinoid system as a modulator of dopamine transmission: implications for Parkinson's disease and schizophrenia. *Neurotox Res*, *3*(1), 23-35.
- Rodriguez de Fonseca, F., Ramos, J. A., Bonnin, A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1993). Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport*, *4*(2), 135-138.
- Rodriguez de Fonseca, F., Wenger, T., Navarro, M., & Murphy, L. L. (1999). Effects of delta9-THC on VIP-induced prolactin secretion in anterior pituitary cultures: evidence for the presence of functional cannabinoid CB1 receptors in pituitary cells. *Brain Res*, *841*(1-2), 114-122.
- Romero, E. M., Fernandez, B., Sagredo, O., Gomez, N., Uriguen, L., Guaza, C., et al. (2002). Antinociceptive, behavioural and neuroendocrine effects of CP 55,940 in young rats. *Brain Res Dev Brain Res*, *136*(2), 85-92.
- Romero, J., Berrendero, F., Manzanares, J., Perez, A., Corchero, J., Fuentes, J. A., et al. (1998). Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta9-tetrahydrocannabinol. *Synapse*, *30*(3), 298-308.
- Romero, J., de Miguel, R., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1998). The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci*, *62*(4), 351-363.
- Romero, J., Garcia-Palomero, E., Berrendero, F., Garcia-Gil, L., Hernandez, M. L., Ramos, J. A., et al. (1997). Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. *Synapse*, *26*(3), 317-323.
- Romero, J., Garcia, L., Cebeira, M., Zadrozny, D., Fernandez-Ruiz, J. J., & Ramos, J. A. (1995). The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci*, *56*(23-24), 2033-2040.
- Ronesi, J., Gerdeman, G. L., & Lovinger, D. M. (2004). Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J Neurosci*, *24*(7), 1673-1679.
- Ronn, L. C., Bock, E., Linnemann, D., & Jahnsen, H. (1995). NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res*, *677*(1), 145-151.
- Ross, R. A., Coutts, A. A., McFarlane, S. M., Anavi-Goffer, S., Irving, A. J., Pertwee, R. G., et al. (2001). Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology*, *40*(2), 221-232.
- Roth, M. E., Cosgrove, K. P., & Carroll, M. E. (2004). Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*, *28*(6), 533-546.
- Rowlett, J. K., Platt, D. M., Yao, W. D., & Spealman, R. D. (2007). Modulation of heroin and cocaine self-administration by dopamine D1- and D2-like receptor agonists in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, *321*(3), 1135-1143.
- Rubino, T., Vigano, D., Realini, N., Guidali, C., Braida, D., Capurro, V., et al. (2008). Chronic Delta(9)-Tetrahydrocannabinol During Adolescence Provokes Sex-Dependent Changes in the Emotional Profile in Adult Rats: Behavioral and Biochemical Correlates. *Neuropsychopharmacology*.

- Rubio, P., Rodriguez de Fonseca, F., Munoz, R. M., Ariznavarreta, C., Martin-Calderon, J. L., & Navarro, M. (1995). Long-term behavioral effects of perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol in rats: possible role of pituitary-adrenal axis. *Life Sci*, *56*(23-24), 2169-2176.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., et al. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, *152*(7), 1092-1101.
- Ryberg, E., Vu, H. K., Larsson, N., Groblewski, T., Hjorth, S., Elebring, T., et al. (2005). Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett*, *579*(1), 259-264.
- Sagredo, O., Garcia-Arencibia, M., de Lago, E., Finetti, S., Decio, A., & Fernandez-Ruiz, J. (2007). Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol*, *36*(1), 82-91.
- Sanchez, C., Galve-Roperh, I., Rueda, D., & Guzman, M. (1998). Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol*, *54*(5), 834-843.
- Sanchez, C., Rueda, D., Segui, B., Galve-Roperh, I., Levade, T., & Guzman, M. (2001). The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol*, *59*(5), 955-959.
- Sancho, R., Calzado, M. A., Di Marzo, V., Appendino, G., & Munoz, E. (2003). Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. *Mol Pharmacol*, *63*(2), 429-438.
- Sano, M., Marder, K., & Dooneief, G. (1996). Basal ganglia diseases. In B. S. Fogel, R. B. Schiffer & S. M. Rao (Eds.), *Neuropsychiatry* (pp. 805-834). Baltimore: Williams&Wilkins.
- Sanudo-Pena, M. C., Tsou, K., Delay, E. R., Hohman, A. G., Force, M., & Walker, J. M. (1997). Endogenous cannabinoids as an aversive or counter-rewarding system in the rat. *Neurosci Lett*, *223*(2), 125-128.
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D. K., Lynch, K. R., Cheng, R., Heng, H. H., et al. (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, *64*(2), 193-198.
- Scorticati, C., Fernandez-Solari, J., De Laurentiis, A., Mohn, C., Prestifilippo, J. P., Lasaga, M., et al. (2004). The inhibitory effect of anandamide on luteinizing hormone-releasing hormone secretion is reversed by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(32), 11891-11896.
- Scorticati, C., Mohn, C., De Laurentiis, A., Vissio, P., Fernandez Solari, J., Seilicovich, A., et al. (2003). The effect of anandamide on prolactin secretion is modulated by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(4), 2134-2139.
- Schatz, A. R., Lee, M., Condie, R. B., Pulaski, J. T., & Kaminski, N. E. (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol*, *142*(2), 278-287.
- Schechter, M. D., & Calcagnetti, D. J. (1993). Trends in place preference conditioning with a cross-indexed bibliography; 1957-1991. *Neurosci Biobehav Rev*, *17*(1), 21-41.
- Schlicker, E., & Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci*, *22*(11), 565-572.
- Schmid, P. C., Paria, B. C., Krebsbach, R. J., Schmid, H. H., & Dey, S. K. (1997). Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(8), 4188-4192.
- Schneider, M., Drews, E., & Koch, M. (2005). Behavioral effects in adult rats of chronic prepubertal treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Behav Pharmacol*, *16*(5-6), 447-454.
- Schneider, M., & Koch, M. (2003). Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, *28*(10), 1760-1769.

- Schramm, N. L., Egli, R. E., & Winder, D. G. (2002). LTP in the mouse nucleus accumbens is developmentally regulated. *Synapse*, *45*(4), 213-219.
- Schuel, H., Burkman, L. J., Lippes, J., Crickard, K., Mahony, M. C., Giuffrida, A., et al. (2002). Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol Reprod Dev*, *63*(3), 376-387.
- Schwartz, R. H., Gruenewald, P. J., Klitzner, M., & Fedio, P. (1989). Short-term memory impairment in cannabis-dependent adolescents. *Am J Dis Child*, *143*(10), 1214-1219.
- Sebret, A., Lena, I., Crete, D., Matsui, T., Roques, B. P., & Dauge, V. (1999). Rat hippocampal neurons are critically involved in physiological improvement of memory processes induced by cholecystinin-B receptor stimulation. *J Neurosci*, *19*(16), 7230-7237.
- Selley, D. E., Cassidy, M. P., Martin, B. R., & Sim-Selley, L. J. (2004). Long-term administration of Delta9-tetrahydrocannabinol desensitizes CB1-, adenosine A1-, and GABAB-mediated inhibition of adenylyl cyclase in mouse cerebellum. *Mol Pharmacol*, *66*(5), 1275-1284.
- Senkov, O., Sun, M., Weinhold, B., Gerardy-Schahn, R., Schachner, M., & Dityatev, A. (2006). Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in induction of long-term potentiation and memory acquisition and consolidation in a fear-conditioning paradigm. *J Neurosci*, *26*(42), 10888-109898.
- Sharkey, K. A., & Pittman, Q. J. (2005). Central and peripheral signaling mechanisms involved in endocannabinoid regulation of feeding: a perspective on the munchies. *Sci STKE*, *2005*(277), pe15.
- Shen, M., Piser, T. M., Seybold, V. S., & Thayer, S. A. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci*, *16*(14), 4322-4334.
- Sheng, W. S., Hu, S., Min, X., Cabral, G. A., Lokensgard, J. R., & Peterson, P. K. (2005). Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia*, *49*(2), 211-219.
- Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., et al. (1995). An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem*, *270*(8), 3726-3731.
- Shivachar, A. C., Martin, B. R., & Ellis, E. F. (1996). Anandamide- and delta9-tetrahydrocannabinol-evoked arachidonic acid mobilization and blockade by SR141716A [N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboximide hydrochloride]. *Biochem Pharmacol*, *51*(5), 669-676.
- Shoham, S., Marcus, E. L., Abraham, Y., & Berri, E. M. (2000). Diet restriction increases enkephalin- and dynorphin-like immunoreactivity in rat brain and attenuates long-term retention of passive avoidance. *Nutr. Neurosci.*, *3*, 41-45.
- Shughrue, P. J., & Merchenthaler, I. (2000). Estrogen is more than just a "sex hormone": novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. *Front Neuroendocrinol*, *21*(1), 95-101.
- Sidlo, Z., Reggio, P. H., & Rice, M. E. (2008). Inhibition of striatal dopamine release by CB1 receptor activation requires nonsynaptic communication involving GABA, H(2)O(2), and K(ATP) channels. *Neurochem Int*, *52*(1-2), 80-88.
- Sim, L. J., Hampson, R. E., Deadwyler, S. A., & Childers, S. R. (1996). Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci*, *16*(24), 8057-8066.
- Sim, L. J., Selley, D. E., Xiao, R., & Childers, S. R. (1996). Differences in G-protein activation by mu- and delta-opioid, and cannabinoid, receptors in rat striatum. *Eur J Pharmacol*, *307*(1), 97-105.
- Sisk, C. L., & Foster, D. L. (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci*, *7*(10), 1040-1047.
- Sisk, C. L., & Zehr, J. L. (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol*, *26*(3-4), 163-174.

- Slanina, K. A., Roberto, M., & Schweitzer, P. (2005). Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology*, 49(5), 660-668.
- Slipetz, D. M., O'Neill, G. P., Favreau, L., Dufresne, C., Gallant, M., Gareau, Y., et al. (1995). Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol*, 48(2), 352-361.
- Smart, D., Gunthorpe, M. J., Jerman, J. C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A. I., et al. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol*, 129(2), 227-230.
- Smart, D., & Jerman, J. C. (2000). Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 21(4), 134.
- Smith, J. E., Co, C., Yin, X., Sizemore, G. M., Liguori, A., Johnson, W. E., 3rd, et al. (2004). Involvement of cholinergic neuronal systems in intravenous cocaine self-administration. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(8), 841-850.
- Smith, P. B., Compton, D. R., Welch, S. P., Razdan, R. K., Mechoulam, R., & Martin, B. R. (1994). The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 270(1), 219-227.
- Smith, P. K. (1987). Does play matter? Functional and evolutionary aspects of animals and human play. *The Behavioral and Brain Sciences*, 5, 139-184.
- Solinas, M., Panlilio, L. V., & Goldberg, S. R. (2004). Exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) increases subsequent heroin taking but not heroin's reinforcing efficacy: a self-administration study in rats. *Neuropsychopharmacology*, 29(7), 1301-1311.
- Song, C., & Howlett, A. C. (1995). Rat brain cannabinoid receptors are N-linked glycosylated proteins. *Life Sci*, 56(23-24), 1983-1989.
- Soria, G., Castane, A., Berrendero, F., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., et al. (2004). Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur J Neurosci*, 20(8), 2203-2213.
- Soria, G., Mendizabal, V., Tourino, C., Robledo, P., Ledent, C., Parmentier, M., et al. (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, 30(9), 1670-1680.
- Soueif, M. I. (1976). Some determinants of psychological deficits associated with chronic cannabis consumption. *Bull Narc*, 28(1), 25-42.
- Sowell, E. R., Peterson, B. S., Thompson, P. M., Welcome, S. E., Henkenius, A. L., & Toga, A. W. (2003). Mapping cortical change across the human life span. *Nat Neurosci*, 6(3), 309-315.
- Sowell, E. R., Thompson, P. M., Tessner, K. D., & Toga, A. W. (2001). Mapping continued brain growth and gray matter density reduction in dorsal frontal cortex: Inverse relationships during postadolescent brain maturation. *J Neurosci*, 21(22), 8819-8829.
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*, 24(4), 417-463.
- Spear, L. P., Shalaby, I. A., & Brick, J. (1980). Chronic administration of haloperidol during development: behavioral and psychopharmacological effects. *Psychopharmacology (Berl)*, 70(1), 47-58.
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem*, 82(3), 171-177.
- Stanwood, G. D., McElligot, S., Lu, L., & McGonigle, P. (1997). Ontogeny of dopamine D3 receptors in the nucleus accumbens of the rat. *Neurosci Lett*, 223(1), 13-16.
- Stark-Adamec, C., Adamec, R. E., & Pihl, R. O. (1981). The subjective marijuana experience: great expectations. *Int J Addict*, 16(7), 1169-1181.
- Steinberg, L. (1989). Pubertal maturation and parent-adolescent distance: an evolutionary perspective. In G. R. Adams, R. Montemayor & T. P. Gullota (Eds.), *Advances in adolescent behavior and development* (pp. 71-97). Newbury Park: Sage Publications.
- Stella, N., Schweitzer, P., & Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644), 773-778.

- Stiglick, A., & Kalant, H. (1985). Residual effects of chronic cannabis treatment on behavior in mature rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 85(4), 436-439.
- Sugiura, T., Kondo, S., Kishimoto, S., Miyashita, T., Nakane, S., Kodaka, T., et al. (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J Biol Chem*, 275(1), 605-612.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., et al. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215(1), 89-97.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Tonegawa, T., Nakane, S., Yamashita, A., et al. (1996). Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochem Biophys Res Commun*, 218(1), 113-117.
- Sugiura, T., & Waku, K. (2000). 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids*, 108(1-2), 89-106.
- Sulcova, E., Mechoulam, R., & Fride, E. (1998). Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol Biochem Behav*, 59(2), 347-352.
- Sullivan, J. M. (2000). Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learn Mem*, 7(3), 132-139.
- Sun, W., & Rebec, G. V. (2005). The role of prefrontal cortex D1-like and D2-like receptors in cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 177(3), 315-323.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., & Gilman, A. G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 461-480.
- Swanson, L. W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res*, 886(1-2), 113-164.
- Szabo, B., Muller, T., & Koch, H. (1999). Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem*, 73(3), 1084-1089.
- Szabo, B., Siemes, S., & Wallmichrath, I. (2002). Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur J Neurosci*, 15(12), 2057-2061.
- Takahashi, R. N., & Singer, G. (1979). Self-administration of delta 9-tetrahydrocannabinol by rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 11(6), 737-740.
- Takeuchi, Y., Matsushita, H., Sakai, H., Kawano, H., Yoshimoto, K., & Sawada, T. (2000). Developmental changes in cerebrospinal fluid concentrations of monoamine-related substances revealed with a Coulochem electrode array system. *J Child Neurol*, 15(4), 267-270.
- Tanda, G., Loddo, P., & Di Chiara, G. (1999). Dependence of mesolimbic dopamine transmission on delta9-tetrahydrocannabinol. *Eur J Pharmacol*, 376(1-2), 23-26.
- Tanda, G., Munzar, P., & Goldberg, S. R. (2000). Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat Neurosci*, 3(11), 1073-1074.
- Tanda, G., Pontieri, F. E., & Di Chiara, G. (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, 276(5321), 2048-2050.
- Tanner, J. M., & Davies, P. S. (1985). Clinical longitudinal standards for height and height velocity for North American children. *J Pediatr*, 107(3), 317-329.
- Tarazi, F. I., & Baldessarini, R. J. (2000). Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. *Int J Dev Neurosci*, 18(1), 29-37.
- Tarazi, F. I., Tomasini, E. C., & Baldessarini, R. J. (1998). Postnatal development of dopamine and serotonin transporters in rat caudate-putamen and nucleus accumbens septi. *Neurosci Lett*, 254(1), 21-24.

- Taylor, J. R., & Jentsch, J. D. (2001). Repeated intermittent administration of psychomotor stimulant drugs alters the acquisition of Pavlovian approach behavior in rats: differential effects of cocaine, d-amphetamine and 3,4- methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy"). *Biol Psychiatry*, 50(2), 137-143.
- Teicher, M. H. (1999). *Limbic serotonin turnover plunges during puberty*. Paper presented at the Meeting of the Society for Neuroscience.
- Teicher, M. H., Andersen, S. L., & Hostetter, J. C., Jr. (1995). Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Brain Res Dev Brain Res*, 89(2), 167-172.
- Terranova, J. P., Michaud, J. C., Le Fur, G., & Soubrie, P. (1995). Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716 A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 352(5), 576-579.
- Terranova, J. P., Storme, J. J., Lafon, N., Perio, A., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., et al. (1996). Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology (Berl)*, 126(2), 165-172.
- Thomas, M. J., & Malenka, R. C. (2003). Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1432), 815-819.
- Thompson, A. M., Swant, J., Gosnell, B. A., & Wagner, J. J. (2004). Modulation of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine self-administration. *Neuroscience*, 127(1), 177-185.
- Toth, G., & Fekete, M. (1986). 5-Hydroxyindole acetic excretion in newborns, infants and children. *Acta Paediatr Hung*, 27(3), 221-226.
- Trad, P. V. (1994). Developmental vicissitudes that promote drug abuse in adolescents. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 20(4), 459-481.
- Trimpop, R. M., Kerr, J. H., & Kirkcaldy, B. (1999). Comparing personality constructs of risk-taking behavior. *Personality and Individual Differences*, 26, 237-254.
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83(2), 393-411.
- Tzavara, E. T., Davis, R. J., Perry, K. W., Li, X., Salhoff, C., Bymaster, F. P., et al. (2003). The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol*, 138(4), 544-553.
- Tzavara, E. T., Valjent, E., Firmo, C., Mas, M., Beslot, F., Defer, N., et al. (2000). Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum. *Eur J Neurosci*, 12(3), 1038-1046.
- Tzavara, E. T., Wade, M., & Nomikos, G. G. (2003). Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *J Neurosci*, 23(28), 9374-9384.
- Tzilos, G. K., Cintron, C. B., Wood, J. B., Simpson, N. S., Young, A. D., Pope, H. G., Jr., et al. (2005). Lack of hippocampal volume change in long-term heavy cannabis users. *Am J Addict*, 14(1), 64-72.
- Tzschentke, T. M., & Schmidt, W. J. (2000). Differential effects of discrete subarea-specific lesions of the rat medial prefrontal cortex on amphetamine- and cocaine-induced behavioural sensitization. *Cereb Cortex*, 10(5), 488-498.
- Ueda, N., Puffenbarger, R. A., Yamamoto, S., & Deutsch, D. G. (2000). The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem Phys Lipids*, 108(1-2), 107-121.
- Ueki, S., Fujiwara, M., & Ogawa, N. (1972). Mouse-killing behavior (muricide) induced by delta 9-tetrahydrocannabinol in the rat. *Physiol Behav*, 9(4), 585-587.
- Ulugol, A., Karadag, H. C., Ipci, Y., Tamer, M., & Dokmeci, I. (2004). The effect of WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, on tactile allodynia in diabetic rats. *Neurosci Lett*, 371(2-3), 167-170.

- Ungless, M. A., Whistler, J. L., Malenka, R. C., & Bonci, A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*, *411*(6837), 583-587.
- van Furth, W. R., & van Ree, J. M. (1994). Endogenous opioids and sexual motivation and performance during the light phase of the diurnal cycle. *Brain Res*, *636*(1), 175-179.
- Van Furth, W. R., Wolterink-Donselaar, I. G., & van Ree, J. M. (1994). Endogenous opioids are differentially involved in appetitive and consummatory aspects of sexual behavior of male rats. *Am J Physiol*, *266*(2 Pt 2), R606-613.
- Van Gaal, L. F., Rissanen, A. M., Scheen, A. J., Ziegler, O., & Rossner, S. (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*, *365*(9468), 1389-1397.
- van Oosten, B., Killestein, J., & Polman, C. (2005). Effect of rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk. *Lancet*, *366*(9483), 368-369; author reply 369-370.
- Vannucchi, M. G., Scali, C., Kopf, S. R., Pepeu, G., & Casamenti, F. (1997). Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. *Neuroscience*, *79*(3), 837-846.
- Vaquero, J. J., Lage, E., Rincón, L., Abella, M., Vicente, E., & Desco, M. (2005). *rPET Detectors Design and Data Processing*. Paper presented at the IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record (CD-ROM).
- Vela, G., Fuentes, J. A., Bonnin, A., Fernandez-Ruiz, J., & Ruiz-Gayo, M. (1995). Perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) leads to changes in opioid-related behavioral patterns in rats. *Brain Res*, *680*(1-2), 142-147.
- Vela, G., Martin, S., Garcia-Gil, L., Crespo, J. A., Ruiz-Gayo, M., Javier Fernandez-Ruiz, J., et al. (1998). Maternal exposure to delta9-tetrahydrocannabinol facilitates morphine self-administration behavior and changes regional binding to central mu opioid receptors in adult offspring female rats. *Brain Res*, *807*(1-2), 101-109.
- Venero, C., Herrero, A. I., Touyarot, K., Cambon, K., Lopez-Fernandez, M. A., Berezin, V., et al. (2006). Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory. *Eur J Neurosci*, *23*(6), 1585-1595.
- Vickers, S. P., & Kennett, G. A. (2005). Cannabinoids and the regulation of ingestive behaviour. *Curr Drug Targets*, *6*(2), 215-223.
- Villares, J. (2007). Chronic use of marijuana decreases cannabinoid receptor binding and mRNA expression in the human brain. *Neuroscience*, *145*(1), 323-334.
- Vincent, B. J., McQuiston, D. J., Einhorn, L. H., Nagy, C. M., & Brame, M. J. (1983). Review of cannabinoids and their antiemetic effectiveness. *Drugs*, *25 Suppl 1*, 52-62.
- Virkkunen, M., Rawlings, R., Tokola, R., Poland, R. E., Guidotti, A., Nemeroff, C., et al. (1994). CSF biochemistries, glucose metabolism, and diurnal activity rhythms in alcoholic, violent offenders, fire setters, and healthy volunteers. *Arch Gen Psychiatry*, *51*(1), 20-27.
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, *2*(7), 489-501.
- Viveros, M. P., Llorente, R., Moreno, E., & Marco, E. M. (2005). Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behav Pharmacol*, *16*(5-6), 353-362.
- Vogel, Z., Barg, J., Levy, R., Saya, D., Heldman, E., & Mechoulam, R. (1993). Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *J Neurochem*, *61*(1), 352-355.
- Volkow, N. D., Gillespie, H., Mullani, N., Tancredi, L., Grant, C., Ivanovic, M., et al. (1991). Cerebellar metabolic activation by delta-9-tetrahydro-cannabinol in human brain: a study with positron emission tomography and 18F-2-fluoro-2-deoxyglucose. *Psychiatry Res*, *40*(1), 69-78.
- Volkow, N. D., Hitzemann, R., Wang, G. J., Fowler, J. S., Wolf, A. P., Dewey, S. L., et al. (1992). Long-term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers. *Synapse*, *11*(3), 184-190.

- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Logan, J., Gatley, S. J., Hitzemann, R., et al. (1997). Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature*, 386(6627), 830-833.
- Vorel, S. R., Liu, X., Hayes, R. J., Spector, J. A., & Gardner, E. L. (2001). Relapse to cocaine-seeking after hippocampal theta burst stimulation. *Science*, 292(5519), 1175-1178.
- Vrana, S. L., Vrana, K. E., Koves, T. R., Smith, J. E., & Dworkin, S. I. (1993). Chronic cocaine administration increases CNS tyrosine hydroxylase enzyme activity and mRNA levels and tryptophan hydroxylase enzyme activity levels. *J Neurochem*, 61(6), 2262-2268.
- Wada, K. (1999). [The concept of "gateway drug"]. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 34(2), 95-106.
- Wakamatsu, K., Masaki, T., Itoh, F., Kondo, K., & Sudo, K. (1990). Isolation of fatty acid amide as an angiogenic principle from bovine mesentery. *Biochem Biophys Res Commun*, 168(2), 423-429.
- Walsh, S. L., & Cunningham, K. A. (1997). Serotonergic mechanisms involved in the discriminative stimulus, reinforcing and subjective effects of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)*, 130(1), 41-58.
- Wang, J., & Ueda, N. (2008). Role of the endocannabinoid system in metabolic control. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 17(1), 1-10.
- Wang, X., Dow-Edwards, D., Keller, E., & Hurd, Y. L. (2003). Preferential limbic expression of the cannabinoid receptor mRNA in the human fetal brain. *Neuroscience*, 118(3), 681-694.
- Watanabe, K., Kayano, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, I., & Yoshimura, H. (1996). Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. *Biol Pharm Bull*, 19(8), 1109-1111.
- Watson, S. J., Benson, J. A., Jr., & Joy, J. E. (2000). Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. *Arch Gen Psychiatry*, 57(6), 547-552.
- Weckowicz, T. E., Collier, G., & Spreng, L. (1977). Field dependence, cognitive functions, personality traits, and social values in heavy cannabis users and nonuser controls. *Psychol Rep*, 41(1), 291-302.
- Weidenfeld, J., Feldman, S., & Mechoulam, R. (1994). Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology*, 59(2), 110-112.
- Wenger, T., Croix, D., Tramu, G., & Leonardelli, J. (1992). [Marijuana and reproduction. Effects on puberty and gestation in female rats. Experimental results]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 53(1), 37-43.
- Wenger, T., Fragkakis, G., Giannikou, P., & Yiannikakis, N. (1997). The effects of prenatally administered endogenous cannabinoid on rat offspring. *Pharmacol Biochem Behav*, 58(2), 537-544.
- Wenger, T., Ledent, C., & Tramu, G. (2003). The endogenous cannabinoid, anandamide, activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Neuroendocrinology*, 78(6), 294-300.
- Wenger, T., & Moldrich, G. (2002). The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66(2-3), 301-307.
- Wert, R. C., & Raulin, M. L. (1986). The chronic cerebral effects of cannabis use. II. Psychological findings and conclusions. *Int J Addict*, 21(6), 629-642.
- Westlake, T. M., Howlett, A. C., Bonner, T. I., Matsuda, L. A., & Herkenham, M. (1994). Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience*, 63(3), 637-652.
- Whitlow, C. T., Freedland, C. S., & Porrino, L. J. (2002). Metabolic mapping of the time-dependent effects of delta 9-tetrahydrocannabinol administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 161(2), 129-136.

- Whitlow, C. T., Freedland, C. S., & Porrino, L. J. (2003). Functional consequences of the repeated administration of Delta9-tetrahydrocannabinol in the rat. *Drug Alcohol Depend*, *71*(2), 169-177.
- Wilson, J. M., & Kish, S. J. (1996). The vesicular monoamine transporter, in contrast to the dopamine transporter, is not altered by chronic cocaine self-administration in the rat. *J Neurosci*, *16*(10), 3507-3510.
- Wilson, J. M., Levey, A. I., Bergeron, C., Kalasinsky, K., Ang, L., Peretti, F., et al. (1996). Striatal dopamine, dopamine transporter, and vesicular monoamine transporter in chronic cocaine users. *Ann Neurol*, *40*(3), 428-439.
- Wilson, J. M., Nobrega, J. N., Carroll, M. E., Niznik, H. B., Shannak, K., Lac, S. T., et al. (1994). Heterogeneous subregional binding patterns of 3H-WIN 35,428 and 3H-GBR 12,935 are differentially regulated by chronic cocaine self-administration. *J Neurosci*, *14*(5 Pt 2), 2966-2979.
- Wilson, J. M., Nobrega, J. N., Corrigall, W. A., Coen, K. M., Shannak, K., & Kish, S. J. (1994). Amygdala dopamine levels are markedly elevated after self- but not passive-administration of cocaine. *Brain Res*, *668*(1-2), 39-45.
- Wilson, M., & Daly, M. (1985). Competitiveness, risk taking and violence: the young male syndrome. *Ethological Sociobiology*, 59-73.
- Wilson, W., Mathew, R., Turkington, T., Hawk, T., Coleman, R. E., & Provenzale, J. (2000). Brain morphological changes and early marijuana use: a magnetic resonance and positron emission tomography study. *J Addict Dis*, *19*(1), 1-22.
- Witkin, J. M., Savtchenko, N., Mashkovsky, M., Beekman, M., Munzar, P., Gasior, M., et al. (1999). Behavioral, toxic, and neurochemical effects of sydnocarb, a novel psychomotor stimulant: comparisons with methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*, *288*(3), 1298-1310.
- Woodward, D. J., Chang, J. Y., Janak, P., Azarov, A., & Anstrom, K. (1999). Mesolimbic neuronal activity across behavioral states. *Ann N Y Acad Sci*, *877*, 91-112.
- Woolverton, W. L., & Virus, R. M. (1989). The effects of a D1 and a D2 dopamine antagonist on behavior maintained by cocaine or food. *Pharmacol Biochem Behav*, *32*(3), 691-697.
- Xi, Z. X., Gilbert, J. G., Peng, X. Q., Pak, A. C., Li, X., & Gardner, E. L. (2006). Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, *26*(33), 8531-8536.
- Yakovlev, P. A., & Lecours, I. R. (1967). The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. In A. Minkowski (Ed.), *Regional development of the brain in early life* (pp. 3-70). Oxford: Blackwell.
- Young, A. M., Katz, J. L., & Woods, J. H. (1981). Behavioral effects of levonantradol and nantradol in the rhesus monkey. *J Clin Pharmacol*, *21*(8-9 Suppl), 348S-360S.
- Zhuang, S., Kittler, J., Grigorenko, E. V., Kirby, M. T., Sim, L. J., Hampson, R. E., et al. (1998). Effects of long-term exposure to delta9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res*, *62*(2), 141-149.
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., et al. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, *400*(6743), 452-457.

APÉNDICE DOCUMENTAL

Augmented Acquisition of Cocaine Self-Administration and Altered Brain Glucose Metabolism in Adult Female but not Male Rats Exposed to a Cannabinoid Agonist during Adolescence

Alejandro Higuera-Matas¹, María Luisa Soto-Montenegro², Nuria del Olmo¹, Miguel Miguéns¹, Isabel Torres¹, Juan José Vaquero², Javier Sánchez², Carmen García-Lecumberri¹, Manuel Desco² and Emilio Ambrosio*¹

¹Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, Spain; ²Laboratorio de Imagen Médica, Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, Hospital General Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Marijuana consumption during adolescence has been proposed to be a stepping-stone for adult cocaine addiction. However, experimental evidence for this hypothesis is missing. In this work we chronically injected male and female Wistar rats with either the cannabinoid agonist CP 55,940 (CP; 0.4 mg/kg) or its corresponding vehicle. Adult acquisition (seven 30 min daily sessions) and maintenance (fourteen 2 h daily sessions) of cocaine self-administration (1 mg/kg), food-reinforced operant learning under conditions of normal (*ad libitum* access to food), and high motivation (food-restriction schedule) were measured. Additionally, brain metabolic activity was analyzed by means of [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. During the acquisition phase, female CP-treated rats showed a higher rate of cocaine self-administration as compared to vehicle-treated females and males; no differences were found between both male groups. This effect disappeared in the maintenance phase. Moreover, no differences among groups were evident in the food-reinforced operant task, pointing to the cocaine-specific nature of the effect seen in self-administration rather than a general change in reward processing. Basal brain metabolic activity also changed in CP-treated females when compared to their vehicle-treated counterparts with no differences being found in the males; more specifically we observed a hyper activation of the frontal cortex and a hypo activation of the amygdalo-entorhinal cortex. Our results suggest that a chronic exposure to cannabinoids during adolescence alters the susceptibility to acquire cocaine self-administration, in a sex-specific fashion. This increased susceptibility could be related to the changes in brain metabolic activity induced by cannabinoids during adolescence.

Neuropsychopharmacology advance online publication, 6 June 2007; doi:10.1038/sj.npp.1301467

Keywords: cannabinoids; PET; brain metabolism; cocaine; self-administration; gateway hypothesis

INTRODUCTION

Epidemiological studies show that the adolescent stage is a developmental period with increased risk of drug abuse (Fried *et al*, 2001; Martin *et al*, 2002; Patton *et al*, 2004; Trad, 1994). Marijuana is widely consumed at this phase of life (Gruber and Pope, 2002) and there is evidence that using the drug at this stage could facilitate later drug abuse, a phenomenon that has been termed the gateway hypothesis (Kandel *et al*, 2006). There is a great variability in human studies in regard to culture, social, and economic background, and education level of the subjects, thus it is

difficult to establish causal links between adolescent marijuana consumption and adult drug abuse. Therefore, experimental studies are needed to clarify this issue (Kandel, 2003) and they are beginning to shed light on some aspects of the problem.

For instance, it has been shown that the peripubertal stage is a critical phase with special neurobehavioral plasticity and an increased vulnerability to the consequences of psychoactive drug exposure (Adriani and Laviola, 2004). Moreover, there is some evidence that a window of high vulnerability exists during adolescence, especially in the peripubertal period, where chronic cannabis administration exerts long-lasting effects on brain and behavior (Schneider and Koch, 2003; see Viveros *et al*, 2005 for review). Also, in a previous work we demonstrated that a chronic exposure to the cannabinoid agonist CP 55,940 (CP) during puberty (P35–P45) induced sex-dependent changes in locomotor activity and anxiety responses that were evident in adulthood (Biscaia *et al*, 2003). Other authors have also reported

*Correspondence: Dr E Ambrosio, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia, C/Juan del Rosal n°10, 28040 Madrid, Spain, Tel: +34 913 987 974, Fax: +34 913 986 287, E-mail: eambrosio@psi.uned.es
Received 17 November 2006; revised 2 May 2007; accepted 3 May 2007

long-term effects of cannabinoids when administered during adolescence. Schneider and Koch (2003) found impairments in sensorimotor gating, recognition memory, and performance in a progressive ratio task when the cannabinoid was administered specifically during puberty (P40-P65) but not adulthood. Schneider *et al* (2005), also observed alterations in prepulse inhibition and anxiety responses in adult rats that had been chronically treated with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 during puberty. Additionally, it has been reported that the cannabinoid system is still maturing during adolescence, and that the density levels (Rodriguez de Fonseca *et al*, 1993) and mRNA expression (McLaughlin *et al*, 1994) of the CB1 receptor peak between P30 and P40, and then rapidly decline to reach usual adult values (Rodriguez de Fonseca *et al*, 1993).

There have been several studies on the possible interactions between cannabinoids and the rewarding actions of psychostimulants, with no clear conclusions (see Arnold, 2005 for a review). However, most of these experiments have been performed in adult animals with their cannabinoid system already matured. It can be argued that if the stimulation of the cannabinoid system had occurred earlier in life, when it was still developing (ie during adolescence), a more profound alteration of the brain's neurochemical messengers would have been evident.

One of the systems that could be affected by a chronic cannabis exposure is the mesocorticolimbic dopaminergic system, which is widely involved in reward processing both in humans (Franken *et al*, 2005) and animals (Di Chiara *et al*, 2004). Supporting this fact, it has been shown that an adolescent exposure to cannabinoids induces long-lasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons (Pistis *et al*, 2004). This sensitization of the dopaminergic system could provide a mechanistic explanation for the vulnerability to cocaine addiction shown by subjects that have consumed cannabinoids during their adolescence. However, the contribution of other neurochemical systems, such as those of acetylcholine, serotonin, opioids, and glutamate among others (Adewale *et al*, 2006; Negus and Mello, 2002; Smith *et al*, 2004; Walsh and Cunningham, 1997), should not be disregarded.

In the experiments reported here, we used [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) scanning to assess the long-term neural adaptations induced by the chronic pubertal treatment. This is arguably the best approach to ascertain general neural metabolic changes and it has the advantage of having a strong translational relevance to human studies.

Most of the experimental research in the field of drug abuse has been carried out on males. However, sex-specific patterns of consumption during all phases of drug addiction are well documented (see Lynch, 2006; Roth *et al*, 2004 for reviews). So, when designing the study we considered it interesting to examine potential sex-specific effects of the cannabinoid administration.

In the present work, we chronically injected male and female rats with the cannabinoid agonist CP in the peripubertal stage (P28-P38) of adolescence (Spear, 2000) and their food and cocaine self-administration behavior in adulthood was examined. Additionally, brain glucose metabolism was analyzed by means of PET scanning using FDG.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Drug Administration

We used Wistar albino rats of both sexes. The subjects were the offspring of rats purchased from Harlan Interfauna Ibérica SA (Barcelona, Spain), which were mated (one male × one female) in our laboratory approximately 2 weeks after their arrival. All animals were maintained at a constant temperature (20°C) and in a reverse 12-h/12-h dark/light cycle (lights on at 2000), with free access to food (commercial diet for rodents A04/A03; Panlab, Barcelona, Spain) and water unless otherwise specified. On the day of birth (postnatal day 0), litters were sex balanced and culled to 10 ± 2 pups per dam. The animals were weaned at 22 days of age.

CP (Tocris) (0.4 mg/kg) or its corresponding vehicle (VH) (ethanol:cremophor:saline (1:1:18) cremophor, Fluka BioChemika) was administered *i.p.*, once daily, from day 28 to day 38 (11 injections), at a volume of 2 ml/kg. The dose of CP was chosen on the basis of our previous study on the long-term effects of a chronic (P35-P45) CP treatment (Biscaia *et al*, 2003). Animals were individually housed and weighted when they reached P75. All experimental procedures were carried out between 1000 and 1700. The animals used in this study were maintained in facilities according to European Union Laboratory Animal Care Rules (86/609/EEC Directive).

Apparatus

For operant food-reinforced behavior and cocaine self-administration studies, 12 operant chambers (Coulbourn Instruments, Allentown, PA, USA) were used. A lever designed to register a response when 3.0 g of force was applied was placed on the front wall of the chamber. A green stimulus light was located above the lever. Food and cocaine operant data acquisition and storage were accomplished on IBM computers (Med Associates, PA, USA).

Imaging was performed with a dedicated small animal PET scanner (piPET) (Siegel *et al*, 1999). Tomographic images were reconstructed using a 3D subset expectation maximization algorithm (3D-OSEM) (20 iterations, 5 subsets), which results in a spatial resolution of 1.65 mm full-width at half-maximum (FWHM) isotropic. The usefulness of this piPET imaging device has been previously reported (Jagoda *et al*, 2004).

Experimental Procedures

The following three experiments were performed and different sets of animals were used for each one of them.

Fixed-ratio 1 food-reinforced behavior. The experimental procedures on the first set of animals began when they were 90 days old. Before starting the training, the body weights of vehicle-exposed (VH) male ($n=7$) and female ($n=9$) rats and CP-exposed (CP) male ($n=6$) and female ($n=12$) rats were reduced to 95–90% of their free-feeding weight. This food restriction was maintained unless otherwise stated. This experiment consisted of three consecutive phases: autoshaping, fixed-ratio 1 (FR1) task with food restriction, and FR1 task with *ad libitum* access to food.

Before the actual FR1 operant task began, animals were submitted to an autoshaping food-reinforced task consisting of 30 min sessions in which food pellets (45 mg; Noyes Pellets, Lancaster, NH, USA) were either randomly delivered in intervals of 60 s average or obtained if the animal emitted an operant response (ie pressing the lever); a stimulus light was turned on right before pellet delivery signaling reward presentation. Animals emitting at least 5 operant responses were submitted to the first phase of the FR1 food-reinforced task, which consisted of 30 min sessions for 7 consecutive days throughout which the animal obtained a food pellet for each lever press. In this phase the stimulus light signaled reward availability.

After completing this phase, the animals had *ad libitum* access to food for the rest of the experiment. After recovering their original body weight, animals were submitted to the same task as in the previous phase for 5 consecutive days.

Cocaine self-administration. When the animals of the second set (males-VH, $n = 11$, females-VH, $n = 8$; males-CP, $n = 10$, females-CP, $n = 7$) reached P75 they were food restricted until they reached between 95–90% of their original body weight, and were submitted to the same autoshaping food-reinforced task described above. When the animals emitted at least five operant responses they underwent the FR1 food-reinforced task described in the previous section. When a sufficient (more than 50 responses per session) and stable (less than 10% variation across three consecutive sessions) response rate was attained, subjects were surgically prepared with an intravenous catheter placed in the jugular vein.

Put briefly, the animals were anesthetized with ketamine (40 mg/kg i.p.) and diazepam (10 mg/kg i.p.). A polyvinylchloride tubing (0.064 i.d.) was implanted in the right jugular vein approximately at the level of the atrium. The catheter was passed subcutaneously and exited in the midscapular region; it then passed through a spring tether system (Alice King, Chatham, CA, USA) that was mounted to the skull of the rat with dental cement. The animals were given at least 5 days to recover before beginning 5 extra days of FR1 food-reinforced task previous to the cocaine self-administration phase. Catheters were flushed daily with 0.5 ml of a solution of antibiotic (gentamicin, 40 mg/ml) dissolved in heparinized saline to prevent infections and to maintain catheter patency.

The drug-reinforced behavior study began when the animals reached P100, and it consisted of two phases. The first one lasted for 7 consecutive days with 30 min sessions (acquisition phase), and immediately after finishing this first part, the animals underwent 14 consecutive daily sessions of 120 min each (maintenance phase). In each session an FR1 schedule of reinforcement was followed with each lever press rendering a 1 mg/kg cocaine injection and being followed by a 30 s timeout period. A stimulus light over the lever signaled drug availability.

[¹⁸F]-FDG PET scan. Basal brain glucose metabolism was measured in a third separate set of animals. To obtain brain metabolism indexes in conditions as similar as possible to those of cocaine self-administered rats, the animals of this experiment followed the same food-restriction and auto-

shaping protocol as described in the previous section. When they were 100 days old, the day before imaging took place, a catheter was inserted in the femoral vein under continuous isoflourane anesthesia. Female (193–214 g; CP $n = 5$, VH $n = 5$) and male (330–370 g; CP $n = 6$, VH $n = 5$) Wistar rats were then injected with [¹⁸F]-FDG (1.83–1.95 mCi). After 35 min of FDG uptake, rats were imaged for 90 min and the images reconstructed by 3D-OSEM algorithm.

Data Analysis

Body weights. Body weights on the day of individualization were analyzed with a two-way analysis of variance (ANOVA).

Food-reinforced behavior and cocaine self-administration. Separate mixed three way ANOVAs were run: one for the analysis of the food-reinforced task, and another two for the acquisition and maintenance phases of cocaine self-administration. ANOVAs included two between-subjects factors (Sex (male or female) and Treatment (CP or VH)) and one within-subjects factor (Days). The dependent variable was the number of reinforcers per session. Additionally, to have more detailed information of within-session performance, separate analyses were run for the first 30, 60, and 90 min of each self-administration session during the maintenance phase.

Square roots transformations were applied when appropriate to correct the skewness in the distribution of the data and the lack of homogeneity of variances. The level of significance was set to $\alpha = 0.05$. All calculations were performed with SPSS 12.0.

PET: statistical parametric mapping. To perform statistical parametric mapping (SPM) analysis, the reconstructed image sets were realigned with respect to a [¹⁸F]-FDG PET template by means of a rigid registration algorithm based on the maximization of mutual information. The template image was generated by coregistering and averaging selected images from each vehicle group; a brain mask was manually segmented on the template and applied to all registered scans before performing intensity normalization. The resulting images were smoothed with a Gaussian kernel ($1.5 \times 1.5 \times 3.0$ mm FWHM), and analyzed with the SPM5 software, using an ANOVA design to detect differences between groups. Statistical significance threshold was set to uncorrected $p < 0.05$ and $K = 10$.

RESULTS

Body Weight

No differences due to Treatment or Treatment \times Sex interaction were found in the body weight of animals in the day of individualization. As expected Sex effects were evident ($F_{1,87} = 202.389$, $p < 0.05$) with male rats weighing more than female ones (Mean_{Males} = 289.360 g, SD_{Males} = 39.01 g; Mean_{Females} = 197.464 g, SD_{Females} = 19.45 g).

Cocaine Self-Administration

Acquisition. The results of the repeated measures ANOVA showed a statistically significant main effect of the between-

subjects factors: Sex ($F_{1,32} = 13.630$, $p < 0.01$), Treatment ($F_{1,32} = 6.686$, $p < 0.05$), and the Sex \times Treatment interaction ($F_{1,32} = 5.124$, $p < 0.05$). The analysis of the interaction revealed a significant main effect of Treatment in females ($F_{1,13} = 12.449$, $p < 0.01$), but not in males, the CP-treated females self-administering a higher number of injections per session than their vehicle-treated controls (Mean_{Females-CP} = 4.667, SD = 1.45; Mean_{Females-VH} = 2.446, SD = 1.15) (see Figure 1a). No effects of the within-subject factor Days were found indicating a stable acquisition in all groups.

Maintenance. Figure 1b shows the mean number of injections per session during the maintenance phase. No effects of the between-subjects factors Sex, Treatment, or the Sex \times Treatment interaction were found in any of the

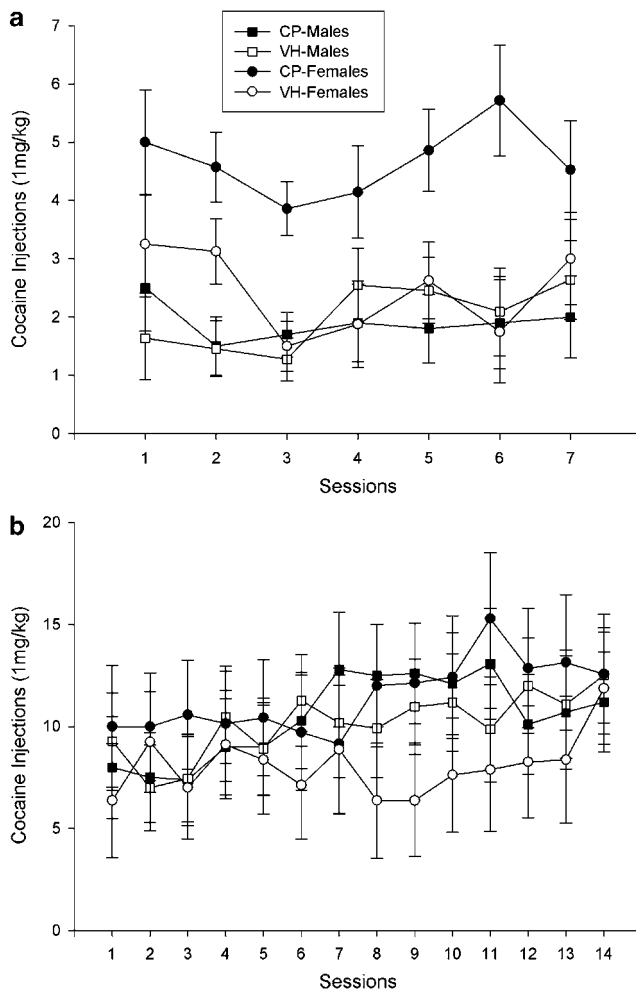


Figure 1 (a) Acquisition of cocaine self-administration: mean number of injections per session across the seven daily acquisition sessions (30 min duration). As observed female CP-treated rats (CP-Females) self-administered a higher number of injections per session when compared to the rest of the groups. No other significant differences were found. The lack of effect of the Day factor indicates a stable self-administration in all groups. (b) Maintenance of cocaine self-administration: performance during the maintenance phase of cocaine self-administration (14 daily sessions of 2 h duration). No differences among groups were found. However the effect of Days was significant, indicating a progressive increase in the responses across days, presumably due to the change in the session's duration.

time frames analyzed (30, 60, 90, and 120 min). A significant effect of the within-subjects factor Days was found ($F_{13,416} = 2.373$, $p < 0.05$) indicating a progressive increase in performance, presumably due to the longer length of sessions in this phase.

Food-Reinforced Behavior

To test the specificity of the effects observed in cocaine self-administration, we ran a parallel experiment with food pellets as reinforcers instead of cocaine infusions. In this case, as seen in Figure 2, no effect of either the Sex, the Treatment, or the Sex \times Treatment interaction was evident neither during the food-restriction phase nor during the *ad libitum* phase.

[¹⁸F]-FDG PET Scan

The SPM technique showed a significant hypoactivation of the amygdalo-entorhinal area ($t = 1.86$, $p < 0.05$; $K = 10$) and a hyperactivation of the frontal cortex ($t = 1.86$, $p < 0.05$; $K = 80$) in the CP-treated females as compared to VH-injected females. No significant differences were found in males (see Figure 3).

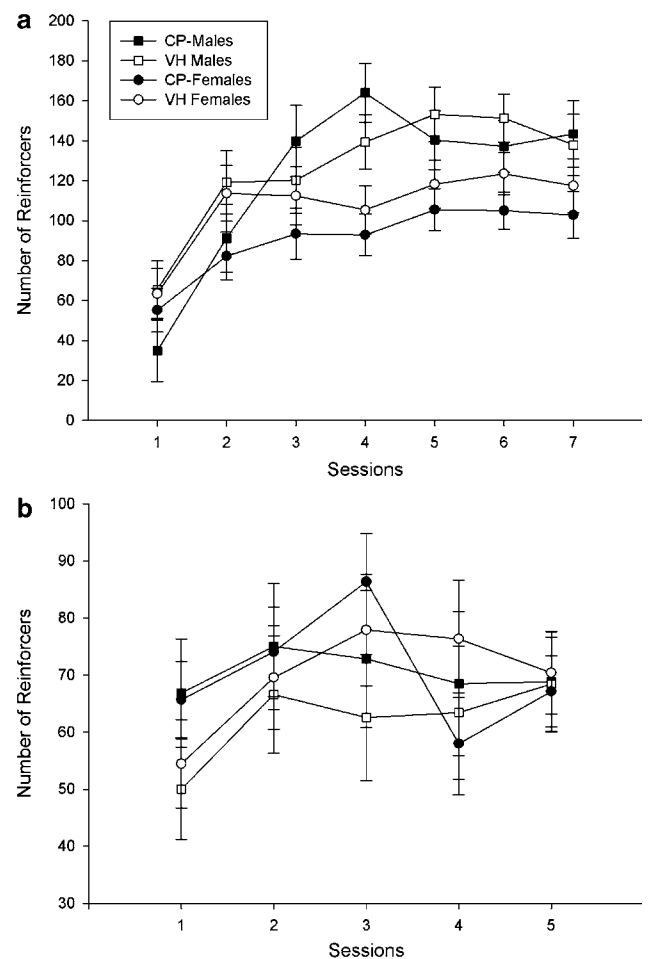


Figure 2 FRI food-reinforced operant behavior: food-reinforced behavior during food restriction (a) and *ad libitum* (b) conditions. The number of reinforcers earned per session is shown. No differences were observed in any of the conditions among the groups.

DISCUSSION

In this work, we have evaluated the long-term effects of a chronic treatment with the cannabinoid agonist CP during adolescence (P28-P38) on adult acquisition and maintenance of cocaine self-administration, food-reinforced operant learning, and brain metabolic activity. During acquisition, the group of female rats exposed to CP during puberty exhibited higher adult cocaine self-administration rates when compared to the other groups. This effect was not present during maintenance and no other differences were observed. Additionally, no differences were evident in the operant food-reinforced task, indicating that the effect on self-administration rates was specific to cocaine and not a general change in reward processing. Moreover, the chronic treatment with CP exerted changes in brain glucose metabolism in CP-treated females as compared to their vehicle counterparts. These alterations consisted of a hyperactivation of the frontal cortex and a hypoactivation of the amygdalo-entorhinal area. No changes were observed in males.

As stated in the 'Introduction', until very recently the gateway hypothesis lacked robust experimental validation. A few studies had examined the causal link between a prior tetrahydrocannabinol (THC) exposure and a subsequent enhanced drug self-administration; however, they used adult THC pre-treated rats that subsequently underwent heroin or cocaine self-administration (Panlilio *et al*, 2007; Solinas *et al*, 2004). Since these designs did not incorporate the developmental component that is cardinal to the gateway hypothesis, a full experimental validation of the hypothesis was still missing. To our knowledge, the first time the gateway hypothesis has been confirmed experimentally is that of Ellgren *et al* (2007) who have reported higher heroin self-administration rates during adulthood in male rats treated with THC during adolescence.

In the context of psychostimulants, Ellgren *et al* (2004) examined at different periods the effects of amphetamine on dopamine levels and behavior following cannabinoid exposure during adolescence. No support for the hypothesis was found since no changes were observed either in

adolescence or adulthood in dopamine or locomotor responses to amphetamine.

Although cannabinoids and dopamine have been shown to interact at several levels (Andersson *et al*, 2005; Gardner, 2005; Hermann *et al*, 2002), the relationship between cannabinoids and the effects of psychostimulant drugs is currently a matter of debate (see Arnold, 2005 for a review). For example, Fattore *et al* (1999) showed that an acute administration of the cannabinoid agonist WIN 55,512-2 (WIN) decreased cocaine self-administration, and Soria *et al* (2005) reported that mice lacking the CB1 receptors exhibited reduced reinforcing efficacy of cocaine. In contrast to this, Tanda *et al* (2000) found that the administration of the CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716A) did not affect cocaine self-administration rates in squirrel monkeys. Additionally, normal behavior in cocaine self-administration and conditioned place preference paradigms has been found in CB1 knockout mice (Cossu *et al*, 2001; Martin *et al*, 2000).

Cocaine is known for exerting both rewarding and anxiogenic effects (Ettenberg, 2004), so the higher self-administration rates shown by CP-females in our study could reflect either an increase in the rewarding actions of cocaine or a decrement in its anxiogenic effect (Panlilio *et al*, 2007). There is evidence that fails to support the former speculation. First, the chronic CP treatment does not seem to affect the rewarding values of natural reinforcers (since no effects were observed in the food-reinforced task), neither in conditions of high motivation (food deprivation) nor in normal basal conditions (*ad libitum* phase). Second, Ellgren *et al* (2004) did not find changes in dopamine release in response to amphetamines after a THC treatment during adolescence, providing further evidence against a change in the rewarding/hedonic value of the drug *per se*.

A change in anxiety responses in CP-treated animals has been previously reported by our group (Biscaia *et al*, 2003). In this study, using the same doses and number of CP injections, we observed that both female and CP-treated animals during early adolescence (P35-45) showed diminished anxiety responses in the elevated plus maze. Although these effects were additive and not interactive, it can be

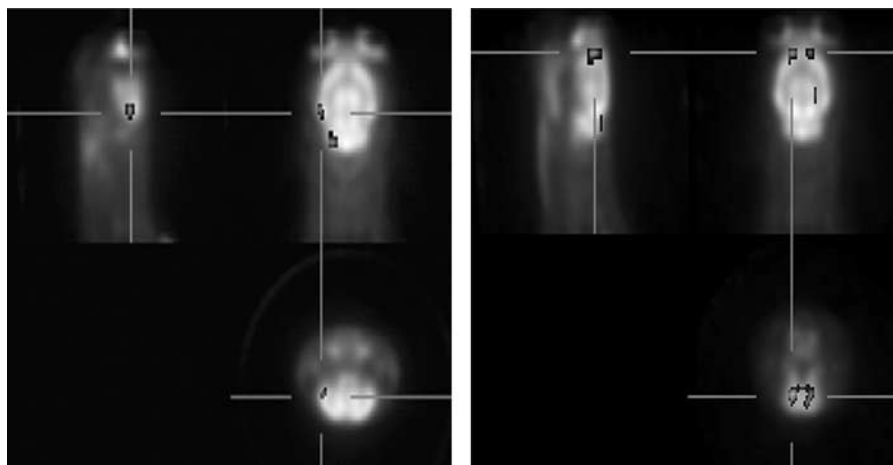


Figure 3 Brain glucose metabolism as measured by PET imaging: SPM revealed significant differences in female rats exposed to the cannabinoid agonist during adolescence. Lower metabolism in amygdalo-entorhinal area (left image) and higher metabolism in frontal cortex (right image) of CP-females as compared to their vehicle-treated controls.

suggested that a higher reduction in anxiety occurred in CP female rats. This can be hypothesized to be a putative mechanism explaining our results in the acquisition of cocaine self-administration. Presumably, CP females might experience cocaine as less anxiogenic and therefore they might self-administer more injections of the drug. This hypothesis needs further experimental testing and CP should be administered in the same age interval used in the present study (P28–P38).

An alternative explanation would point to changes in general locomotor activity that could have been induced by the treatment in the females; these motor alterations could result in an elevated frequency of exploratory behavior (and therefore higher chances of pressing the lever during the acquisition phase). In this sense, it has been shown that female rats perinatally exposed to THC showed persistent changes in spontaneous locomotor activity (Navarro *et al*, 1994; Rubio *et al*, 1995). Additionally adult rats treated with the CB1 agonist WIN exhibited an increased locomotor activity as measured in the open field, but only at the lowest dose tested (0.6 mg/kg) (Drews *et al*, 2005). Although appealing, this hypothesis is not supported by more specific experimental work since we have found a decrement rather than an increment in locomotor activity in CP-treated females using a very similar design to the one presented here (Biscaia *et al*, 2003). Moreover, Schneider *et al* (2005) did not find any change in this respect in adult rats treated with WIN during adolescence.

Surprisingly, we have not observed the typical pattern of sex differences in self-administration (Lynch, 2006) in the VH groups (ie females acquiring cocaine self-administration faster and self-administering higher amounts of the drug), a fact which might be due, at least in part, to the particular self-administration schedule used here, and the dose of cocaine employed. In this sense, it has been recently reported that sex-differences in cocaine self-administration disappear when low FR ratios are used and when cocaine doses are lower than 3 mg/kg (Kantak *et al*, 2007). Interestingly, the treatment seemed to boost this latent sex-specific effect in the acquisition phase.

The chronic treatment employed in this study also induced changes in brain glucose metabolism. Although the precise onset of these changes was not evaluated, they were still evident at the age when self-administration began. Our data point to a hyperactivation of the frontal cortex and a hypoactivation of the amygdalo-entorhinal area caused by the chronic treatment with CP during early adolescence. In addition, these changes only occurred in CP-treated females, a fact which parallels our behavioral findings.

The results of the present study differ from those reported by other groups that have employed whole brain imaging techniques such as 2-DG autoradiography to measure brain glucose metabolism. In that kind of studies, a general reduction in glucose utilization after THC administration has been consistently reported (Freedland *et al*, 2003; Whitlow *et al*, 2002, 2003). However, in those experiments, the cannabinoid was always administered in the adult stage, and on the other hand, the drug used was THC and not CP. Interestingly, human studies have shown an increased glucose metabolism in the frontal cortex (Volkow *et al*, 1991), especially in the right hemisphere after an intravenous THC injection. The increased activity found in the

frontal cortex could be derived from the persistent stimulation of the dopaminergic mesocorticolimbic pathway caused by the chronic treatment. Thus, the activation of the cannabinoid receptors has been shown to increase the activity of meso-prefrontal activity of dopaminergic neurons (Diana *et al*, 1998). Perhaps, a repetitive stimulation of the receptor in a particularly plastic stage might have increased the activity of the frontal cortex in a persistent fashion. Regarding this possibility, only one report in the literature has explored the importance of the age of onset of cannabinoid consumption, and it has been carried out in human subjects (Wilson *et al*, 2000). The authors found that initiating marijuana consumption during adolescence seems to lead to greater brain cerebral flow alterations induced by THC. At the behavioral level the hyperactivation of the frontal cortex seen in CP-treated females could partially explain (among other behavioral disruptions) their heightened vulnerability to psychostimulants, due to the importance of this area in the circuitry of drug addiction (Tzschentke and Schmidt, 2000).

Another interesting finding in the present work is the hypoactivation seen in the amygdalo-entorhinal area of CP-treated females as compared to the other groups. This area is believed to play a role in the storage of long-term memories before their entry into the perirhinal cortex where they are thought to be kept for longer periods of time until recovery (Izquierdo and Medina, 1997). Therefore, a hypoactivation in this area might indicate some deficits in long-term memory storage, at least in the first stages of its initial consolidation. Sim *et al* (1996) reported decreases in WIN-stimulated GTP γ ³⁵S binding in the entorhinal cortex after a chronic THC treatment. This desensitization of CB1 receptors might account for the hypoactivation observed in this brain region.

In conclusion, we have shown that a chronic treatment with a cannabinoid agonist during a specific stage of adolescence is able to induce behavioral and neural changes that are still evident in adulthood and that could be mediating the enhanced vulnerability to cocaine self-administration seen in female rats pubertally treated with the cannabinoid agonist CP. The sex-specificity of the effects needs to be further explored and the role of estrogens as putative mediators of our findings is currently the focus of ongoing experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

Cocaine chlorhydrate was kindly provided by the Dirección General de Estupefacientes (Spain). We thank Miguel Biscaia, Gonzalo Higuera, and Paloma Díaz for critical comments on a previous version of this manuscript and Luis Troca, Rosa Ferrado, and Alberto Marcos for technical assistance. This work was supported by Grants FIS G03/05 (Red de Trastornos Adictivos), BSO2001-1099, FIS 01-05-01, Plan Nacional sobre Drogas (PNSD) 2001–2003, PNSD 2004–2007, GR-SAL/0260/2004 to EA and Grants INT/2012/2002, CB06/01/0079, and CENIT (2006–2009) to MD.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that except for income received from their primary employer, no financial support or compensa-

tion has been received from any individual or corporate entity over the past 3 years for research or professional service and there are no personal financial holdings that could be perceived as constituting a potential conflict of interest.

REFERENCES

- Adeawale AS, Platt DM, Spealman RD (2006). Pharmacological stimulation of group II metabotropic glutamate receptors reduces cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of drug seeking in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **318**: 922–931.
- Adriani W, Laviola G (2004). Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol* **15**: 341–352.
- Andersson M, Usiello A, Borgkvist A, Pozzi L, Dominguez C, Fienberg AA et al (2005). Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase A site in striatal projection neurons. *J Neurosci* **25**: 8432–8438.
- Arnold JC (2005). The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* **81**: 396–406.
- Biscaia M, Marin S, Fernandez B, Marco EM, Rubio M, Guaza C et al (2003). Chronic treatment with CP 55,940 during the periadolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)* **170**: 301–308.
- Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M et al (2001). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. *Behav Brain Res* **118**: 61–65.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C et al (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* **47**(Suppl 1): 227–241.
- Diana M, Melis M, Gessa GL (1998). Increase in meso-prefrontal dopaminergic activity after stimulation of CB1 receptors by cannabinoids. *Eur J Neurosci* **10**: 2825–2830.
- Drews E, Schneider M, Koch M (2005). Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **80**: 145–150.
- Ellgren M, Hurd YL, Franck J (2004). Amphetamine effects on dopamine levels and behavior following cannabinoid exposure during adolescence. *Eur J Pharmacol* **497**: 205–213.
- Ellgren M, Spano SM, Hurd YL (2007). Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology* **32**: 607–615.
- Ettenberg A (2004). Opponent process properties of self-administered cocaine. *Neurosci Biobehav Rev* **27**: 721–728.
- Fattore L, Martellotta MC, Cossu G, Mascia MS, Fratta W (1999). CB1 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Behav Brain Res* **104**: 141–146.
- Franken IH, Booij J, van den Brink W (2005). The role of dopamine in human addiction: from reward to motivated attention. *Eur J Pharmacol* **526**: 199–206.
- Freedland CS, Whitlow CT, Smith HR, Porrino LJ (2003). Functional consequences of the acute administration of the cannabinoid receptor antagonist, SR141716A, in cannabinoid-naïve and -tolerant animals: a quantitative 2-[14C]deoxyglucose study. *Brain Res* **962**: 169–179.
- Fried PA, James DS, Watkinson B (2001). Growth and pubertal milestones during adolescence in offspring prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol* **23**: 431–436.
- Gardner EL (2005). Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav* **81**: 263–284.
- Gruber AJ, Pope Jr HG (2002). Marijuana use among adolescents. *Pediatr Clin North Am* **49**: 389–413.
- Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2002). Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience* **109**: 451–460.
- Izquierdo I, Medina JH (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* **68**: 285–316.
- Jagoda EM, Vaquero JJ, Seidel J, Green MV, Eckelman WC (2004). Experiment assessment of mass effects in the rat: implications for small animal PET imaging. *Nucl Med Biol* **31**: 771–779.
- Kandel DB (2003). Does marijuana use cause the use of other drugs? *JAMA* **289**: 482–483.
- Kandel DB, Yamaguchi K, Klein LC (2006). Testing the gateway hypothesis. *Addiction* **101**: 470–472, discussion 474–476.
- Kantak KM, Goodrich CM, Uribe V (2007). Influence of sex, estrous cycle, and drug-onset age on cocaine self-administration in rats (*Rattus norvegicus*). *Exp Clin Psychopharmacol* **15**: 37–47.
- Lynch WJ (2006). Sex differences in vulnerability to drug self-administration. *Exp Clin Psychopharmacol* **14**: 34–41.
- Martin CA, Kelly TH, Rayens MK, Brogli BR, Brenzel A, Smith WJ et al (2002). Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **41**: 1495–1502.
- Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2000). Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur J Neurosci* **12**: 4038–4046.
- McLaughlin CR, Martin BR, Compton DR, Abood ME (1994). Cannabinoid receptors in developing rats: detection of mRNA and receptor binding. *Drug Alcohol Depend* **36**: 27–31.
- Navarro M, Rubio P, Rodriguez de Fonseca F (1994). Sex-dimorphic psychomotor activation after perinatal exposure to (-)-delta 9-tetrahydrocannabinol. An ontogenic study in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* **116**: 414–422.
- Negus SS, Mello NK (2002). Effects of mu-opioid agonists on cocaine- and food-maintained responding and cocaine discrimination in rhesus monkeys: role of mu-agonist efficacy. *J Pharmacol Exp Ther* **300**: 1111–1121.
- Panlilio LV, Solinas M, Matthews SA, Goldberg SR (2007). Previous exposure to THC alters the reinforcing efficacy and anxiety-related effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology* **32**: 646–657.
- Patton GC, McMorris BJ, Toumbourou JW, Hemphill SA, Donath S, Catalano RF (2004). Puberty and the onset of substance use and abuse. *Pediatrics* **114**: e300–e306.
- Pistis M, Perra S, Pillolla G, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL (2004). Adolescent exposure to cannabinoids induces long-lasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry* **56**: 86–94.
- Rodriguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnin A, Fernandez-Ruiz JJ (1993). Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* **4**: 135–138.
- Roth ME, Cosgrove KP, Carroll ME (2004). Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* **28**: 533–546.
- Rubio P, Rodriguez de Fonseca F, Munoz RM, Ariznavarreta C, Martin-Calderon JL, Navarro M (1995). Long-term behavioral effects of perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol in rats: possible role of pituitary-adrenal axis. *Life Sci* **56**: 2169–2176.
- Schneider M, Drews E, Koch M (2005). Behavioral effects in adult rats of chronic prepubertal treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Behav Pharmacol* **16**: 447–454.
- Schneider M, Koch M (2003). Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating,

- recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* **28**: 1760–1769.
- Siegel S, Vaquero JJ, Aloj L, Seidel J, Pagoda E, Gandler WR *et al* (1999). Initial results from PET/planar small animal imaging system. *IEEE Trans Nucl Sci* **46**: 571–575.
- Sim LJ, Hampson RE, Deadwyler SA, Childers SR (1996). Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* **16**: 8057–8066.
- Smith JE, Co C, Yin X, Sizemore GM, Liguori A, Johnson III WE *et al* (2004). Involvement of cholinergic neuronal systems in intravenous cocaine self-administration. *Neurosci Biobehav Rev* **27**: 841–850.
- Solinas M, Panlilio LV, Goldberg SR (2004). Exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) increases subsequent heroin taking but not heroin's reinforcing efficacy: a self-administration study in rats. *Neuropsychopharmacology* **29**: 1301–1311.
- Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M *et al* (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* **30**: 1670–1680.
- Spear LP (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* **24**: 417–463.
- Tanda G, Munzar P, Goldberg SR (2000). Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat Neurosci* **3**: 1073–1074.
- Trad PV (1994). Developmental vicissitudes that promote drug abuse in adolescents. *Am J Drug Alcohol Abuse* **20**: 459–481.
- Tzschentke TM, Schmidt WJ (2000). Differential effects of discrete subarea-specific lesions of the rat medial prefrontal cortex on amphetamine- and cocaine-induced behavioural sensitization. *Cereb Cortex* **10**: 488–498.
- Viveros MP, Llorente R, Moreno E, Marco EM (2005). Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behav Pharmacol* **16**: 353–362.
- Volkow ND, Gillespie H, Mullani N, Tancredi L, Grant C, Ivanovic M *et al* (1991). Cerebellar metabolic activation by delta-9-tetrahydro-cannabinol in human brain: a study with positron emission tomography and ¹⁸F-2-fluoro-2-deoxyglucose. *Psychiatry Res* **40**: 69–78.
- Walsh SL, Cunningham KA (1997). Serotonergic mechanisms involved in the discriminative stimulus, reinforcing and subjective effects of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* **130**: 41–58.
- Whitlow CT, Freedland CS, Porrino LJ (2002). Metabolic mapping of the time-dependent effects of delta 9-tetrahydrocannabinol administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **161**: 129–136.
- Whitlow CT, Freedland CS, Porrino LJ (2003). Functional consequences of the repeated administration of Delta9-tetrahydrocannabinol in the rat. *Drug Alcohol Depend* **71**: 169–177.
- Wilson W, Mathew R, Turkington T, Hawk T, Coleman RE, Provenzale J (2000). Brain morphological changes and early marijuana use: a magnetic resonance and positron emission tomography study. *J Addict Dis* **19**: 1–22.

**A CHRONIC PERI-PUBERTAL TREATMENT WITH THE CANNABINOID
AGONIST CP 55,940 ALTERS THE BRAIN METABOLIC RESPONSES TO
ACUTE COCAINE DURING ADULTHOOD IN RATS**

Higuera-Matas, A., Soto-Montenegro, ML., López-Montoya, G., Miguéns, M., Del
Olmo, N., Vaquero, JJ., García-Lecumberri, C., Desco, M. and Ambrosio, E.

Corresponding Author:

Emilio Ambrosio Ph.D.
Psychobiology Department
Faculty of Psychology
UNED
C/Juan del Rosal nº10
28040
Madrid, Spain
e-mail: eambrosio@psi.uned.es
tlf: +34913987974
fax:+34913986287

ABSTRACT

It has been hypothesized that cannabis consumption during adolescence induces a higher risk of drug abuse in the adulthood. However the neural basis of this induced vulnerability is unclear. The present study was designed to test if acute cocaine administration could differentially affect cerebral glucose metabolism of adult rats that had been exposed to the cannabinoid agonist CP-55,940 (CP) during their adolescence. The cannabinoid agonist or its corresponding vehicle (VEH) was administered i.p. once daily from day 28-38 PN to male and female Wistar rats: VEH-male (n=7); VEH-female (n=9); CP-male (n=8) and CP-female (n=9). When the animals reached adulthood they underwent PET imaging in two sessions separated by two days; the first session with saline administration (“basal” condition) and the second session with cocaine administration ten minutes before imaging. Nine regions of interest (ROI) were manually drawn on coronal sections. An ANOVA for repeated measures revealed a significant effect of cocaine that was dependent upon gender and previous cannabinoid treatment.. In the dorsal hippocampus cocaine induced a significant metabolic decrease specifically in CP-females while a general decrease in glucose metabolism was evident in the amygdale, thalamus and caudate-putamen of female rats as compared to the males. Cocaine also induced a hypometabolic response in the caudate-putamen. These results are discussed in the context of their possible relevance to the neural mechanisms underlying cocaine’s actions and the enhanced vulnerability to cocaine addiction seen in female rats treated with cannabinoids during adolescence.

Keywords: *Cocaine, PET, Gateway Hypothesis, CP 55,940, cannabis, adolescence*

INTRODUCTION

Several surveys and reports indicate that marijuana is the drug most widely consumed during adolescence, (Gruber & Pope, 2002). It has been hypothesized that its consumption at this stage of life might constitute a predisposition factor for later cocaine abuse (Kandel, 2003; Kandel, Yamaguchi, & Klein, 2006), although the number of animal studies that support this association is limited. The relationship between the exogenous or endocannabinoids and cocaine addiction is controversial but some links have been established (Arnold, 2005). For instance, we have recently shown that a chronic cannabinoid treatment during puberty enhances the acquisition of cocaine self-administration in adult female but not male Wistar rats (Higuera-Matas et al., 2007). The neural basis of this gender-specific proneness is still unknown.

Brain metabolic changes induced by an acute injection of cocaine have been described in rats, involving enhanced local glucose metabolism in the caudate-putamen, globus pallidus, substantia nigra pars reticulata, subthalamic nucleus and cerebellar vermis, as well as a reduced metabolism in the habenulla (London, Wilkerson, Goldberg, & Risner, 1986). There are also human studies showing that an acute cocaine injection decreases global brain metabolism with specific decrements in neocortical areas, basal ganglia, portions of the hippocampal formation, thalamus, and midbrain (London et al., 1990). Another study in cocaine abusers showed that the cortical decreases were long-lasting (still evident even after 3-4 months of a drug-free period) (Volkow et al., 1992). In previous reports, it was found that the chronic cannabinoid treatment induced long-lasting glucose metabolic changes in two cortical areas (the frontal cortex -enhanced metabolic response; and the entorhinal cortex-blunted metabolic activity), presumably due to changes, among others, in the functional activity of the CB1 receptors (Higuera-Matas et al., 2007; Sim, Hampson, Deadwyler, & Childers, 1996).

Given the cerebral metabolic changes and the altered pattern of cocaine self-administration found in rats treated during their adolescence with a cannabinoid agonist (Higuera-Matas et al., 2007), we decided to study if an i.v. cocaine injection could differentially affect cerebral glucose metabolism of adult rats that had been exposed to the cannabinoid agonist during their adolescence.

MATERIAL AND METHODS

Animals, drug administration and experimental protocol

Male and female Wistar albino rats were used in the study. The subjects were the offspring of rats purchased from Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain) which were mated (one male x one female) in our laboratory approximately 2 weeks after their arrival. All animals were maintained at a constant temperature (20° C) and in a reverse 12-h/12-h dark/light cycle (lights on at 20:00 hours), with free access to food and water. On the day of birth (postnatal day 0), litters were gender-balanced and culled to 10±2 pups per dam. The animals used in this study were maintained in facilities according to European Union Laboratory Animal Care Rules (86/609/EEC Directive) and all procedures were performed according to the same Directive.

CP 55,940 (CP) (Tocris) (0.4 mg/kg) or its corresponding vehicle (VH) [ethanol:cremophor: saline (1:1:18) (cremophor, Fluka BioChemiKa)] were administered i.p., once daily, from day 28 to day 38 (11 injections), at a volume of 2 ml/kg, resulting in four groups of animals: VH-male (n=7), VH-female (n=9), CP-male (n=8) and CP-female (n=9) .

The dose of CP was chosen on the basis of previous studies on the long-term effects of a chronic (P35-P45) CP treatment (Biscaia et al., 2003; Higuera-Matas et al., 2007). Animals were individually housed and they reached P75. and at P93, an i.v.

catheter was surgically implanted in their jugular vein. To this end, animals were anesthetized with ketamine (40 mg/kg i.p.) and diazepam (10 mg/kg i.p.) and a polyvinylchloride tubing (0.064 i.d.) was implanted in the right jugular vein approximately at the level of the atrium. The catheter was passed subcutaneously and exited about the midscapular region. Catheters were flushed daily with 0.5 millilitres of a solution of antibiotic (Gentamicin 40mg/ml) dissolved in heparinized saline in order to prevent infection and to maintain catheter patency.

On day postnatal 100, the animals underwent PET imaging in two sessions separated by two days. At the first session, a saline i.v. injection (0.9% NaCl) was administered to all groups to determine “basal” uptake. At the second session we studied the cerebral metabolic changes induced by a cocaine i.v. challenge (1 mg/kg) in all groups. PET tracer [2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose (FDG)] was administered ten minutes after saline or cocaine infusions.

FDG-PET study

FDG (1.99 ± 0.24 mCi) was injected by the jugular vein catheter. FDG uptake period was 35 minutes. At the end of the uptake period, the animals were anesthetized with isoflurane (5% for induction and 1-1.5% for maintenance in 100% O₂) and imaged during 60 min in a dedicated small-animal PET scanner (rPET, SUINSA) (Vaquero *et al.*, 2005b) Tomographic images were reconstructed using a 3D-FBP algorithm creating fifty-five 55 x 55 slices. The voxel size was 0.81 x 0.81 x 0.81 mm³, and the spatial resolution in these images was about 1.65 mm FWHM isotropic. Energy window was 400-700 keV, and decay and deadtime corrections were applied.

Data Analysis

Regions of Interest (ROIs) were manually drawn on coronal-sections, using an atlas as a template (Kruger, Saporta, & Swanson, 1995). Nine ROIs were studied:

amygdala, cerebellum, Frontal Cortex, Dorsal Hippocampus, Ventral Hippocampus, Thalamus, Striatum, background and whole brain. To normalize FDG uptake, tissue activity was corrected by subtracting background and dividing by whole brain activity. Results are expressed as a percentage (%) ([FDG uptake = (study ROI/whole brain) \times 100]).

Results were analyzed by means of a factorial ANOVA with repeated measures. We defined three independent factors “Gender” (male or female) and “Cannabinoid treatment” (CP or vehicle) as between-subjects factors and “Cocaine” as the within-subjects factor (Saline or Cocaine). Two ways and one way ANOVAs were run to analyze second and third order interactions, respectively. Results were accepted as statistically significant for $p < 0.05$. All calculations were made with SPSS v.14.0.

RESULTS

Dorsal Hippocampus

Cocaine induced a metabolic decrease in the dorsal hippocampus, as revealed by the statistically significant effect of the “Cocaine” factor, $F_{1,29}=6.115$ $p < 0.05$. However, a significant interaction of the factors “Cocaine”, “Gender” and “Cannabinoid treatment” was found ($F_{1,29}=6.398$ $p < 0.05$). The analysis of this interaction revealed a decreased FDG uptake specifically in CP-Females ($F_{1,8}=10.223$ $p < 0.01$) which would account for the general effect of the Cocaine factor reported above.

Ventral Hippocampus

No statistically significant effects of Gender, Cannabinoid treatment, Cocaine or their interactions were detected in this ROI.

Frontal Cortex

No statistically significant effects of Gender, Cannabinoid treatment, Cocaine or their interactions were detected in this ROI.

Amygdala

We observed a trend towards hypometabolism in cocaine-injected rats as compared to saline-exposed animals ($F_{1,29}=3.645$ $p=0.06$). We also found a significant effect of SEX, as a between-subjects factor ($F_{1,29}=7.413$ $p<0.01$), showing the females a reduced FDG uptakes than males.

Thalamus

Again, there was a significant effect of SEX ($F_{1,29}=10.012$ $p<0.01$) showing the female rats a reduced metabolism in this area as compared to male animals.

Cerebellum

No significant effects were found for any of the factors analysed or their interactions.

Dorsal Striatum

A significant effect of the Cocaine factor was found ($F_{1,29}=16.691$ $p<0.01$). Cocaine induced a significant decrease in the striatal glucose metabolism. Also, the females had a reduced striatal metabolic activity than male rats ($F_{1,29}=15.269$ $p<0.01$).

Figures 1a and 1b summarizes glucose metabolism observed in “basal” conditions and after cocaine administration.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report that has analyzed the brain glucose metabolic effects of an acute i.v. cocaine injection (1mg/kg) in adult male and female rats which had undergone a peri-pubertal chronic treatment with the cannabinoid agonist CP 55,940.

We have found a strong gender specificity in our results, that is in clear accordance with our previous report showing increased acquisition of cocaine self-administration in the female rats peri-pubertally treated with CP (Higuera-Matas et al., 2007), although at present we do not have a clear explanation for this. A modulation of the estrogenic levels as a consequence of the CP chronic treatment has been discarded by our finding that the plasma concentration of this hormone is not altered in CP-females.

We have found that CP-females exhibited a blunted metabolic response when compared to their VH-injected controls. Several studies indicate that chronically administered cannabinoids may alter the structure and function of the hippocampal formation. In this sense, it has been shown that a chronic treatment with the cannabinoid agonist WIN 55,512-2 alters the dendritic distribution in the hippocampus as well as the morphology of this limbic structure (Lawston, Borella, Robinson, & Whitaker-Azmitia, 2000). However, other study showed no morphological changes in the hippocampus of cannabis abusers (Tzilos et al., 2005). At a functional level, cannabinoids are known to reduce the firing of hippocampal neurons (Robinson, Goonawardena, Pertwee, Hampson, & Riedel, 2007) and a recent fMRI study showed that marijuana consumers displayed a reduced hippocampal activation during an associative memory task (Jager et al., 2007).

The hippocampal formation is also involved in reward-related learning; the subiculum (one component of the hippocampal formation) sends projections to the Nucleus Accumbens (French & Totterdell, 2002, , 2003) and lesions of the subicular complex have been shown to disrupt the maintenance of cocaine self-administration (Black, Green-Jordan, Eichenbaum, & Kantak, 2004). In our CP-females subgroup, cocaine induced a reduction in glucose metabolism in the dorsal hippocampus, probably

through a decrease in CB1 receptor number (Villares, 2007) or activity (Sim, Hampson, Deadwyler, & Childers, 1996). It could be suggested that this change might be interpreted as a diminished functionality of this structure and therefore cocaine would not be as rewarding as in basal conditions. This would translate into an increase in drug intake. Also, cocaine has been shown to either disrupt (Melnick, Kubie, Laungani, & Dow-Edwards, 2001), not affect (Del Olmo, Higuera-Matas et al., 2006; Kantak et al., 2005) or improve (Del Olmo, Higuera-Matas, Miguens, Garcia-Lecumberri, & Ambrosio, 2007) spatial learning, perhaps by altering hippocampal long-term potentiation (del Olmo, Miguens et al., 2006). It would seem from the present results that the CP pre-treatment in females would make cocaine produce a hippocampal hypometabolism. Thus, in this group of rats, the cognition-altering properties of cocaine might be enhanced. Another possible implication of the hypometabolic response of the hippocampus to cocaine challenge in the CP-females group would relate to relapse phenomena. The normal association of the drug injection to the context where it occurs may be altered in CP-females thereby affecting contextual cues-induced relapse (Fuchs et al., 2005) to cocaine addiction; in this sense, it has been reported that the electrical stimulation of the hippocampus can precipitate relapse to cocaine self-administration (Vorel, Liu, Hayes, Spector, & Gardner, 2001).

We have not found any effect of cocaine in amygdalar metabolism which is in accordance to previous findings by others (Lyons, Friedman, Nader, & Porrino, 1996; Porrino, Domer, Crane, & Sokoloff, 1988). However, we have not been able to observe any cocaine-related effect in the thalamus; other studies did find alterations in this structure after cocaine challenge (London et al., 1990), but they were performed in humans which might explain the discrepancies between both reports .

Additionally, a general decrease in the glucose metabolism was found in the Dorsal Striatum, as reported in (London et al., 1990; Volkow et al., 1997), which might explain the well documented locomotor disturbances provoked by cocaine in rats.

In summary, our results seem to indicate that the metabolic response to cocaine in the Dorsal Hippocampus of CP-treated female rats is somewhat reduced as compared to their VH injected control. We propose that these results might partially explain the higher vulnerability to cocaine addiction reported in female rats treated with cannabinoids during their adolescence.

ACKNOWLEDGEMENTS

Alejandro Higuera-Matas is the recipient of a pre-doctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (“Programa de Formación del Profesorado Universitario” -FPU). The authors wish to thank Alberto Marcos, Rosa Ferrado and Luis Troca for technical assistance. This work has been supported by grants from “Ministerio de Ciencia y Tecnología” (TEC2004-07052-C02-01 / TCM), “Ministerio de Sanidad y Consumo” (CIBER CB06/01/0079), “Ministerio de Industria” (Programa CENIT) and “Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña” (2007-2010) to M.D. and grants FIS G03/05 (“Red de Trastornos Adictivos”), BSO2001-109, FIS 01-05-01, “Plan Nacional sobre Drogas (2001-2003 and 2004-2006)” GR-SAL/0260/2004, “Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid” and “Plan de Promoción de la Investigación en la UNED” to E.A.

REFERENCES

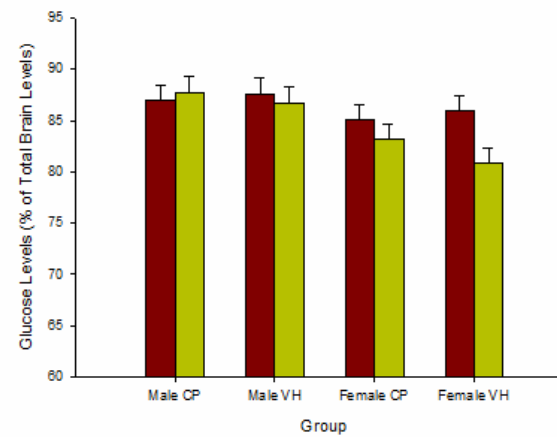
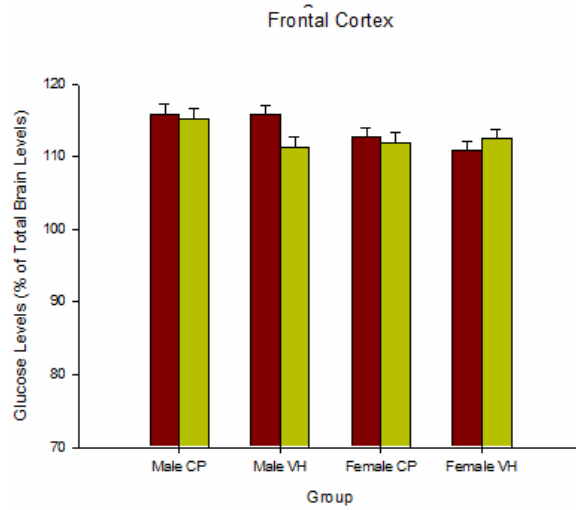
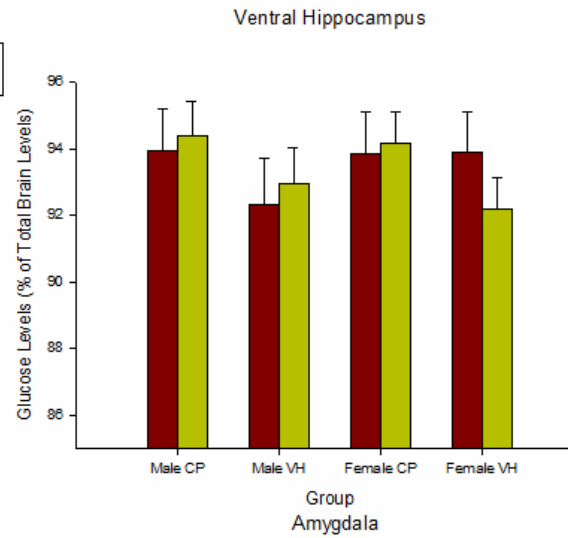
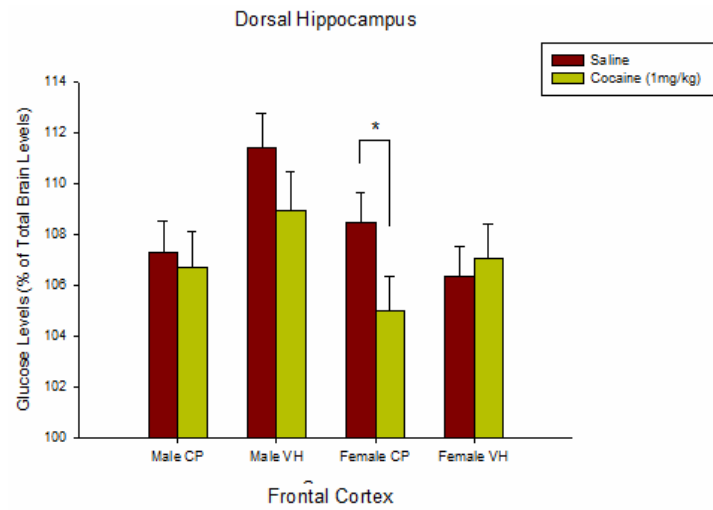
- Arnold, J. C. (2005). The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, *81*(2), 396-406.
- Biscaia, M., Marin, S., Fernandez, B., Marco, E. M., Rubio, M., Guaza, C., et al. (2003). Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*, *170*(3), 301-308.
- Black, Y. D., Green-Jordan, K., Eichenbaum, H. B., & Kantak, K. M. (2004). Hippocampal memory system function and the regulation of cocaine self-administration behavior in rats. *Behav Brain Res*, *151*(1-2), 225-238.
- Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Miguens, M., Garcia-Lecumberri, C., & Ambrosio, E. (2007). Cocaine self-administration improves performance in a highly demanding water maze task. *Psychopharmacology (Berl)*, *195*(1), 19-25.
- Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Miguens, M., Garcia-Lecumberri, C., Borcel, E., Solis, J. M., et al. (2006). Hippocampal synaptic plasticity and water maze learning in cocaine self-administered rats. *Ann N Y Acad Sci*, *1074*, 427-437.
- del Olmo, N., Miguens, M., Higuera-Matas, A., Torres, I., Garcia-Lecumberri, C., Solis, J. M., et al. (2006). Enhancement of hippocampal long-term potentiation induced by cocaine self-administration is maintained during the extinction of this behavior. *Brain Res*, *1116*(1), 120-126.
- French, S. J., & Totterdell, S. (2002). Hippocampal and prefrontal cortical inputs monosynaptically converge with individual projection neurons of the nucleus accumbens. *J Comp Neurol*, *446*(2), 151-165.
- French, S. J., & Totterdell, S. (2003). Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience*, *119*(1), 19-31.
- Fuchs, R. A., Evans, K. A., Ledford, C. C., Parker, M. P., Case, J. M., Mehta, R. H., et al. (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*, *30*(2), 296-309.
- Gruber, A. J., & Pope, H. G., Jr. (2002). Marijuana use among adolescents. *Pediatr Clin North Am*, *49*(2), 389-413.
- Higuera-Matas, A., Luisa Soto-Montenegro, M., Del Olmo, N., Miguens, M., Torres, I., Jose Vaquero, J., et al. (2007). Augmented Acquisition of Cocaine Self-Administration and Altered Brain Glucose Metabolism in Adult Female but not Male Rats Exposed to a Cannabinoid Agonist during Adolescence. *Neuropsychopharmacology*.
- Jager, G., Van Hell, H. H., De Win, M. M., Kahn, R. S., Van Den Brink, W., Van Ree, J. M., et al. (2007). Effects of frequent cannabis use on hippocampal activity during an associative memory task. *Eur Neuropsychopharmacol*, *17*(4), 289-297.
- Kandel, D. B. (2003). Does marijuana use cause the use of other drugs? *Jama*, *289*(4), 482-483.
- Kandel, D. B., Yamaguchi, K., & Klein, L. C. (2006). Testing the Gateway Hypothesis. *Addiction*, *101*(4), 470-472; discussion 474-476.
- Kantak, K. M., Udo, T., Ugalde, F., Luzzo, C., Di Pietro, N., & Eichenbaum, H. B. (2005). Influence of cocaine self-administration on learning related to prefrontal cortex or hippocampus functioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *181*(2), 227-236.

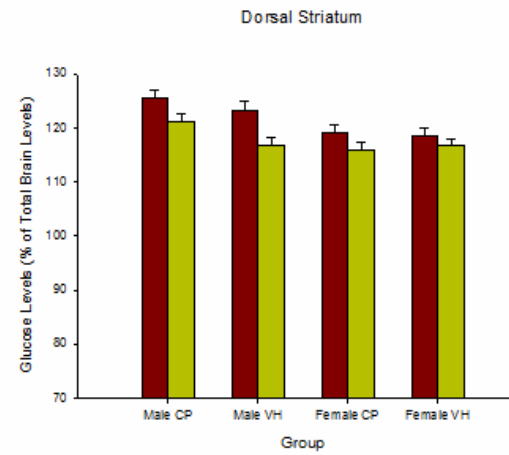
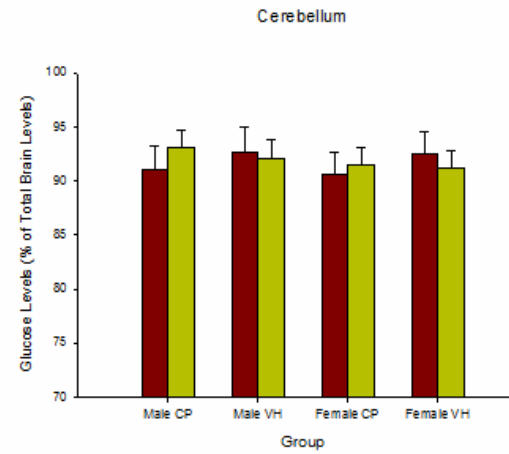
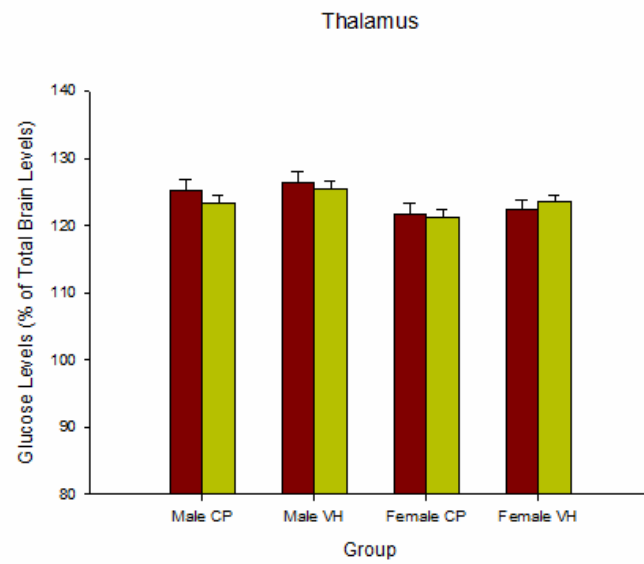
- Kruger, L., Saporta, S., & Swanson, L. W. (1995). *Photographic atlas of the rat brain : the cell and fiber architecture illustrated in three planes with stereotaxic coordinates*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press.
- Lawston, J., Borella, A., Robinson, J. K., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2000). Changes in hippocampal morphology following chronic treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. *Brain Res*, 877(2), 407-410.
- London, E. D., Cascella, N. G., Wong, D. F., Phillips, R. L., Dannals, R. F., Links, J. M., et al. (1990). Cocaine-induced reduction of glucose utilization in human brain. A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluorodeoxyglucose. *Arch Gen Psychiatry*, 47(6), 567-574.
- London, E. D., Wilkerson, G., Goldberg, S. R., & Risner, M. E. (1986). Effects of L-cocaine on local cerebral glucose utilization in the rat. *Neurosci Lett*, 68(1), 73-78.
- Lyons, D., Friedman, D. P., Nader, M. A., & Porrino, L. J. (1996). Cocaine alters cerebral metabolism within the ventral striatum and limbic cortex of monkeys. *J Neurosci*, 16(3), 1230-1238.
- Melnick, S. M., Kubie, J. L., Laungani, R., & Dow-Edwards, D. L. (2001). Impairment of spatial learning following preweaning cocaine exposure in the adult rat. *Neurotoxicol Teratol*, 23(5), 445-451.
- Porrino, L. J., Domer, F. R., Crane, A. M., & Sokoloff, L. (1988). Selective alterations in cerebral metabolism within the mesocorticolimbic dopaminergic system produced by acute cocaine administration in rats. *Neuropsychopharmacology*, 1(2), 109-118.
- Robinson, L., Goonawardena, A. V., Pertwee, R. G., Hampson, R. E., & Riedel, G. (2007). The synthetic cannabinoid HU210 induces spatial memory deficits and suppresses hippocampal firing rate in rats. *Br J Pharmacol*, 151(5), 688-700.
- Sim, L. J., Hampson, R. E., Deadwyler, S. A., & Childers, S. R. (1996). Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci*, 16(24), 8057-8066.
- Tzilos, G. K., Cintron, C. B., Wood, J. B., Simpson, N. S., Young, A. D., Pope, H. G., Jr., et al. (2005). Lack of hippocampal volume change in long-term heavy cannabis users. *Am J Addict*, 14(1), 64-72.
- Villares, J. (2007). Chronic use of marijuana decreases cannabinoid receptor binding and mRNA expression in the human brain. *Neuroscience*, 145(1), 323-334.
- Volkow, N. D., Hitzemann, R., Wang, G. J., Fowler, J. S., Wolf, A. P., Dewey, S. L., et al. (1992). Long-term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers. *Synapse*, 11(3), 184-190.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Logan, J., Gatley, S. J., Hitzemann, R., et al. (1997). Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature*, 386(6627), 830-833.
- Vorel, S. R., Liu, X., Hayes, R. J., Spector, J. A., & Gardner, E. L. (2001). Relapse to cocaine-seeking after hippocampal theta burst stimulation. *Science*, 292(5519), 1175-1178.

FOOTNOTES

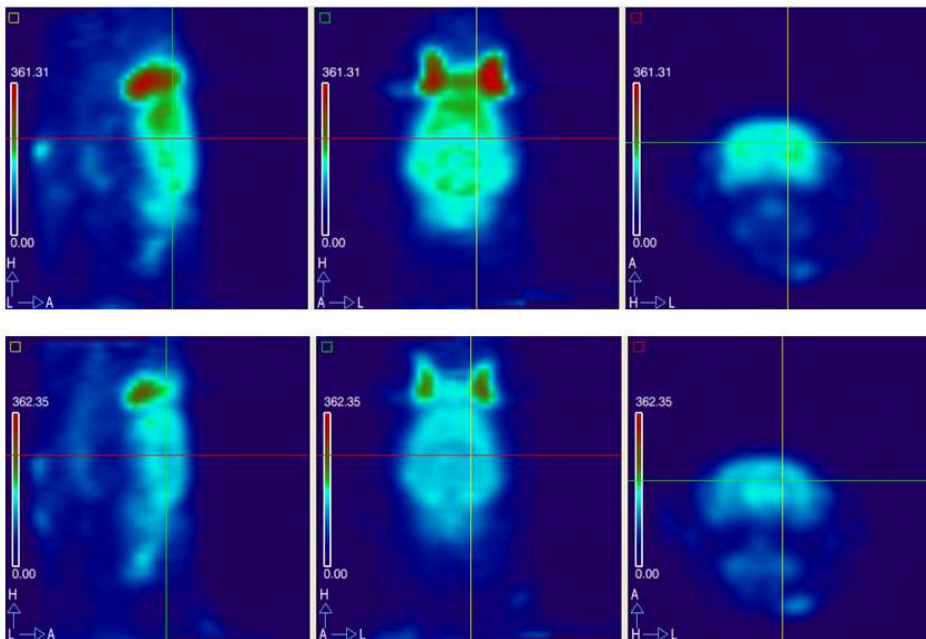
Figure 1 a and b: Figure shows the glucose metabolism in all the ROIs studied. In the Dorsal Hippocampus, cocaine induced a significant metabolic decrease specifically in CP-Females. A general decrease in glucose metabolism was evident in the Dorsal Striatum after cocaine. For a full description of the effects found in the other areas refer to the Results section.

Figure 2: Figure shows the brain sagittal, coronal and axial sections of the PET scan of a CP-female and VH-female rats. *Upper-left panel.* VH-female rat after saline injection. *Lower-left panel.* The same VH-female rat after cocaine injection. Dorsal hippocampal FDG uptake was reduced after cocaine challenge but only in the CP-female. No such changes are evident in the VH-female (Upper- and Lower-right panels)

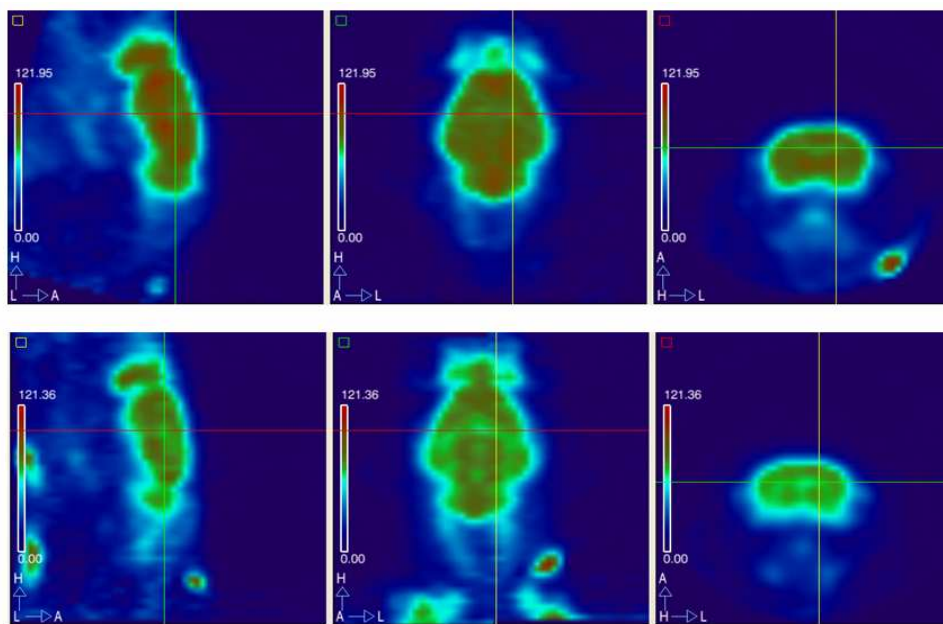




CP FEMALE: Upper panel: Saline. Lower Panel: Cocaine



VH FEMALE: Upper panel: Saline. Lower Panel: Cocaine



**ALTERATIONS IN THE RAT ADULT DOPAMINERGIC SYSTEM
FOLLOWING A PUBERTAL CANNABINOID TREATMENT: IMPLICATIONS
FOR THE VULNERABILITY TO COCAINE ADDICTION**

Higuera-Matas, A., Botreau, F, Del Olmo, N., Miguéns, M., Olías, O., Montoya, G.L., García-Lecumberri, C., and Ambrosio, E.

Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología. UNED. C/Juan del Rosal nº10. Madrid. Spain.

Corresponding Author:

Emilio Ambrosio
Departamento de Psicobiología
Facultad de Psicología
UNED
C/Juan del Rosal nº10
28040 Madrid
Spain
Tlf: +34913987974
Fax: +34913986287
e-mail: eambrosio@psi.uned.es

ABSTRACT

We have previously shown that a chronic (1 daily injection for 11 days) adolescent (P28-38) treatment with the cannabinoid agonist CP 55,940 (0.4mg/kg; 2ml/kg i.p.) induced an augmented acquisition of cocaine self-administration in female but not male rats in the adulthood. In order to ascertain the possible dopaminergic mechanisms underlying this vulnerability, we measured the levels of the dopamine transporter (DAT), D1- and D2-like receptors, using quantitative autoradiography, and tyrosine hydroxylase (TH) gene expression by in situ hybridization. This was done on brain tissue from adult female and male rats that had undergone the CP treatment, either in basal (not self-administered) conditions or after cocaine self-administration. Our results show that CP-females had higher levels of the DAT in the caudate-putamen (CPu) when compared to their VH-treated counterparts. CP-male rats had higher levels of D1-like receptors in basal conditions in the NAcc-Shell. Females, as a whole, also had a higher number of D2 receptors in the NAcc-Core. Self-administration evoked an up-regulation of the DAT in the CPu, NAcc-Shell, NAcc-Core and Tu in all the animals. As regards D1 receptors, self-administered rats showed an increment in the SN when compared to the basal values. After self-administration we also detected higher levels of D2 receptors in the Tu and SN while a down-regulation of the D2-like binding sites occurred in the Dentate Gyrus (DG) and CA1-STRAD, in this last structure, CP animals also had lower levels of D2 receptors. No differences in TH gene expression were detected among groups. These results may explain to some extent the vulnerability to cocaine self-administration after the adolescent cannabinoid exposure reported previously.

Keywords: Dopamine receptors, Dopamine Transporter, Cannabinoids, CP 55,940, Gateway Hypothesis, Cocaine Self-administration.

INTRODUCTION

Epidemiological research in the field of drug addiction has suggested that a prior exposure to drugs of abuse might facilitate a later addiction to the same or other drugs; this proposal has been termed the Gateway Hypothesis of Drug Addiction (Anthony, 2002; Fergusson, Boden, & Horwood, 2006; W. D. Hall & Lynskey, 2005; Kandel, Yamaguchi, & Klein, 2006; Lynskey, 2002; Wada, 1999). The model has some pitfalls however, especially as regards the heterogeneity of the subjects studied and possible third variables that could be intervening and therefore making it difficult to draw causal conclusions. In order to overcome these problems, animal models have been developed that mimic the human situation in which cannabis is consumed during adolescence and a subsequent higher vulnerability exists to opiate (Ellgren, Spano, & Hurd, 2007) or cocaine (Higuera-Matas et al., 2007) addiction. In a previous study, we showed that a cannabinoid agonist chronically administered to adolescent rats, increased the vulnerability to cocaine self-administration in female but not male rats in the early phases of the addictive process (Higuera-Matas et al., 2007). However the molecular mechanisms underlying these effects were unknown.

Cocaine's main pharmacological effects are on the dopaminergic system. Injections of this drug increase the levels of dopamine in the NAcc (Di Chiara & Imperato, 1988) presumably due to cocaine's ability to block the dopamine transporter (F. S. Hall et al., 2004) which has been suggested to mediate cocaine self-administration (Ritz, Lamb, Goldberg, & Kuhar, 1988). Additionally cocaine self-administration alters the number of dopamine transporter molecules (Ben-Shahar, Moscarello, & Ettenberg, 2006; Letchworth, Nader, Smith, Friedman, & Porrino, 2001) as well as that of D1-like

and D2-like receptors (Ben-Shahar et al., 2007; Moore, Vinsant, Nader, Porrino, & Friedman, 1998; Nader et al., 2002).

The interactions between the endogenous cannabinoid system and the dopaminergic system are numerous (Rodriguez De Fonseca et al., 2001); for instance it has been shown that the afore mentioned phasic dopamine release evoked by cocaine requires cannabinoid receptor activation (Cheer et al., 2007) whereas CB1 antagonism markedly increases dopamine receptor-mediated stereotypies (Ferrer et al., 2007). These interactions might suggest a role for the central endocannabinoid system in cocaine addiction, although this is still a controversial issue (Arnold, 2005; Maldonado, Valverde, & Berrendero, 2006). In this later sense, it first seemed that endocannabinoids were mainly involved in the reinstatement of cocaine seeking behaviour because the potent cannabinoid agonist HU 210 reinstates cocaine seeking while the antagonists SR 141716A and AM 251 inhibited cocaine or cocaine-associated cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behaviour (De Vries et al., 2001; Xi et al., 2006). However further studies also showed that the cannabinoid agonist WIN 55,512-2 decreased intravenous cocaine self-administration in rats (Fattore, Martellotta, Cossu, Mascia, & Fratta, 1999) and that genetic ablation of the CB1 receptor impaired cocaine self-administration (Soria et al., 2005).

Given that the number of CB1 receptors peaks during adolescence (Rodriguez de Fonseca, Ramos, Bonnin, & Fernandez-Ruiz, 1993), we would hypothesize that a chronic cannabinoid treatment during puberty would evoke a sustained dopamine release which in turn would alter the number and function of the dopaminergic receptors and the dopamine transporter. This neurochemical changes may account, at least in part, for the differential cocaine self-administration rates observed in adult rats treated with a cannabinoid agonist during adolescence.

Therefore in this study we chronically treated male and female rats with the cannabinoid agonist CP 55,940 (CP) or its corresponding vehicle during adolescence and we analyzed the basal adult levels of the dopamine transporter, D1 and D2 receptors. These same parameters were also evaluated after three weeks of cocaine self-administration (1mg/kg) in adult animals treated with the same pharmacological regimen (see (Higuera-Matas et al., 2007) for further details).

MATERIALS AND METHODS

1. – Animals and drug administration

We used Wistar albino rats of both sexes. The subjects were the offspring of rats purchased from Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain) which were mated (one male x one female) in our laboratory approximately 2 weeks after their arrival. All animals were maintained at a constant temperature (20° C) and in a reverse 12-h/12-h dark/light cycle (lights on at 20:00 hours), with free access to food (commercial diet for rodents A04/A03; Panlab, Barcelona, Spain) and water unless otherwise specified. On the day of birth (postnatal day 0), litters were sex-balanced and culled to 10±2 pups per dam. The animals were weaned at 22 days of age.

CP 55,940 (CP) (Tocris) (0.4 mg/kg) or its corresponding vehicle (VH) [ethanol:cremophor: saline (1:1:18) (cremophor, Fluka BioChemiKa)] was administered i.p., once daily, from day 28 to day 38 (11 injections), at a volume of 2 ml/kg. The dose of CP was chosen on the basis of our previous study on the long-term effects of a chronic (P35-P45) CP treatment ((Biscaia et al., 2003)). Animals were individually housed and weighted when they reached P75. All experimental procedures were carried out between 10:00 hours and 17:00 hours. The animals used in this study were

maintained in facilities according to European Union Laboratory Animal Care Rules (86/609/EEC Directive).

2. - Apparatus

For operant food-reinforced behavior and cocaine self-administration studies, twelve operant chambers (Coulbourn Instruments, USA) were used. A lever designed to register a response when 3.0 g of force was applied was placed on the front wall of the chamber. A green stimulus light was located above the lever. Food and cocaine operant data acquisition and storage were accomplished on IBM computers (Med Associates, USA).

3.- Experimental Procedure

3.1. Cocaine Self-Administration

When rats (males-VH n=11; females-VH n=8; males-CP n=10; females-CP n=7) reached P75 they were food restricted until they reached between 95% to 90% of their original body weight, and were submitted to the same autoshaping food-reinforced task described above. When the animals emitted at least 5 operant responses they underwent the FR1 food-reinforced task described in the previous section. When a sufficient (more than 50 responses per session) and stable (less than 10% variation across 3 consecutive sessions) response rate was attained, subjects were surgically prepared with an intravenous catheter placed in the jugular vein.

Put briefly, the animals were anesthetized with ketamine (40 mg/kg i.p.) and diazepam (10 mg/kg i.p.). A polyvinylchloride tubing (0.064 i.d.) was implanted in the

right jugular vein approximately at the level of the atrium. The catheter was passed subcutaneously and exited in the midscapular region; it then passed through a spring tether system (Alice King, Chatham, USA) that was mounted to the skull of the rat with dental cement. The animals were given at least 5 days to recover before beginning 5 extra days of FR1 food-reinforced task previous to the cocaine self-administration phase. Catheters were flushed daily with 0.5 milliliters of a solution of antibiotic (Gentamicin 40mg/ml) dissolved in heparinized saline in order to prevent infections and to maintain catheter patency.

The drug reinforced behavior study began when the animals reached P100 and it consisted of two phases. The first one lasted for 7 consecutive days with 30 minute sessions (Acquisition phase), and immediately after finishing this first part, the animals underwent 14 consecutive daily sessions of 120 minutes each (Maintenance phase). In each session a FR1 schedule of reinforcement was followed with each lever press rendering a 1 mg/kg cocaine injection and being followed by a 30 second timeout period. A stimulus light over the lever signaled drug availability. See (Higuera-Matas et al., 2007) for further details.

3.2. Tissue Processing

After the last self-administration session, the rats were quickly decapitated and their brains removed and frozen in isopentane cooled with dry ice: CP-treated females (n=9), VH-females (n=7), CP-males (n=10) and VH-treated males (n=10). After that, they were stored at -80°C until processed for the neurochemical assays.

Also, in order to assess several parameters of the dopaminergic system in a basal state, brains from CP-treated females (n=9), VH-females (n=8), CP-males (n=6) and

VH-treated males (n=6) which had just undergone the food autosnapping training were extracted after quick decapitation and frozen in dry ice-cooled isopentane and stored at -80°C. Brain coronal sections were carried out at different levels across the brains, according to the (Paxinos & Watson, 2005) atlas, and mounted on to gelatin-coated slides and stored at -80° until the day of the assay.

3.3. Dopamine Transporter Autoradiography

In the DAT assay sections the protocol used followed the method described by (Canfield, Spealman, Kaufman, & Madras, 1990) with a few modifications. Briefly, slide-mounted brain sections were preincubated for 20 min in sodium phosphate buffer 50 mM at 0-4°C (pH 7.4) containing 50mM NaCl to remove any residual cocaine that might be present, and then incubated for 2h in the same buffer containing [N-metil-³H]-WIN 35,428 (87 Ci/mmol; Perkin Elmer, Spain). The incubation was performed either in absence or presence of 100 µM of non-labelled cocaine to determine total and non-specific binding, respectively. After incubation, slides were washed twice (1min) in cold PBS buffer and followed by a brief two rinse washes in distilled water. They were subsequently dried under a stream of cool dried air. For the DAT study, we analyzed the Caudate-Putamen (CPu), the Nucleus Accumbens-Shell (NAcc-Shell), the Nucleus Accumbens-Core (NAcc-Core), and the Olfactory Tubercle (Tu).

3.4. D1 and D2 Receptors Autoradiography

The binding assay of the dopaminergic receptors was carried as follows: In brief, triplicate tissue sections of each brain level were incubated with 1nM ³H-SCH-23390

(D1-like receptors; 85Ci/mmol) or 1 nM ³H-YM (D2-like receptors; 71.4Ci/mmol) (Perkin Elmer, Madrid, Spain) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂ and 4 mM MgCl₂ at room temperature for 60 min. Non specific binding was determined in the presence of 10 μM of SCH-23390 (D1) or 10 μM (+)Butaclamol (D2) (Sigma, Spain) (D2). Following the incubation, sections were dipped quickly into 50 mM Tris-HCl incubation buffer (0-4 °C), dipped quickly again into H₂O₂ water, and blown dry under cold air.

In the D1-like receptors study, CPu, NAcc-Shell, NAcc-Core, Tu and Substantia Nigra (SN) were analyzed while the same regions and the Dentate Gyrus (DG) and CA1 Stratum Radiatum (CA1-StRad) were included in the D2 study.

3.5. In situ hybridization for TH mRNA detection

Sections were fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min and, after rinsing twice in phosphate-buffered saline, were acetylated by incubation in 0.25% acetic anhydride and prepared in 0.1 m triethanolamine in 0.15 m sodium chloride (pH 8.0) for 10 min. Sections were rinsed in 0.3 m sodium chloride with 0.03 m sodium citrate, pH 7.0, then dehydrated and delipidated through an ethanol–chloroform series. The probe was complementary to bases 1223-1252 of the rat TH cDNA. probes were 3' end-labelled with [³⁵S]-dATP using terminal deoxynucleotidyl-transferase. Sections were then hybridized with [³⁵S]-labelled oligonucleotide probes ($7.5 \cdot 10^5$ dpm per section).

Here, VTA and SN were chosen as regions of interest.

3.5. Exposure, Development and Quantification of autoradiograms

Slides were apposed to Hyperfilm ³H (GE Healthcare, Spain) in the case of quantitative autoradiography or Biomax films (Kodak, Spain) in in situ hybridization studies. Exposure time was nine weeks (autoradiography) or 5 days (in situ hybridization) and then developed following conventional methods. Autoradiograms were analyzed with a PC computer using the public domain NIH Image program. In the case of quantitative autoradiography, ³H-labeled standards were used to calibrate the non-linear response of the film radioactivity. Measurements were pooled from brain sections and the values averaged. Results were expressed in fmols/mg of tissue equivalent. For in situ hybridization studies, the “non-calibrated” mode of the NIH Image program was used. Results are expressed as optical density units.

4.- Statistical Analysis

A three ways ANOVA was carried out to analyze the effects of SEX (male/female), TREATMENT (CP/VH) or CONDITION (Basal/Self-administration) and their possible interactions. Second and third order interactions were analyzed by means of two ways and one way ANOVAs respectively. Statistical significance was set to $\alpha=0.05$. All calculations were made with the version 14.00 of SPSS statistical package.

RESULTS

The details of the behavioural results of this experiment have been published elsewhere (Higuera-Matas et al., 2007). Briefly, CP-female rats showed a consistently higher number of self-administered cocaine injections per session as compared to the

other groups during the acquisition phase. This effect however, disappeared during maintenance. No significant differences among the other groups appeared in any of the phases of the study. No differences appeared among groups in a food-reinforced operant task pointing to the specificity of the effects seen in the cocaine self-administration study.

1.- Dopamine Transporter

In the CPu, we found a significant effect of the CONDITION factor ($F_{1,57}=14.403$ $p<0.01$) and the SEX X TREATMENT interaction ($F_{1,57}=8.403$ $p<0.01$). After self-administration, rats had significantly higher levels of DAT-binding in the CPu. The analysis of the SEX X TREATMENT interaction showed a significant effect of the TREATMENT in the female rats ($F_{1,31}=4.591$ $p<0.05$) but not in males. CP-treated females had higher levels of DAT in the CP than their VH counterparts.

In the NAcc only a significant effect of CONDITION was evident ($F_{1,56}=6.237$, $p<0.01$ for the Shell region and $F_{1,56}=7.899$, $p<0.01$ for the Core division) with self-administered rats having higher levels of DAT in this nucleus.

A similar pattern was found in the Tu, where self-administered rats had higher levels of DAT specific binding ($F_{1,57}=5.420$, $p<0.05$). (Fig. 1)

2.- D1-like Receptors

In the NAcc-Shell, a main effect of the TREATMENT was found ($F_{1,59}=6.467$ $p<0.01$) with CP animals showing a higher number of D1-like binding sites. Also, a significant SEX X TREATMENT X CONDITION interaction was found ($F_{1,59}=5.120$ $p<0.05$) showing that the CP treatment induced an upregulation in the number of D1/D5

receptors in males in the basal state ($F_{1,13}= 11.838$ $p<0.01$). This effect disappeared after cocaine self-administration and was not observed in females.

In the Tu, a significant SEX X TREATMENT X CONDITION interaction was found ($F_{1,59}=4.262$ $p<0.05$), however when we analyzed this main effect we did not find any specific significant effect of the second and third order interactions.

In the SN, cocaine self-administration induced an up-regulation of the number of D1-like specific binding ($F_{1,55}=8.827$ $p<0.01$) irrespective of the SEX and TREATMENT factors. (Fig. 2)

No other significant effects were found in the remaining areas subjected to study.

3.- D2-like Receptors

We found a significant SEX X TREATMENT interaction in the NAcc-Shell ($F_{1,44}=5.2$ $p<0.05$) however no simple effects could be detected, however there was a trend towards statistical significance in the CP-females which showed fewer D2-like binding sites ($F_{1,24}=3.602$ $p=0.07$). In the NAcc-Core female rats showed higher levels of D2-like specific binding than males ($F_{1,41}=4.802$ $p<0.05$); additionally the effect of the SEX X TREATMENT interaction was found to be significant ($F_{1,41}=6.344$ $p<0.05$) and we detected a trend in the CP-males to have higher number of D2 receptors than their vehicle controls ($F_{1,24}=3.745$ $p=0.06$).

In the Tu, females exhibited higher D2-like binding sites than males ($F_{1,40}=5.780$ $p<0.05$). Additionally self-administered rats showed an up-regulation of the number of D2-like receptors in this area as compared to non self-administered rats ($F_{1,40}=16.069$ $p<0.01$). Also, a significant SEX X TREATMENT interaction was detected ($F_{1,40}=8.670$

p<0.01) with CP-females having less D2-like binding sites than their VH-treated controls ($F_{1,20}=4.036$ p<0.05).

We also found that self-administered rats had higher number of D2-like receptors in the SN ($F_{1,43}=6.257$ p<0.05) and a significant SEX X TREATMENT interaction ($F_{1,43}=5.711$ p<0.05).

After self-administration a down-regulation of the number of D2 receptors was observed in the DG ($F_{1,41}=18.546$ p<0.01) and in the CA1-StRad ($F_{1,38}=6.916$ p<0.01). (Fig. 3)

3.- Tyrosine Hydroxylase Gene Expression

No significant effect of the factor SEX, TREATMENT, CONDITION or any of their interactions was obtained (Fig. 5).

DISCUSSION

In this work we report enduring alterations in the dopaminergic system of adult male and female rats that have been chronically treated with a cannabinoid agonist (CP 55,940) during their adolescence. When compared to their VH-treated controls, CP-females showed higher levels of the DAT in the CPu, lower levels of D2 receptors in the Tu and a trend to show lower levels of these receptors in the NAcc-Shell, interestingly, these changes persisted even after three weeks of cocaine self-administration. On the other hand, CP-treated males showed higher levels of D1 receptors in the NAcc-Shell in basal conditions as compared to their VH counterparts, however this effect was abolished after cocaine self-administration; they also exhibited a trend to have higher levels of D1 receptors in the NAcc-Core when compared to VH-

males. Additionally, cocaine self-administration *per se*, induced an up-regulation of the DAT in three regions (CPu, NAcc-Shell, NAcc-Core), an up-regulation of D1 receptors in the SN, an up-regulation of D2 receptors in the Tu and SN, and a down-regulation of these receptors in the DG and CA1-StRaD. TH gene expression was not altered by any of the factors that were manipulated in the study.

Several studies have examined the long-term consequences of perinatal cannabinoid exposures on postnatal development of the dopaminergic system (Bonnin, de Miguel, Castro, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1996; Bonnin, de Miguel, Hernandez, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1995; Rodriguez de Fonseca, Cebeira, Fernandez-Ruiz, Navarro, & Ramos, 1991; Rodriguez de Fonseca, Cebeira, Hernandez, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1990). Interestingly, the patterns of results in these studies seem to be the opposite to the one reported here; in the perinatal studies cited above, it seems that males are more affected than females by the treatment, and they show altered D2-like levels; by contrast, we have found alterations in the levels of D2-like receptors in the CP-females. Conversely, females perinatally treated with THC show changes in the levels of D1-like receptors in response to the perinatal treatment while we have observed these changes in CP-males. It therefore seems that the effect of the cannabinoid exposure on the dopaminergic system critically depends on the age when the exposure takes place.

In a previous work we reported that CP-females showed higher cocaine self-administration rates in the initial phases of the addictive process (i.e. acquisition) (Higuera-Matas et al., 2007), interestingly, in this group of rats we have found higher levels of the DAT protein in the CPu with no changes in D1 or D2 receptors in this structure. This increased DAT expression might be due to a higher dopaminergic tone in this part of the striatum, so an elevated transport would be needed to guarantee a proper

clearance of synaptic dopamine. It seems however that a rapid clearance is achieved since we have not found any alterations in the levels of D1- or D2-like receptors in the striatum of CP-females which would be expected if a sustained elevation in dopamine levels had occurred. The increased dopaminergic tone in the dorsal striatum revealed by the higher expression of the DAT could point to an altered plasticity or function of this structure (although by mechanisms independent of those involving D1- or D2-like receptors). The dorsal striatum has been proposed to play a role in habitual but not initial cocaine use (Ito, Dalley, Robbins, & Everitt, 2002) so we cannot discard the possibility that the CPu is acting at earlier phases of the addictive process in CP-females so that their behaviour would resemble more to that of rats which already have a well established cocaine self-administration habit. In fact, this does seem to be the case, since CP-females do not show the normal pattern of acquisition of cocaine self-administration; they begin with higher and more stable rates of drug intake when compared to their VH-treated controls and to males (Higuera-Matas et al., 2007).

We have also found a down-regulation in the levels of D2 receptors in the olfactory tubercle of CP-females. The olfactory tubercle has been shown to play a role in cocaine self-administration: first cocaine is more easily self-administered in this area than in the NAcc-Shell, and second D2 antagonists co-administered with cocaine abolish the self-administration of the drug in this area (Ikemoto, 2003). Interestingly it has recently been suggested that the olfactory tubercle could be included as the most ventral component of the ventral striatum (Ikemoto, 2007) the most cardinal region for the initiation of drug addiction (Hyman, Malenka, & Nestler, 2006). It could therefore be suggested that the animals would need a higher amount of cocaine to produce the same effects in this area since the number of D2 receptors is significantly lower and because these receptors are involved in the acquisition and maintenance of cocaine self-

administration (Bari & Pierce, 2005; Britton et al., 1991; Caine & Koob, 1994; Caine, Negus, & Mello, 2000; Corrigan & Coen, 1991; Edwards, Whisler, Fuller, Orsulak, & Self, 2007; Haile & Kosten, 2001; Hubner & Moreton, 1991; Khroyan, Barrett-Larimore, Rowlett, & Spealman, 2000; Rowlett, Platt, Yao, & Spealman, 2007; Senkov et al., 2006; Woolverton & Virus, 1989). We have also found a trend in CP-females to show lower levels of D2-like receptors in the NAcc-Shell which along with the diminished levels of these receptors in the Tu might account, at least to some extent for the heightened cocaine self-administration seen in CP-females during acquisition. Interestingly, the alterations in the levels of these proteins endure even after self-administration in both structures, so in our conditions, cocaine self-administration has not been able to act as a homeostatic mechanism, at least not as it relates to the altered D2-like receptor levels observed in CP-females.

These changes in the number of D2-like receptors as a whole could contribute to explain the different self-administration patterns found in CP-females either *per se* or through the breaking of the normal balance that exists between D1-like and D2-like in the basal ganglia (Walters, Bergstrom, Carlson, Chase, & Braun, 1987). Another possible explanatory mechanism could point to altered CREB levels in the ventral striatum as a consequence of the down-regulation in the levels of D2-like receptors (especially in the Tu); it has been suggested that CREB levels inversely regulate cocaine's reinforcing properties so a higher D2-like signalling would reduce the levels of cAMP which in turn would phosphorylate PKA to a lesser extent, resulting in less CREB activation (Anderson & Pierce, 2005). This reduced CREB activation could possibly increase cocaine reinforcement and therefore explain the behaviour of CP-females in the acquisition phase (Higuera-Matas et al., 2007).

We have also found an up-regulated expression of D1-like receptors in the NAcc-Shell in CP-treated animals, and especially in CP-males, although in this case, the differences disappeared after self-administration. However, no changes in cocaine self-administration rates have been observed in the males, it seems that an up-regulation of the D1-receptor in the NAcc-Shell induced by the cannabinoid treatment is not able to affect cocaine self-administration, either because D2-receptors would be more relevant in this case or because only lowered (antagonistic-like change) and not heightened (agonistic-like change) levels of the receptor can provoke changes in the self-administration behaviour. Nonetheless, we can postulate that these changes in CP-males could have some relevance for the reinstatement of drug seeking behaviour, given the importance of D1-like receptors in this paradigm (Alleweireldt, Kirschner, Blake, & Neisewander, 2003; Alleweireldt, Weber, Kirschner, Bullock, & Neisewander, 2002; Anderson, Bari, & Pierce, 2003; Khroyan, Barrett-Larimore, Rowlett, & Spealman, 2000), however the differential pattern of drug-seeking behaviour after a withdrawal period has not been studied under our conditions as yet.

TH gene expression was not altered by the sex, the treatment, cocaine self-administration or any of their interactions. The lack of effect of the treatment was somewhat expected, since in perinatal studies where pregnant rats are administered with THC, and then TH gene expression of the offspring is measured, no effects of the cannabinoids were obtained (Garcia-Gil, Ramos, Rubino, Parolaro, & Fernandez-Ruiz, 1998). It is surprising nonetheless, that self-administration did not produce any effect on TH gene expression. It has been previously reported that a chronic exposure to cocaine up-regulated the expression of TH mRNA, but in this study a prolonged access to cocaine was allowed (Vrana, Vrana, Koves, Smith, & Dworkin, 1993). Therefore, it can be argued that only an extended contact with the drug alters TH gene expression.

In this work we have also found an up-regulation of the levels of the DAT in the forebrain regions studied (CPu, NAcc-Shell, NAcc-Core and Tu) after three weeks of cocaine self-administration. These results agree with those of cocaine self-administration studies which have also found DAT up-regulations in different brain areas of rats and monkeys (Ben-Shahar, Moscarello, & Ettenberg, 2006; Letchworth, Nader, Smith, Friedman, & Porrino, 2001; Wilson & Kish, 1996; Wilson, Nobrega, Carroll et al., 1994; Wilson, Nobrega, Corrigall et al., 1994). Human studies have also shown that DAT function is elevated in cocaine users (Witkin et al., 1999) and that the level of DAT cocaine's occupancy correlates with self-reported informs of euphoria.

Interestingly, cocaine did not affect the number of D1- or D2-like receptors in those regions where DAT levels were up-regulated after self-administration. An exception to this is the Tu where both the DAT and D2-like receptors showed increased levels. This later fact is not in agreement with previous literature showing up-regulations in the number of DAT proteins and down-regulations in the levels of D2-like receptors –most likely as a result of heightened dopamine levels- after cocaine self-administration (Porrino, Daunais, Smith, & Nader, 2004). These diverging results might be mostly explained by differences in the animal species used in each study and the regimen of access to the drug.

Cocaine self-administration also induced an up-regulation of D1- and D2-like receptors in the SN; this is in contrast with human (Meador-Woodruff, Little, Damask, Mansour, & Watson, 1993) and monkey (Farfel, Kleven, Woolverton, Seiden, & Perry, 1992) studies that have found no changes after intermittent cocaine exposure. However, to our knowledge, no studies have been performed in the rat that had measured D1 or D2 levels in the SN after cocaine self-administration; therefore it is impossible to compare these findings with previous studies.

Finally D2-like receptors were down-regulated in the DG and CA1-STRAD after cocaine self-administration. These changes can have functional significance given the enhanced synaptic plasticity found in the CA1-STRAD after cocaine self-administration (del Olmo et al., 2006; Thompson, Swant, Gosnell, & Wagner, 2004) and the relevance of D2 mechanisms in long-term potentiation (Frey, Hartmann, & Matthies, 1989; Manahan-Vaughan & Kulla, 2003).

In conclusion, we have shown that a chronic treatment with the cannabinoid agonist CP 95,940 during adolescence modifies central dopaminergic systems in a sex-specific fashion. We postulate that these changes can explain, to some extent the enhanced vulnerability to cocaine addiction seen in female rats chronically exposed to cannabinoids during adolescence. In all, these results might provide a biological base that supports a Gateway Hypothesis of drug addiction.

ACKNOWLEDGEMENTS

Alejandro Higuera-Matas is the recipient of a pre-doctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (“Programa de Formación del Profesorado Universitario” -FPU). The authors wish to thank Alberto Marcos, Rosa Ferrado and Luis Troca for technical assistance. This work has been supported by grants FIS G03/05 (“Red de Trastornos Adictivos”), BSO2001-109, FIS 01-05-01, “Plan Nacional sobre Drogas (2001-2003 and 2004-2006)” GR-SAL/0260/2004, “Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid” and “Plan de Promoción de la Investigación en la UNED”.

FIGURES

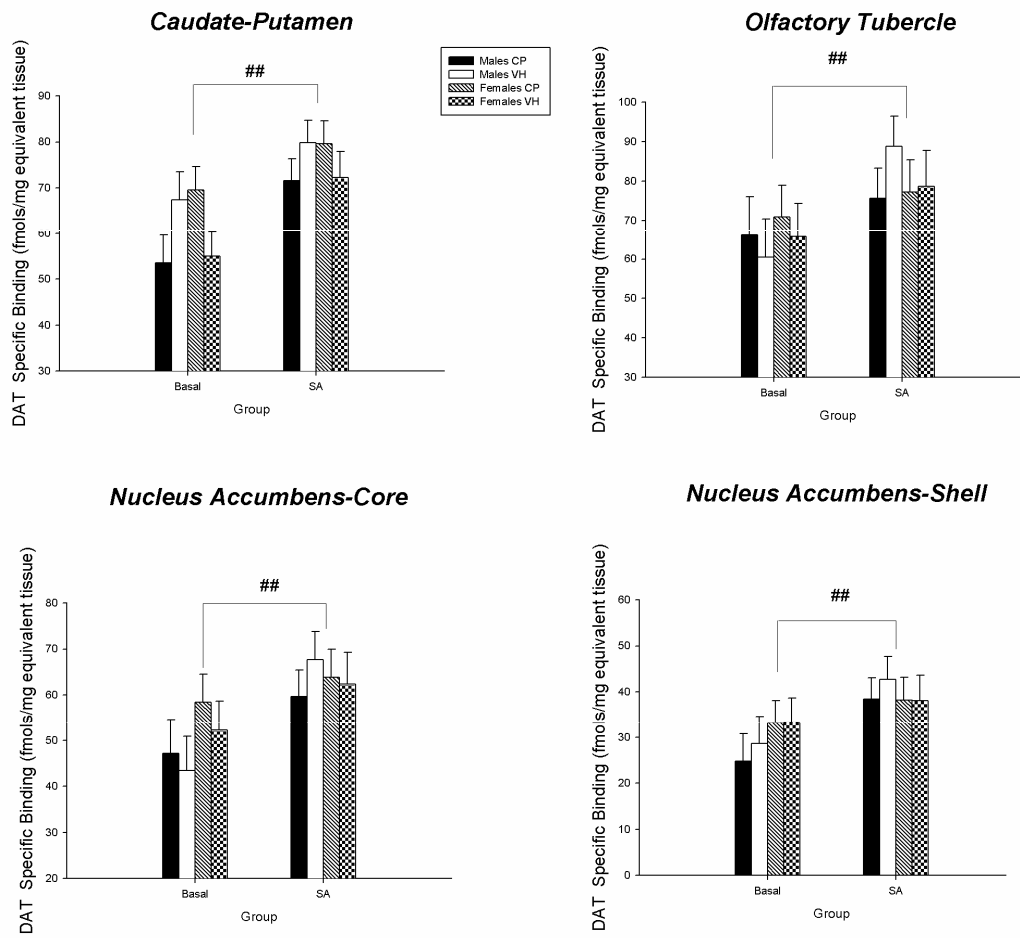


Fig. 1

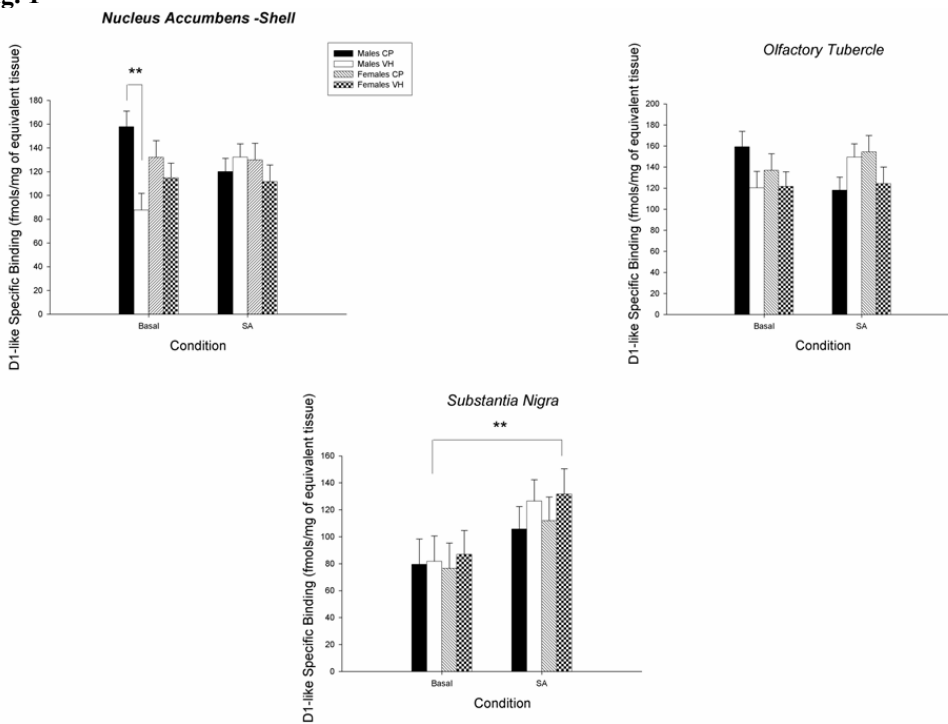


Fig. 2

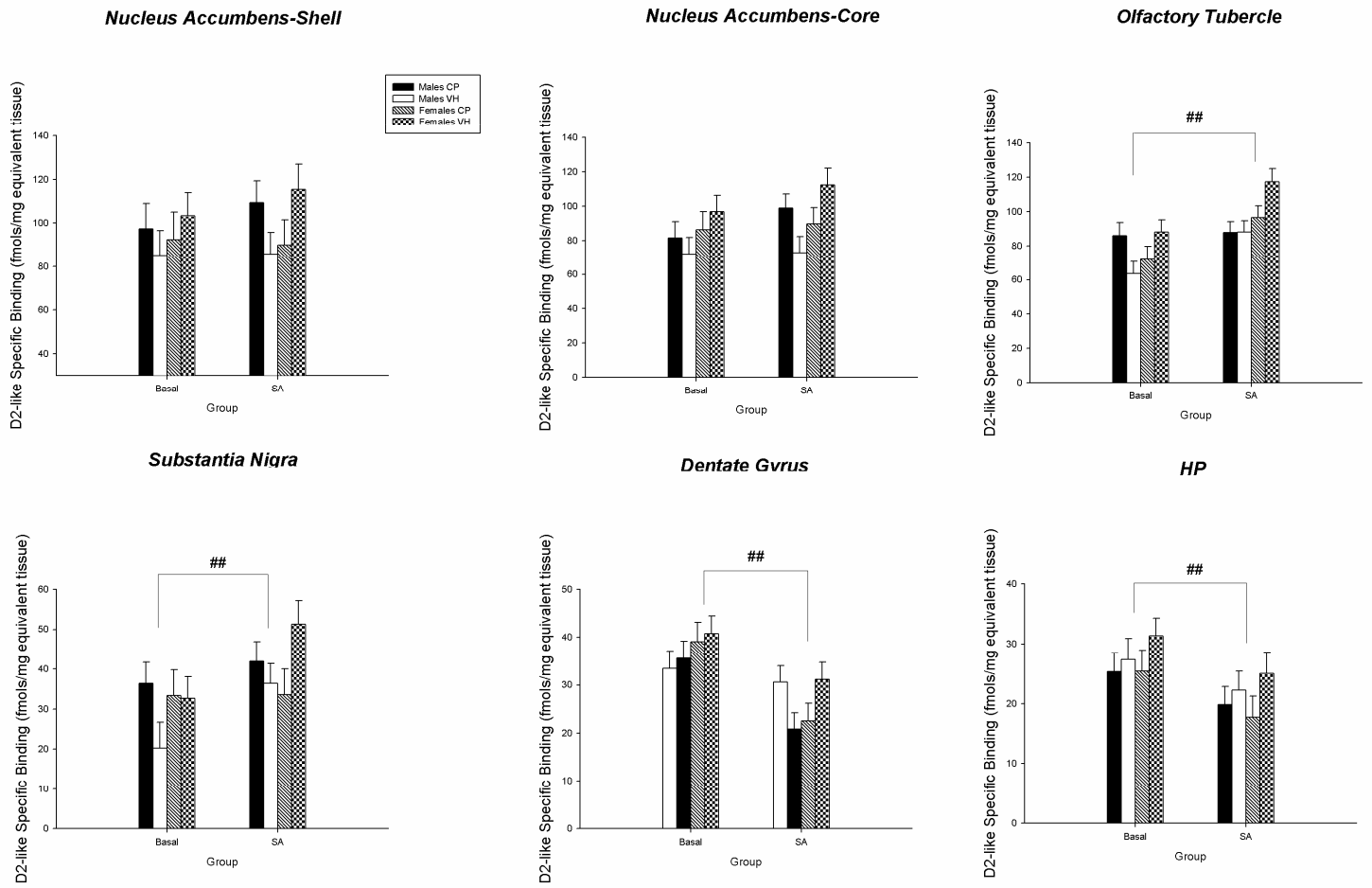


Fig. 3

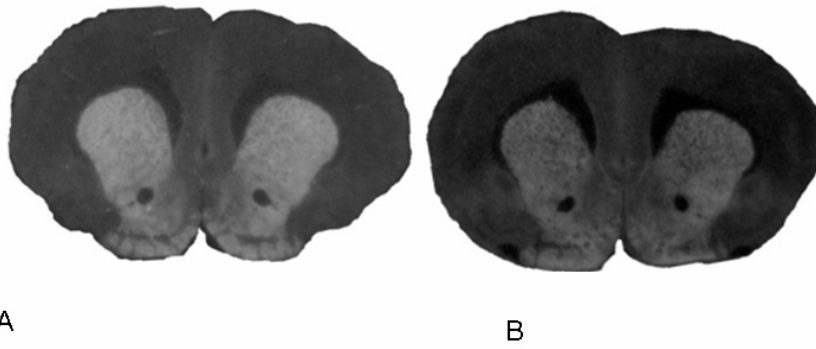


Fig. 4

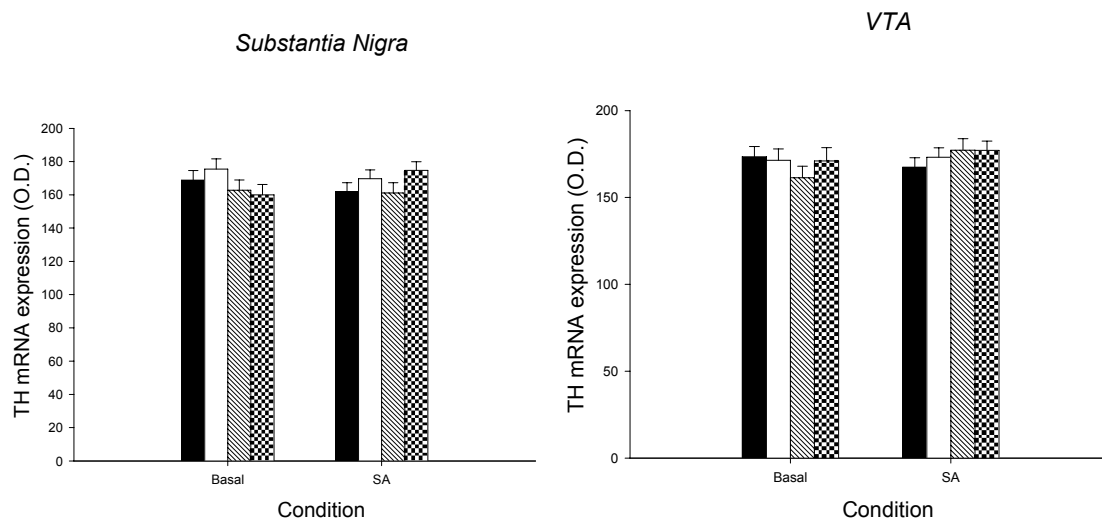


Fig. 5

FOOTNOTES

Figure 1: DAT specific binding in the CPu, NAcc, and Tu. The graph depicts the specific binding for the four groups included in the study (CP- and VH- males and females). In the CPu, CP-females showed a significantly higher number of DAT molecules, even after self-administration, as compared to their VH-treated counterparts. Additionally, cocaine self-administration induced a significant up-regulation in the DAT levels in all the regions studied). ## Significant effect of Condition ($p < 0.01$).

Figure 2: D1-like specific binding. The levels of D1-like receptors were significantly higher in CP-males as compared to their VH-injected controls. However, these differences disappeared after cocaine self-administration. Additionally, the levels of D1 receptors were up-regulated in the SN after three weeks of cocaine self-administration. ## Significant effect of Condition ($p < 0.01$). ** Significant difference as compared to VH-males ($p < 0.01$).

Figure 3: D2-like specific binding in striatal and hippocampal regions as well as in the SN. CP-females exhibited a lower number of D2-like receptors in the Tu; this was unchanged after cocaine self-administration. However the levels of D2 receptors increased after three weeks of cocaine self-administration in the Tu and SN while they were lower in the DG and CA1-STRAD. Some differences also exist between males and females as it relates to D2 levels. Females have higher levels of this protein as compared to males in the NAcc-Core and Tu. ## Significant effect of Condition ($p < 0.01$).

Figure 4: DAT levels in the dorsal striatum. Representative coronal autoradiograms of CP- (A) and VH- (B) females. Brighter tones represent higher binding levels.

Figure 5: TH mRNA expression in the SN and VTA as revealed by in situ hybridization. No differences were obtained among groups.

REFERENCES

- Alleweireldt, A. T., Kirschner, K. F., Blake, C. B., & Neisewander, J. L. (2003). D1-receptor drugs and cocaine-seeking behavior: investigation of receptor mediation and behavioral disruption in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *168*(1-2), 109-117.
- Alleweireldt, A. T., Weber, S. M., Kirschner, K. F., Bullock, B. L., & Neisewander, J. L. (2002). Blockade or stimulation of D1 dopamine receptors attenuates cue reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *159*(3), 284-293.
- Anderson, S. M., Bari, A. A., & Pierce, R. C. (2003). Administration of the D1-like dopamine receptor antagonist SCH-23390 into the medial nucleus accumbens shell attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *168*(1-2), 132-138.
- Anderson, S. M., & Pierce, R. C. (2005). Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacol Ther*, *106*(3), 389-403.
- Anthony, J. C. (2002). Death of the 'stepping-stone' hypothesis and the 'gateway' model? Comments on Morral et al. *Addiction*, *97*(12), 1505-1507.
- Arnold, J. C. (2005). The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, *81*(2), 396-406.
- Bari, A. A., & Pierce, R. C. (2005). D1-like and D2 dopamine receptor antagonists administered into the shell subregion of the rat nucleus accumbens decrease cocaine, but not food, reinforcement. *Neuroscience*, *135*(3), 959-968.
- Ben-Shahar, O., Keeley, P., Cook, M., Brake, W., Joyce, M., Nyffeler, M., et al. (2007). Changes in levels of D1, D2, or NMDA receptors during withdrawal from brief or extended daily access to IV cocaine. *Brain Res*, *1131*(1), 220-228.
- Ben-Shahar, O., Moscarello, J. M., & Ettenberg, A. (2006). One hour, but not six hours, of daily access to self-administered cocaine results in elevated levels of the dopamine transporter. *Brain Res*, *1095*(1), 148-153.
- Biscaia, M., Marin, S., Fernandez, B., Marco, E. M., Rubio, M., Guaza, C., et al. (2003). Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*, *170*(3), 301-308.
- Bonnin, A., de Miguel, R., Castro, J. G., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1996). Effects of perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol on the fetal and early postnatal development of tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat brain. *J Mol Neurosci*, *7*(4), 291-308.
- Bonnin, A., de Miguel, R., Hernandez, M. L., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1995). The prenatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol affects the gene expression and the activity of tyrosine hydroxylase during early brain development. *Life Sci*, *56*(23-24), 2177-2184.
- Britton, D. R., Curzon, P., Mackenzie, R. G., Keabian, J. W., Williams, J. E., & Kerkman, D. (1991). Evidence for involvement of both D1 and D2 receptors in maintaining cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav*, *39*(4), 911-915.
- Caine, S. B., & Koob, G. F. (1994). Effects of dopamine D-1 and D-2 antagonists on cocaine self-administration under different schedules of reinforcement in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, *270*(1), 209-218.
- Caine, S. B., Negus, S. S., & Mello, N. K. (2000). Effects of dopamine D(1-like) and D(2-like) agonists on cocaine self-administration in rhesus monkeys: rapid

- assessment of cocaine dose-effect functions. *Psychopharmacology (Berl)*, 148(1), 41-51.
- Canfield, D. R., Spealman, R. D., Kaufman, M. J., & Madras, B. K. (1990). Autoradiographic localization of cocaine binding sites by [³H]CFT ([³H]WIN 35,428) in the monkey brain. *Synapse*, 6(2), 189-195.
- Corrigall, W. A., & Coen, K. M. (1991). Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists. *Pharmacol Biochem Behav*, 39(3), 799-802.
- Cheer, J. F., Wassum, K. M., Sombers, L. A., Heien, M. L., Ariansen, J. L., Aragona, B. J., et al. (2007). Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. *J Neurosci*, 27(4), 791-795.
- De Vries, T. J., Shaham, Y., Homberg, J. R., Crombag, H., Schuurman, K., Dieben, J., et al. (2001). A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med*, 7(10), 1151-1154.
- del Olmo, N., Miguens, M., Higuera-Matas, A., Torres, I., Garcia-Lecumberri, C., Solis, J. M., et al. (2006). Enhancement of hippocampal long-term potentiation induced by cocaine self-administration is maintained during the extinction of this behavior. *Brain Res*, 1116(1), 120-126.
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(14), 5274-5278.
- Edwards, S., Whisler, K. N., Fuller, D. C., Orsulak, P. J., & Self, D. W. (2007). Addiction-related alterations in D1 and D2 dopamine receptor behavioral responses following chronic cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, 32(2), 354-366.
- Ellgren, M., Spano, S. M., & Hurd, Y. L. (2007). Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, 32(3), 607-615.
- Farfel, G. M., Kleven, M. S., Woolverton, W. L., Seiden, L. S., & Perry, B. D. (1992). Effects of repeated injections of cocaine on catecholamine receptor binding sites, dopamine transporter binding sites and behavior in rhesus monkey. *Brain Res*, 578(1-2), 235-243.
- Fattore, L., Martellotta, M. C., Cossu, G., Mascia, M. S., & Fratta, W. (1999). CB1 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Behav Brain Res*, 104(1-2), 141-146.
- Fergusson, D. M., Boden, J. M., & Horwood, L. J. (2006). Cannabis use and other illicit drug use: testing the cannabis gateway hypothesis. *Addiction*, 101(4), 556-569.
- Ferrer, B., Gorriti, M. A., Palomino, A., Gornemann, I., de Diego, Y., Bermudez-Silva, F. J., et al. (2007). Cannabinoid CB1 receptor antagonism markedly increases dopamine receptor-mediated stereotypies. *Eur J Pharmacol*, 559(2-3), 180-183.
- Frey, U., Hartmann, S., & Matthies, H. (1989). Domperidone, an inhibitor of the D2-receptor, blocks a late phase of an electrically induced long-term potentiation in the CA1-region in rats. *Biomed Biochim Acta*, 48(7), 473-476.
- Garcia-Gil, L., Ramos, J. A., Rubino, T., Parolaro, D., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1998). Perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure did not alter dopamine transporter and tyrosine hydroxylase mRNA levels in midbrain dopaminergic neurons of adult male and female rats. *Neurotoxicol Teratol*, 20(5), 549-553.
- Haile, C. N., & Kosten, T. A. (2001). Differential effects of D1- and D2-like compounds on cocaine self-administration in Lewis and Fischer 344 inbred rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 299(2), 509-518.

- Hall, F. S., Sora, I., Drgonova, J., Li, X. F., Goeb, M., & Uhl, G. R. (2004). Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. *Ann N Y Acad Sci*, *1025*, 47-56.
- Hall, W. D., & Lynskey, M. (2005). Is cannabis a gateway drug? Testing hypotheses about the relationship between cannabis use and the use of other illicit drugs. *Drug Alcohol Rev*, *24*(1), 39-48.
- Higuera-Matas, A., Luisa Soto-Montenegro, M., Del Olmo, N., Miguens, M., Torres, I., Jose Vaquero, J., et al. (2007). Augmented Acquisition of Cocaine Self-Administration and Altered Brain Glucose Metabolism in Adult Female but not Male Rats Exposed to a Cannabinoid Agonist during Adolescence. *Neuropsychopharmacology*.
- Hubner, C. B., & Moreton, J. E. (1991). Effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists on cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, *105*(2), 151-156.
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu Rev Neurosci*.
- Ikemoto, S. (2003). Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: intracranial self-administration studies. *J Neurosci*, *23*(28), 9305-9311.
- Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev*.
- Ito, R., Dalley, J. W., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2002). Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J Neurosci*, *22*(14), 6247-6253.
- Kandel, D. B., Yamaguchi, K., & Klein, L. C. (2006). Testing the Gateway Hypothesis. *Addiction*, *101*(4), 470-472; discussion 474-476.
- Khroyan, T. V., Barrett-Larimore, R. L., Rowlett, J. K., & Spealman, R. D. (2000). Dopamine D1- and D2-like receptor mechanisms in relapse to cocaine-seeking behavior: effects of selective antagonists and agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, *294*(2), 680-687.
- Letchworth, S. R., Nader, M. A., Smith, H. R., Friedman, D. P., & Porrino, L. J. (2001). Progression of changes in dopamine transporter binding site density as a result of cocaine self-administration in rhesus monkeys. *J Neurosci*, *21*(8), 2799-2807.
- Lynskey, M. (2002). An alternative model is feasible, but the gateway hypothesis has not been invalidated: comments on Morral et al. *Addiction*, *97*(12), 1505-1507.
- Maldonado, R., Valverde, O., & Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*, *29*(4), 225-232.
- Manahan-Vaughan, D., & Kulla, A. (2003). Regulation of depotentiation and long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by dopamine D2-like receptors. *Cereb Cortex*, *13*(2), 123-135.
- Meador-Woodruff, J. H., Little, K. Y., Damask, S. P., Mansour, A., & Watson, S. J. (1993). Effects of cocaine on dopamine receptor gene expression: a study in the postmortem human brain. *Biol Psychiatry*, *34*(6), 348-355.
- Moore, R. J., Vinsant, S. L., Nader, M. A., Porrino, L. J., & Friedman, D. P. (1998). Effect of cocaine self-administration on dopamine D2 receptors in rhesus monkeys. *Synapse*, *30*(1), 88-96.
- Nader, M. A., Daunais, J. B., Moore, T., Nader, S. H., Moore, R. J., Smith, H. R., et al. (2002). Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure. *Neuropsychopharmacology*, *27*(1), 35-46.

- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (5. ed.). Burlington, Ma.: Elsevier Academic Press.
- Porrino, L. J., Daunais, J. B., Smith, H. R., & Nader, M. A. (2004). The expanding effects of cocaine: studies in a nonhuman primate model of cocaine self-administration. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(8), 813-820.
- Ritz, M. C., Lamb, R. J., Goldberg, S. R., & Kuhar, M. J. (1988). Cocaine self-administration appears to be mediated by dopamine uptake inhibition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 12(2-3), 233-239.
- Rodriguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Fernandez-Ruiz, J. J., Navarro, M., & Ramos, J. A. (1991). Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 43(2-3), 713-723.
- Rodriguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Hernandez, M. L., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1990). Changes in brain dopaminergic indices induced by perinatal exposure to cannabinoids in rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 51(2), 237-240.
- Rodriguez De Fonseca, F., Gorriti, M. A., Bilbao, A., Escuredo, L., Garcia-Segura, L. M., Piomelli, D., et al. (2001). Role of the endogenous cannabinoid system as a modulator of dopamine transmission: implications for Parkinson's disease and schizophrenia. *Neurotox Res*, 3(1), 23-35.
- Rodriguez de Fonseca, F., Ramos, J. A., Bonnin, A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1993). Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport*, 4(2), 135-138.
- Rowlett, J. K., Platt, D. M., Yao, W. D., & Spealman, R. D. (2007). Modulation of heroin and cocaine self-administration by dopamine D1- and D2-like receptor agonists in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 321(3), 1135-1143.
- Senkov, O., Sun, M., Weinhold, B., Gerardy-Schahn, R., Schachner, M., & Dityatev, A. (2006). Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in induction of long-term potentiation and memory acquisition and consolidation in a fear-conditioning paradigm. *J Neurosci*, 26(42), 10888-109898.
- Soria, G., Mendizabal, V., Tourino, C., Robledo, P., Ledent, C., Parmentier, M., et al. (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, 30(9), 1670-1680.
- Thompson, A. M., Swant, J., Gosnell, B. A., & Wagner, J. J. (2004). Modulation of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine self-administration. *Neuroscience*, 127(1), 177-185.
- Vrana, S. L., Vrana, K. E., Koves, T. R., Smith, J. E., & Dworkin, S. I. (1993). Chronic cocaine administration increases CNS tyrosine hydroxylase enzyme activity and mRNA levels and tryptophan hydroxylase enzyme activity levels. *J Neurochem*, 61(6), 2262-2268.
- Wada, K. (1999). [The concept of "gateway drug"]. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 34(2), 95-106.
- Walters, J. R., Bergstrom, D. A., Carlson, J. H., Chase, T. N., & Braun, A. R. (1987). D1 dopamine receptor activation required for postsynaptic expression of D2 agonist effects. *Science*, 236(4802), 719-722.
- Wilson, J. M., & Kish, S. J. (1996). The vesicular monoamine transporter, in contrast to the dopamine transporter, is not altered by chronic cocaine self-administration in the rat. *J Neurosci*, 16(10), 3507-3510.
- Wilson, J. M., Norega, J. N., Carroll, M. E., Niznik, H. B., Shannak, K., Lac, S. T., et al. (1994). Heterogeneous subregional binding patterns of 3H-WIN 35,428 and 3H-GBR 12,935 are differentially regulated by chronic cocaine self-administration. *J Neurosci*, 14(5 Pt 2), 2966-2979.

- Wilson, J. M., Nobrega, J. N., Corrigall, W. A., Coen, K. M., Shannak, K., & Kish, S. J. (1994). Amygdala dopamine levels are markedly elevated after self- but not passive-administration of cocaine. *Brain Res*, *668*(1-2), 39-45.
- Witkin, J. M., Savtchenko, N., Mashkovsky, M., Beekman, M., Munzar, P., Gasior, M., et al. (1999). Behavioral, toxic, and neurochemical effects of sydnocarb, a novel psychomotor stimulant: comparisons with methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*, *288*(3), 1298-1310.
- Woolverton, W. L., & Virus, R. M. (1989). The effects of a D1 and a D2 dopamine antagonist on behavior maintained by cocaine or food. *Pharmacol Biochem Behav*, *32*(3), 691-697.
- Xi, Z. X., Gilbert, J. G., Peng, X. Q., Pak, A. C., Li, X., & Gardner, E. L. (2006). Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, *26*(33), 8531-8536.

**CHRONIC ADOLESCENT CANNABINOID TREATMENT INDUCES
ANXIOLYSIS AND SELECTIVE REFERENCE MEMORY IMPROVEMENTS
DURING ADULTHOOD WITHOUT ALTERING WORKING MEMORY IN
RATS**

Higuera-Matas, A^a., Botreau, F^a., Miguéns, M^a., Del Olmo, N^b., Borcel, E^a., Pérez-Álvarez, L^a., García-Lecumberri, C^a. and Ambrosio E^a.

^a Psychobiology Department. School of Psychology. UNED, 28040, Madrid, Spain.

^b Neuropharmacology Lab. Univ. San Pablo CEU, P.O. Box 67, 28660 Boadilla, Madrid, Spain.

Corresponding Author: Emilio Ambrosio, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, UNED, C/ Juan del Rosal nº10, 28040 Madrid, Spain. Tlf: +34913987974; Fax: +34913986287; e-mail: eambrosio@psi.uned.es

ABSTRACT

Adolescent exposure to cannabinoids has been associated with long-lasting alterations in anxiety-related responses, as well as with deficits in learning and memory. However, as yet the neural basis underlying these cannabinoid-induced alterations has not been clearly defined. Here, we measured anxiety responses in the elevated plus maze (EPM) in adult wistar rats treated at puberty with the cannabinoid agonist CP 55,940 (CP), as well as defining their recognition memory performance in the novel object paradigm and spatial learning and memory in the water maze. Treatment was administered as a single daily intraperitoneal injection (0.4mg/kg; 2ml/kg) over 11 days (P28-P38). Similarly, we also measured the expression of PSA-NCAM in the hippocampus as well as the levels of plasma estradiol in the same adults. Moreover, hippocampal long-term potentiation (LTP) was also studied in these adult animals. We found that CP had an anxiolytic effect in the adult rats, revealed by the shorter time spent in the closed arms of the EPM, as well as by their reduced grooming behavior. No differences between the animals were found in recognition memory although improved reference memory was observed in animals administered CP. There was also a trend in females that received CP to better remember the platform location than the other animals, and effect which was not accompanied by changes in plasma estradiol. On the other hand, only males that were administered CP presented higher levels of PSA-NCAM in the hippocampus although this effect was not related to changes in LTP.

KEYWORDS: Cannabinoid, adolescence, anxiety, reference memory, working memory, LTP, PSA-NCAM

INTRODUCTION

During adolescence, a period of particular vulnerability to the effects of drugs of abuse (Viveros, Llorente, Moreno, and Marco, 2005), marijuana is the most commonly used illicit drug (Gruber and Pope, 2002). During this period of development, substantial morphological and functional modifications are taking place in the brain and these changes are thought to support the emergence of adult cognitive processes (Chambers, Taylor, and Potenza, 2003). For example, it has been shown that the number of the CB1 receptors peaks during adolescence before rapidly declining and reaching adult values (Rodriguez de Fonseca, Ramos, Bonnin, and Fernandez-Ruiz, 1993). These receptors are very abundant in the hippocampus (Herkenham, Lynn, Little, Johnson, Melvin, de Costa, and Rice, 1990), a neural structure mainly involved in learning and memory processes (Squire, 2004). Indeed, it has been reported that cannabinoids alter normal synaptic functioning in the hippocampus resulting in memory impairment (Mato, Chevaleyre, Robbe, Pazos, Castillo, and Manzoni, 2004; Robbe, Montgomery, Thome, Rueda-Orozco, McNaughton, and Buzsaki, 2006). Accordingly, it might be hypothesized that exposure to cannabinoids during adolescence would provoke changes in hippocampal function that would alter adult cognitive domains. In this regard, conflicting data has emerged on the residual effects of cannabinoids. Early studies in humans showed that chronic marijuana use before the age of 16 was correlated with impaired visual scanning task performance (Ehrenreich, Rinn, Kunert, Moeller, Poser, Schilling, Gigerenzer, and Hoehe, 1999). Moreover, it was reported that marijuana exposure during adolescence is associated with a long-term deficit in working memory (Schwartz, Gruenewald, Klitzner, and Fedio, 1989). Animal studies in this field have shown that chronic cannabinoid exposure during adolescence impairs working memory when measured by the novel object recognition task in adult female rats. However, this impairment was not evident after chronic administration to adults (O'Shea, Singh, McGregor, and Mallet, 2004), although similar results were observed in adult male rats treated in adolescence with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 (Schneider and Koch, 2003).

In this context, it is also important to understand how the anxiety responses develop and how cannabinoid exposure during adolescence may affect these, since it is now clear that these anxiety-related responses influence learning and memory (Herrero, Sandi, and Venero, 2006). It seems that there is a degree of sex-specificity in the residual effect on adult anxiety following adolescent exposure to tetrahydrocannabinol (THC). Indeed, female rats are specifically affected at this stage whereas males are affected by cannabinoids during the early postnatal, adolescent and adult periods (O'Shea, McGregor, and

Mallet, 2006; O'Shea et al., 2004). Moreover, we have also shown that chronic treatment with the cannabinoid agonist CP 55,940 during adolescence (P35-P45) exerts a long lasting anxiolytic effect in the elevated plus maze (EPM) test, without altering the plasma levels of corticosterone (Biscaia, Marin, Fernandez, Marco, Rubio, Guaza, Ambrosio, and Viveros, 2003).

Despite the growing literature on the residual effects of cannabinoid on learning, memory and anxiety, little is known about their underlying neural bases. Long term potentiation (LTP) is the best studied form of synaptic plasticity in the hippocampus (Malenka, 2003; Malenka and Bear, 2004) and it is thought to support normal learning and memory (Lynch, 2004). Cannabinoids exert complex actions on the induction and maintenance of LTP. In this regard, it has typically been found that exogenous cannabinoids impair LTP (Misner and Sullivan, 1999; Nowicky, Teyler, and Vardaris, 1987) while endocannabinoids present a more complex picture since they induce facilitation (Carlson, Wang, and Alger, 2002) or impairment (Slanina, Roberto, and Schweitzer, 2005; Terranova, Michaud, Le Fur, and Soubrie, 1995) of hippocampal LTP. Chronic administration of THC provokes deficits in LTP that are evident as early as three days after withdrawal (Hoffman, Oz, Yang, Lichtman, and Lupica, 2007). Indeed, when the long term effects of prenatal chronic THC treatment were analyzed, LTP was significantly reduced in adulthood in parallel with reduced levels of glutamate (Mereu, Fa, Ferraro, Cagiano, Antonelli, Tattoli, Ghiglieri, Tanganelli, Gessa, and Cuomo, 2003). However, to our knowledge, the long lasting effects of adolescent cannabinoid exposure on hippocampal LTP have not yet been studied.

The phenomenon of LTP in part relies on the neural cell adhesion molecule (NCAM: (Luthl, Laurent, Figurov, Muller, and Schachner, 1994; Ronn, Bock, Linnemann, and Jahnsen, 1995) and its polysialylated form (PSA-NCAM: (Muller, Djebbara-Hannas, Jourdain, Vutskits, Durbec, Rougon, and Kiss, 2000; Muller, Wang, Skibo, Toni, Cremer, Calaora, Rougon, and Kiss, 1996). The role of PSA-NCAM in learning and memory is evident since mice lacking polysialyltransferase-1 (which binds polysialic acid to NCAMs) display impaired spatial learning (Markram, Gerardy-Schahn, and Sandi, 2007) and PSA-NCAM administration to hippocampal slices from NCAM deficient mice rescues LTP (Senkov, Sun, Weinhold, Gerardy-Schahn, Schachner, and Dityatev, 2006). Additionally the expression of NCAM and PSA-NCAM was upregulated 24 hours after training in a spatial water maze task (Venero, Herrero, Touyarot, Cambon, Lopez-Fernandez, Berezin, Bock, and Sandi, 2006). The relationship of these molecules with the cannabinoid system is only just beginning to be elucidated, and it was recently reported that acute activation of CB1 cannabinoid receptors transiently diminished PSA-NCAM

expression in the dentate gyrus of the hippocampus (Mackowiak, Chocyk, Markowicz-Kula, and Wedzony, 2007). Thus, we considered it interesting to investigate any possible long term alteration of the expression of these proteins as a consequence of our chronic cannabinoid administration.

The effect of the age at which cannabinoid exposure takes place is sex specific, as are its effects on memory (O'Shea et al., 2006; O'Shea et al., 2004). Furthermore, given the influence of estrogen on learning and memory (Daniel, 2006; Daniel, Hulst, and Berbling, 2006; Daniel, Hulst, and Lee, 2005; Daniel, Sulzer, and Hulst, 2006), as well as the relationship between cannabinoids and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in females (Scorticati, Fernandez-Solari, De Laurentiis, Mohn, Prestifilippo, Lasaga, Seilicovich, Billi, Franchi, McCann, and Rettori, 2004; Scorticati, Mohn, De Laurentiis, Vissio, Fernandez Solari, Seilicovich, McCann, and Rettori, 2003), we measured the levels of plasma estradiol (ESTR) in our animals, expecting to find altered values in the rats treated in adolescence with cannabinoids.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Drug Administration

We used Wistar albino rats of both sexes and the experiments were carried out on the offspring of rats (from Harlan Interfauna Ibérica S.A., Barcelona, Spain) that were mated at our centre approximately 2 weeks after their arrival (one male x one female). All animals were maintained at a constant temperature (20° C) and in a reverse 12-h/12-h dark/light cycle (lights on at 20:00 hours), with free access to food and water (commercial diet for rodents A04/A03; Panlab, Barcelona, Spain). On the day of birth (postnatal day 0), the litters were sex-balanced and culled to 10±2 pups per dam. The animals were weaned at 22 days of age.

CP 55,940 (CP - Tocris, 0.4 mg/kg) or its corresponding vehicle (VH - ethanol:cremophor: saline, 1:1:18. Cremophor, Fluka BioChemiKa) was i.p. administered in a volume of 2 ml/kg once daily, from post-natal day 28 to 38 (11 injections). The dose of CP was chosen on the basis of our previous study on the long-term effects of a chronic CP treatment (P35-P45, (Biscaia et al., 2003) and on a previous report studying enhanced cocaine self-administration in CP-treated females (Higuera-Matas, Luisa Soto-Montenegro, Del Olmo, Miguens, Torres, Jose Vaquero, Sanchez, Garcia-Lecumberri, Desco, and Ambrosio, 2007). The animals were then housed individually when they reached P75. All experimental procedures were carried out between 10:00 hours and 17:00 hours and three different batches of animals were used for the behavioral, biochemical and electrophysiological experiments. The animals used in this

study were all maintained and handled according to European Union Laboratory Animal Care Rules (86/609/EEC Directive).

Behavioral Tests

Experimental procedures began when rats from the first batch of animals were 97 days old [CP-females (n=11), CP-males (n=9), VH-females (n=10), VH-males (n=8)] and began with handling for three consecutive days. At P100, the rats were tested in the Elevated Plus Maze (EPM) which consists of two opposing open arms (45 × 10 cm) and two enclosed arms (45 × 10 × 50 cm) that extend from a central platform (10 × 10 cm), elevated 65 cm above the floor. The rats were placed individually on the central platform facing an enclosed arm and were allowed to freely explore the maze for 5 min. The behavior of each rat was monitored using a video camera, and the movements of the rats were automatically registered and analyzed with a computerized tracking system (Ethovision 3.0, Noldus IT, Netherlands). Entry into an arm was defined as entry of all four paws into one arm. Hence, the number of times the animal entered each type of arm and the time spent in them, as well as the latency before entering an open arm were recorded. The behavioral analysis was completed by measuring the frequency and duration of the following behaviors: (1) head dipping, i.e., looking over the edge of an open arm or the central platform; (2) rearing, i.e., standing up on hind legs with or without pressing the front paws on the wall; (3) grooming; and (4) freezing.

The day after the EPM test, the protocol to study recognition working memory began. The rats were habituated to the empty open field (100 x 100 x 40 cm) for 3 min over 2 days. For the acquisition phase, the rats were placed into the open field containing two identical objects that they had never seen, and they were allowed to remain in the arena until they explored the object for 30 secs or for a total of 5 min (we considered that the rat was exploring the object when it smelt the object or climbed onto it). The time spent exploring each object was recorded. Recognition memory was tested after 30 min in a 5 min test session, during which one of the objects used during training was replaced by a novel object. The objects were cleaned thoroughly between trials to ensure the absence of olfactory cues. Additionally, they had been tested before in naive rats to ensure an equivalent level of spontaneous preference. The recognition index was calculated as the time spent exploring the new object minus the time spent exploring the old object divided by the total exploration time.

Four days after object recognition, the animals were tested in a water maze as described in (Cassel, Lazaris, Birthelmer, and Jackisch, 2007) with minor modifications. The Morris water maze used was a black circular pool (2 m diameter, 45 cm high) filled with water (30 cm depth at 25 °C) and divided into four quadrants. The pool was located in a room with numerous extra maze cues, and the behavior of the individual animals was monitored with a video camera and a computerized tracking system (Ethovision 3.0, Noldus IT). Different parameters of the rats performance were analyzed, including: escape latency or total time needed by the rats to find the platform (secs); total distance swum to reach the platform (cm); swimming speed (cm/s); and the percentage of the total time spent swimming in each quadrant. When differences in velocity were detected between groups, the distance to the platform rather than the escape latency was reported. We first tested spatial reference memory, then cued performance and finally, spatial working memory.

For reference memory testing, rats underwent a training schedule over 4 consecutive days with 4 consecutive trials per day. The platform (11cm diameter) was placed in the middle of one of the quadrants (1.5 cm below the water surface), equidistant from the sidewall and the middle of the pool, and its location did not change during training. The duration of each trial was 60 sec or until the rat found the platform. If the rat failed to escape within those 60 seconds, it was guided to the platform by the experimenter. Once the animals reached the platform, they were left on it for 20 seconds (even those that failed to locate it), they were then removed from the pool and the next trial began. Starting points were randomly assigned and they were different from trial to trial. 24 hours after the last training day, the platform was removed and the rats were allowed to search for it for 60 sec (probe test).

Two days after the test, rats were submitted to a visible platform test, where the platform location was signalled by a flag. A similar procedure to the one used for reference memory was followed but this time, the rats had two consecutive training days with four consecutive trials per day and no probe test. All the other parameters remained the same. The day after the last visible platform test session, the working memory procedure began. Training was carried out on 4 consecutive days with four consecutive trials per day. Each trial lasted 60 secs or until the rat found the hidden platform, the location of which was changed every day but remained constant during the trials performed on each day.

Biochemical Assays and Hormone Determinations

Tissue Extraction

Tissue dissection was performed in the second batch of animals, on P100 in males or on the first day of proestrus following P100 in females (CP-females n=7; CP-males n=8; VH-females n=7; VH-males n=7). Vaginal smears were collected from females and if positive for proestrous, the animal was quickly sacrificed. Otherwise, the rats were returned to their home cage and tested again on the following day until they were found to be in proestrus. Rats were sacrificed by rapid decapitation having previously been lightly anesthetized with Isoflurane. The hippocampus and frontal cortex was dissected out from each animal on ice and trunk blood was collected. The tissue samples were coded and stored at -80 °C until use. Blood was centrifuged (3000 rpm for 20 min, at 4 °C) and the plasma stored at -35°C until the day of the RIA assay.

Synaptosome preparations

Crude synaptosomal pellets were obtained according to a protocol modified from Lynch and Voss (1991). In brief, the hippocampal tissue was homogenized with 16 strokes in ten volumes of ice-cold sucrose (0.32 M) and HEPES (5 mM) buffer that contained a cocktail of protease inhibitors (Roche, Spain) and centrifuged at 1000 g for 5 min. The supernatant was then centrifuged at 15 000 g for 15 min, and the pellet was resuspended in Krebs buffer containing protease inhibitors for future use. The protein concentration for each sample was estimated by the method of Bradford (1976).

Determination of Estradiol Levels

Plasma estradiol levels were measured with a RIA kit (DSL Diagnostics, USA). The intra-assay variability of the RIA ranged from 2.01 % to 5.17%. The sensitivity of the assay (minimum detectable dose) was 11pg/ml.

ELISA

The accumulation of PSA-NCAM was quantified by enzyme-linked immunoabsorbent assays (ELISAs) according to a previously described protocol (Merino, Cordero, and Sandi, 2000). In brief, flat bottom 96 well microplates were allowed to adsorb a coating solution (Na_2CO_3 0.1 M NaHCO_3 , 0.1 M) for 2 h at room temperature. The solution was removed and 50 μl of the pellet from the samples was added at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to each well of the ELISA plates. The plates were incubated overnight at 4° C and then washed three times with 1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 20, pH 7.4. Additional binding sites were blocked with BSA (3%) for 2 h at room temperature, and the wells were rinsed three times as described above before incubating them with 50 μl aliquots of the corresponding first antibody for 20–24 h at 4 °C. After again washing the wells, 50 μl

aliquots of peroxidase conjugated second antibody were added and left for 2 h. Subsequently, 50 μ l of citrate buffer (50 mM Na_2HPO_4 , 25 mM citric acid, pH 4.5) containing o-phenylene diamine (1 mg/ml) and H_2O_2 (0.06%, added just before use) was placed in each well, and the peroxidase allowed to react for 10 min at room temperature. The reaction was terminated by the addition of 50 μ l of 10 M H_2SO_4 to each well and the optical density was determined by measuring absorbency at 492 nm with a Microplate Reader (DigiScan Reader V3.0 and DigiWIN software Program; ASYS Hitech GmbH, Austria). A monoclonal antibody was used (clone 2-2B AbCys, France) and this mouse IgM antibody (diluted 1:2000) was recognised by a peroxidase (1 chain) conjugated IgM anti-mouse secondary antibody used at a 1:1000 dilution (Sigma-Aldrich, Spain).

Long Term Potentiation studies in hippocampal slices

When rats from the third batch were between P100 and P110 (CP-females n=7; CP-males n=4; VH-females n=6; VH-males n=6), they were quickly decapitated and their brains were removed and dropped into bubbling (95% O_2 and 5% CO_2) ice-cold Krebs–Ringer bicarbonate (KRB) solution containing (in mM): 109 NaCl, 2.5 KCl, 1 KH_2PO_4 , 1.3 MgSO_4 , 2.5 CaCl_2 , 26.2 NaHCO_3 and 11 glucose. Transverse slices (400 μ m) were cut with a manual tissue chopper from the dorsal portion of each hippocampus and placed in a humidified interface chamber at room temperature (20–25 $^\circ\text{C}$) as described previously (Del Olmo et al., 2000, 2003). After a 2h incubation, the slices were transferred to the submersion recording chamber that was continuously perfused with a standard KRB solution at 1.8–2 ml/min rate. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded in the CA1 stratum radiatum with tungsten electrodes (1 $\text{M}\Omega$) and evoked by stimulating Schaffer collateral–commissural fibres with biphasic electrical pulses (30–70 μA ; 100 μs ; 0.033 or 0.066 Hz) delivered through bipolar tungsten insulated microelectrodes (0.5 $\text{M}\Omega$). The recording electrode was connected to an AI-402 amplifier (Axon Instruments, USA) attached to a CyberAmp 380 signal conditioner (Axon Instruments, USA), and electrical pulses were supplied by a pulse generator Master 8 (AMPI, Israel). Evoked responses were digitized at 25–50 Hz using a Digidata 1322A (Axon Instruments, USA) and stored on a Pentium IV IBM compatible computer using pCLAMP 9.0 software (Axon Instruments, USA). The synaptic strength was assessed by measuring the initial slope of the fEPSP that was analyzed by means of pCLAMP 9.0 software. Data were normalized with respect to the mean values of the responses obtained from each animal at the 20 min baseline period. After obtaining stable synaptic responses for at least 20 min (baseline period), the hippocampal slice was tetanized with three trains of a 100 Hz pulse lasting for 1 s

and 100 μ s with an interval of 20 s (high frequency stimulation, HFS). A single slice from each separate animal was considered as $n=1$ and all electrophysiological experiments were carried out at 31–32 °C.

Statistical Analysis

For the EPM, object recognition, electrophysiology and ELISAs, ANOVAs were used to analyse differences between the groups. Two independent variables were assessed: SEX (male or female) and TREATMENT (CP or Vehicle). Unifactorial ANOVAs were used to examine interactions and the Bonferroni method or t-tests were used to analyse the simple effects. For the water maze data, a mixed ANOVA was used with SEX and TREATMENT as the between-subject factors and Days (with each day comprising the average of all the trials of that day) as the within-subject factor.

Non-parametric statistics (Kruskal-Wallis H and Mann-Whitney U tests) were used whenever the basic assumptions of ANOVA were not met. The Greenhouse-Geisser correction for the degrees of freedom was applied when non-spherical mixed ANOVA was detected.

RESULTS

EPM

We found that animals that were administered CP displayed less anxious responses in the EPM than their VH injected controls. A significant effect of the TREATMENT factor was observed on the time spent in the closed arms ($H_1=4.011$ $p<0.05$), with CP animals spending significantly less time in the closed arms (Fig. 1). In contrast, no other differences were found in the time spent in the remaining areas of the EPM. We also detected a significant effect of TREATMENT on the frequency of grooming behavior ($F_{1,34}=6.816$ $p<0.01$), whereby CP animals showing less frequent grooming behavior. However, it is noteworthy that the overall frequency of this behavior was low (Mean_{CP}=0.348 SEM_{CP}=0.195; Mean_{VH}=1.088 SEM_{VH}=0.205). No significant differences were detected in any of the other behaviors studied.

Novel Object

While non spatial working memory was analyzed with the novel object test, no significant effects of any of the factors were found in the recognition index (Mean_{Male-CP}=0.59 SEM_{Male-CP}=0.06; Mean_{Male-VH}=0.57 SEM_{Male-VH}=0.04; Mean_{Female-CP}=0.59 SEM_{Female-CP}=0.03; Mean_{Female-VH}=0.54 SEM_{Female-VH}=0.04). All the animals seemed to remember the objects quite well since their recognition index was typically higher than 0.3 (Vannucchi, Scali, Kopf, Pepeu, and Casamenti, 1997).

Water maze

Reference Memory

In the water maze reference memory task, we found that male rats outperformed females as demonstrated by the significant effect of SEX on days 3 ($F_{1,34}=5.089$, $p<0.05$) and 4 ($F_{1,34}=5.570$ $p<0.05$) of training. Indeed, the male rats travelled a shorter cumulative distance to the platform, which demonstrated better learning. There were no other significant effects on the principle measures of behavior, although when we looked at the percentage of failed trials per day, animals administered CP failed in fewer trials than the VH controls, as revealed by the significant effect of TREATMENT ($F_{1,34}=5.577$ $p<0.05$; $\text{Mean}_{\text{FailedTrialsCP}}=27.321$ $\text{SEM}=3.534$; $\text{Mean}_{\text{FailedTrialsVH}}=39.453$ $\text{SEM}=3.729$; Fig 2 A).

During the probe test, a significant SEX x TREATMENT interaction was found ($F_{1,34}=6.487$ $p<0.05$), with a trend in the CP-females towards a lower latency in reaching the platform ($F_{1,19}=3.676$ $p=0.07$; Fig. 2 B).

Visible Platform Cued Task

The ANOVA did not show any interactive effects of TREATMENT or of the SEX of the animals with the TRIAL. However, the females CP treated animals were faster in finding the location of the visible platform as shown by the significant effect of SEX and TREATMENT when analyzed as between subject factors ($F_{1,34}=9.534$ $p<0.01$ for SEX and $F_{1,34}=4.544$ $p<0.05$ for TREATMENT). However, when this issue was analysed in more detail, these effects were due to a large difference in the latency of VH-females on the first day ($t_{19}=2.304$ $p<0.05$), while no differences could be found on the second day between any of the groups (Fig. 2C).

Working Memory

Male rats performed better in this task as shown by the shorter average distance travelled to the platform (significant effect of SEX on days 1 ($F_{1,34}=4.390$ $p<0.05$), 3 ($F_{1,34}=6.875$ $p<0.01$) and 4 ($F_{1,34}=8.521$ $p<0.01$; Fig. 2D). No other significant effect of any factor was found in the path distance or in the percentage of failed trials.

Plasma Estradiol Levels

Given the trend of CP-treated female rats to perform better in the spatial reference memory task (i.e. the probe test), we determined whether a change in the level of circulating estradiol could account for these results in a separate batch of animals. However, no significant differences were found between female rats administered CP or the VH alone ($\text{Mean}_{\text{Female-CP}}=18.65$ pg/ml $\text{SEM}_{\text{Female-CP}}=2.34$; $\text{Mean}_{\text{Female-VH}}=21.29$ pg/ml $\text{SEM}_{\text{Female-VH}}=4.31$; Fig 3).

PSA-NCAM

When we analyzed PSA-NCAM in the hippocampus, we found a small but significant increment in PSA-NCAM in CP-males when compared to their VH controls ($t_{12}=-2.735$ $p<0.05$: Fig. 4A).

Hippocampal Long-Term Potentiation

The LTP induced by HFS was similar in all four groups of rats, with no differences due to SEX, TREATMENT, or the interaction of these two factors (Fig. 4B).

DISCUSSION

In the present study, we present evidence that the anxiety in adult animals treated with the cannabinoid agonist CP during early adolescence (P28-P38) is somewhat reduced. Additionally, we found improved spatial learning in these CP animals since they failed in fewer trials. A significant interaction between the sex and pharmacological treatment highlighted a trend in CP females to develop better reference memory for the location of the hidden platform. However, no significant effects of the treatment or the interaction of sex and treatment were found on either spatial working memory (water maze) or non-spatial working memory (the novel object recognition task). Additionally, sex did affect reference and working memory in the water maze task, male rats performing better than their female counterparts. The visible platform control task showed some interesting results since CP-females find the platform faster than their VH controls, although this effect disappeared on the second day of the task. We also found increased hippocampal PSA-NCAM expression in CP-males when compared to VH-males but no other effects were detected on PSA-NCAM levels. Nevertheless, a similar pattern of LTP was observed in all the groups included in the study.

The results of the experiments reported here are novel in several respects. Although the developmental effects of cannabinoid exposure in anxiety and cognition have been previously studied in terms of behavior (Ehrenreich et al., 1999; O'Shea et al., 2006; O'Shea et al., 2004; Quinn, Matsumoto, Callaghan, Long, Arnold, Gunasekaran, Thompson, Dawson, Mallet, Kashem, Matsuda-Matsumoto, Iwazaki, and McGregor, 2007; Schneider and Koch, 2003), little is known about the neural substrates underlying these modifications. With regards anxiety, our results are in agreement with early studies (Biscaia et al., 2003) where a reduction in the levels of anxiety in animals treated with CP during late adolescence (P35-P45) was also found. It is also worth mentioning that we have not found changes in the levels of plasma corticosterone among our animals (data not shown), also in accordance with that

reported previously (Biscaia et al., 2003). However, a direct or indirect influence of the treatment at other levels of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (i.e.: changes in the levels of CRH or ACTH) cannot not be ruled out.

Deficits in the working memory domain after chronic adolescent THC treatments have been reported previously, while adult spatial reference memory or non-spatial learning in the water maze has not been shown to be affected (Cha, White, Kuhn, Wilson, and Swartzwelder, 2006). In contrast, we show that the acquisition of a spatial reference memory task improves in animals that received CP. When we tested the retrieval of previously encoded information in this task, there was a significant effect of the interaction between sex and the pharmacological treatment, and females that received CP tend to perform better in the probe test. This might reflect altered estrogen levels as a consequence of CP treatment, although we found no alterations in the levels of plasma estrogens between CP and VH exposed females. Interestingly, we found no deficits in working memory measured both in the water maze and in the novel object test. The lack of impaired working memory is quite surprising given that it has consistently been shown that chronic THC administration during adolescence impairs working memory in a long-lasting fashion (O'Shea et al., 2006; O'Shea et al., 2004; Quinn et al., 2007). This discrepancy may be due to methodological issues, particularly with regards the novel object paradigm and in relation to the inter-trial interval between the first exposure to the objects and the second. We have used a short interval (30 min) while in the aforementioned studies this interval ranged from 1 to 48 h. It seems that the impairment induced by cannabinoids is only significant when long intervals are introduced, requiring stronger working memory. With an easier task, like the one used here, chronic CP administration does not seem to produce any kind of alteration. Interestingly, the lack of effect is conserved in the spatial working memory as measured in the water maze. In this task, the shorter latency to find the visible platform specifically during the first day in CP-treated females coupled with the fact that this difference disappeared on the second day could indicate a change in attention rather than an improvement in sensory-motor capacities in this group of animals. It might be argued that when having to pay attention to novel stimuli (such as the flag signalling the platform location during the first day of the test), CP-treated female rats perform better. However, this effect might disappear when the novelty of the situation had disappeared (as for example on the second day of the task).

In addition, it is noteworthy that the only biochemical effect of our treatment measured here, was the enhanced expression of PSA-NCAM in the hippocampus of males that received CP. Indeed, it seems

that these increased PSA-NCAM levels are due to a higher polysialylation of NCAM given that the total amount of NCAM, or its 180,140 and 120 isoforms, were not altered by the treatment or between the sexes (unpublished observations). This is quite interesting since it has been reported that CB1 receptor activation transiently decreases PSA-NCAM expression in the dentate gyrus of the hippocampus (Mackowiak et al., 2007). It seems that the influence of the cannabinoid system on PSA-NCAM expression depends on the age and time of exposure to cannabinoids.

To offer a plausible explanation for our results in the reference memory task, it could be argued that the enhanced attention to novel stimuli in CP-treated females in conjunction with the anxiolysis found in animals administered CP and the higher levels of hippocampal PSA-NCAM in males that received CP (alone or in combination), might to some extent account for the fewer failed trials in the CP group as a whole and the tendency of CP-treated females to display improved spatial reference memory (although in this case PSA-NCAM changes would not be that important). This hypothesis is partially supported by the fact that attentional mechanisms are relevant to spatial learning, as highlighted in studies with the spontaneously hypertensive rat (SHR) model of attention and hyperactivity disorder (Clements and Wainwright, 2006). The altered attention of SHR's is reflected in impaired spatial learning, so it could be conversely argued that a greater attention could result in a better performance in the water maze. With regards anxiety, it has also been shown that animals with a lower anxiety trait perform better in the water maze than animals screened for high anxiety (Herrero et al., 2006). Moreover, the levels of PSA-NCAM are up-regulated after 24 h or after a spatial learning training session, and endoneuroaminidase infusion, an enzyme that cleaves PSA from NCAM, interferes with normal spatial learning (Venero et al., 2006). These effects are consistent with the involvement of the higher levels of PSA-NCAM in the hippocampus of CP-treated males in the improved performance of the CP group.

Surprisingly, we have not found enhanced LTP in the CA1 field of the hippocampus of CP-treated animals. We hypothesized that improved spatial reference memory would be accompanied by a stronger and more enduring LTP, however this was not the case here. To our knowledge, in the only study to ascertain the long term effects of chronic THC exposure on adult LTP (Mereu et al., 2003), prenatal exposure to THC was shown to produce memory deficits linked to dysfunction of hippocampal LTP and glutamate release. It would seem that the time at which cannabinoid exposure takes place is a key factor for its long-term physiological and behavioral effects. Additionally, while diminished glutamate release was found in the CA1 in basal conditions (Mereu et al., 2003), we failed to note such changes

(unpublished observations), which parallels the lack of an effect of our treatment on central glutamatergic synaptic plasticity (LTP).

With regards the sex-effect found on spatial reference memory and working memory, the fact that males outperform females is consistent with previous data in rats, although the influence of strain and training protocols should not be disregarded (Jonasson, 2005). Our data together show an improvement in spatial reference learning in CP animals and specifically in females administered CP when reference memory is analyzed. We propose that the aforementioned effects could be due to changes in anxiety, attentional mechanisms, changes in the levels of some plasticity mediators such as PSA-NCAM or some combination of the three. Further experiments should address other windows of vulnerability during adolescence to further ascertain the role of CP-induced attention changes in spatial learning.

ACKNOWLEDGEMENTS

Alejandro Higuera-Matas is a recipient of a pre-doctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (“Programa de Formación del Profesorado Universitario” -FPU). The authors wish to thank Alberto Marcos, Rosa Ferrado and Luis Troca for technical assistance. This work has been supported by grants FIS G03/05 (“Red de Trastornos Adictivos”), BSO2001-109, FIS 01-05-01, “Plan Nacional sobre Drogas (2001-2003 and 2004-2006)” GR-SAL/0260/2004, “Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid” and “Plan de Promoción de la Investigación en la UNED”.

REFERENCES

- Biscaia, M., Marin, S., Fernandez, B., Marco, E. M., Rubio, M., Guaza, C., Ambrosio, E., & Viveros, M. P. (2003). Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*, *170*, 301-308.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.
- Carlson, G., Wang, Y., & Alger, B. E. (2002). Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, *5*, 723-724.
- Cassel, J. C., Lazaris, A., Birlhelmer, A., & Jackisch, R. (2007). Spatial reference- (not working- or procedural-) memory performance of aged rats in the water maze predicts the magnitude of sulphiride-induced facilitation of acetylcholine release by striatal slices. *Neurobiology of Aging*, *28*, 1270-1285.
- Clements, K. M., & Wainwright, P. E. (2006). Spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats differ in performance on a win-shift task in the water radial arm maze. *Behavioral Brain Research*, *167*, 295-304.
- Cha, Y. M., White, A. M., Kuhn, C. M., Wilson, W. A., & Swartzwelder, H. S. (2006). Differential effects of delta9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *83*, 448-455.
- Chambers, R. A., Taylor, J. R., & Potenza, M. N. (2003). Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *American Journal of Psychiatry*, *160*, 1041-1052.
- Daniel, J. M. (2006). Effects of oestrogen on cognition: what have we learned from basic research? *Journal of Neuroendocrinology*, *18*, 787-795.
- Daniel, J. M., Hulst, J. L., & Berbling, J. L. (2006). Estradiol replacement enhances working memory in middle-aged rats when initiated immediately after ovariectomy but not after a long-term period of ovarian hormone deprivation. *Endocrinology*, *147*, 607-614.
- Daniel, J. M., Hulst, J. L., & Lee, C. D. (2005). Role of hippocampal M2 muscarinic receptors in the estrogen-induced enhancement of working memory. *Neuroscience*, *132*, 57-64.
- Daniel, J. M., Sulzer, J. K., & Hulst, J. L. (2006). Estrogen increases the sensitivity of ovariectomized rats to the disruptive effects produced by antagonism of D2 but not D1 dopamine receptors during performance of a response learning task. *Hormones and Behavior*, *49*, 38-44.
- Ehrenreich, H., Rinn, T., Kunert, H. J., Moeller, M. R., Poser, W., Schilling, L., Gigerenzer, G., & Hoehe, M. R. (1999). Specific attentional dysfunction in adults following early start of cannabis use. *Psychopharmacology (Berl)*, *142*, 295-301.
- Gruber, A. J., & Pope, H. G., Jr. (2002). Marijuana use among adolescents. *Pediatric Clinics of North America*, *49*, 389-413.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, *87*, 1932-1936.
- Herrero, A. I., Sandi, C., & Venero, C. (2006). Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*, *86*, 150-159.

- Higuera-Matas, A., Luisa Soto-Montenegro, M., Del Olmo, N., Miguens, M., Torres, I., Jose Vaquero, J., Sanchez, J., Garcia-Lecumberri, C., Desco, M., & Ambrosio, E. (2007). Augmented Acquisition of Cocaine Self-Administration and Altered Brain Glucose Metabolism in Adult Female but not Male Rats Exposed to a Cannabinoid Agonist during Adolescence. *Neuropsychopharmacology*.
- Hoffman, A. F., Oz, M., Yang, R., Lichtman, A. H., & Lupica, C. R. (2007). Opposing actions of chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinoid antagonists on hippocampal long-term potentiation. *Learning and Memory*, *14*, 63-74.
- Jonasson, Z. (2005). Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*, 811-825.
- Luthi, A., Laurent, J. P., Figurov, A., Muller, D., & Schachner, M. (1994). Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature*, *372*, 777-779.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, *84*, 87-136.
- Lynch, M. A., & Voss, K. L. (1991). Presynaptic changes in long-term potentiation: elevated synaptosomal calcium concentration and basal phosphoinositide turnover in dentate gyrus. *Journal of Neurochemistry*, *56*, 113-118.
- Mackowiak, M., Chocyk, A., Markowicz-Kula, K., & Wedzony, K. (2007). Acute activation of CB1 cannabinoid receptors transiently decreases PSA-NCAM expression in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Brain Research*, *1148*, 43-52.
- Malenka, R. C. (2003). The long-term potential of LTP. *Nature Review Neuroscience*, *4*, 923-926.
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, *44*, 5-21.
- Markram, K., Gerardy-Schahn, R., & Sandi, C. (2007). Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience*, *144*, 788-796.
- Mato, S., Chevalyere, V., Robbe, D., Pazos, A., Castillo, P. E., & Manzoni, O. J. (2004). A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, *7*, 585-586.
- Mereu, G., Fa, M., Ferraro, L., Cagianò, R., Antonelli, T., Tattoli, M., Ghiglieri, V., Tanganelli, S., Gessa, G. L., & Cuomo, V. (2003). Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, *100*, 4915-4920.
- Merino, J. J., Cordero, M. I., & Sandi, C. (2000). Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. *European Journal of Neuroscience*, *12*, 3283-3290.
- Misner, D. L., & Sullivan, J. M. (1999). Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. *Journal of Neuroscience*, *19*, 6795-6805.
- Muller, D., Djebbara-Hannas, Z., Jourdain, P., Vutskits, L., Durbec, P., Rougon, G., & Kiss, J. Z. (2000). Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, *97*, 4315-4320.

- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G., & Kiss, J. Z. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*, *17*, 413-422.
- Nowicky, A. V., Teyler, T. J., & Vardaris, R. M. (1987). The modulation of long-term potentiation by delta-9-tetrahydrocannabinol in the rat hippocampus, in vitro. *Brain Research Bulletin*, *19*, 663-672.
- O'Shea, M., McGregor, I. S., & Mallet, P. E. (2006). Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *Journal of Psychopharmacology*, *20*, 611-621.
- O'Shea, M., Singh, M. E., McGregor, I. S., & Mallet, P. E. (2004). Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *Journal of Psychopharmacology*, *18*, 502-508.
- Quinn, H. R., Matsumoto, I., Callaghan, P. D., Long, L. E., Arnold, J. C., Gunasekaran, N., Thompson, M. R., Dawson, B., Mallet, P. E., Kashem, M. A., Matsuda-Matsumoto, H., Iwazaki, T., & McGregor, I. S. (2007). Adolescent Rats Find Repeated Delta(9)-THC Less Aversive Than Adult Rats but Display Greater Residual Cognitive Deficits and Changes in Hippocampal Protein Expression Following Exposure. *Neuropsychopharmacology*.
- Robbe, D., Montgomery, S. M., Thome, A., Rueda-Orozco, P. E., McNaughton, B. L., & Buzsaki, G. (2006). Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nature Neuroscience*, *9*, 1526-1533.
- Rodriguez de Fonseca, F., Ramos, J. A., Bonnin, A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1993). Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport*, *4*, 135-138.
- Ronn, L. C., Bock, E., Linnemann, D., & Jahnsen, H. (1995). NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Research*, *677*, 145-151.
- Scorticati, C., Fernandez-Solari, J., De Laurentiis, A., Mohn, C., Prestifilippo, J. P., Lasaga, M., Seilicovich, A., Billi, S., Franchi, A., McCann, S. M., & Rettori, V. (2004). The inhibitory effect of anandamide on luteinizing hormone-releasing hormone secretion is reversed by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, *101*, 11891-11896.
- Scorticati, C., Mohn, C., De Laurentiis, A., Vissio, P., Fernandez Solari, J., Seilicovich, A., McCann, S. M., & Rettori, V. (2003). The effect of anandamide on prolactin secretion is modulated by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, *100*, 2134-2139.
- Schneider, M., & Koch, M. (2003). Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, *28*, 1760-1769.
- Schwartz, R. H., Gruenewald, P. J., Klitzner, M., & Fedio, P. (1989). Short-term memory impairment in cannabis-dependent adolescents. *American Journal of Diseases of Children*, *143*, 1214-1219.
- Senkov, O., Sun, M., Weinhold, B., Gerardy-Schahn, R., Schachner, M., & Dityatev, A. (2006). Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in induction of long-term potentiation and memory acquisition and consolidation in a fear-conditioning paradigm. *Journal of Neuroscience*, *26*, 10888-109898.
- Slanina, K. A., Roberto, M., & Schweitzer, P. (2005). Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology*, *49*, 660-668.

- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, 171-177.
- Terranova, J. P., Michaud, J. C., Le Fur, G., & Soubrie, P. (1995). Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716 A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 352, 576-579.
- Vannucchi, M. G., Scali, C., Kopf, S. R., Pepeu, G., & Casamenti, F. (1997). Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. *Neuroscience*, 79, 837-846.
- Venero, C., Herrero, A. I., Touyarot, K., Cambon, K., Lopez-Fernandez, M. A., Berezin, V., Bock, E., & Sandi, C. (2006). Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory. *European Journal of Neuroscience*, 23, 1585-1595.
- Viveros, M. P., Llorente, R., Moreno, E., & Marco, E. M. (2005). Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behavioral Pharmacology*, 16, 353-362.

Figure 1: **Elevated Plus Maze:** The figure shows the mean percentage of time spent by the rats in each arm of the EPM. A significant effect of TREATMENT was found in the percentage of time spent in the closed arms. CP-treated rats spent less time in the closed arms, showing less anxious behaviour.

Figure 2: **Water Maze Task:** (A) The figure shows the mean percentage of failed trials per day in the reference memory water maze task. There was a significant effect of our chronic adolescent cannabinoid treatment since CP-rats show fewer failed trials over the days. (B) Probe test: A significant SEX x TREATMENT interaction was found, as well as a tendency in CP-female rats towards a lower latency to reach the place where the platform was during training. (C) Latency to reach the visible platform in the 2 days of the task. A significant effect of TREATMENT and SEX was found. However, when we analyzed this effect in more depth we could see that the differences were specifically due to a significant difference between CP and VH females on the first day of training. * Significant difference with CP-females ($p < 0.05$). (D) Working Memory. The path distance in the working memory task is represented and we could only detect SEX effects in days 1, 3 and 4 with male rats performing better than females. #, ## Significant SEX effect ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively).

Figure 3: **Plasma Estradiol Levels:** No effects of the TREATMENT, or of the SEX x TREATMENT interaction were found. As expected, a significant SEX effect was observed with female rats showing higher ESTR levels than their VH controls. # Significant SEX effect ($p < 0.05$).

Figure 4: **Synaptic Plasticity:** (A) Levels of PSA-NCAM in the hippocampus revealed by ELISA. CP-males have significantly higher expression of this protein in their hippocampus. * Significant difference with VH ($p < 0.05$). (B) None of the factors studied affected CA1-LTP in males and female rats.

Figure 1

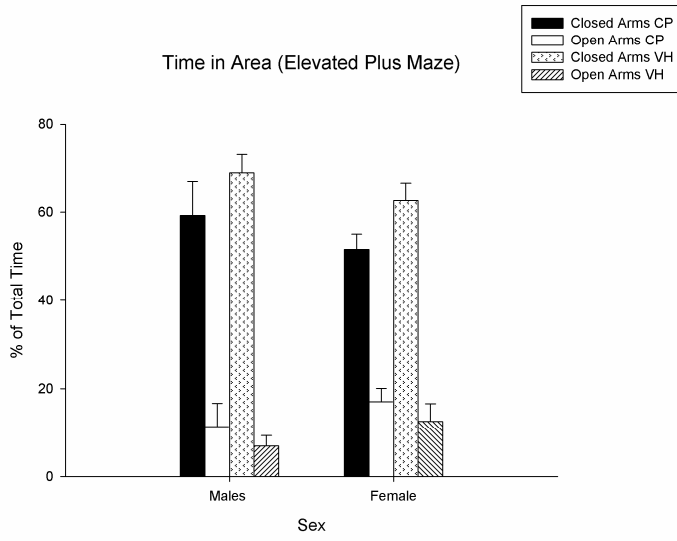


Figure 2

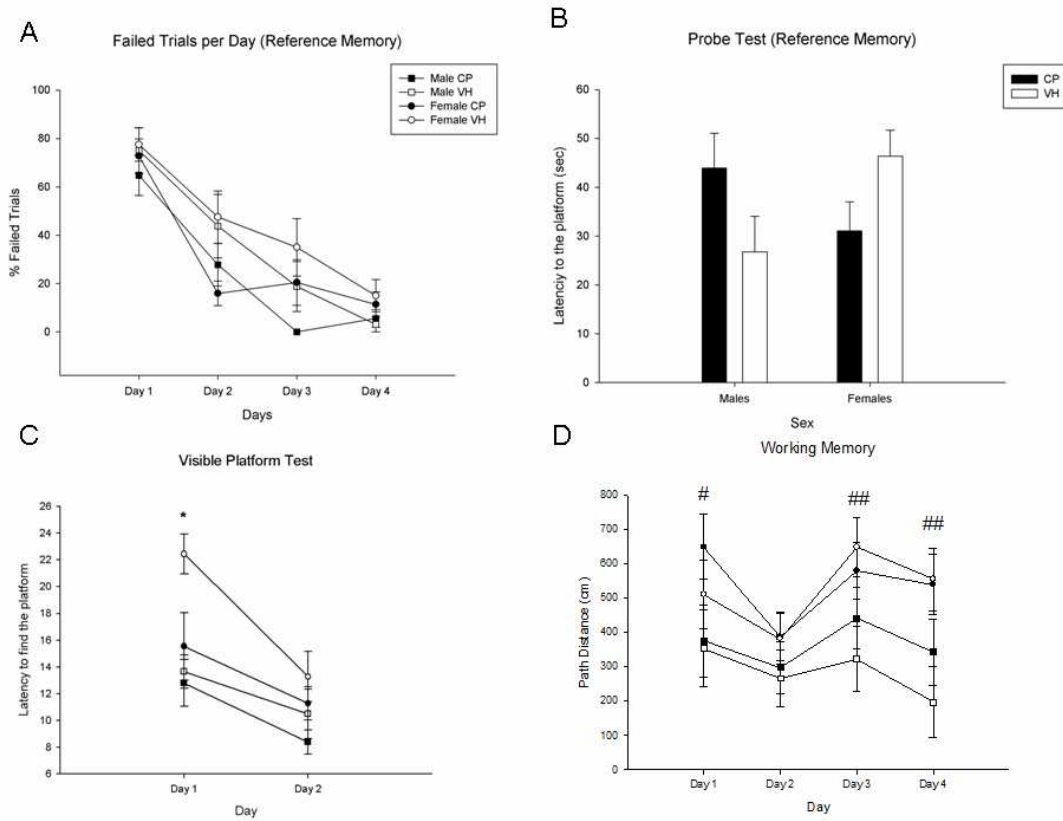


Figure 3

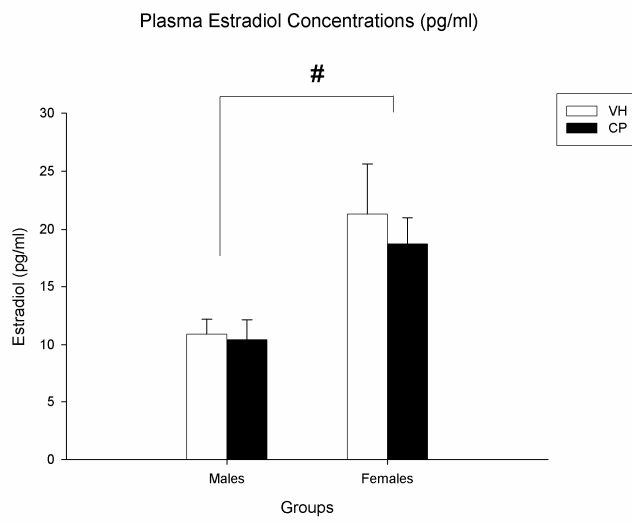


Figure 4

